

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS

GEORGE FERNANDO FINCO

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA REAÇÃO DE
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO AZEITE DE OLIVA**

DISSERTAÇÃO

TOLEDO
2018

GEORGE FERNANDO FINCO

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA REAÇÃO DE
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO AZEITE DE OLIVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos -PPGQB - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Toledo, como requisito para obtenção do título de “Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos” – Área de Concentração: Engenharia Biotecnológica.

Orientadora: Karina Graziella Fiametti Colombo
Coorientadora: Viviane da Silva Lobo

TOLEDO
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Carla Rech Ribeiro - CRB 9/1685
Biblioteca UTFPR Toledo

F493a Finco, George Fernando

Avaliação e determinação da produção de monoglicérides e diglicérides a partir da reação de glicerólise enzimática do azeite de oliva / George Fernando Finco; orientadora: Karina Graziella Fiametti Colombo; co-orientadora: Viviane da Silva Lobo.-- Toledo, PR : UTFPR, 2017.
117 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Toledo, 2018.

Bibliografia: f. 93-104

1. Cinética de enzimas. 2. Engenharia de alimentos.
3. Cinética química. I. Colombo, Karina Graziella Fiametti.
II. Lobo, Viviane da Silva. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 660.6

AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO AZEITE DE OLIVA

GEORGE FERNANDO FINCO

Esta dissertação foi apresentada às 09 (nove) horas do dia 09/04/2018 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS, com área de concentração em Engenharia Biotecnológica, linha de pesquisa em Processos Biotecnológicos, Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr.^a Roberta Letícia Kruger
(UNICENTRO)

Prof. Dr.^a Ana Maria Velez Escallon
(UTFPR)

Prof. Dr. Dr.^a Karina Graziella Fiametti
Colombo (UTFPR) - *Orientadora*

Prof. Dr. Dr.^a Viviane da Silva Lobo
(UTFPR) – *Coorientadora*

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
(UTFPR) – Coordenador do
PPGPQB

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR – *CAMPUS TOLEDO*

Dedico este trabalho:

Em especial aos meus pais Aguinaldo e Silvia, pelo exemplo de pessoas que são para mim, por me darem todas as condições para realizar essa pesquisa, por me ajudarem a formar o meu caráter e por sempre me ajudarem a decidir qual caminho tomar, com muito amor, discernimento, motivação, compreensão e paciência. Sem vocês, nada disso teria acontecido. À minha namorada Gleisi, pela alegria, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pela vida, por estarem me guiando, iluminando cada passo, me dando força para não desistir em cada obstáculo para conseguir mais essa conquista.

Aos meus pais Aguinaldo e Silvia, por todos os ensinamentos, todo amor, carinho, incentivo e paciência para chegar ao final de mais um passo dessa caminhada. Tenham a certeza que cada dia que passa aprendo mais com vocês e que cada palavra dita nas horas difíceis foi de grande valia para concluir esse trabalho e serão lembradas nas demais decisões que terei de tomar sozinho na vida.

Às minhas orientadoras Karina Graziella Fiametti Colombo e Viviane da Silva Lobo, pela confiança, ensinamentos, compreensão e dedicação que depositaram em mim. Por todas as palavras de motivação e aprendizado, que foram fundamentais para a conclusão dessa dissertação.

A todos os professores pela ajuda, discussões e principalmente pelos conhecimentos ensinados em aula e fora dela. Em especial ao professor Éder Lisandro de Moraes Flores que me recebeu no campus Medianeira, dispôs de seu tempo com a maior boa vontade e repassou seus conhecimentos na área e me deixou extremamente à vontade para fazer minha pesquisa com todos os equipamentos que eu precisasse.

Aos meus amigos do mestrado pela convivência e companheirismo, em especial ao Ruan por se disponibilizar em realmente me ensinar a fazer análises a quais eu só havia visto em livros.

Aos técnicos dos Laboratórios de Processos Químicos do campus de Toledo, em especial: Carol, que forneceu horas e horas de seu tempo, sempre de boa vontade, para que essa pesquisa saísse mesmo com um detector inapropriado.

Aos meus amigos, por sempre estarem presentes nos finais de semana, quando eu precisei de uma palavra amiga ou de uma cerveja gelada, estiveram lá, e com certeza fizeram meus dias mais felizes, em especial: Ederson, Fran, Fernando, Andriele, Thiago, Edson, Amanda e Valéria.

A minha namorada Gleisi, por literalmente me suportar durante esse período que precisei me dedicar bastante a essa pesquisa. Pela estabilidade emocional e por me passar toda tranquilidade e segurança de que no final tudo daria certo, só bastava eu me esforçar. Pela paciência nos dias em Toledo, em Medianeira e nos finais de semanas dedicados a ler, escrever e pensar.

Ao Programa de Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos.

Ao velho amigo Luiz por todos os pedais, que não foram muitos, mas agora serão mais constantes, pelas risadas e companheirismo; e meu amigo de infância Anderlei, por todos os conselhos e conversas nesses 18 anos de amizade. Serei eternamente grato pelo que aprendi com vocês, são dois irmãos que a vida me deu.

A UTFPR – Campus Toledo e campus Medianeira pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos de mestrado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a pesquisa.

A todos, que de alguma forma, perto ou longe, contribuíram e alguma forma para a realização deste trabalho.

“Siga os seus sonhos. O único propósito deles é guiarem você onde você pode chegar. Você não deve nada a ninguém, portanto não perca tempo sendo algo que você não gosta para agradar gente que não gosta de você. Seja você a cada passo e leve quem você puder junto contigo porque o sucesso não é o quão longe você é capaz de chegar sozinho, são quantas pessoas você pode levar consigo nessa caminhada. Então, eu sigo andando.”

Paulo Muzy

FINCO, George Fernando. Avaliação e determinação da produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática do azeite de oliva. 2018. 117 f. Dissertação (Engenharia Biotecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

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 100 como biocatalisador, para obter-se agentes emulsificantes de maior valor agregado. Realizou-se os testes 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 2^3 e outro 2^2 . Adotou-se tal metodologia para otimizar a produção e encontrou-se o ponto com maior produção de MAG e DAG. Os resultados obtidos a partir desses planejamentos mostraram que a condição ótima é aquela que foi tratada como ponto central, razão molar glicerol:óleo 2:1, 35°C, 600 rpm, 7,5% (m/m) de enzima e num tempo de reação de 120 minutos, e apresentaram uma eficiência de conversão de aproximadamente 98% em MAG e DAG, enquanto que as amostras menos eficientes tiveram conversão de aproximadamente 58%, nos pontos extrapolados do planejamento fatorial. A partir destas condições monitorou-se as cinéticas de reação das amostras mais e menos eficientes e determinou-se a ordem de reação, e trata-se de uma reação de primeira ordem e pseudo primeira ordem, respectivamente.

Palavras-chave: Glicerólise Enzimática. Azeite de Oliva. Triacilgliceróis.

FINCO, George Fernando. Evaluation and determination of the production of monoglycerides and diglycerides from the enzymatic glycerolysis reaction of olive oil. 2018. 117 f. Dissertação (Engenharia Biotecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

The aim of the present work was 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 100 enzyme as a biocatalyst, to obtain higher added value emulsifying agents. The tests were performed in twelve microemulsion points that had stability to glycerolysis, the point that presented the highest conversion efficiency of the triacylglycerols (TAG) was submitted to a factorial design 2^3 and another 2^2 . This methodology was adopted to optimize the production and to find the point with greater production of MAG and DAG. The results obtained from these schedules showed that the optimum condition is the one that was treated as the center point, glycerol molar ratio: oil 2:1, 35°C, 600 rpm, 7.5% (m/m) of enzyme and at a reaction of 120 minutes and showed a conversion efficiency of approximately 98% in MAG and DAG, whereas the less efficient samples had conversion of approximately 58% at the extrapolated points of the factorial design. From these conditions the reaction kinetics of the more and less efficient samples were monitored and the order of reaction was determined, and it is a first order reaction and pseudo first order, respectively.

Keywords: Enzymatic Glycerolysis. Olive Oil. Triacylglycerol.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

MAG	Monoacilgliceróis;
DAG	Diacilgliceróis;
TAG	Triacilgliceróis;
AG	Acilgliceróis;
MO	Microemulsões;
R ²	Coeficiente 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;
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> ;
GCMS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> ;
RI	<i>Refractive Index</i> .

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fórmula Estrutural dos ácidos linolênico, linoleico e oleico.....	20
Figura 02: Reação de glicerólise de um TAG para formação de MAG e DAG	21
Figura 03: Tipos de MO.....	28
Figura 04: Fórmula estrutural do Polisorbato 20.....	30
Figura 05: Estrutura do Tween 80	32
Figura 06: Equilíbrio das fases entre três compostos.....	42
Figura 07: Cromatograma com padrões de MAG, DAG e TAG.....	58
Figura 08: Cromatograma área de pico x tempo da Amostra 14 (Razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2 h a 600 RPM).....	62
Figura 09: Diagrama de Pareto dos efeitos da conversão de TAG em MAG + DAG	71
Figura 10: Cromatograma do ponto central, sistema a 35°C e 7,5% de enzima – Área de pico x Tempo.....	74
Figura 11: Superfície resposta do DCCR 2 ²	75
Figura 12: Gráfico de superfície de resposta do DCCR 2 ² 3D.....	76
Figura 13: Cinética de reação da Amostra 03 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)	77
Figura 14: Cinética de reação da Amostra 06 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)	77
Figura 15: Cinética de reação da amostra 07 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)	78
Figura 16: Cinética de reação da amostra 11 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)	78
Figura 17: Cinética de reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)	79
Figura 18: Gráficos das ordens de reação da amostra 03 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM).....	80
Figura 19: Gráficos das ordens de reação da amostra 06 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM).....	81
Figura 20: Gráficos das ordens de reação da amostra 07 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM).....	81

Figura 21: Gráficos das ordens de reação da amostra 11 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM).....	82
Figura 22: Gráficos das ordens de reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição química do azeite de oliva.....	25
Tabela 02: Relação de setores, aplicações e produtos obtidos por lipases	35
Tabela 03: Planejamento Fatorial 3/1/8 para a glicerólise enzimática	47
Tabela 04: DCCR 2 ² do melhor ponto do planejamento 2 ³	49
Tabela 05: MO bem-sucedidas e suas proporções	52
Tabela 06: Valores de pH durante a glicerólise enzimática	55
Tabela 07: Cálculo de concentração de TAG das MO`s formadas.....	56
Tabela 08: Área dos picos (mRIU) dos grupos AG's das MO's tratadas	59
Tabela 09: Eficiência de conversão para cada microemulsão formada	61
Tabela 10: Padrões utilizados, equação da reta e tempos de retenção	64
Tabela 11: Área de pico de cada padrão para cada amostra	64
Tabela 12: Concentração de cada padrão pós glicerólise enzimática	65
Tabela 13: Planejamento Fatorial 3/1/8 da glicerólise enzimática da amostra 14	67
Tabela 14: ANOVA 3/1/8 do planejamento fatorial 2 ³ em termos de conversão.....	69
Tabela 15: Coeficiente de regressão linear do planejamento 2 ³ da amostra 14.....	69
Tabela 16: Eficiência da reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 600 RPM, 2 horas de reação) no planejamento DCCR 2 ²	72
Tabela 17: ANOVA do delineamento DCCR 2 ²	73
Tabela 18: Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2 ²	73
Tabela 19: Tabela de atividade para as microemulsões em teste	84
Tabela 20: Atividade enzimática do planejamento fatorial 2 ³	86
Tabela 21: Atividade enzimática DCCR 2 ²	87

LISTA DE IMAGENS

Imagem 01: Reator encamisado acoplado a banho termostático.....	43
Imagem 02: Sistema com filtro de seringa.....	44
Imagem 03: HPLC Ultimate 3000 utilizado nas corridas cromatográficas	49
Imagem 04: Diversas tentativas de microemulsões malsucedidas.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
1.2 JUSTIFICATIVA	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Óleos e gorduras.....	20
2.1.1 Modificação de óleos e gorduras.....	21
2.2 Azeite de oliva	22
2.3 Monoacilgliceróis e diacilgliceróis e suas aplicações	24
2.4 Microemulsões	27
2.5 Surfactante e Co-surfactante.....	29
2.6 Lipases como biocatalisadores	33
2.7 Microemulsões combinadas a lipases	36
2.8 Glicerólise enzimática de óleos vegetais.....	37
2.9 Determinação da ordem de reação	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Descrição dos materiais	41
3.2 Preparo das microemulsões.....	41
3.3 Testes de glicerólise enzimática.....	42
3.4 Quantificação de MAG, DAG e TAG	44
3.5 Avaliação do pH da reação	45
3.6 Cinética da reação de glicerólise enzimática.....	45
3.7 Determinação da ordem de reação	46
3.8 Planejamento Fatorial 2 ³ do meio reacional	46
3.8.1 Análise de Variância.....	47
3.9 Elaboração da Curva de Calibração.....	48
3.10 Delineamento de Composto Central Rotacional DCCR 2 ²	49
3.11 Atividade Enzimática	50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 MO bem-sucedidas de acordo com o diagrama ternário.....	52
4.2 Monitoramento do pH.....	54
4.3 Cálculo de concentração das MO's formadas	55
4.4 Curva de calibração	57
4.5 Resultados da glicerólise enzimática das MO's	59
4.5.1 Eficiência de conversão pela área de pico.....	60
4.5.2 Eficiência de conversão pela curva de calibração.....	63
4.6 Planejamento fatorial da melhor conversão	66
4.7 ANOVA 2 ³	69
4.7.1 Otimização DCCR 2 ² e superfície de resposta.....	72
4.8 Cinética de reação	76
4.8.1 Determinação da Ordem de Reação.....	80
4.9 Atividade enzimática das microemulsões bem-sucedidas.....	83
4.9.1 Atividade enzimática das amostras do planejamento 2 ³ e DCCR 2 ²	85
5 CONCLUSÕES	88
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	89
6 REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO A.....	103
APÊNDICE A.....	106
APÊNDICE B.....	111

1 INTRODUÇÃO

Ao realizar uma pesquisa, deve-se buscar as condições ótimas de reação a fim de obter melhores resultados, já que as indústrias procuram eficiência e menores custos. Além disso, é interessante reduzir os resíduos poluentes, utilizar tecnologias advindas de fontes renováveis. Por exemplo, na conversão de óleos e gorduras, onde converte-se moléculas mais complexas, os TAG em moléculas mais simples, os MAG e DAG, busca-se o máximo de eficiência de conversão e, se possível, com a utilização de algum subproduto como fonte de reagente para que a reação ocorra.

Um bom exemplo da aplicação de um subproduto é o uso da glicerina, subproduto da reação do biodiesel, em áreas alimentícias e higiene pessoal. Uma vertente a ser otimizada e estudada é sua aplicação com os TAG, onde obtém-se emulsificantes como resultado. Emulsificantes são vastamente utilizados em indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias, automotivas e cosmética. Tais aplicações acarretam um valor agregado maior ao produto final.

Contudo, a reação de glicerólise em condições normais é um processo que exige elevadas temperaturas e altos tempos de reação, pois refere-se a reações lentas, que podem levar dias para que a reação aconteça (SILVA, 2015). A fim de acelerar essa técnica, propõe-se a utilização de lipases, que são enzimas que podem ser encontradas de forma natural em animais, vegetais e microrganismos. Por essa técnica, a reação de catálise de TAG por glicerólise enzimática é bem mais rápida, quando comparada com a reação convencional.

Portanto, nesse trabalho utilizou-se o azeite de oliva, a enzima lipase comercial e o glicerol em um sistema de microemulsões (MO), para obter maior conversão na eficiência de catálise. Os produtos foram submetidos a análise de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), através da área de pico dos cromatogramas e curva de calibração com padrões externos, e então determinar as quantidades de MAG, DAG e TAG nas amostras tratadas pós glicerólise enzimática.

A cinética de reação também foi determinada para saber como a reação se comportou em todo o processo, e assim, predizer se houve sobra de reagente, conversão total ou parcial, em produtos. Todas essas condições foram testadas para saber o que está sendo sintetizado a partir dessa reação e, por fim, avaliar se há

vantagens biotecnológicas em termos de custo/benefício e abrangência de aplicação final.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar MAG e DAG a partir da glicerólise enzimática do azeite de oliva.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar MO de diferentes proporções (surfactante/cosurfactante, água, óleo);
- Promover a glicerólise enzimática das MO preparadas;
- Quantificar os MAG e DAG formados por HPLC;
- Determinar a eficiência na conversão de TAG em MAG e DAG;
- Realizar planejamento fatorial na solução que apresentar maior porcentagem de MAG e DAG, a fim de especificar qual/quais variáveis de processo são significativas;
- Determinar a cinética de reação de glicerólise enzimática;
- Determinar a ordem de reação.

1.2 JUSTIFICATIVA

Baseado em vários estudos, verifica-se um grande potencial na utilização de lipases em processos de glicerólise enzimática, já que trata-se de uma reação que utiliza um biocatalisador, e trabalha em condições amenas de temperatura e pH. Enquanto a reação de glicerólise convencional exige elevadas temperaturas e longos períodos para que complete a catálise, faz-se necessário um estudo mais aprofundado na utilização de biocatalisadores e sua faixa de aplicação para uma possível utilização em escalas maiores. Para que isso aconteça, é importante monitorar todos os passos da reação, desde concentração inicial e final de TAG, MAG e DAG. Sabe-se que o azeite de oliva tem em sua composição 98% de TAG que

deverão ser convertidos em MAG e DAG, após a reação completa (MARTÍNEZ et al., 2016).

Desta forma, fundamenta-se a presente dissertação de mestrado, com uma análise profunda sobre a atividade enzimática e ordem de reação da síntese de MAG e DAG a partir de um sistema com azeite de oliva, pós reação de glicerólise enzimática, na presença de lipase comercial como biocatalisador, a fim de determinar quais as melhores condições de processo na conversão de TAG. Com isso, busca-se aumentar o valor agregado do produto final, que pode ser estudado para aplicações como agentes emulsificantes em indústrias farmacêuticas, alimentícias e automotivas, por exemplo.

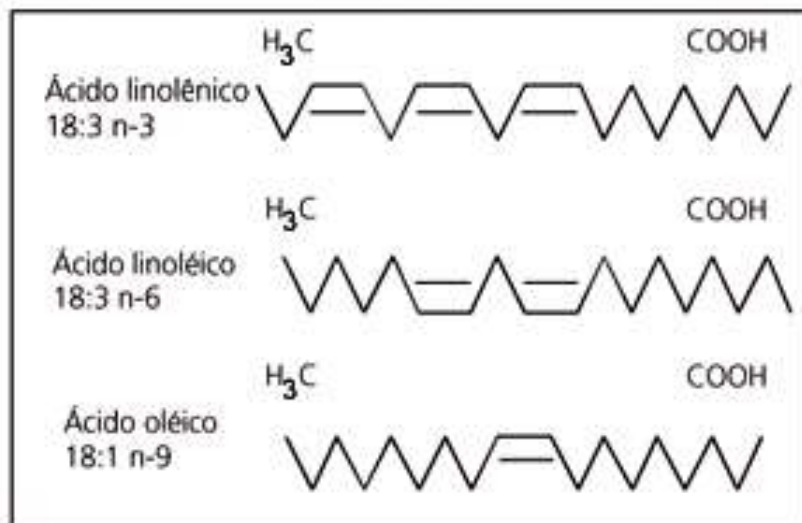
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esse capítulo tem o objetivo de agrupar informações sobre a reação de glicerólise enzimática na obtenção de MAG e DAG por meio de MO e em um sistema com glicerol sob diversas concentrações. Tal estudo tem interesse da indústria oleoquímica, que busca desenvolver técnicas capazes de alterar as propriedades físico-químicas, as funções e características organolépticas de matérias primas, e possibilitar uma maior aplicação de produtos. Por sua vez, a utilização do glicerol também é interessante, já que é um subproduto de biocombustíveis, na produção de biodiesel (MULLER, 2013).

2.1 ÓLEOS E GORDURAS

Chamados de lipídeos, glicerídeos ou gliceróis, são nutrientes essenciais na alimentação humana e animal, pois além de ser fonte de energia são responsáveis pelo transporte de vitaminas lipossolúveis (A, D, K e E), contribuem para a palatabilidade e são fontes de ácidos graxos essenciais, linolênico, linoleico e oleico, os quais podem ter suas estruturas observadas na Figura 01 (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

Figura 01: Fórmula Estrutural dos ácidos linolênico, linoleico e oleico

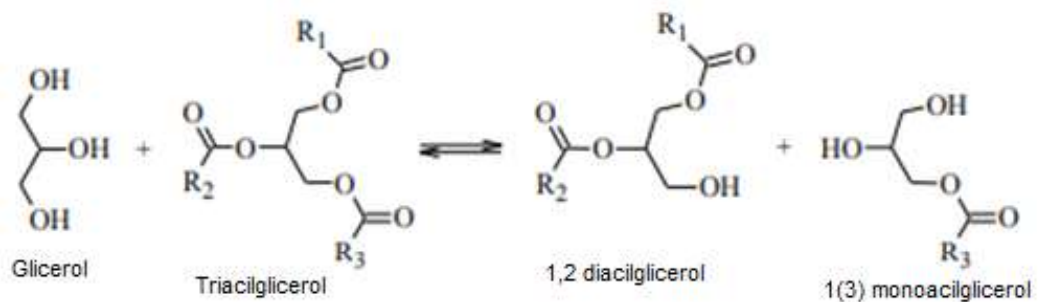


Fonte: GARÓFOLO; PETRILLI (2006).

O termo lipídeo é definido como componente do alimento que é insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, como éter etílico, éter de petróleo, acetona, clorofórmio, benzeno e álcoois. Tais solventes apolares são capazes de extrair a fração lipídica neutra que incluem os MAG, DAG e TAG (CAMPBELL-PLATT, 2015).

A estrutura dos lipídeos pode variar de duas formas: simples ácidos graxos, os mais diversos acilgliceróis; lipídeos complexos, ceras (formas sólidas), esteróis, proteínas com afinidade por gordura (lipoproteínas), vitaminas lipossolúveis, fosfolipídios (presente em membranas intracelulares). Os principais componentes de qualquer gordura animal ou vegetal estão na forma de triacilgliceróis, que trata-se de uma molécula constituída de uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de algum ácido graxo, como pode ser observado na Figura 02 (FONSECA, 2015).

Figura 02: Reação de glicerólise de um TAG para formação de MAG e DAG



Fonte: FONSECA (2015).

2.1.1 Modificação de óleos e gorduras

Uma vertente interessante no cunho laboratorial é a modificação dos óleos e gorduras, pois trata-se de materiais de fácil obtenção, de formas naturais e tem uma aplicação bastante ampla como matérias primas em indústrias alimentícias, química e farmacêuticas (KARLESKIND, 1996). Nesse contexto, busca-se aumentar os estudos da modificação e aplicação de lipídeos na indústria, como por exemplo na redistribuição na estrutura desses ácidos graxos, ou seja, modificar as características físico químicas dos compostos, para aplica-los em setores diferentes (GARCIA-MESA et al., 2008).

A alteração físico-química de óleos e gorduras também é interessante para a formação de compostos mais simples e com diferentes aplicações, uma vez que

compostos mais complexos podem ser quebrados a estruturas mais simples e com aplicações diferentes, como por exemplo, na modificação da composição de oleaginosas no intuito da produção de AG mais simples para utilizar nas indústrias. Além do mais, busca-se a aplicação de uma fonte limpa, de óleos e gorduras, assim, tem-se uma fonte renovável que pode ser aplicada em cunho industrial (HARWOOD et.al, 2017).

Os ácidos graxos representam mais de 95% da massa dos TAG e a qualidade do produto formado dependem da fonte do óleo e da região onde a planta foi produzida (GARCIA, 2006).

Portanto, a indústria tem desenvolvido diversos processos para controlar a composição dos produtos e subprodutos formados a partir de TAG. Dentre eles a reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do TAG (interesterificação), a modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação) e a reversão da ligação éster (hidrólise), os quais buscam-se aplicações em escalas maiores (FOCKING, 2017). Esses processos podem ser feitos de forma fracionada ou contínua, com ou sem a utilização de catalisadores, químico, físico ou biológicos, e podem exigir, ou não, uma purificação no final do processo, em caso de mistura com vários produtos (HAMMOND; KAREL; KLIBANOV, 1985).

2.2 AZEITE DE OLIVA

O *Olea europae sativa*, conhecido popularmente e comercialmente como azeite de oliva, trata-se de um óleo vegetal comestível, é obtido por extração física ou por solventes. Amplamente utilizado no âmbito alimentício por ter um dos sabores mais apreciados dos óleos vegetais não refinados (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1987)

Em sua composição, traz aproximadamente 90% de ácidos graxos insaturados, dentre eles o principal componente monoinsaturado o ácido oleico. Desse percentual, somente 10% refere-se a ácidos graxos poli-insaturados. Vale ressaltar que tanto a semente como a polpa da oliva têm óleo e com a mesma composição (MORETTO; FETT, 1998).

Durante a maturação da semente a composição de ácidos graxos saturados diminui e aumenta-se a produção dos insaturados, portanto, a fase de maturação da

oliva com menor quantidade de ácidos graxos saturados é com ela verde. Devido a isso, usa-se a oliva verde no processo de extração do azeite (ALVEZ et al., 2018).

O azeite de oliva extra virgem é obtido por prensagem a frio da oliva, em um processo relativamente simples que utiliza somente a força física para a extração. Tal processo faz com que o azeite conserve os componentes originais da oliva, por exemplo os polifenóis que caracterizam o odor do azeite. Demais azeites de oliva (que não são virgens nem extra virgens) são extraídos por utilização de solventes, os chamados azeites refinados, o que acarreta uma perda de boa parte desses compostos fenólicos (RAMALHO; SUAREZ, 2012).

O azeite de oliva pode ser caracterizado das seguintes formas: extra virgem, de melhor qualidade e com grau de acidez inferior a 0,8%, o mais saudável e completo para a saúde humana; virgem, tem uso especialmente culinário e teor de acidez entre 0,81% e 2%; virgem lampante, é impróprio para consumo e é utilizado juntamente com outros óleos para posterior consumo, teor de acidez em aproximadamente 3,3%; refinado, aquele que pode sofrer alteração química e perde palatabilidade e características do azeite de melhor qualidade, com teor de acidez de aproximadamente 0,5%, sua aplicação é industrial, misturando-o a demais azeites para chegar a um teor de acidez final inferior a 1,5%; azeite composto, é a mistura do azeite de oliva lampante (15%) com o óleo de soja (85%), amplamente vendido e com menor qualidade dentre os outros (GONÇALVES; MARÇO; VALDERRAMA, 2015).

A qualidade do azeite de oliva a ser obtido após extração faz relação a concentração e com a composição dos compostos fenólicos presentes, que dependem especialmente de dois fatores importantes: a forma de cultivo e as condições geográficas em que a oliva está submetida. Esses fatores são determinantes para o grau de amadurecimento da planta, o que acarreta nas mudanças químicas na composição que trazem as características do produto final. Contudo, demais fatores também devem ser levados em conta no cultivo, dentre eles, o regime de irrigação, tecnologia de extração do azeite e até mesmo o modo de armazenamento do óleo (GOUVINHAS et al., 2015).

Os óleos e gorduras comestíveis são compostos por duas frações, a parte saponificável (com glicerol) e a parte insaponificável (sem glicerol). A fração saponificável do azeite de oliva representa aproximadamente 99% de sua composição, com cerca de 95-98% de TAG, os ésteres de ácidos graxos e glicerol. A

parte sem glicerol, embora em pouca quantidade, tem vários compostos fenólicos, os quais garantem as características especiais do azeite e com várias propriedades antioxidantes (KNOTHE et al., 2006; DIAS et al., 2017).

A parte que contém glicerol do azeite de oliva é composta na sua parte saponificável por diversos ácidos graxos (Tabela 01), os principais são oleico, linoleico e palmítico. Esses ácidos são caracterizados como AG, sendo eles MAG, DAG e, na sua maioria, TAG, sendo que os últimos são os que sofrem modificação química para obtenção dos primeiros. Enquanto que a parte sem glicerol é composta por hidrocarbonetos, ceras, esteróis, álcoois, diálcoois triterpênicos, ésteres etílicos e metílicos, ácidos graxos livres e alguns contaminantes, como metais e fenóis que apesar de apresentados em baixas concentrações são importantes para manter as características do produto (RUÍZ-GUTIÉRREZ; PÉREZ-CAMINO; 2002; NDIAYE, 2004).

Tabela 01: Composição química do azeite de oliva extra virgem

Ácidos Graxos Livres	Quantidade (%)
Ácido palmítico (C16:0)	8,78 ± 0,04
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,5 ± 0,01
Ácido esteárico (C18:0)	2,86 ± 0,05
Ácido oleico (C18:1)	75,7 ± 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 MAG são cadeias com uma molécula de glicerol ligada a uma molécula de ácido graxo. São os compostos que apresentam maior polaridade entre os ácidos graxos. Além disso, apresentam características semelhantes aos TAG, em termos nutricionais. São amplamente empregados na indústria alimentícia, quando com elevado grau de pureza, por apresentar característica de emulsificante, especialmente quando comparados com outros AG. Portanto, são utilizados em produtos lácteos,

confeitaria, panificação, além de estabilizantes e condicionantes, e normalmente 0,5%, em massa, tende a ser suficiente para obter uma emulsão estável (FELTES, 2011).

São classificados como emulsificantes não-iônicos, caracterizados como monoésteres anfifílicos, composto com uma parte hidrofóbica (normalmente um ácido graxo) e outra hidrofílica (radicais livres do glicerol), portanto, são compostos mais polares que os lipídeos simples (FRANZOL; REZENDE, 2015). Essa caracterização de afinidade pela água é dada por forças intermoleculares, no caso das hidrofóbicas a interação de *Van der Waals*, e nas hidrofílicas pela presença de ligações de hidrogênio do radical hidroxila da parte polar com as moléculas de água (ATKINS; JONES, 2007).

Por apresentarem tais características os MAG costumam ser aplicados como agentes emulsificantes e estabilizantes em sorvetes. Além de, como dito, na panificação, pois são capazes de reforçar a estrutura do glúten e, por consequência, prolongar o frescor do produto. Usados como clarificadores de bebidas para facilitar a dispersão. Na indústria farmacêutica, em medicamentos, para facilitar a liberação controlada do princípio ativo do fármaco. Como pode-se ver a aplicabilidade é grande, e isso é interessante pois os MAG que contém ácido oleico, por exemplo, apresentam potencial antioxidante e antidiabético (FELTES, 2011).

Outra vertente muito utilizada nos dias atuais está sendo a síntese desses emulsificantes com a utilização de enzimas imobilizadas. A vantagem na imobilização de enzimas é a reutilização para posteriores reações, quando necessário, faz-se uma purificação antes dessa reutilização. Tal aplicação é interessante nas indústrias, pois sabe-se que visam a viabilidade econômica e conseguir uma maneira de economizar e manter os resultados é crucial para tal âmbito (BARBOSA et al., 2015).

Correia, Fonseca e Ferreira-Dias (2011) utilizaram óleo de bagaço de azeitona refinado como fonte TAG e a lipase *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano. Promoveu-se a glicerólise enzimática sem a utilização de surfactantes, a uma temperatura de 30°C sob um período de 24 horas. E obtiveram uma conversão de 32% de MAG e 18% de DAG, e os autores trouxeram-nas como satisfatórias e o polímero se comportou bem como suporte para a enzima imobilizada.

DAG são ésteres de glicerol também presentes em gorduras (cerca de 2 a 10%), são compostos por dois ácidos graxos unidos covalentemente por ligação de

éster a uma molécula de glicerol. Uma característica interessante da molécula de DAG é que pode apresentar isomeria de posição em seus ácidos graxos e podem gerar os isômeros 1,2-DAG e 1,3-DAG (SEONG-KOON et al., 2007).

São utilizados, assim como os MAG, como emulsificantes na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Tem propriedades estabilizantes, emolientes e ligantes. Por terem essas características, os DAG e os MAG são os produtos mais valiosos que se obtém numa glicerólise e glicerólise enzimática. Além disso, são aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para utilização como emulsificantes tanto em alimentos quanto em produtos farmacêuticos (JUNIOR, 2017).

Os DAG, em especial o 1,3 DAG atua no combate do colesterol, prevenção de obesidade e na redução do acúmulo de gordura corporal. Então, são benéficos para redução de doenças relacionadas a tais fatores. Isso se dá pois metabolizam-se de forma diferente que os TAG (MATSUO; TOKIMITSU, 2001). Contudo, os estudos para a produção de DAG são voltados para o enriquecimento do óleo de cozinha, molhos, chocolates além de produtos que atuem nos fatores acima citados (CABRAL, 2014).

Como dito, a síntese de MAG e DAG é conduzida de várias formas, porém, na indústria ocorre a glicerólise do TAG, normalmente em temperaturas elevadas (acima de 200°C) e na presença de catalisadores químicos. Nessas condições, normalmente, obtêm-se uma mistura composta por 50% de MAG, 40% de DAG e 10% de TAG. Normalmente, não emprega-se o uso das enzimas nas indústrias por dois motivos, o primeiro deles é o custo elevado, uma vez que enzimas quando não sintetizadas internamente agregam muito valor ao produto final e como a indústria visa lucros, a aplicação de enzimas não se torna economicamente viável. O segundo motivo é por tratar-se de uma proteína específica e extremamente sensível, quando em temperaturas baixas acaba inativada e quando mediadas em temperaturas elevadas, acaba desnaturada e conseqüentemente inativada, essa última de forma irreversível o que pode acarretar prejuízo (SILVA, 2017a).

Na reação de glicerólise enzimática, para formar 3 mols de MAG utiliza-se 2 mols de glicerol e um mol de TAG. Para que isso aconteça, deve-se utilizar enzimas como catalisadores em temperaturas ambientes, contudo, necessita-se de um estudo mais aprofundado nessa área, pois existem poucos estudos de aplicações em escalas maiores dessa técnica (FREGOLENTE, 2006). Na produção de DAG, normalmente

utiliza-se as lipases 1,3 específicas para a glicerólise dos TAG's. Portanto, os MAG e DAG são os produtos mais interessantes para obter-se em reações de glicerólise (MATSUO; TOKIMITSU, 2001).

Paralelamente a isso, outros estudos estão surgindo com a aplicação dessas lipases, com condições que também podem ser utilizadas na glicerólise enzimática, como por exemplo pH de 4 a 9 e uma temperatura de reação de até 70°C. Além disso, as enzimas diminuem o valor energético da reação, e, em alguns casos, podem ser utilizadas até mesmo em temperatura ambiente, enquanto que em uma glicerólise convencional deve-se manter a temperatura acima de 200°C, por consequência, exige elevados gastos. A seletividade da enzima permite a formação de produtos mais puros e com menor geração de resíduos, portanto, tem-se um produto de qualidade (SANTOS et al., 2013).

2.4 MICROEMULSÕES

Trata-se de um sistema de água dispersa em óleo (A/O), ou óleo disperso em água (O/A) e para que haja a estabilidade entre esses dois compostos com diferença de polaridade, utiliza-se o surfactante. O surfactante adsorve de forma espontânea na mistura e diminui a tensão superficial. Os tamanhos das MO variam de 50 a 500nm, com uma grande estabilidade, sem turbidez e aparentemente baixa viscosidade. Essa estabilidade é dada por testes de estresse térmico e físico, submetidos a variações grandes de temperatura para que não haja separação de fases e se mantenham límpidas, além de agitação em Vortex no mesmo objetivo, testes de durabilidade em refrigerador também são interessantes e variam de acordo com a metodologia aplicada, o importante é a MO não perder as características durante os testes (KHAN; SINGH; SEN, 2016; SOMA; PAPADOPOULOS, 1996).

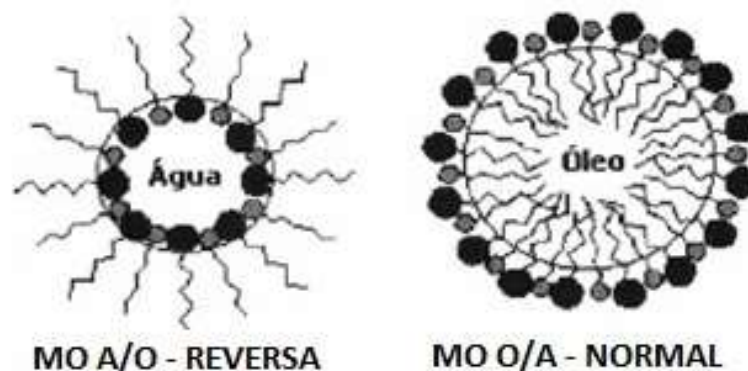
Hoar e Schulman definiram em 1943 o termo MO como uma dispersão transparente, opticamente isotrópica, fluida e termodinamicamente estável entre dois líquidos imiscíveis, e podem, ou não, conter um surfactante e um co-surfactante, quando necessário. São transparentes, pois diminui-se o tamanho dos microdomínios entre água e óleo.

Ao analisar a estrutura das MO, caracteriza-se como agregados de surfactantes (micelas) de A/O (micelas reversas), O/A (micelas normais) ou as chamadas

bicontínuas, onde existem ambas emulsões em um mesmo sistema. O nome das MO é dado pela quantidade dos reagentes emulsionados, ou seja, quando tem-se menor quantidade de água, normalmente tem-se uma micela reversa, e quando tem-se maior quantidade de água, tem-se um sistema normal (BORNSCHEUER et al., 1994).

O fato acima mencionado pode ser observado na Figura 03, as micelas normais estão organizadas em monocamadas com seus grupos polares (cabeças) direcionadas para a solução aquosa, formando uma superfície polar e seus grupos apolares (caudas) em direção ao óleo, inverso a água. Ressalta-se que as micelas são estáveis e essas estruturas suportam variações térmicas e físicas relativamente bruscas, por exemplo, são capazes de aguentar tranquilamente as temperaturas ótimas das enzimas, caso isso não fosse possível não seria interessante aplicá-las, uma vez que a glicerólise enzimática exige um sistema micelar, a enzima e um surfactante/co-surfactante para ajudar no encaixe chave-fechadura (LAWRENCE; REES, 2000).

Figura 03: Tipos de MO



Fonte: CARVALHO; CABRAL (2000).

A estabilidade da emulsão é importante no ponto de vista industrial, pois está diretamente ligada à capacidade de resistir às alterações das propriedades e do meio em que está inserida ao longo do tempo, portanto, deve ser estável quando a fase dispersa não sofrer alteração perceptível. Os fatores ligados a estabilidade do sistema micelar são cremação, sedimentação, floculação e rompimento da emulsão, todos diretamente relacionados a variação de temperatura, pressão, agitação e estresse. Portanto, trata-se de um sistema dinâmico, contudo, devido ao aumento da área

interfacial, termodinamicamente instável. Assim, é necessária energia para que se obtenha uma MO, normalmente, energia mecânica (LIMA, 2015).

Também pode-se observar na Figura 03 que nas micelas A/O (reversas), forma-se uma espécie de núcleo central polar. Vê-se que tais grupos são caracterizados por apresentar um diâmetro e número de agregação (massa molecular) definidos, com uma estrutura relativamente ordenada. Para definir o diâmetro da micela reversa é necessário conhecer a relação molar água/surfactante, o qual é um parâmetro crucial para a formação da MO e conseqüentemente a estabilidade do sistema, para suportar uma glicerólise enzimática e monitoramento de cinética, além do estresse natural de manipulação das amostras (GUAN et al., 2015).

Com as micelas formadas, tem-se um sistema pronto para entrar com o glicerol e biocatalisadores, por exemplo, nas reações de glicerólise enzimática. O tipo de micela formada interfere na resistência do biocatalisador, por exemplo, as O/A propiciam o aumento da resistência da enzima, aumentam a faixa de pH e temperatura em que a reação possa ocorrer. Além disso, tendem a aumentar a solubilidade e a área superficial do substrato, por conseqüência, facilita o encaixe chave-fechadura da enzima com a interface do óleo. Tais fatos são importantes para aumentar a eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG e permite trabalhar com a enzima mais facilmente, pois trata-se de uma proteína, que quando desnaturada perde a função (ZHANG et al., 2017b; GAO et al., 2015).

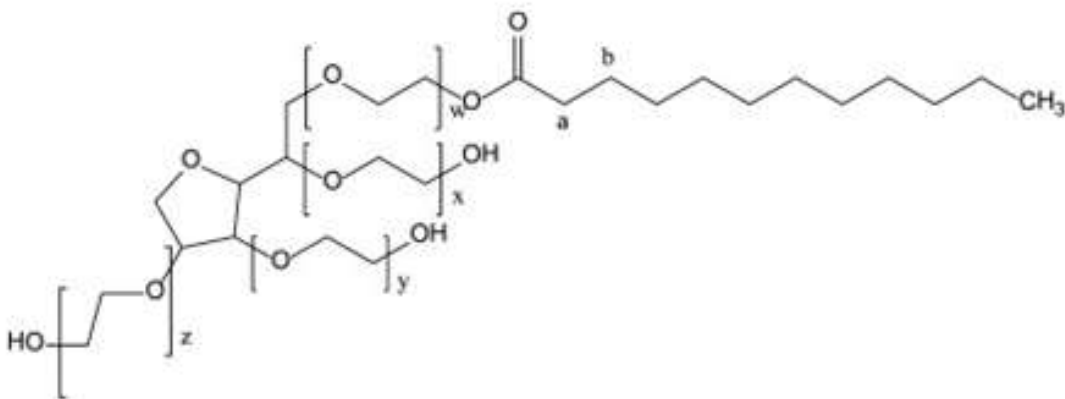
Contudo, quando tem-se concentrações similares de fase oleosa e aquosa, pode ocorrer a formação de uma micela bicontínua, ou seja, ambas as micelas em um mesmo sistema, tal fato pode ser observado através de um microscópio eletrônico, pois seu diâmetro é na escala de nanômetros (JIAN et al., 2001). Atualmente, há estudos da utilização de MO reversas para glicerólise enzimática de óleos de fritura residual, assim, utiliza-se um resíduo como fonte de TAG para síntese de MAG e DAG, através de um sistema emulsionado (RAMÍREZ; ROMÁN; ARTEAGA, 2016).

2.5 SURFACTANTE E CO-SURFACTANTE

Os surfactantes são substâncias que pela sua estrutura são caracterizadas como anfifílicas, pois possuem uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cauda apolar (lipofílica), como observado na Figura 04. A parte polar pode ser catiônica, aniônica,

dipolar ou não carregada. Apresentam, como principal característica, duas regiões de solubilidades distintas, porém, com distância suficiente para agirem de forma independente. Trata-se de um agente que reduz a tensão superficial de uma mistura. Então, traz-se uma importante propriedade desse grupo de compostos: a formação de um filme molecular, de forma ordenada, na interface de atuação, que reduz a tensão interfacial e superficial (DJEKIC et al., 2012).

Figura 04: Fórmula estrutural do Polisorbato 20



Fonte: Lei, et al., 2013.

A aplicação dos surfactantes é no intuito de promover o aumento da área de interface do sistema óleo/glicerol/água. Para que, quando o biocatalisador entrar no sistema, aumente a velocidade de catálise do meio. Assim, o surfactante está diretamente ligado à formação de sistemas micelares e à catálise dos TAG, o que acarreta ligação à eficiência de conversão (HAYES, 2017).

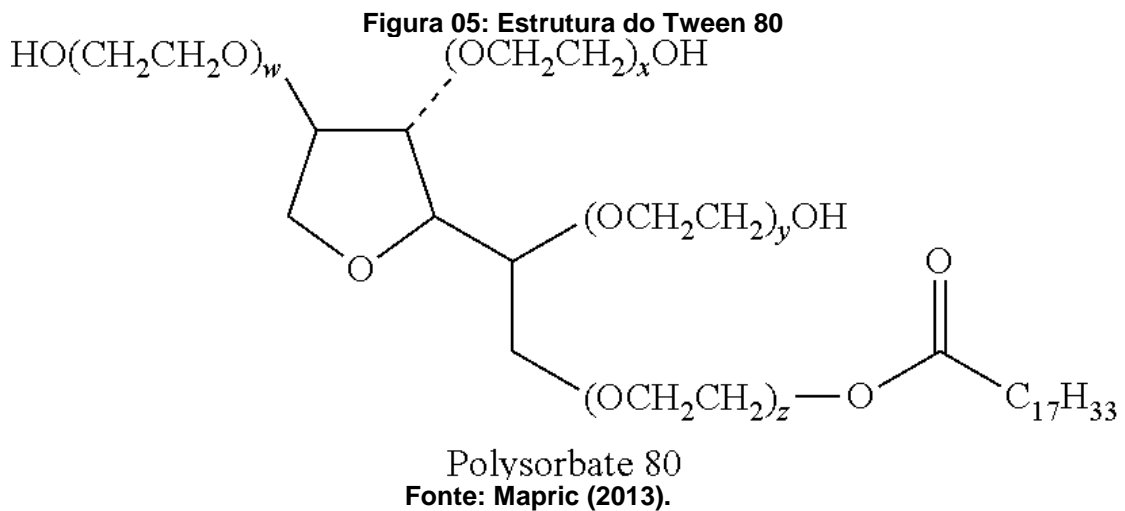
Uma aplicação recente para surfactantes vem sendo na recuperação química de óleos usados, dentre eles de cunho petrolífero, contudo, para esses resíduos de elevados número de carbono ainda requer uma quantidade extremamente grande de surfactante para que haja recuperação desses óleos. São utilizados surfactantes hidrofóbicos que precisam ser ramificados no objetivo de formar MO com viscosidade baixa / moderada para que possam aumentar a interação desse surfactante com o óleo e então submeter o processo a elevadas temperaturas, pressões e solventes para que a reação aconteça, uma vez que enzimas não são capazes de suportar

elevadas pressões e temperaturas já que refere-se a proteínas específicas (LU et al., 2014).

Para avaliar a eficiência de um surfactante, utiliza-se a concentração micelar crítica, que é definida pela solubilidade do surfactante em uma fase aquosa. Esse valor é obtido pela dissolução de porções conhecidas de determinado surfactante em água, sempre monitorando a tensão superficial e interfacial, e plota-se valores da tensão em função da quantidade utilizada de surfactante no meio. Quanto menor for a concentração micelar crítica obtida, mais eficiente é o surfactante (ARAÚJO, 2016).

A versatilidade de um surfactante permite atuar em diversos produtos, como detergentes, fármacos e óleos lubrificantes automotivos. Como dito, tem a função de diminuir a tensão interfacial entre fases polares e apolares, portanto, diminui a energia interfacial livre do sistema. Na linha de automotiva, tem por função elevar o ponto de fulgor de um lubrificante, o que proporciona uma maior resistência termodinâmica do mesmo, devido ao aumento da área interfacial e estabilidade ao sistema (CARRETEIRO; BELMIRO, 2006). Além dessas aplicações, são utilizados como emulsificantes, agentes molhantes, anti-espumantes e solubilizantes, normalmente aplicado como adjunto para facilitar reações e aumentar interface do sistema (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Dentre os mais diversos surfactantes, destaca-se o polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$), conhecido como Tween 80, observado na Figura 05, o qual é uma linha de compostos não iônicos, formados por ésteres de sorbitan etoxilados, conforme o tipo de ácido graxo de origem e seu grau de etoxilação. Podem ser obtidos com diferentes balanços hidrofílicos-lipofílicos (HLB), tem peso molecular de $1310,0 \text{ g.mol}^{-1}$. As principais características são: cadeia apolar de polioxietileno (característico das diversas famílias do Tween); tensoativos hidrofílicos (alto equilíbrio hidrofílico); solúveis ou dispersáveis em água. Muito utilizado na indústria farmacêutica, na parte de cremes e loções. Já sua aplicação em alimentos é mais restrita pois refere-se a um composto com certo grau de toxicidade e seu estudo em alimentos merece estudos aprofundados pouco encontrados nas bibliografias, por se tratar de um ramo novo de estudo (MAPRIC, 2013).



Novos surfactantes estão sendo desenvolvidos, os chamados, biosurfactantes, que apresentam as mesmas características do surfactante, porém, obtidos de fontes microbiológicas. Também diminuem a tensão superficial e interfacial do sistema, possuem alta propriedade emulsificante, e normalmente refere-se a subprodutos metabólicos de fungos, bactérias e leveduras. As vantagens frente aos surfactantes sintéticos são com relação a biodegradabilidade, menores níveis de toxicidade e apresentarem maior estabilidade em termos de pH, temperatura e salinidade (ARAÚJO, 2016).

Os biosurfactantes tem aplicabilidade semelhantes aos surfactantes convencionais, e podem ser utilizados em reações de hidrólise, com ou sem utilização de enzimas, estabilização de emulsões e microemulsões, por exemplo (ARAÚJO, 2016). Os surfactantes são estruturalmente parecidos, parte lipofílica e parte hidrofílica, sendo que em sua maioria são neutros ou aniônicos, com estruturas de pequenos ácidos graxos até grandes polímeros, destacando-se os glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, surfactantes poliméricos e particulados. Quando necessário faz-se o uso da utilização junto com os co-surfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os co-surfactantes atuam para reduzir a tensão interfacial adicional entre água e óleo, que é necessária para a formação e estabilidade química, física e termodinâmica das MO. Também tem papel fundamental na fluidificação do filme interfacial formado pelo surfactante, acima mencionado, tal atuação impede a elevação brusca da viscosidade do meio micelar. Os principais co-surfactantes são

álcoois com cadeia de dois a dez carbonos, pois podem influenciar na solubilidade das fases aquosas e oleosas, pela sua cadeia apolar com ponta polar (SILVA et al., 2015).

2.6 LIPASES COMO BIOCATALISADORES

Uma das principais limitações da utilização dos catalisadores químicos, é que apresentam baixa versatilidade e seletividade, devido a exigência de elevadas temperaturas para conseguir moderadas taxas de conversão de TAG em MAG e DAG. São bastante reativos e o que leva a formação de subprodutos indesejáveis, até mesmo contaminações. Tal fato demanda de etapas posteriores de purificação, portanto, eleva os custos do processo. Nesse contexto, surgem as enzimas que são biocatalisadores proteicos ou glicoproteicos, que atuam em condições mais plausíveis de pH, temperatura (30 a 70°C) e pressão. Sua elevada seletividade atinge taxas de reação muito elevadas e obtém-se resíduos biodegradáveis, como no trabalho de Castro et al., (2004).

Segundo Webb (1992), em seu livro de recomendações do NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) a classificação e codificação das enzimas são de acordo com a catálise promovida por elas.

Dentre os processos de maior interesse destaca-se a síntese e interesterificação de lipídeos pelas lipases, já que essas enzimas apresentam uma alta estabilidade em solventes orgânicos, larga especificidade pelo substrato e excelente conversão de reagente em produto (CAO et al., 2016).

Segundo Hartman e Lago (1973) as lipases são classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) por catalisar reações de hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos e obtém-se como produto final os ácidos de interesse e o glicerol. Sua importância advém do poder de catalisar diversas reações e serem estáveis tanto em meios orgânicos quanto aquosos. 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).

As lipases podem ser encontradas facilmente na natureza em fontes vegetais, animais e microbianas, pois são enzimas digestivas importantes da gordura que é

utilizada como fonte de energia para os seres vivos e também é importante para o metabolismo intracelular (VILLENEUVE et al., 2000). Contudo, as lipases são majoritariamente produzidas por microrganismos, já que podem ser produzidas e caracterizadas a partir de diversas fontes, microbiológica, animal e até mesmo vegetal, há facilidade em controle de produção em processos fermentativos e reduz-se os custos de obtenção (GOLANI; HAJELA; PANDEY, 2016).

Portanto, as lipases são capazes de modificar compostos, têm alta especificidade em sínteses orgânicas, alta estabilidade em solventes orgânicos, melhora a palatabilidade de alimentos e não dependem de co-fatores. Logo, a indústria e comercialização de lipases está em uma curva crescente de mercado e por consequência no desenvolvimento de novas tecnologias para o setor industrial (YEOH et al., 2009). Além dessa aplicação, vem sendo utilizada em várias fontes de TAG, como por exemplo, girassol, oliva, andiroba e até casca de coco verde (ARAÚJO, 2016; SILVA, 2017b; CABRAL, 2014).

As lipases têm uma massa molar que variam de 20 a 75 kDA, tem uma faixa de pH ótimo de 4 a 9, são estáveis a temperaturas que variam de 30 a 70°C, sendo que sua faixa ótima é de 30 a 40°C (STAMATIS et al., 1993; BORNSCHEUER, 2003). Tem sua atividade aumentada quando situa-se na interface polar/apolar de uma MO, por apresentarem maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. São proteínas que possuem um mecanismo complexo de ativação interfacial, com várias teorias, a mais aceita diz que a parte da superfície da enzima que está em melhor equilíbrio termodinâmico, ao ser inserida na MO encontra o sítio ativo favorável para que ocorra a catálise (ERICSON et al., 2008).

Novos trabalhos são publicados estudando a aplicação de enzimas na síntese de MAG e DAG, como no trabalho de Zhang et al., (2017a), que faz o uso da enzima comercial *Lypozime 435* na síntese de DAG a partir de óleo de soja em um reator de coluna bolha em sistema isento de solventes sob temperaturas quase que extremas para a enzima, aproximadamente 80°C e obteve resultados de conversão de aproximadamente 63,5% de DAG, o que é extremamente alto, visto que a formação e MAG também acontece na glicerólise enzimática, porém, os autores não monitoraram a formação do mesmo.

A enzima Lipozyme TL 100L é uma lipase 1,3 específica e é sintetizada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* e deve ser acondicionada a 0-10°C e tem seu

ponto ótimo de reação acima de 20°C e abaixo de 50°C, atua na faixa de pH de 7 a 10 e tem atividade de 100 KLU/g, líquida e altamente eficiente para reações de catálise, transesterificação, interesterificação e reações de hidrólise em geral (STREM, 2017).

Por sua vez, as lipases são aplicadas em larga escala nas indústrias, como aditivo em detergentes. Para melhorar a detergência utiliza-se mais de um tipo de enzima, dentre elas proteases, amilases e celulases. O comércio desses biocatalisadores somente para aplicações de detergentes gira em torno de 450 milhões de dólares por ano. Como são biodegradáveis, não produzem resíduos nocivos e diminuem o impacto ambiental pela redução dos riscos ao meio ambiente. Além dessa vasta aplicação, são utilizadas na síntese farmacêutica, degradação de óleos e gorduras, tratamento de efluentes, indústrias alimentícias, análises laboratoriais, dentre várias outras aplicações que podem ser observadas na Tabela 02 (FREIRE; CASTILHO, 2008; ISLAM et al., 2016).

Tabela 02: 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; CASTILHO (2008).

A atividade enzimática é um parâmetro importante a ser analisado, pois como o próprio nome já diz, monitora a ação da enzima em determinada reação. Essa determinação pode ser feita através da titulação em NaOH da amostra em um sistema emulsionado, realizada nesse trabalho. Outra forma de determinação da atividade é a

partir da reação catalisada pela atividade enzimática, através da quantificação do produto em diferentes tempos de reação. Outro é um método colorimétrico, que faz análise cinética em tempo fixo, onde adiciona-se iodo como indicador da atividade. Deve-se ressaltar o fato de que 1 unidade (1U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto (FERREIRA et al., 2013; JONSSON et al., 2007; MOURA; PINTO; RODRIGUES, 2007).

2.7 MICROEMULSÕES COMBINADAS A LIPASES

A biocatálise apresenta um grande potencial para a reação em substratos hidrofóbicos. Contudo, segundo Su e Wei (2008) a catálise enzimática em sistemas bifásicos com uma fase aquosa (que contém a enzima) e uma fase lipofílica (substrato hidrofóbico em forma de micelas) tem sua cinética afetada pelas limitações de difusão entre água e a área interfacial orgânica do sistema. Contudo, para resolver esse problema, dispersa-se a fase aquosa de forma mecânica no solvente orgânico adequado, de forma a não conduzir à desnaturação e/ou inativação da enzima. Entretanto, em sistemas normais (O/A), a enzima apresenta uma maior estabilidade, porém sua atividade é relativamente baixa (ZAKS; KLIBANOV, 1988).

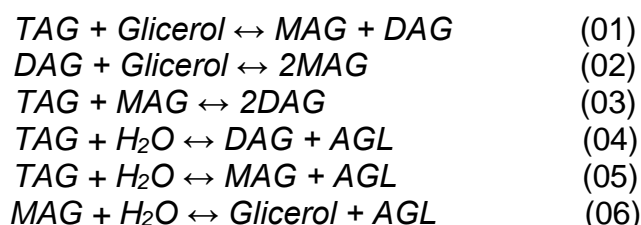
Os sistemas micelares têm uma área interfacial maior do que somente o substrato sozinho (sem a água e o surfactante), a qual permite-se a ação da lipase sobre as moléculas de ácido graxo e ésteres presentes. Logo, é de interesse aumentar a essa área e promover um maior número de “chaves-fechaduras” para que ocorra a catálise mais rápido. Além disso, sistemas micelares são capazes de dissolver compostos hidrofílicos e hidrofóbicos sob variadas concentrações, devido a estrutura dos TAG com cadeia apolar e ponta polar, então, permite a interação com ambas polaridades (MORE; GOGATE; WAGHMARE, 2017).

Vale ressaltar que os altos rendimentos reacionais são dados porque altera-se o equilíbrio termodinâmico das reações de catálise, deslocando-o para a formação de produtos, somente ajustando a quantidade de água do sistema. Por sua vez, o uso de sistemas reversos pode alterar naturalmente as constantes de equilíbrio de várias reações enzimáticas. E as reações com várias enzimas são possíveis em sistemas micelares reversos (DJEKIC; PRIMORAC, 2008).

Como a maioria das enzimas, as lipases exigem uma ativação interfacial para otimizar sua atividade catalítica, normalmente pela ambientação térmica. Existem várias hipóteses sobre o que seria essa ativação enzimática, uma das mais aceitas é que ocorre uma mudança conformacional induzida pela interface da micela, então, ocorre o encaixe perfeito entre a enzima e o sistema micelar e a enzima atua no papel catalítico. Essas hipóteses são feitas com bases nos experimentos realizados, e por se tratar de um composto novo, tais hipóteses são necessárias para prever o comportamento enzimático e precisam ser colocados a prova a fim de testá-las, como por exemplo, ambientação da temperatura que foi empregada no trabalho e a ativação por estufa nas enzimas em estado sólido (ZAAK et al., 2017).

2.8 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS

Obtém-se MAG e DAG como produtos na reação de glicerólise enzimática, a partir da reação de esterificação do glicerol com os TAG's. O glicerol é utilizado para poder-se aproveitar os três ácidos graxos, pelas três hidroxilas da estrutura do mesmo (JUNIOR, 2013). As possíveis reações entre TAG, DAG, MAG, AGL (ácidos graxos livres) e glicerol que envolvem o processo de glicerólise enzimática são descritas pelas reações a seguir. Tratam-se de reações reversíveis, ou seja, há todo momento de reação ocorre alternância de reagentes e produtos e a tendência de formação de reagentes é determinada pelas condições do sistema, dentre eles temperatura, pressão e quantidade de reagentes.



Tais reações descritas acima demonstram que um mol de TAG reage com um mol de glicerol e forma um mol de MAG e um mol de DAG, como visto na reação 01. Então, um mol de DAG reage com o glicerol e forma dois mols de MAG (Reação 02).

Se o produto de interesse for DAG, manipula-se o excesso de DAG na reação para que um mol de TAG reaja com um mol de MAG e forme dois mols de DAG, como pode ser visto na reação 03. As demais reações podem ocorrer, somente manipulando os reagentes, assim, desloca-se o equilíbrio para o outro lado da reação, o que favorece a formação de determinados produtos e ocorra as reações de interesse (KRISTENSEN; XU; MU, 2005).

Sabe-se que a glicerólise de TAG, sem o uso de catalisadores, conhecida como reação de estado sólido, apresenta um rendimento relativamente baixo, produzindo de 30 a 50% de MAG e DAG e um tempo de reação longo (uma semana, em média), assim, é uma técnica não atrativa para a indústria. Isso acontece, porque o equilíbrio é desfavorável, tende a formação de reagentes, então, adota-se diversas estratégias para deslocar esse equilíbrio para o outro lado da reação, como por exemplo, as micelas reversas (KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998). No trabalho de Bôas, Teixeira e Castro (2014), os autores analisaram a razão molar de um TAG para monitorar a produção de MAG em um sistema contínuo com um reator de leito fixo por um período de 10 dias, com análise em cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CGMS). Os autores trouxeram sistemas com razões molares de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12, e nos resultados ótimos, razão molar 1:9, obteve-se conversão de 33% em MAG, ou seja, a melhor condição do estudo em um sistema sem biocatalisador fica com resultados relativamente baixos, quando comparados frente à utilização de enzimas.

Diversos são os estudos para comprovar a eficiência de métodos que usam a glicerólise com lipases para quebrar óleos e gorduras, e que possam ser alternativas comerciais e industriais. Isso acontece, porque, diminui-se a energia utilizada no processo e minimizam resíduos indesejados (CHEW et al., 2008; HU; CHEN; XIA, 2013; BLANCO, 2015; LAN et al., 2015).

Para que ocorra a reação, a lipase deve ser imobilizada como catalisador em um sistema com três fases: hidrofílica de glicerol, hidrofóbica de óleo e uma fase sólida com a enzima. O glicerol liga-se frequentemente às enzimas, de forma que a interação entre óleo e enzima é dificultada. Tal fato acarreta uma diminuição na eficiência de reação, pois o glicerol atua como um inibidor competitivo da enzima, e age no mesmo sítio ativo que ela. Portanto, evitar tal interação, deve-se adicionar uma quantidade

menor de glicerol no meio, limitar a sua massa, ou pode-se utilizar um solvente para que o glicerol possa agir e ocorrer uma homogeneização do meio (YANG et al., 2005).

Existem dois requisitos para a que aconteça a glicerólise enzimática: primeiro, que haja a formação da interface óleo/glicerol e segundo, que a enzima seja adsorvida nesse sistema. Portanto, quanto maior for a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida e conseqüentemente menores energias de ativação e maiores velocidades de reação (BALCÃO; MALCATA, 1998). Para tal, aumenta-se a área de contato entre enzimas e substrato com a utilização das micelas. As micelas proporcionam maior miscibilidade do glicerol em solventes apolares, através das características físico-químicas do sistema micelar e da interação com área superficial onde ocorre a quebra dos TAG e formação dos MAG e DAG (MARTÍNEZ et al., 2018).

No cunho ambiental, refere-se a um processo enzimático tecnicamente limpo e seguro, pois utiliza biocatalisadores como agente da reação e pode ser conduzido de forma imobilizada ou íntegra, por apresentarem resíduos com baixos níveis de toxicidade, dentre eles destaca-se os filtrados das reações de glicerólise enzimática, biocatalisadores removidos da reação, impurezas de fácil descarte e solventes orgânicos da reação, que por consequência, trazem baixo impacto ambiental (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; PERKINS et al., 2016).

Porém, como dito, busca-se diferentes alternativas na produção de MAG e DAG via enzimática, bem como, técnicas que otimizem todo o processo, desde aperfeiçoamento da imobilização da enzima no sistema micelar, novas fontes de enzimas, condições de temperatura e quantidades de reagentes ideais, utilização de surfactantes e co-surfactantes que aumentem a miscibilidade dos reagentes, tudo isso para elevar o rendimento final da reação (SANTOS, 2011; TITUS et al., 2015).

Muitos trabalhos na literatura utilizam diferentes condições enzimáticas e na presença, ou não, de solventes orgânicos para produção de MAG dos mais diversos substratos. Um exemplo foi o trabalho de Tu, Lu e Knothe (2017) que promoveram a glicerólise enzimática, utilizando ácido sulfúrico como solvente, e resíduos de graxa de baixa qualidade. Os autores obtiveram cerca de 30 a 60% de eficiência na produção de MAG e DAG, respectivamente. Contudo, o interessante foi a diminuição de resíduos tóxicos durante a glicerólise, pois aumentou-se a área interfacial de contato entre enzima e substrato, notou-se queda drástica nos volumes de ácido sulfúrico e metanol utilizados na reação convencional.

Estudos atuais se baseiam nas mais diferentes fontes para modificar estruturas de óleos e gorduras, no intuito de obter compostos mais simples, com maior valor agregado final e com menor grau de toxicidade, capaz de ser aplicado em outros setores. Nesse viés, entra os estudos com enzimas dispersas em reação e imobilizadas em diversos suportes, dentre eles, em superfícies sólidas por adsorção física, covalente ou iônica, encapsulamento e microencapsulamento e por ligação cruzada. O importante é que esse suporte seja inerte, fisicamente estável, com baixo custo e que tenha uma superfície disponível para a enzima (TACIN; OLIVEIRA; GATTÁS, 2014).

2.9 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO

A ordem de qualquer reação pode variar de acordo com as constantes presentes no meio, e em decorrência, afeta a velocidade de reação. Uma técnica confiável para determinar a ordem de reação do processo é o das velocidades iniciais. A glicerólise enzimática é realizada sob diferentes quantidades de substratos e enzimas, a partir dessa reação pode-se determinar a velocidade de reação (v_0) para cada ensaio, pela diferença numérica da curva de decaimento em um gráfico de concentração do substrato em função do tempo (CABRAL, 2014).

Para que o método seja eficiente, as demais variáveis devem ser mantidas constantes durante o processo, ou seja, depois que a catálise for iniciada, não pode-se alterar a quantidade de reagentes. Refere-se a uma técnica que possibilita acabar com interferências de reações paralelas, assim, pode-se focar em uma única variável e determinar a ordem de reação (zero, primeira ou segunda), de acordo com um gráfico que vá de acordo com os possíveis modelos a serem seguidos (LEVENSPIEL, 2000).

Nesse contexto, pode-se afirmar que quando a concentração (C) é muito maior que o valor unitário, tende-se a uma reação de ordem zero, enquanto que quando C for muito menor que um, observa-se traços de uma cinética de primeira ordem. Além disso, comportamentos entre ordens refere-se a pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens, que podem ser determinados através do coeficiente de determinação, explicado a seguir (SAUER, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritas as técnicas adotadas para realizar a síntese de MAG e DAG por glicerólise enzimática, bem como materiais, equipamentos, reagentes e demais aparatos utilizados. Está apresentada também a metodologia para síntese e avaliação quantitativa e qualitativa dos produtos da glicerólise enzimática. Realizou-se o preparo de amostras e a reação no *campus* Toledo e a leitura em HPLC no *campus* Medianeira.

3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

Empregou-se como substratos base da catálise o azeite de oliva extra virgem comercial, Oliva de Los Andes Premium – 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.

Para agir sobre o sistema micelar, fez-se uso da lipase comercial, Lipozyme TL 100L da Novozymes, líquida, produzida a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus*, tem ponto ótimo de reação acima de 20°C a 50°C, pH de 7 a 10 e atividade inicial de 100 KLU/g, segundo o fabricante. Foi adicionada ao meio reacional e removida através de um filtro de seringa após o tempo pré-estabelecido na metodologia.

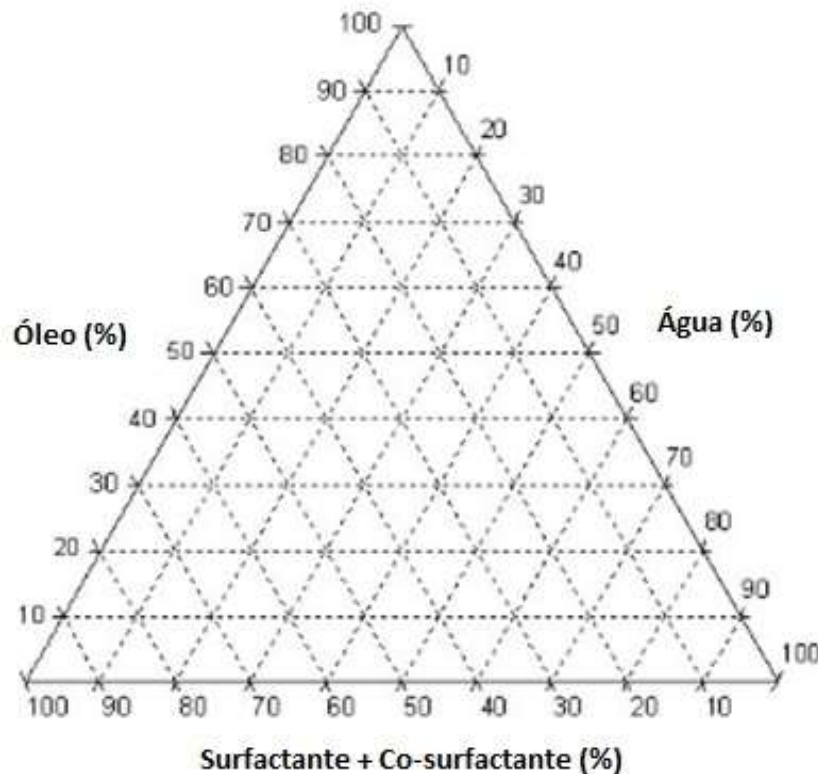
As amostras foram quantificadas em análises cromatográficas, com padrões de MAG, DAG e TAG, sendo eles: Ácido linoleico 97%; glicerol trilinoleico 98%; ácido oleico >99%; monopalmitico >99%; glicerol trioleico >99%; ácido dilinoleico 98%. Todos da marca Sigma-Aldrich. Estes padrões foram escolhidos por serem compostos comumente encontrados em maiores quantidades nos azeites de oliva.

3.2 PREPARO DAS MICROEMULSÕES

Para afirmar quais as melhores proporções de azeite de oliva, água e surfactante, fez-se diversos testes experimentais seguindo um diagrama de equilíbrio líquido-líquido, semelhante ao da Figura 06. O objetivo é a formação da MO, com a menor quantidade de surfactante possível, visando a questão comercial e também toxicológica, para aplicações futuras. Após utilizar diferentes quantidades de

reagentes, água, óleo, surfactante e co-surfactante, seguiu-se para um Vortex (Phoenix Lufenco AP59), onde ocorreu a homogeneização das mesmas, por agitação constante por 1,5 min e então foram armazenadas em temperatura ambiente por 48 horas (PESCARA, 2016).

Figura 06: Equilíbrio das fases entre três compostos



Fonte: Adaptado de MOURA et al., 2011.

3.3 TESTES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

Após o descanso da MO, preparou-se um sistema que consistiu em um agitador magnético, um banho termostático (Tecnal TE 2005) e reator de vidro encamisado, todos acoplados e ajustados sob agitação constante, por um agitador mecânico (IKA RW 20) e temperatura controlada, para ocorrer a glicerólise enzimática.

Adicionou-se a enzima comercial em estado líquido e o glicerol no reator encamisado, junto ao glicerol e a MO anteriormente formada, e então a reação ocorreu por um período pré-definido de 2 horas, a 600 RPM e 45°C, como pode ser observado na Imagem 01.

Imagem 01: Reator encamisado acoplado a banho termostático



Fonte: O autor.

Ao final do tempo pré-estabelecido, removeu-se a enzima das amostras, por um sistema de filtração com um filtro de seringa (Imagem 02). O filtrado foi transferido para frascos de coloração âmbar, levados a um recipiente de isopor e ao refrigerador, até posterior quantificação por HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 com injetor automático, realizados na UTFPR *campus* Medianeira.

Imagem 02: Sistema com filtro de seringa

Fonte: O autor.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE MAG, DAG E TAG

As quantidades de AG nas amostras são necessárias para saber quanto de TAG foi convertido a MAG e DAG, para que se pudesse prever o comportamento da reação em função do tempo e determinar o rendimento da reação. Tal análise foi feita segundo o método 993.24 da AOAC (1996) em HPLC, Thermo Scientific Ultimate 3000, com temperatura do forno da coluna de 35°C e temperatura do detector de 40°C, com coluna C18 de 5 μ m e 100 Å da Phenomenex modelo 00G-4252-E0 de 250 x 4,6mm, volume da injeção e 20 μ L, detector RI, fluxo de 1 mL.min⁻¹ com fase móvel de acetonitrila/acetona (1:1 v/v), grau HPLC da marca Dinamica, de forma isocrática.

Depois da glicerólise enzimática e remoção da enzima, as amostras foram diluídas para uma concentração de 20 g.L⁻¹ e adicionou-se 200 μ L de clorofórmio e completou-se o volume do balão com a fase móvel. Transferiu-se as amostras para

tubos de ensaio, agitou-se os ensaios no Vortex, transferiu-se ao HPLC para análise. As amostras foram injetadas em duplicata, para que o erro pudesse ser mensurado.

Realizou-se a quantificação das MO de duas maneiras: a primeira por área de pico na região de MAG, TAG e TAG e a segunda pelo tempo de retenção e área de pico dos padrões envolvidos na curva de calibração. A primeira maneira fez-se necessário, pois nos cromatogramas que serão apresentados adiante (apêndice A) apareceram picos não caracterizados na região de MAG, DAG e TAG, portanto, são componentes interessantes na conversão final, pois sabe-se que quase 99% da massa do azeite de oliva são TAG. Todavia, utilizou-se seis padrões externos que fez-se a curva de calibração, 10 a 50 ppm, e definiu-se os tempos de retenção de cada um, portanto, sabe-se a resposta do cromatograma em relação a concentração dos ácidos linoleico e oleico, monopalmitico, trioleico, trilinoleico e dilinoleico (LIMA et al., 2013). As amostras 15 e 16 que apresentavam concentrações de TAG fora da curva de calibração (superiores a 50 g.L⁻¹) foram diluídas para 30 g.L⁻¹. Acondicionou-se em bancada até chegarem a temperatura ambiente para posterior corrida.

3.5 AVALIAÇÃO DO PH DA REAÇÃO

O comportamento do pH foi acompanhado ao longo da reação, com o auxílio de um pHmetro (Lucaderma Luca 210). Tomou-se as medidas de pH nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de cada reação, para todas as reações onde obteve-se as MO estabilizadas (listados na Tabela 05). Esse monitoramento é importante, pois se o pH variar muito, pode afetar a atividade da lipase e o rendimento da catálise será diminuído.

3.6 CINÉTICA DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

No intuito de acompanhar a decomposição de TAG e formação de MAG e DAG, monitorou-se a reação que apresentou maior eficiência de conversão em produtos, de trinta em trinta minutos em um período de 9 horas. Retirou-se alíquotas de 200 µL no tempo 0 min até o tempo 540 min, então, transferiu-se para corrida no HPLC, já pré-programado nas condições descritas anteriormente (SANTOS et al., 2004).

Aplicou-se tal procedimento para monitorar a reação e se a reação chegou ao final e em qual tempo isso aconteceu, no objetivo de concretizar se a produção de MAG e DAG fora cessada, bem como a quebra dos TAG (DEMAJOROVIC, 1995).

3.7 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO

A fim de determinar a ordem de reação fez-se uso do método que abrange a taxa de reação ($-r_a$). O princípio do método se baseia no quanto a reação se completou em função de determinado instante de tempo. Pode-se dizer que a cada instante de tempo tem-se uma concentração diferente da quantidade de MAG e DAG, por consequência, uma quantidade diferente de reagentes (SCHMAL, 2010).

Para cada ensaio que se demonstrou eficiente (maiores níveis de atividade enzimática, maior síntese de MAG e DAG e menores quantidades de tensoativos) repetiu-se os testes e durante tempo pré-definido, 2 horas, transferiu-se uma alíquota para o HPLC e analisou-se a quantidade de MAG e DAG geradas em função da conversão obtida. Contudo, para determinar qual é a ordem de reação, fez-se necessário a construção de um gráfico para cada possível ordem: Para reações de ordem zero, plotou-se concentração da solução (Ca) pelo tempo; em reações de primeira ordem, plota-se $\ln Ca$ pelo tempo; por fim, em reações de segunda ordem representa-se $1/Ca$ pelo tempo. O gráfico que apresentar maior coeficiente de determinação (R^2), define melhor o modelo referente a ordem de reação da glicerólise enzimática. Esse melhor modelo é dado como o mais explicativo pela confiabilidade de uma amostra linear (LEVENSPIEL, 2000). Isso é cabível pela definição de R^2 que segundo Souza e Farias (2008) quanto maior for esse valor, mais explicativo é o modelo. Ou seja, estima-se qual é a possível ordem de reação.

3.8 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DO MEIO REACIONAL

Depois de formar as MO estáveis, utilizou-se a de melhor eficiência de conversão e submeteu-o a uma nova glicerólise enzimática variando a quantidade de enzima, a temperatura do sistema e o tempo de reação, com pontos de máximo e de mínimo para as três variáveis. Isso pode ser observado em um planejamento fatorial 2^3 , de três fatores, um bloco e oito corridas, reproduzido na Tabela 03. Os valores de

máximo e de mínimo para concentração de enzima foram 7,5% e 3,75%; temperatura do sistema 55°C e 35°C; tempo de reação 4h e 2h, respectivamente. Os pontos de máximos estão representados na Tabela 03 por 1,00 e os de mínimo por -1,00, para posterior análise de variância dos resultados obtidos em parâmetros de conversão (FIAMETTI, 2012).

Tabela 03: Planejamento Fatorial 3/1/8 para a glicerólise enzimática

Teste	Enzima (%)	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)
1	-1,00 / 3,75	-1,00 / 35	-1,00 / 2
2	1,00 / 7,5	-1,00 / 35	-1,00 / 2
3	-1,00 / 3,75	1,00 / 55	-1,00 / 2
4	1,00 / 7,5	1,00 / 55	-1,00 / 2
5	-1,00 / 3,75	-1,00 / 35	1,00 / 4
6	1,00 / 7,5	-1,00 / 35	1,00 / 4
7	-1,00 / 3,75	1,00 / 55	1,00 / 4
8	1,00 / 7,5	1,00 / 55	1,00 / 4

Fonte: O autor.

3.8.1 Análise de Variância

Ao obter as quantidades de MAG e DAG pelo cromatograma, calculou-se a porcentagem de conversão pela Equação 01, para uma posterior análise de variância nas condições 3/1/8 anteriormente descritas.

$$\% \text{ conversão} = \frac{[MAG \text{ final}] + [DAG \text{ final}]}{[TAG \text{ inicial}]} * 100 \quad (01)$$

Então, com o auxílio do software Statistica versão 11.0 submeteu-se os resultados a análise de variância com 95 % de significância, e então determinou-se quais variáveis são significativas e se houve interação significativa entre elas. Assim, foi possível definir qual/quais foram as variáveis realmente importantes na formação de MAG e DAG. Viu-se isso quando p foi maior que p crítico, então a variável é significativa.

3.9 ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para obtenção da curva de calibração preparou-se uma solução estoque com todos os padrões descritos anteriormente em uma concentração mais alta, fez-se diluições para concentrações menores e leu-se em HPLC (Imagem 03). Primeiramente pesou-se na balança (Shimadzu AUW 220D) quantidades de 0,05g de cada padrão e transferiu-se para um balão volumétrico de 1 mL, assim, cada padrão ficou com uma concentração de 50 g.L⁻¹.

Diluiu-se para concentrações de 40, 30, 20 e 10 g.L⁻¹. Todos em balões de 1mL no campus Toledo. Essas amostras foram acondicionadas em refrigerador e então levadas ao campus Medianeira para leitura em HPLC.

Imagem 03: HPLC Ultimate 3000 onde utilizados nas corridas cromatográficas



Fonte: O autor.

Preparou-se o equipamento com os parâmetros já descritos, transferiu-se as amostras para vials de 1mL e fez-se corrida de 50 min de todos os pontos da curva

do ponto menos concentrado ao mais concentrado para que não houvesse interferência na leitura.

3.10 DELINEAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL DCCR 2²

Como forma de otimizar os resultados obtidos no planejamento fatorial 2³, utilizou-se um delineamento de composto central rotacional (DCCR) 2², para determinação das condições ótimas de síntese de MAG e DAG. Com o auxílio do programa *Statistica* plotou-se os dados da Tabela 04, com as variáveis temperatura e porcentagem de enzima, com pontos de máximo e de mínimo, triplicata de um ponto central, com base nos resultados obtidos da melhor conversão do planejamento mencionado, num tempo já pré-estabelecido de 2 horas (FIAMETTI, 2012).

Tabela 04: 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.

Os pontos de máximos utilizados foram 40°C e 10% de enzima, os de mínimo 30°C e 5% de enzima, os pontos centrais 35°C e 7,5% de enzima, os valores extrapolados máximos 42°C e 11,03% de enzima e os valores extrapolados mínimos 28°C e 3,97% de enzima. Tal teste fora empregado para uma posterior análise de superfície de resposta e demais testes estatísticos necessários a fim e encontrar as condições ótimas.

3.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada para monitorar a ação da enzima comercial Lipozyme TL 100 através de uma metodologia para a dosagem de atividade lipolítica. O meio reacional para o substrato deve ser previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta de uma solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, goma arábica 10% e pelo substrato óleo de oliva, os pontos a serem analisados. Ao preparar a solução, deve-se medir o pH da emulsão e corrigir para 7,0; com NaOH 0,05 M ou 50 mM (FERNANDES et al., 2007).

Primeiramente, preparou-se o tampão de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), chamado solução A, na concentração de 0,1 M. Sabe-se que 1,0 mol pesa 119,98g, portanto 0,1 mol equivale a 11,998g de fosfato, pesou-se essa quantidade na balança. Posteriormente, preparou-se a solução B, fosfato de sódio dibásico 0,1 M (Na_2HPO_4). Sabe-se que 1,0 mol pesa 141,96g, portanto, pesou-se 0,1 mol ou 14,196 g desse sal. Ambas as soluções foram dissolvidas em água destilada e transferidas a balões volumétricos de 1000 mL, devidamente identificados e reservados (RODRIGUES et.al., 2015).

Transferiu-se a solução B para um béquer de 2 litros e mediu-se o pH através de um pHmetro previamente calibrado e adicionou-se a solução A até ter-se um pH 7 e aproximadamente 2 litros de solução. Reservou-se a solução obtida e preparou-se a emulsão, chamada de goma (LIMA et al., 2013).

Primeiramente, pesou-se 71,5g de óleo de oliva e 100g de goma arábica, e reservou-os. Utilizou-se um liquidificador e adicionou-se a goma, juntamente com 1 litro da solução tampão obtida, ligou-se o liquidificador e aos poucos inseriu-se o óleo de oliva até a formação da emulsão. Esse processo durou aproximadamente 10 minutos. Após esse período obteve-se uma goma amarelada, pronta para receber as amostras da glicerólise enzimática (FERNANDES et al., 2007).

Preparou-se diversos *erlenmeyers* e adicionou-se 20 mL da emulsão juntamente a 0,5 mL da amostra que fora feita análise de atividade e levou ao shaker por 20 minutos a 35°C e 150 RPM. Após o tempo pré-estabelecido, adicionou-se 10 mL de uma solução de acetona:etanol 1:1 para que a reação cessasse, colocou-se 5 gotas de fenolftaleína, titulou-se e anotou-se o volume gasto da solução de NaOH que

fora preparada e descrita no item 3.12 (FERRETI; SPOTTI; COSÍMO, 2017). A atividade enzimática foi calculada pela equação 02.

$$A = \frac{\left[\left(\frac{\Delta V}{\Delta t}\right) \cdot [\text{NaOH}] + Fc + 60(\text{seg})\right]}{1000\text{mL} + 1 \text{ min}} \cdot 1000 \quad (02)$$

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

A atividade é dada em (U) e refere-se à quantidade de enzima que é capaz de catalisar uma reação com determinada velocidade de formação de produto por minuto, pois leva em conta a quantidade de NaOH consumido na titulação em função do tempo (FERREIRA et al., 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo estão discutidos os resultados obtidos durante a glicerólise enzimática e em todos os processos de quantificação, atividade e cinética de reação.

4.1 MO BEM-SUCEDIDAS DE ACORDO COM O DIAGRAMA TERNÁRIO

As condições iniciais do processo foram escolhidas seguindo indicação do estudo realizado por Fiametti (2009), sendo conduzidas a 45°C, com uma razão molar glicerol:azeite de oliva de 2:1, 7,5%(m/m) de enzima em 2 horas de reação sob agitação constante de 600rpm. As quantidades de reagentes utilizados, inclusive nas MO's, estão descritas na Tabela 05. O volume de enzima utilizado refere-se a 7,5% do valor do substrato, que é a soma de todos os reagentes, o qual a enzima agirá com seu princípio chave-fechadura.

Tabela 05: MO bem-sucedidas e suas proporções

MO	Glicerol (mL)	Azeite (%/mL)		Água (%/mL)		Tween (%/mL)		Butanol (mL)	Substrato (mL)	Enzima (mL)
3	0,6	5	0,3	5	0,3	90	5,4	10,8	16,8	1,26
6	0,6	5	0,3	10	0,6	85	5,1	10,2	16,2	1,21
7	1,2	10	0,6	5	0,3	85	5,1	10,2	16,2	1,21
9	0,6	5	0,3	15	0,9	80	4,8	9,6	15,6	1,17
11	1,2	10	0,6	10	0,6	80	4,8	9,6	15,6	1,17
12	0,6	5	0,3	20	1,2	75	4,5	9	15	1,12
14	1,2	10	0,6	15	0,9	75	4,5	9	15	1,12
15	1,8	15	0,9	10	0,6	75	4,5	9	15	1,12
16	2,4	20	1,2	5	0,3	75	4,5	9	15	1,12
18	0,6	5	0,3	25	1,5	70	4,2	8,4	14,4	1,08
20	0,6	5	0,3	30	1,8	65	3,9	7,8	13,8	1,03
22	0,6	5	0,3	30	1,8	60	3,6	7,2	12,9	0,97

Fonte: O autor.

Dentre inúmeras tentativas feitas, que podem ser observadas na Imagem 04, as MO's caracterizadas estão descritas na Tabela 05. Mesmo com todas as tentativas

falhas, houve a formação de 12 pontos diferentes de MO que se mantiveram estáveis por um período de 48 horas para então submetê-las a glicerólise enzimática e demais metodologias. Nota-se que na Tabela 05 a razão molar glicerol:azeite foi respeitada segundo a metodologia de Fiametti (2009), e utilizou-se a razão 2:1 (m/m).

Estudos recentes trazem a aplicação do Tween 80 na preparação de nanoemulsões de tocoferóis, vitamina E, a base de azeite, sem o auxílio de co-surfactante a fim de monitorar a estabilidade da emulsão formada. Além disso, determinou-se através de testes que para a formação dessas nanoemulsões necessita-se de um tempo de homogeneização ultrassônica de aproximadamente 3 minutos, com 4% de teor de azeite e 2,08% de surfactante e assim, tem-se os resultados ótimos para o teste em questão (MEHMOOD et al., 2017).

Isso é característico nos testes de TAG para a formação de MO, uma vez que deve-se basear no diagrama de equilíbrio de fases, Figura 06, e deverá haver uma estabilidade entre as fases para que se tenha o produto em questão (PESCARA, 2016). Segundo o trabalho de Hu, Chen e Xia (2013), os autores buscaram produzir DAG de cadeias médias a partir da glicerólise, mas para que conseguissem formar esses pontos de emulsões, várias foram as tentativas até conseguir-se pontos ótimos para que então pudesse ser feita a reação. Vale ressaltar que somente as MO que mostraram-se homogêneas e límpidas que foram utilizadas. As apresentadas na Imagem 04 não foram utilizadas por não haver esse equilíbrio entre as fases e muito menos estabilidade para que então a enzima comercial Lipozyme TL 100 pudesse agir e converter TAG em MAG e DAG.

Imagem 04: Tentativas de microemulsões malsucedidas / bem-sucedidas



Fonte: O autor.

Dentre os testes que não houve a formação da MO por diversos fatores, pelo excesso de água na emulsão caracterizada por A/O, pela não compatibilidade dos reagentes do diagrama ternário da Figura 06, pelo excesso de óleo e pouca água e formação de emulsão parcial por falta de área de superfície dos reagentes, pelo excesso de surfactante e/ou co-surfactante, conforme sugerido por Karleskind (1996) e Pescara (2016).

4.2 MONITORAMENTO DO PH

Os valores de pH monitorados durante os 120 minutos de reação podem ser observados na Tabela 06.

Tabela 06: Valores de pH durante a glicerólise enzimática

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

Fonte: O autor.

Observa-se pela Tabela 06 acima uma variação baixa do pH durante a formação de MAG e DAG, isso foi importante, pois uma variação brusca do pH acarretaria uma inativação da enzima Lipozime TL 100L e não haveria conversão no tempo de duas horas, precisaria de muito mais tempo de reação. No estudo de Muller (2013) a variação do pH durante a glicerólise enzimática também foi baixa, e na faixa de 6,5 a 7,5, portanto, obteve-se resultados parecidos no presente trabalho em condições diferentes, ou seja, o comportamento da reação em função do pH foi similar. Essa baixa variação do pH foi importante para garantir que não houvesse queda de rendimento, portanto, tem-se esse parâmetro dentro das condições ideais da enzima, portanto, pode-se concluir que não houve inativação da enzima e tal parâmetro varia pouco durante a reação de glicerólise enzimática.

4.3 CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DAS MO'S FORMADAS

Com o intuito de se conhecer a concentração de TAG nas amostras no momento T_0 da reação de glicerólise enzimática, pesou-se em uma balança analítica o volume do azeite de oliva das MO formadas, observadas na Tabela 05, a fim de calcular a concentração através da Equação 03 que utiliza os parâmetros massa e volume da amostra. Tais informações são observadas na Tabela 07.

$$C = \frac{m}{v} \quad (03)$$

Na equação acima “C” representa concentração, “m” massa e “v” volume da MO e foi determinada em g.L⁻¹.

Tabela 07: Cálculo de concentração de TAG das MO`s formadas

MO	Volume Total das MO na reação (mL)	Volume Azeite (mL)	Massa Azeite (g)	Concentração (g.L ⁻¹)
3	16,8	0,3	0,2766	16,4643
6	16,2	0,3	0,2763	17,0556
7	16,2	0,6	0,5538	34,1852
9	15,6	0,3	0,2769	17,7521
11	15,6	0,6	0,5532	35,4615
12	15,0	0,3	0,2763	18,4234
14	15,0	0,6	0,5539	36,9280
15	15,0	0,9	0,8298	55,3201
16	15,0	1,2	1,1040	73,6031
18	14,4	0,3	0,2769	19,2292
20	13,8	0,3	0,2772	20,0870
22	12,9	0,3	0,2775	21,5116

Fonte: O autor.

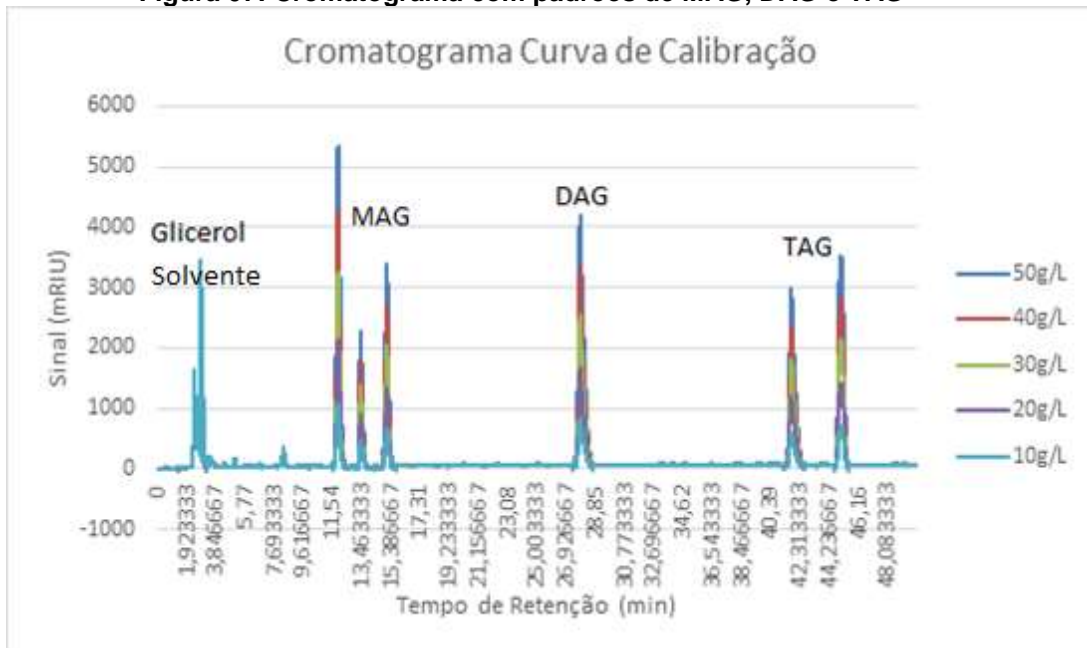
Ao analisar a Tabela 07, observa-se que as MO`s tinham concentrações de TAG que variaram de 16 até 73 g.L⁻¹. Tal informação foi importante para posterior padronização das amostras em termos de concentração, uma vez que respeitou-se os valores da curva de calibração e trabalhou-se com as MO em concentrações dentro da mesma, já que valores fora da curva caracterizam extrapolação dos resultados, o que não é interessante para a determinação das concentrações dos padrões utilizados no presente trabalho. As amostras mais concentradas foram diluídas para 30 g.L⁻¹ enquanto que as menos concentradas foram tratadas da mesma forma pois a curva de calibração foi feita de 10 a 50 g.L⁻¹. Essa diluição fora necessária para trabalhar com os valores dentro da curva, para ter-se certeza de que os padrões utilizados estão de acordo com a curva feita (HU; CHEN; XIA, 2013).

4.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Segundo a metodologia da AOAC (1996), num cromatograma de TAG, MAG e DAG a primeira série de picos é referente ao solvente e restante de glicerol não utilizado na MO, tal fato pode ser observado na Figura 07. O primeiro pico é referente à linoleína o segundo é da oleína depois monopalmitol. Esses três picos são observados até a faixa dos 15,6 min de tempo de retenção, característicos dos MAG's. Ou seja, se comportou da maneira esperada. O pico em 27,6 min é referente à dioleína, um DAG e os dois últimos picos em 41,4 e 44,8 min refere-se às TAG trioleína e trilinoleína, respectivamente. Também respeitou os tempos de retenção segundo a metodologia, tendo mais afinidade com a coluna. A separação dos picos foi bem-sucedida, possibilitou-se a definição e determinação de cada composto.

Tais semelhanças de tempo de retenção podem ser observadas nos trabalhos de Pacheco et al., 2014 e de Yang et al., 2015 que quantificaram 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, em ambos, nos cromatogramas primeiro saíram os MAG, depois os DAG os TAG, que podem ser explicados pela interação com a coluna e com a fase móvel. Os MAG saem primeiro por apresentarem maior interação com a fase móvel, no caso, acetona:acetoneitrila 1:1, os DAG tem uma interação intermediária e os TAG tem maior afinidade com a coluna C18 reversa, e essa interação é entre os carbonos da coluna que mantém forças de Van der Waals com os carbonos dos TAG, que tem cadeia maior que os MAG e DAG, por exemplo, condiz com o cromatograma da Figura 07 e com os trabalhos acima citados.

Figura 07: Cromatograma com padrões de MAG, DAG e TAG



Fonte: O autor.

Para determinar a linearidade de cada padrão na curva de calibração, plotou-se gráficos individuais e determinou-se o coeficiente de determinação (R^2) de cada padrão da curva. No objetivo de aferir se a curva de calibração foi feita de forma coerente e coesa, assim, saber a linearidade dos resultados. Isso pode ser observado nos gráficos das curvas de calibração demonstradas no Apêndice B. Utilizou-se a área de pico x concentração como sinais resposta para poder-se prever a linearidade da curva.

O R^2 nos confere a existência, ou não, de correlação entre absorbância e concentração (BAESSO; SOUZA, 2010). E em todas as curvas de calibração obteve-se valores superiores a 0,99, ou seja, houve concordância entre os dados já que obteve-se um valor muito próximo a 1, e a sequência do trabalho pode ser executado com uma curva de calibração de alta linearidade, portanto, tem-se um modelo adequado. No trabalho de Lima (2004) também vê-se altos valores de R^2 , o que traz confiabilidade nos resultados de toda pesquisa subsequente. Portanto, os padrões supracitados puderam ser quantificados após leitura no HPLC, respeitando a linearidade da curva de calibração.

No trabalho de Fonseca (2015), vê-se que o autor fez o mesmo procedimento na quantificação de dois dos padrões supracitados, a monooleína e dioleína, e para

ambos obteve-se coeficientes de determinação superiores a 0,99, ou seja, os resultados foram semelhantes e assim, tornam-se confiáveis para quantificação dos padrões. O autor considerou a conversão dos TAG em um sistema com um derivado enzimático da Lipozyme TL IM, e tratou a eficiência de catálise pela área e pico da região dos MAG, DAG e TAG, visto que, o mesmo utilizou somente dois dos padrões existentes nas amostras, sendo inviável tratar tal parâmetro através de somente esses padrões, deixando de lado todos os outros compostos presentes, portanto, fez-se de maneira semelhante com o presente trabalho, tal metodologia será explicada mais detalhadamente nos próximos tópicos.

4.5 RESULTADOS DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DAS MO

Com o equipamento devidamente calibrado e estabilizado nas condições pré-determinadas e anteriormente descritas, fez-se as corridas de todas as MO devidamente diluídas e em temperatura ambiente. Obteve-se os resultados, em função da área de pico, observados na Tabela 08.

Tabela 08: Área dos picos (mRIU) dos grupos AG's das MO's tratadas

MO	MAG	DAG	TAG	Solvente	Total
3	3064,4221	1173,8222	642,5221	1233,1701	4880,7623
6	3309,5736	1209,0373	684,2838	1217,2628	5202,8943
7	6631,7566	2442,2554	561,0214	1176,4534	9635,0327
9	3623,9830	1214,9065	380,2154	1244,3259	5219,1045
11	7202,6663	2723,2685	331,2145	1146,0005	10257,1486
12	3726,5798	1420,6778	480,2146	1310,3964	5627,4716
14	7502,3506	2645,7954	110,0214	1146,1625	10258,167
15	5810,7532	2178,7322	681,0213	1130,2957	8670,5057
16	5768,7706	2166,9931	630,1245	1222,4171	8565,8879
18	3634,4021	1467,2786	681,0113	1031,2928	5782,6899
20	4476,3677	1602,2677	601,2154	1531,0202	6679,8505
22	4180,4817	1670,3492	691,0129	1670,4789	6541,8428

Fonte: O autor.

O cálculo de rendimento foi feito de duas maneiras, área de pico e por curva de calibração, o primeiro fora utilizado para mostrar a formação de MAG, DAG em função

da quebra dos TAG graficamente, uma vez que, utilizou-se uma quantidade parcial dos padrões existentes no azeite de oliva. Enquanto que pela curva de calibração tem-se uma certeza de qual composto foi formado e em qual concentração ele está presente em cada MO, por isso, ambas as técnicas foram empregadas no estudo das análises. Os resultados em termos de eficiência foram feitos pela área de pico pela região dos MAG e DAG formados, para que realmente soubesse a taxa de catálise dos TAG. Dessa forma, não deixa-se de lado elementos primordiais na composição do azeite de oliva.

Este tipo de análise pode ser empregado em várias áreas que são estudadas por HPLC, como por exemplo no trabalho de Silva (2017a) que desenvolveu um plástico empregando um carboidrato de características especiais, poliols que não é um açúcar, obtido do óleo de andiroba por catálise enzimática. O autor fez a quantificação das amostras pelo mesmo equipamento utilizado no presente trabalho, numa metodologia muito parecida, voltada para os compostos de interesse dele obviamente, e utilizou a área de pico da região para determinar a eficiência do método e obteve resultados interessantes que precisam ser melhor estudados para otimização do método.

Na pesquisa de Cabral (2014), o autor determinou a cinética da glicerólise do azeite de oliva em sistemas de batelada, com e sem a utilização de biocatalisadores, portanto, sob um tempo de reação de 24 horas em cada batelada. Além disso, a quantificação foi dada pela área da região do cromatograma, quanto pela utilização de alguns padrões do óleo de oliva, ou seja, de forma semelhante ao presente estudo, também com o mesmo objetivo que fora monitorar a conversão de TAG. Para os padrões de conversão de sistemas sem utilização de enzimas como catalisadores, os autores trouxeram resultados dados como satisfatórios, em termos de conversão e cinética de reação.

4.5.1 Eficiência de conversão pela área de pico

A conversão e eficiência de cada amostra está apresentada na Tabela 08. Percebe-se que a quantidade de MAG formada foi superior à de DAG, como por exemplo no caso das MO's 7, 9 e 15 que teve uma produção de MAG 300% maior que a de DAG. Segundo Koblitz (2003), isso é dado pois quando ocorre a quebra do

TAG, os radicais livres formados vão em direção do glicerol, formam-se os MAG e DAG. Além disso, sua porcentagem de MAG foi muito superior aos de DAG, assim, como observado na Tabela 09 do presente estudo. Essa quebra é interessante e necessária pois é objetivo do trabalho, a conversão de TAG, então, ocorre a formação de compostos menos complexos e que tem propriedade emulsificante, o que necessita posteriores estudos de aplicabilidade em nichos farmacêuticos, alimentícios e talvez automotivos, precisam ser colocados em teste para saber se poderiam ser utilizados em indústrias e substituir os emulsificantes comerciais que atualmente são utilizados no mercado de trabalho (JALA et al., 2016).

Tabela 09: Eficiência de conversão para cada microemulsão formada

MO	MAG	DAG	TAG	Eficiência (%)
3	0,6278	0,2405	0,1316	86,8356
6	0,6361	0,2323	0,1315	86,8480
7	0,6882	0,2534	0,0582	94,1772
9	0,6943	0,2327	0,0728	92,7149
11	0,7022	0,2654	0,0322	96,7708
12	0,6622	0,2524	0,0853	91,4666
14	0,7313	0,2579	0,0107	98,9274
15	0,6701	0,2512	0,0785	92,1455
16	0,6734	0,2529	0,0735	92,6437
18	0,6284	0,2537	0,1177	88,2233
20	0,6701	0,2398	0,0900	90,9995
22	0,6390	0,2553	0,1056	89,4370

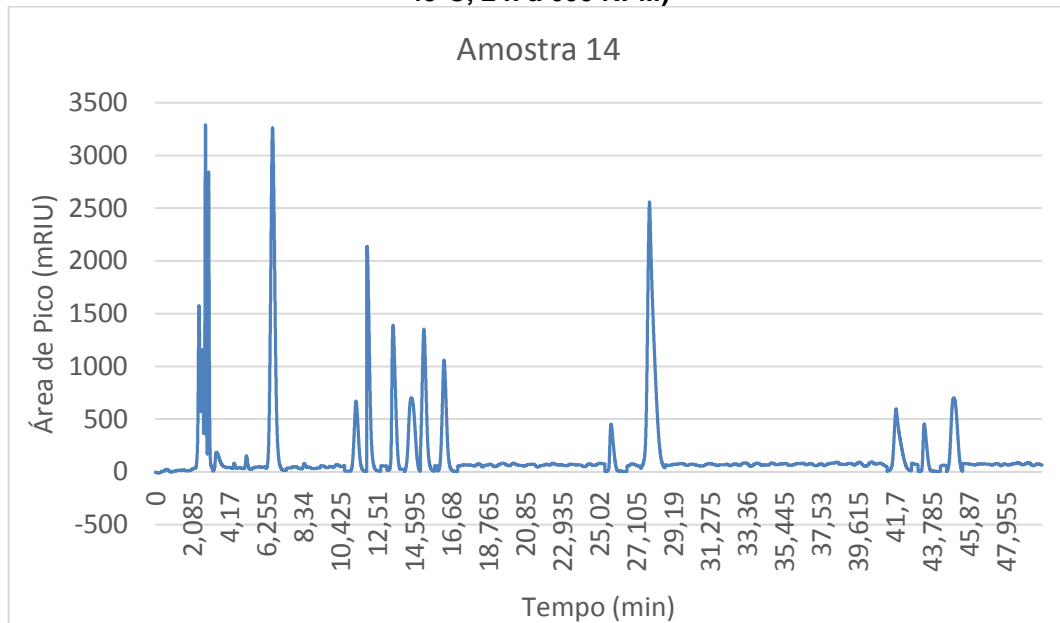
Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 09 nota-se elevadas eficiências de conversão, todas superiores a 86%. Contudo, destaca-se a MO número 14 que obteve eficiência de quase 99%, ou seja, a conversão de TAG em MAG e DAG foi surpreendentemente alta. Segundo o trabalho de Wang et.al., (2016), o qual focou na reação de glicerólise, utilizando a lipase MAS1 imobilizada e obteve conversões superiores a 80%, ou seja, utilizou condições que proporcionaram altas eficiências.

Tais resultados têm explicação pois a reação foi realizada com uma enzima de excelente atividade, nas condições ótimas de temperatura e pH. Além do tempo de reação e quantidade de enzima necessários para que ocorresse a reação. Ou seja, o

método foi realizado de forma coerente e a glicerólise enzimática aconteceu de forma eficaz. O cromatograma referente a MO 14, que foi obtida com a razão molar glicerol:azeite de 2:1, 7,5% (v/v) de enzima, duas horas de reação, a 45°C e 600 RPM, pode ser observado na Figura 08.

Figura 08: Cromatograma área de pico x tempo da Amostra 14 (Razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2 h a 600 RPM)



Fonte: O autor.

Analisando o trabalho de Kruger (2010), obteve-se um cromatograma semelhante na quebra de TAG de azeite de oliva, com a primeira região sendo os picos de solvente, um 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. Ou seja, teve-se resultados coerentes em comparação com outro trabalho que quantificava componentes da mesma matriz. Contudo, as eficiências do presente trabalho foram bem maiores do que o trabalho mencionado, na faixa de 73%, pois a enzima utilizada apresentou grande atividade, que será explicada posteriormente, e foi bastante efetiva na questão chave-fechadura. Porém, o trabalho citado utilizou uma enzima imobilizada e que permite a reutilização da lipase em novas reações de glicerólise, porém, deve-se levar em consideração uma possível perda de atividade do biocatalisador em questão.

Por sua vez, comparando com o trabalho de Solaesa et al., (2017), os mesmos fizeram a quantificação somente por área de pico da região do cromatograma e obtiveram eficiências altas de conversão. Vale ressaltar que o estudo em questão foi um teste de glicerólise em diversos sistemas e utilizaram óleo de sardinha como fonte de TAG, contudo, o princípio de quantificação fora parecido e o teor de MAG e DAG também fora analisado, além disso, utilizou-se vários sistemas micelares e também uma lipase como enzima de catálise, então, serve de parâmetro para fundamentar as técnicas empregadas no presente trabalho.

O estudo de Valério (2009) estudou a glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes alimentícios e em sistema livres de solventes, e obteve resultados ótimos, com uma eficiência de aproximadamente 90% de conversão de TAG em MAG e DAG, porém, trabalhou em condições diferentes pelas vias de processo e enzima utilizada (Novozym 435), razão molar 6:1 (glicerol: óleo), 16% de surfactante e 9% de enzima imobilizada com temperatura de 70°C e 2 horas de reação.

4.5.2 Eficiência de conversão pela curva de calibração

Usou-se as equações das retas observadas no apêndice B, das curvas de calibração de cada padrão para determinação da concentração de cada composto nas amostras que sofreram glicerólise enzimática. Localizou-se nos cromatogramas, os tempos de retenção de cada padrão e por meio desse tempo inseriu-se a área de pico de cada ensaio na equação da reta e obteve-se a concentração. Como pode ser observado nas Tabelas 10, 11 e 12 onde AP, PD e C, significam área de pico (mRIU), padrão e concentração (g.L^{-1}), respectivamente.

Portanto, obteve-se a área de pico, depois aplicou-o na equação da reta no lugar do y e obteve-se o valor de x, que é a concentração de cada padrão e conseguiu-se determinar os valores de todos os padrões através da curva de calibração e que não fora interessante determinar a eficiência de reação, pois nos cromatogramas das amostras nota-se mais compostos que não puderam ser determinados. A concentração dos padrões deu-se analisando a Tabela 10 notou-se que os coeficientes de determinação foram bem elevados, todos próximos ao valor unitário, o que caracterizou um modelo bem linear, os tempos de retenção foram respeitados

segundo a ordem que deveriam sair pelas interações entre coluna e fase móvel que serão explicadas adiante e a equação da reta de cada padrão foi utilizada na determinação da concentração obtida na Tabela 12, através dos picos dos padrões da Tabela 11. Vale a ressalva de que os padrões apresentaram valores dentro da curva de calibração, como previsto e gerou confiabilidade nos resultados apresentados.

Tabela 10: 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 11: Área de pico de cada padrão para cada amostra

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 12: Concentração de cada padrão pós glicerólise enzimática

Amostra	C PD1	C PD2	C PD3	C PD4	C PD5	C PD6
3	4,38	7,92	6,41	5,13	2,88	2,70
6	4,74	9,64	7,08	5,45	2,91	2,85
7	8,89	16,59	13,42	10,76	2,61	2,51
9	5,34	8,75	7,77	5,66	2,07	2,02
11	9,45	17,68	15,06	11,67	1,91	1,91
12	5,50	9,52	8,14	6,65	2,35	2,29
14	9,70	18,15	15,31	11,86	1,31	1,25
15	7,75	14,19	12,15	9,75	2,93	2,83
16	7,70	14,14	11,91	9,86	2,85	2,69
18	5,45	8,85	7,92	6,73	2,92	2,83
20	5,95	10,42	9,37	7,55	2,64	2,61
22	5,70	9,92	8,65	7,78	2,97	2,88

C PD: Concentração do padrão

Fonte: O autor.

Assim, pode-se determinar a concentração de alguns dos MAG, DAG e TAG que estão presentes no azeite de oliva. Como no trabalho de Gole e Gogate (2014), que promoveu a glicerólise de ácidos graxos livres diversos, por sistema de micro-ondas, e também utilizou-se de padrões externos para curvas de calibração de óleos e seguiu um planejamento que coincide com o que foi utilizado no presente trabalho. Portanto, mostrou-se uma maneira eficaz de quantificação de AG.

Analisando as Tabelas acima, percebe-se a quantificação dos padrões por área de pico, seus tempos de retenção e a concentração (g.L-1) de cada um. Com relação aos tempos de retenção, pode-se observar que os MAG aparecem por primeiro, seguidos dos DAG e por fim os TAG, isso é explicado pela interação com a fase móvel e estacionária, ou seja, os MAG têm mais afinidade com a fase móvel do HPLC e saíram primeiro, enquanto que os TAG têm mais afinidade com a coluna, fase estacionária, e ficam retidos por mais tempo, saindo por último no cromatograma. Essa interação é uma interação intermolecular físico química que explica a diferença nos tempos de retenção, uma vez que, moléculas que poderiam ser interferentes sairiam sobrepostas nos cromatogramas, contudo, isso não aconteceu, pois, cada MAG, DAG e TAG tem interação diferente com as fases do sistema e pode ser observado pelos tempos de retenção que variaram de 11,55 a 44,65 minutos (SKOOG et al., 2014). Demais gráficos podem ser observados nos Anexos A do presente trabalho.

No trabalho de Solaesa (2017), foi promovida a glicerólise enzimática por lipase em óleo de sardinha em diferentes sistemas, como por exemplo, livre de solventes, utilizando o surfactante Tween 80 e o surfactante AOT, em várias condições de pressão e tempos de reação e concluíram que o importante é promover a MO antes da glicerólise enzimática e os surfactantes tiveram comportamentos semelhantes, sem diferenças significativas tanto para as conversões, quanto equilíbrio do sistema. Além disso, o autor trouxe a reação de glicerólise em um sistema de enzima comercial imobilizada (Novozym 435) e possibilitou a reutilização da lipase e concluiu que em maiores temperaturas, mais próximo do ponto ótimo da enzima, em torno de 90°C, tem-se resultados melhores em termos de conversão e menores valores de oxidação.

4.6 PLANEJAMENTO FATORIAL DA MELHOR CONVERSÃO

No intuito de determinar qual/quais variáveis são significativas no processo, com a MO 14 (maior eficiência de conversão) como base, montou-se um planejamento fatorial 2^3 , $3/1/8$, com as seguintes variáveis: teor de enzima, temperatura e tempo de reação. Os ensaios foram feitos em duplicata e tratados com pontos de máximo e de mínimo e codificados com o auxílio do software Statistica 11.0, como pode ser visto na Tabela 13. Os resultados foram apresentados em termos de eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG por área de pico, uma vez que não pode ser feito pela curva de calibração, pois utilizou-se somente seis padrões presentes nas amostras de azeite de oliva, enquanto que observando o cromatograma da Figura 08 nota-se a presença de outros picos, que caracterizam compostos presentes no azeite de oliva, porém, não pode-se determinar qual é cada um. O planejamento fatorial foi realizado em duplicata.

Além disso, a quantificação dos padrões só foi possível pela equação da reta, a qual substituiu-se nos valores de y a área de pico do padrão e encontrou-se x os quais variaram bastante para cada padrão, levando em consideração a conversão, uma vez que nas amostras que apresentaram maior conversão, amostra 11 e 14, por exemplo, os valores da concentração de TAG foram menores do que nas amostras com menores eficiências (LAN et al., 2015). Porém, no geral as conversões para tais amostras foram efetivas, no parâmetro de área de pico, e assim, demais estudos foram necessários, como dito, dentre eles o planejamento fatorial $3/1/8$ a seguir.

Tabela 13: Planejamento Fatorial 3/1/8 da glicerólise enzimática da amostra 14

Teste	Enzima (mL)	Tempo (min)	Temp (°C)	[MAG] g/L	[DAG] g/L	[TAG] g/L	Eficiência (%)
1	-1 / 0,562	-1 / 120	-1 / 35	23,4788	7,8472	5,6019	84,83
2	1 / 1,125	-1 / 120	-1 / 35	26,5179	9,7305	0,6794	98,16
3	-1 / 0,562	1 / 240	-1 / 35	19,7380	7,7474	9,4424	74,43
4	1 / 1,125	1 / 240	-1 / 35	26,8946	9,7416	0,2917	99,21
5	-1 / 0,562	-1 / 120	1 / 55	23,9588	7,9062	5,0628	86,29
6	1 / 1,125	-1 / 120	1 / 55	20,8901	7,7807	8,2571	77,64
7	-1 / 0,562	1 / 240	1 / 55	20,2956	7,7659	8,8664	75,99
8	1 / 1,125	1 / 240	1 / 55	21,0563	7,7511	8,1204	78,01
1'	-1 / 0,562	-1 / 120	-1 / 35	23,6819	7,7585	5,4875	85,14
2'	1 / 1,125	-1 / 120	-1 / 35	26,3112	9,8117	0,8050	97,82
3'	-1 / 0,562	1 / 240	-1 / 35	19,6678	7,5000	9,7600	73,57
4'	1 / 1,125	1 / 240	-1 / 35	26,9611	9,3464	0,6203	98,32
5'	-1 / 0,562	-1 / 120	1 / 55	23,6634	7,7696	5,4948	85,12
6'	1 / 1,125	-1 / 120	1 / 55	20,9898	7,9653	7,9727	78,41
7'	-1 / 0,562	1 / 240	1 / 55	20,3067	8,1426	8,4786	77,04
8'	1 / 1,125	1 / 240	1 / 55	21,1708	7,7991	7,9579	78,45

Fonte: O autor.

Observa-se nos resultados da eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG uma boa eficiência e baixa variabilidade nos resultados entre as duplicatas, uma vez que a eficiência que apresentou menor conversão foi referente ao teste 3 e 3' com aproximadamente 74% de eficiência, e a maior conversão deu-se nos testes 2, 4, 2' e 4' com eficiência superior a 98%. Isso acontece pois nos pontos 3 e 3' tem-se pontos de mínimo em quantidade de enzima e tempo de reação, e ponto de máximo na temperatura, então, a quantidade de enzima presente na reação foi insuficiente para que houvesse a conversão de TAG, pois não havia enzima suficiente para completar o conjunto “chave-fechadura” com o azeite.

O tempo de reação foi menor do que no ponto de máximo e a temperatura mais elevada, pode ter caracterizado a desnaturação da enzima, uma vez que, trata-se de uma proteína e quando desnaturada perde a sua função, de promover a quebra dos TAG. Outro ponto interessante é que os pontos da duplicata tiveram resultados parecidos, o que caracteriza uma boa reprodutibilidade dos testes, tendo em vista que não adiantaria conseguir resultados com acima de 90% de eficiência somente uma

vez, caracterizando a confiabilidade nas reações. Assim, as conversões tiveram seus valores confirmados pela duplicata (VALÉRIO, 2009).

Por sua vez, nas amostras 2, 4, 2' e 4', a quantidade de enzima foi em seu ponto de máximo, e demonstrou pela taxa de conversão que houve enzima suficiente para os AG da matriz amostral, a temperatura dos pontos foi tratada em ponto de mínimo, que está próximo da temperatura ótima da enzima, em torno de 40°C, o que fez com que a Lipozyme TL 100L tivesse sua ação otimizada e por fim, o tempo de reação para os ensaios 2 e 2' foi de mínimo, enquanto que para 4 e 4' foi de máximo, ou seja, não apresentou variação em termos de eficiência. Porém, para ter certeza de qual/quais variáveis foram significativas no processo e se o tempo de reação fora significativo, ou não, realizou-se um teste de análise de variância ANOVA 2³ para posterior discussão dos resultados obtidos.

Para conseguir essas eficiências elevadas faz-se necessário otimizar as condições dos testes, buscando valores de temperatura, concentração de enzima, tipo de enzima, tempo de reação, sistema do reator, velocidade de agitação, dentre inúmeras variáveis que possam aparecer. Portanto, buscou-se uma forma de otimizar essas variáveis dentro das condições experimentais e assim, não precisou-se alterar o sistema reacional para conseguir conversões superiores a 90%, como foi o caso. Contudo, caso fosse preciso, alterações deveriam ser feitas para que isso fosse alcançado, então, pode-se dizer que as condições encontradas foram otimizadas e estudadas para que conseguisse tais valores de conversão (ISLAM et al., 2016).

Ramírez, Román e Arteaga (2016), obtiveram MAG e DAG a partir de óleo de fritura usado, e a reação foi fortemente dependente da quantidade de água dentro do sistema micelar e nas condições com maiores concentrações de enzima, obteve-se melhores resultados, portanto, os autores trouxeram uma rota alternativa na transformação de um resíduo em produtos de maior valor agregado. Contudo, sua faixa de conversão foi relativamente baixa quando comparado ao presente trabalho na faixa de 30% de conversão, uma vez que a fonte de TAG dos autores é óleo de fritura usado que contém várias impurezas e contaminantes, devido a quebra e oxidação que o óleo fora submetido.

4.7 ANOVA 2³

Com base nos resultados do planejamento fatorial, realizou-se um teste de ANOVA com confiabilidade de 95% pelo software *Statistica* e obteve-se uma tabela de análise de variância (Tabela 14) coeficiente de regressão (Tabela 15) efeitos estimados, e Diagrama de Pareto (Figura 09) no fim de determinar a significância das variáveis no grau de confiabilidade do teste. Os presentes testes foram necessários para determinar qual/quais variáveis foram significativas no processo de catálise de TAG e formação de MAG e DAG, e além disso, o lado que essa variável nos diz, ou seja, favorecendo os produtos ou os reagentes. Obviamente, o objetivo fora formação de produtos, assim, o grau de significância das variáveis e interações entre as variáveis fora avaliado e posteriormente otimizado em outros planejamentos, descritos posteriormente.

Tabela 14: ANOVA 3/1/8 do planejamento fatorial 2³ em termos de conversão

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
(1)Tempo Reação (min)*	4,442	1	4,4416	10,252
(2)Temperatura Sistema (°C)*	920,364	1	920,3639	2124,485
(3)Volume Enzima (mL)*	252,89	1	252,8895	583,747
1 by 2	0,375	1	0,3752	0,866
1 by 3	1,271	1	1,2713	2,934
2 by 3*	103,276	1	103,2764	238,394
Erro Puro	3,899	9	0,4332	
Total SS	1286,517	15		

Fonte: O autor.

Tabela 15: Coeficiente de regressão linear do planejamento 2³ da amostra 14

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	p
Média*	84,27688	0,164548	0
(1)Tempo (min)*	0,52688	0,164548	0,010797
(2)Temperatura (°C)*	-7,58438	0,164548	0
(3)Volume (mL)*	3,97563	0,164548	0
1 by 2	0,15313	0,164548	0,376358
1 by 3	-0,28187	0,164548	0,120859
2 by 3*	-2,54062	0,164548	0

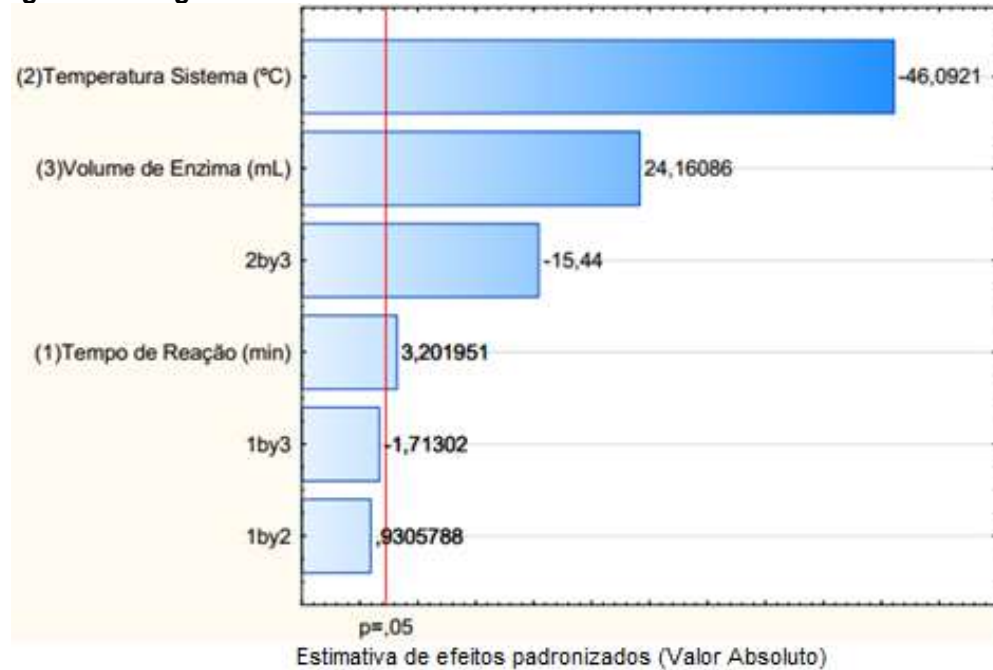
Fonte: O autor.

Nas Tabelas 14 e 15 vê-se que em um grau de significância de 95% as variáveis que não foram significativas foram somente a interação tempo de reação x temperatura e temperatura x volume de enzima, as demais variáveis todas foram significativas já que apresentaram $p < 0,05$. Além disso, observa-se direção do efeito, uma vez que se o valor do coeficiente for positivo o efeito é para a formação de MAG e DAG, todavia, o efeito negativo favorece a não conversão de TAG e, conseqüentemente, a menor eficiência.

Além disso, essas tabelas nos trazem que qualquer variação no sistema altera de forma significativa a conversão, estatisticamente afirmando. Isso pode ser explicado pois estamos lidando com uma emulsão e essa emulsão precisa de equilíbrio e estabilidade, que pode ser afetada dependendo do produto que for adicionado ao meio. Por sua vez, ao utilizar uma enzima para promover a catálise, trata-se de uma proteína sensível a temperatura, que abaixo da sua temperatura ótima tem sua atividade reduzida e acima da temperatura ótima ocorre a desnaturação proteica e perda de ativação, a qual é irreversível. Pois bem, é tão importante a busca pelas chamadas condições ideais de processo, que são aquelas condições onde as variáveis são colocadas em pontos específicos que foquem a síntese de MAG e DAG, nossos agentes emulsificantes e produtos de interesse na reação (SOLAESA et al., 2016).

Segundo o estudo de Blanco et al., (2015), foi realizada a glicerólise enzimática do óleo de peixe utilizando a enzima comercial Lipozyme TL IM com o surfactante Tween 65 com o objetivo de otimizar a produção de DAG das amostras. Tratou-se de uma metodologia parecida com reagentes da mesma família e obteve a conversão para DAG entre 13,76 e 20,76%, o primeiro com o surfactante e o segundo sem surfactante. Além disso, os autores conseguiram comprovar estatisticamente que há variáveis significativas na reação, assim como fora comprovado no presente trabalho.

Figura 09: Diagrama de Pareto dos efeitos da conversão de TAG em MAG + DAG



Fonte: O autor.

Já na Figura 09, nota-se as variáveis significativas e o quão elas são, além disso, conforme dito o sinal do efeito. Nota-se que o tempo de reação é o efeito menos significativo, portanto, como forma de otimizar os resultados até então obtidos, fez-se um delineamento do composto central rotacional 2^2 (DCCR) para obtenção de um gráfico de superfície resposta para as variáveis, como maneira de otimizar a reação de glicerólise enzimática, nas condições ideais para formação de MAG e DAG, em função da eficiência de conversão.

De acordo com o Diagrama de Pareto, nota-se o quão significativa a temperatura é no sistema, ou seja, um aumento da temperatura promove uma queda na produção de MAG e DAG, visto que seu sinal é negativo, além de que, a quantidade de enzima também é limitante para o sistema. Esses resultados estão de acordo com o esperado, já que trata-se de uma proteína que quando desnaturada ou prejudicada pela baixa temperatura, deixa de agir como deveria, ou seja, diminui a eficiência. E quando o substrato não consegue encontrar enzima suficiente para promover o encaixe chave-fechadura, a reação também não acontece, portanto, nos pontos em que teve enzima suficiente para conversão praticamente total dos TAG, isso foi feito, enquanto que quando não houve, o rendimento da reação diminuiu e consequentemente gerou um fator significativo visualizado na Figura 09. Então, a

presença da enzima no meio é um fator que gera a catálise, trazendo um efeito positivo, já a temperatura é uma variável sensível que quando fora dos pontos ótimos prejudica a reação (HU; CHEN; XIA, 2013).

4.7.1 Otimização DCCR 2² e superfície de resposta

Utilizando a amostra com maior rendimento dentre as microemulsões formadas, a amostra 14, elaborou-se um planejamento fatorial denominado composto central rotacional, para isso, estipulou-se pontos de máximo e de mínimo, além de uma triplicata no ponto central, como já descrito na metodologia e obteve-se os resultados, em termos de eficiência na produção de MAG e DAG, descritos na Tabela 16. Onde o ponto de máximo para temperatura e porcentagem de enzima são, respectivamente, 40°C e 10%, de mínimo são 30°C e 5%, ponto central são 35°C e 7,5%, extrapolado máximo 42°C e 11,02% e extrapolado mínimo 28°C e 3,97%.

Tabela 16: Eficiência da reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 600 RPM, 2 horas de reação) no planejamento DCCR 2²

Teste	Temperatura (°C)	Enzima ([])	Eficiência (%)
1	-1 / 30	-1 / 5	66,61
2	1 / 40	-1 / 5	70,24
3	-1 / 30	1 / 10	82,76
4	1 / 40	1 / 10	86,72
5	-1,41 / 28	0 / 7,5	72,79
6	1,41 / 42	0 / 7,5	58,28
7	0 / 35	-1,41 / 3,97	67,73
8	0 / 35	1,41 / 11,02	97,11
9	0 / 35	0 / 7,5	98,12
10	0 / 35	0 / 7,5	98,82
11	0 / 35	0 / 7,5	98,41

Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 16, nota-se que a eficiência variou entre 58% e 98%, ou seja, a conversão de TAG em MAG e DAG teve variância nas condições propostas no

DCCR, contudo, para saber se essas variáveis foram significativas estatisticamente, fez-se com o auxílio do programa Statistica uma ANOVA, coeficiente de regressão e gráficos de superfície resposta, que podem ser observados nas Tabelas 17 e 18 e Figuras 11 e 12. No estudo de Raizer (2015), o autor sintetizou DAG por glicerólise enzimática a partir dos TAG de óleo de girassol por ultrassom e utilizou um DCCR 2² com temperatura e quantidade de enzima como variáveis dependentes e descobriu através da ANOVA e Diagrama de Pareto que a variável mais significativa foi a porcentagem de enzima, pelo efeito enzima/substrato, com um efeito positivo que favoreceu a reação. Além disso, permitiu encontrar o ponto ótimo de produção de DAG aos 27 minutos de reação.

Tabela 17: ANOVA do delineamento DCCR 2²

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
(1)Enzima (%)(L)*	687,578	1	687,578	27,63583
Enzima (%)(Q)*	303,902	1	303,902	12,21472
(2)Temp (°C)(L)	20,763	1	20,763	0,83455
Temp (°C)(Q)*	1408,812	1	1408,812	56,62439
1L by 2L	0,027	1	0,027	0,00109
Erro	124,4	5	24,88	
Total SS	2287,7	10		

Fonte: O autor.

Tabela 18: Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2²

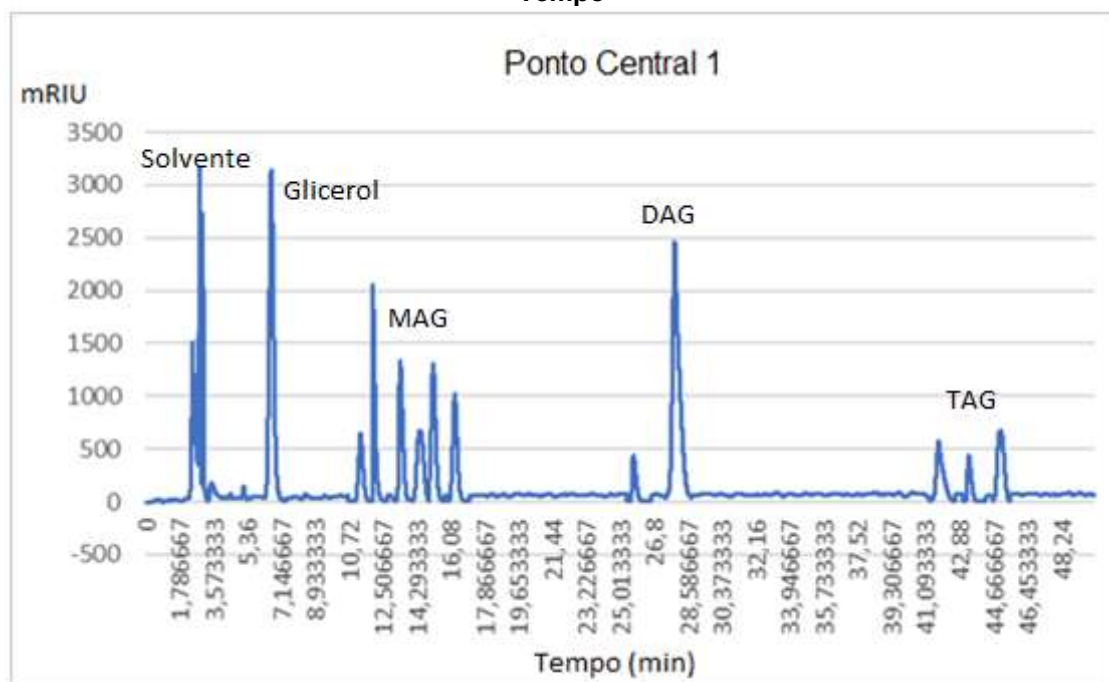
Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	p
Média/Intercep.*	98,4391	2,879778	0
(1)Enzima (%)(L)*	9,2846	1,766147	0,003307
Enzima (%)(Q)*	-7,3655	2,107473	0,017378
(2)Temp (°C)(L)	-1,6134	1,766147	0,402863
Temp (°C)(Q)*	-15,8586	2,107473	0,000656
1L by 2L	0,0825	2,493991	0,974891

Fonte: O autor.

Analisando as Tabelas 17 e 18 acima, nota-se que há uma diferença significativa em praticamente todas as variáveis, portanto, faz-se necessário o gráfico de superfície de resposta entre as temperatura e teor de enzima para encontrar a região com melhor resposta e assim, determinar os pontos ótimo do sistema, onde a formação de MAG e DAG for mais elevada, e isso pode ser observado nas figuras a seguir.

A Figura 10 nos mostra um cromatograma do ponto central analisado no DCCR e fica clara a presença da região de MAG, DAG e TAG, para determinação da eficiência, que como dito, traz as condições de 35°C e 7,5% de enzima. Os picos saíram bem separados nas regiões propostas, saíram nos tempos condizentes com a curva de calibração e em ordem esperada, primeiro o solvente, depois o glicerol, seguido dos MAG, DAG e por fim os TAG.

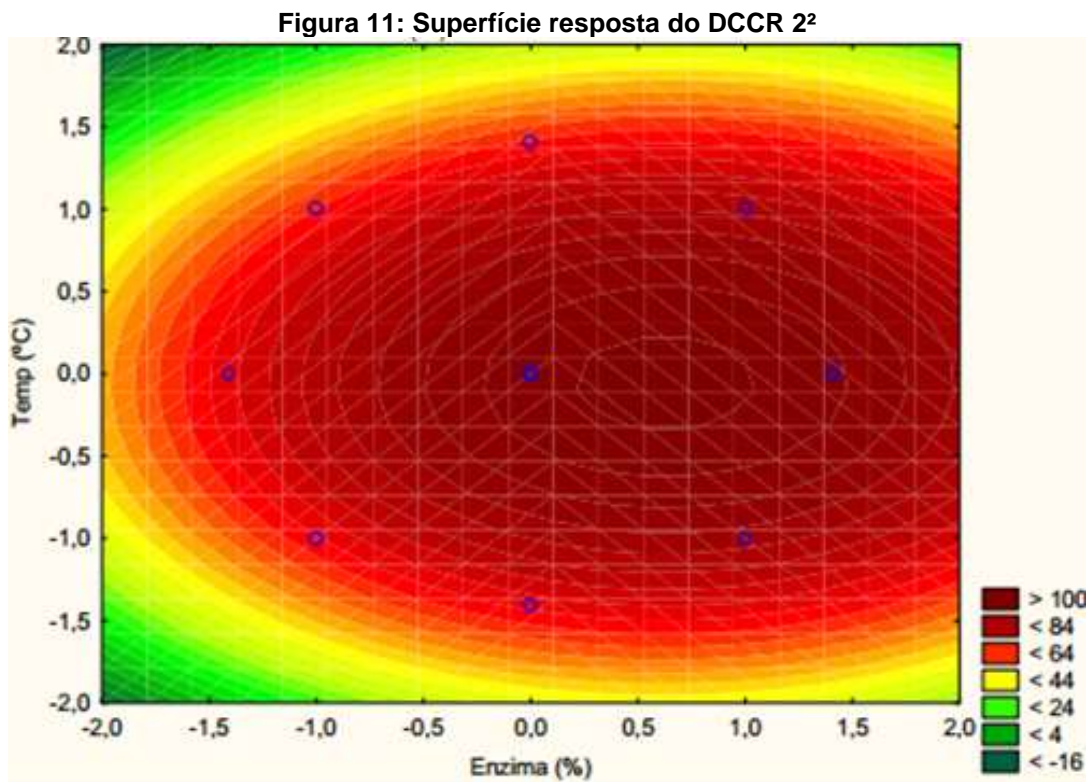
Figura 10 – Cromatograma do ponto central, sistema a 35°C e 7,5% de enzima – Área de pico x Tempo



Fonte: O autor.

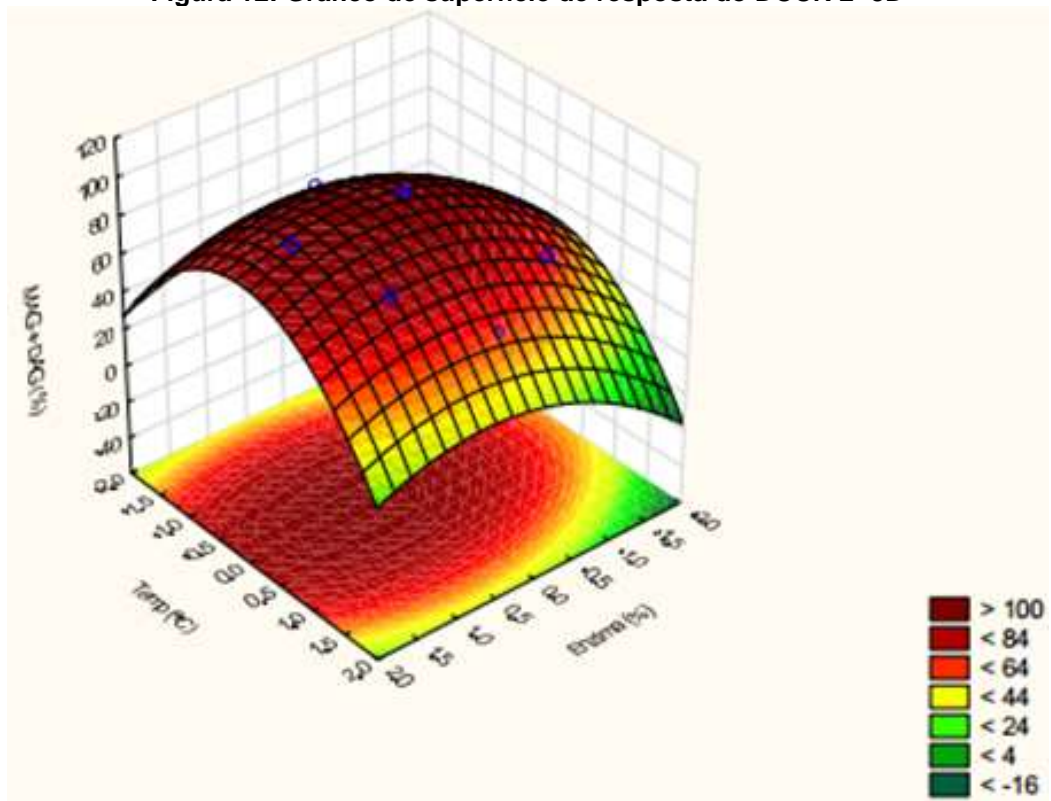
Analisando os gráficos de superfície de resposta acima, Figuras 11 e 12, percebe-se que os pontos ótimos de temperatura estão aproximadamente na região do ponto central, enquanto que para a concentração de enzima está entre o ponto

central e o ponto de máximo da enzima. Ou seja, a temperatura em torno de 35°C e a quantidade de enzima de 7,5 a 10%. Esses resultados são condizentes e esperados, uma vez que a temperatura ótima da enzima Lipozyme TL 100 é em 35°C, temperaturas menores acarretam queda de atividade e valores maiores uma possível desnaturação proteica e em ambos, perda de função. A quantidade de enzima é explicada pela fundamentação chave-fechadura, uma vez que quando há enzimas suficientes para o substrato do meio, a catálise acontece, e o excesso de enzima não prejudicou a catálise, conforme exposto nos gráficos (TU; LU; KNOTHE, 2017; JUNIOR, 2017; CORREIA; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2011).



Fonte: O autor.

Figura 12: Gráfico de superfície de resposta do DCCR 2² 3D

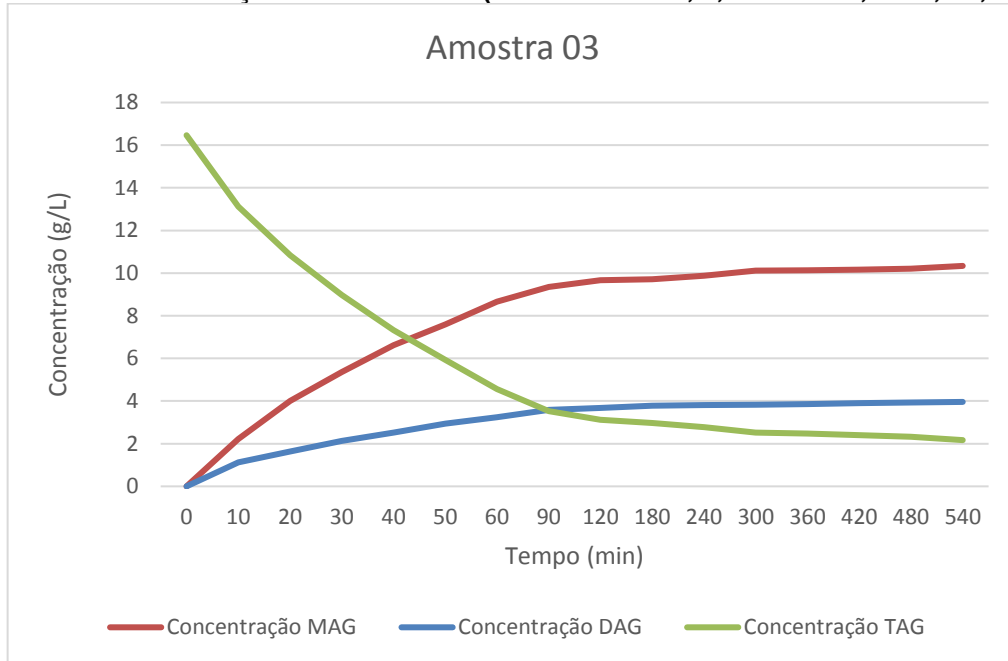


Fonte: O autor.

4.8 CINÉTICA DE REAÇÃO

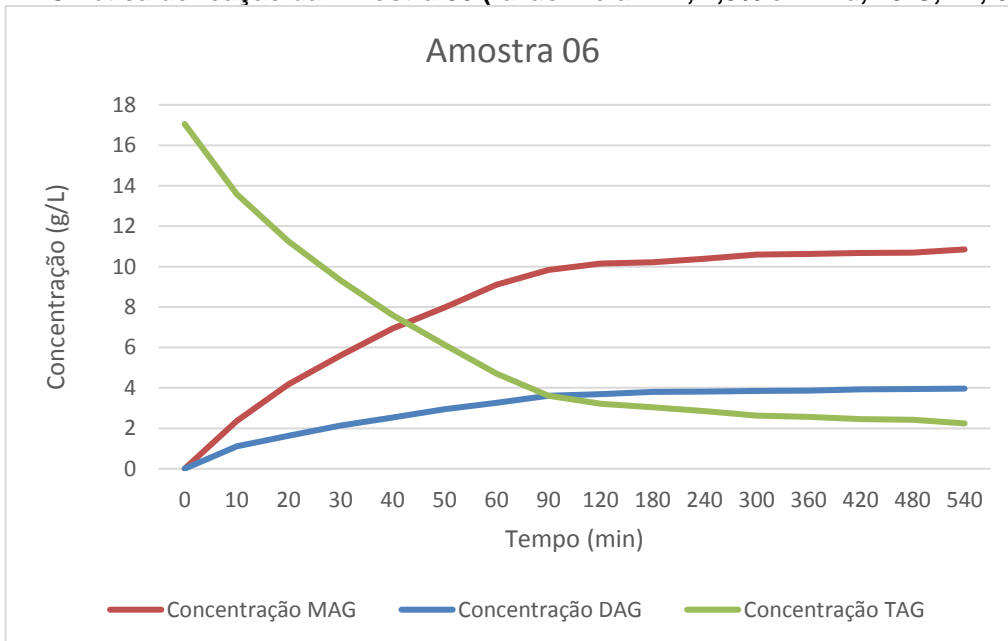
A fim de avaliar a cinética de reação, monitorou-se os pontos com maiores e menores eficiências, com retiradas de alíquotas de dez em dez minutos até a primeira hora de reação, e aumentou-se o intervalo para trinta minutos até a segunda hora, posteriormente, retirou-se as alíquotas de hora em hora até 9 (nove) horas de reação. Tal procedimento foi feito para as amostras 3,6,7,11 e 14, as condições de reação para essas amostras foram de razão molar 2:1 de glicerol:azeite, 45°C, 600 RPM, sendo que as variáveis foram o teor de enzima e de surfactante/co-surfactante, que podem ser observado na Tabela 05. A eficiência de conversão de TAG para MAG e DAG dessas amostras foram 86,83%; 86,84%; 94,18%; 96,77%; 98,93%, respectivamente. Os comportamentos das reações podem ser observados a partir das Figuras 13 a 17.

Figura 13: Cinética de reação da Amostra 03 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)

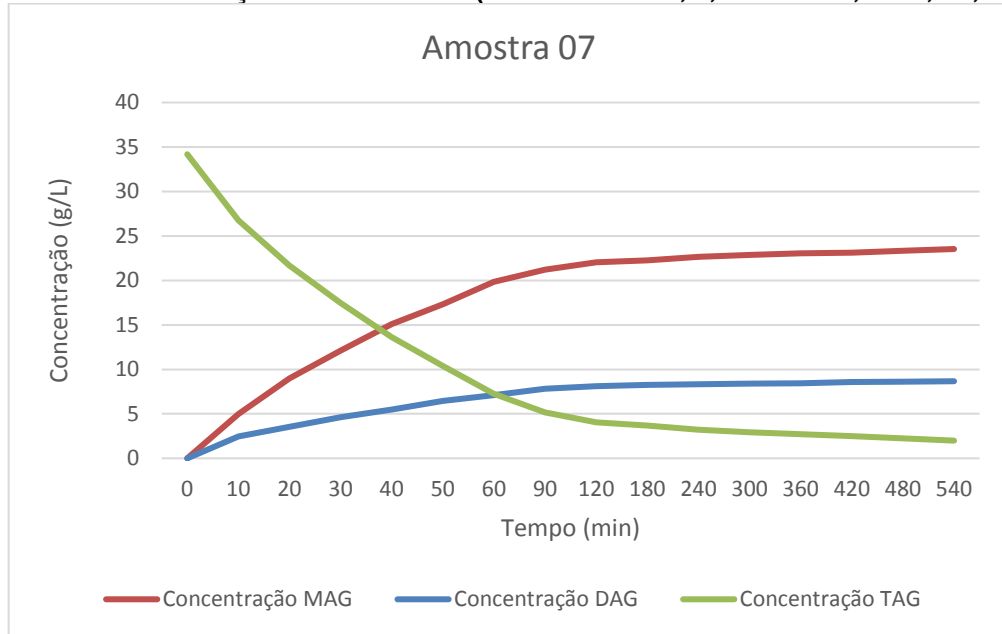


Fonte: O autor.

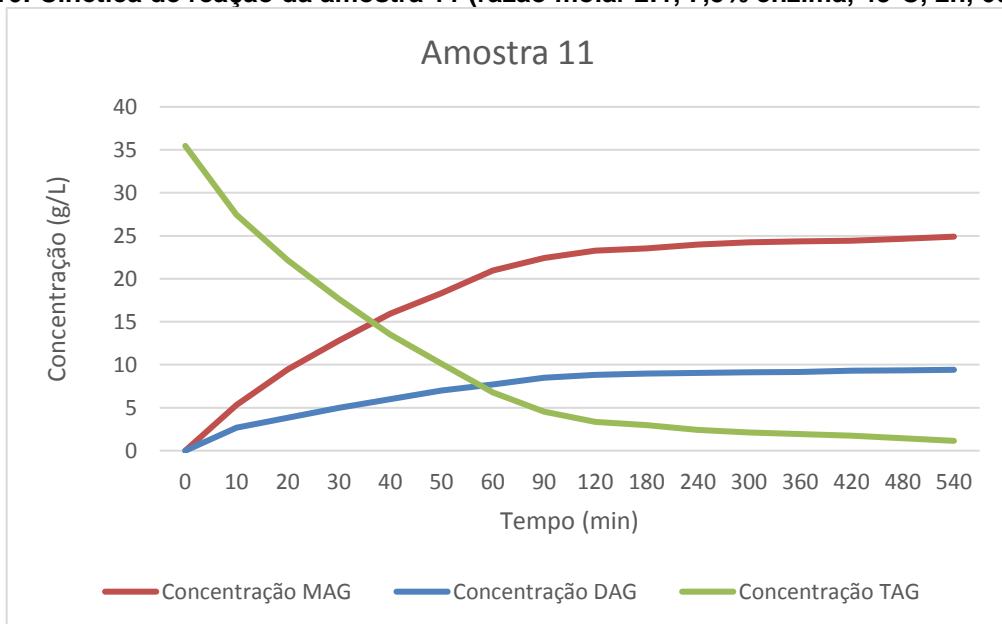
Figura 14: Cinética de reação da Amostra 06 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



Fonte: O autor.

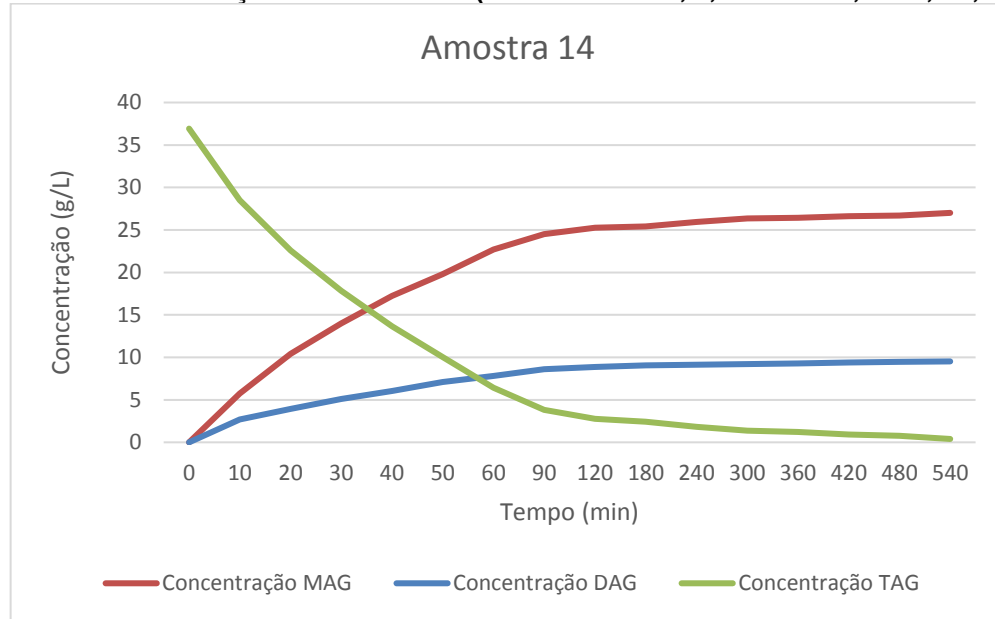
Figura 15: Cinética de reação da amostra 07 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)

Fonte: O autor.

Figura 16: Cinética de reação da amostra 11 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)

Fonte: O autor.

Figura 17: Cinética de reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



Fonte: O autor.

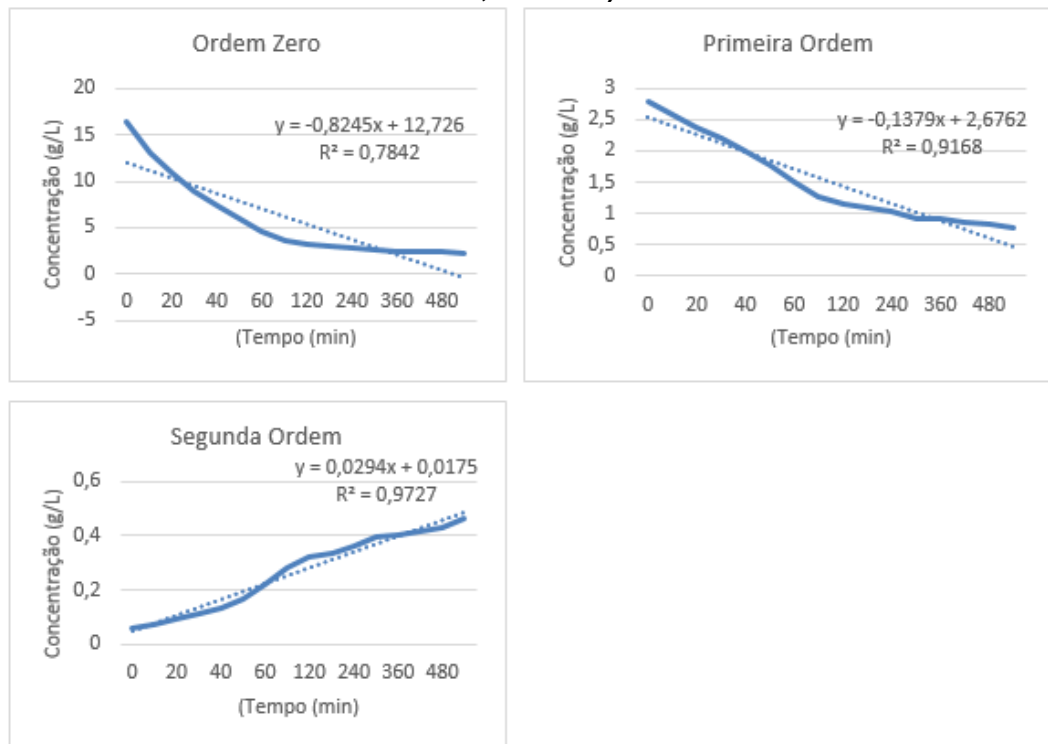
Com base nas figuras acima percebe-se nas amostras com menor rendimento, 03 e 06, a decomposição dos TAG diminuiu gradativamente entre os tempos 90 e 120 minutos, enquanto que nos outros pontos, de maior rendimento, ocorreu no tempo 60 a 90 minutos, o mesmo pode ser observado na produção de MAG e DAG, uma vez que, os produtos são formados a partir da decomposição do reagente. Isso pode ser observado nos trabalhos de Martínez et al., (2016), e de Fiametti (2009) que a formação de MAG e DAG se deram nos primeiros 120 minutos de reação, contudo, vê-se que no presente trabalho nesse mesmo período de tempo a taxa de conversão foi mais lenta até os 540 minutos a qual foram submetidos.

Além disso, a conversão superior a 98% das amostras acima citadas, nos indica que a reação realmente chegou ao final e que praticamente todo TAG foi convertido em MAG e DAG, portanto, obteve-se o objetivo proposto, com ênfase que em duas horas de reação é suficiente a alta eficiência obtida. Ainda analisando as curvas de cinética, percebe-se que tempos de 4, 5 ou mais horas de reação é inviável para a catálise e formação de MAG e DAG, pois nota-se que quando aproxima-se desses tempos de reação praticamente não há variação na curva. Portanto, pode-se dizer que a reação se estabilizou (CAI et al., 2016).

4.8.1 Determinação da Ordem de Reação

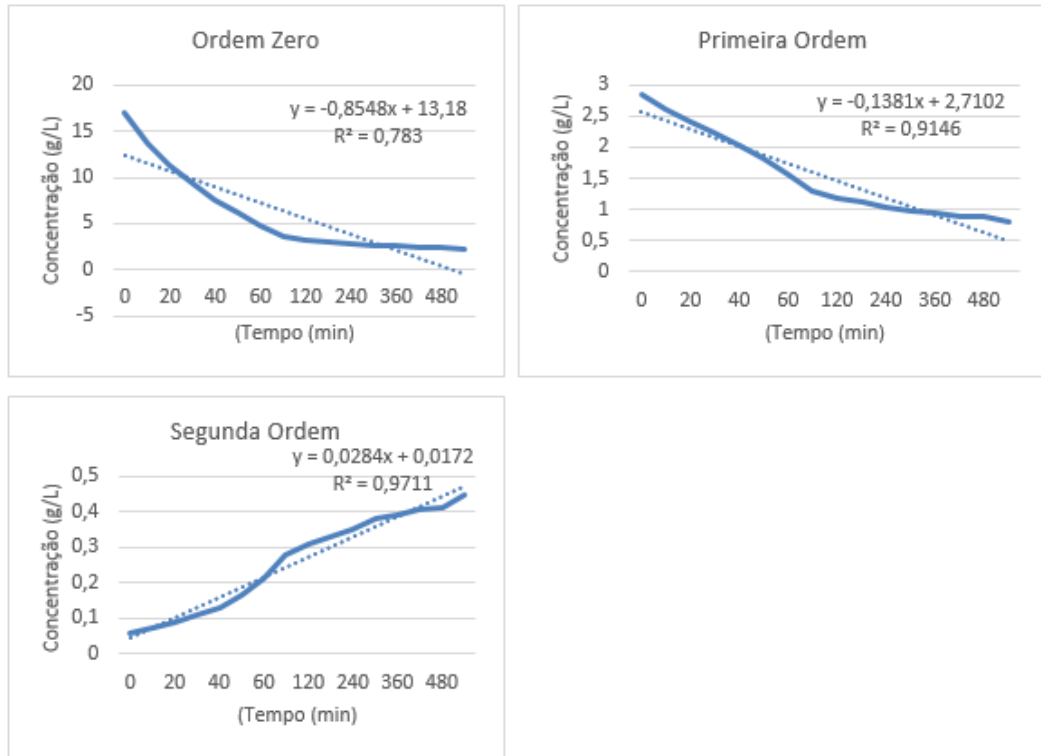
Para determinar a ordem de reação plotou-se gráficos de ordem zero ($C_f \times t$), um ($\ln C_f \times t$) e dois ($1/C_f \times t$) nos pontos monitorados pela cinética, amostras 03, 06, 07, 11 e 14. Utilizou-se tais testes, pois referem-se aos pontos que obtiveram maiores e menores eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG, portanto, considerou-se que as demais variações dos testes seguiram os mesmos parâmetros demonstrados nas Figuras 18 a 22.

Figura 18: Gráficos das ordens de reação da amostra 03 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



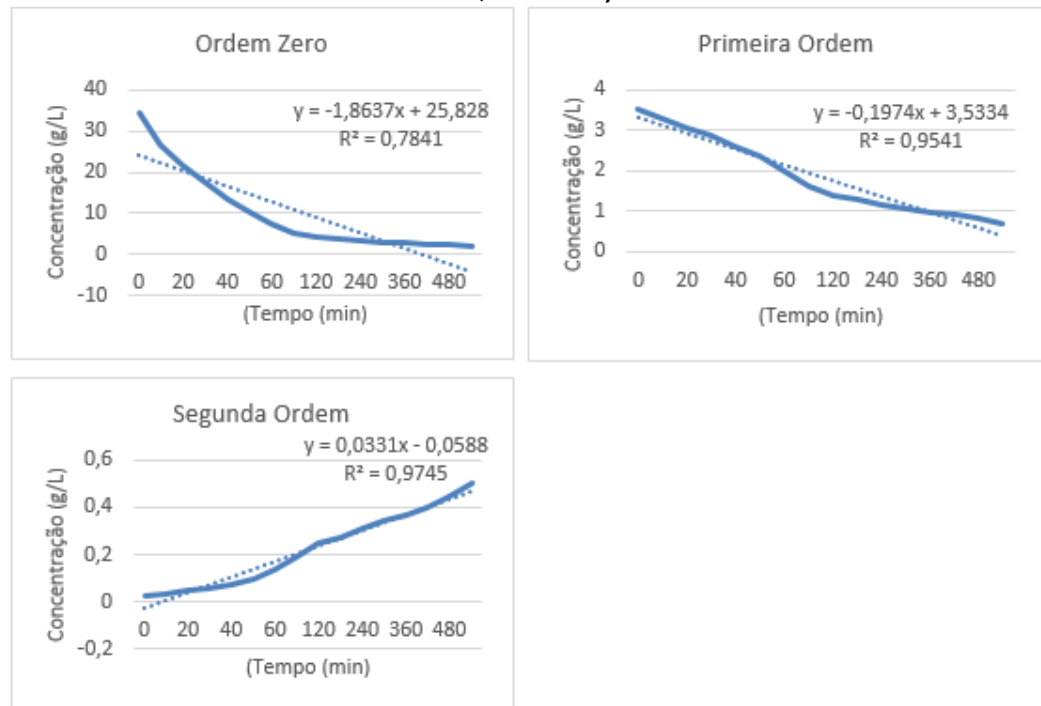
Fonte: O autor.

Figura 19: Gráficos das ordens de reação da amostra 06 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



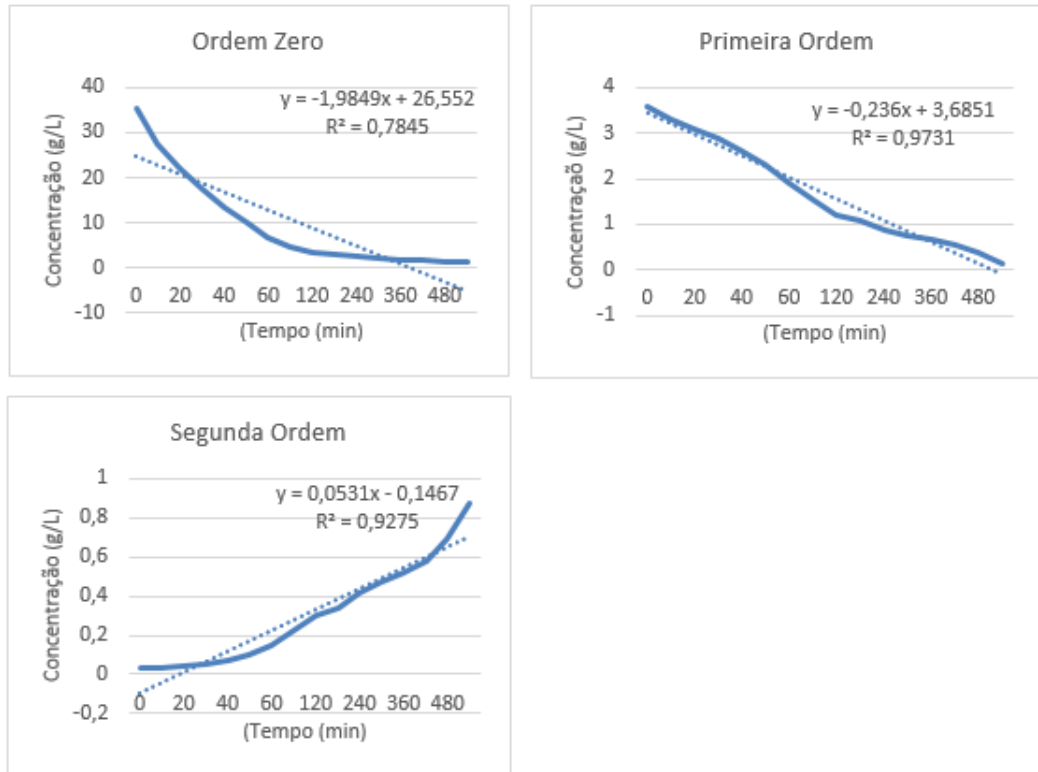
Fonte: O autor.

Figura 20: Gráficos das ordens de reação da amostra 07 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



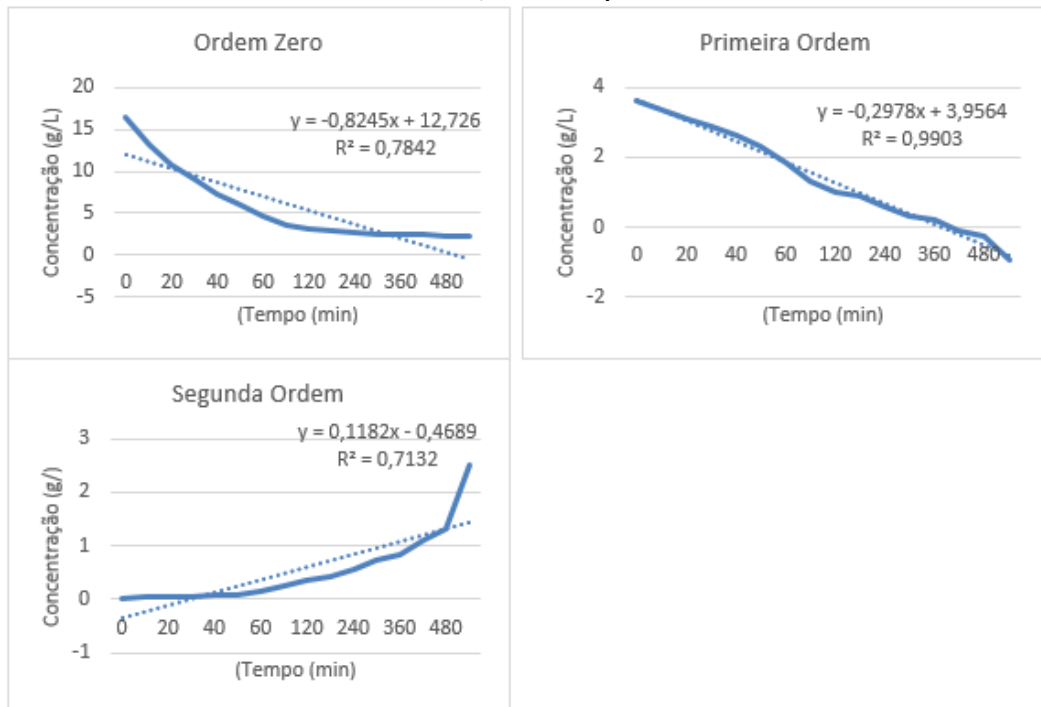
Fonte: O autor.

Figura 21: Gráficos das ordens de reação da amostra 11 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



Fonte: O autor.

Figura 22: Gráficos das ordens de reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C, 2h, 600 RPM)



Fonte: O autor.

Como pode ser observado nas Figuras 18 a 22, com referência ao coeficiente de determinação (R^2), o modelo mais explicativo é aquele que tem o valor mais próximo ao valor unitário, pode-se concluir que ao isolar e tratar os testes paralelamente, os experimentos 03, 06 e 07 apresentaram-se como reações de segunda ordem. Por sua vez, os modelos 11 e 14, os que apresentaram maiores eficiências, tiveram seus modelos mais lineares como uma reação de primeira ordem. Dessa forma, baseando-se nestas hipóteses, tem-se modelos de primeira ordem e de segunda ordem, contudo quando normalmente tem-se fase líquida e quando um dos componentes em geral é água ela participa da reação como reagente e como diluente, isso caracteriza um sistema chamado de pseudo-primeira ordem (SCHMAL, 2010).

De acordo com os estudos Wang et al., 2011, a ordem de reação de uma glicerólise enzimática normalmente é dada por uma reação de primeira ou de pseudo-primeira ordem. Ao correlacionar com o trabalho, obteve-se ordens de reação muito semelhantes ao estudo em questão, primeira e pseudo-primeira ordem. Isso é importante para monitorar o comportamento da reação e como os TAG são quebrados para a formação dos MAG e DAG. Além disso, analisando os gráficos das ordens, nota-se linearidades bastante altas para as ordens, com modelos com R^2 acima de 0,99 o que pode-se prever a ordem de reação com segurança, baseando-se nos resultados apresentados.

4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MICROEMULSÕES BEM-SUCEDIDAS

O monitoramento da atividade enzimática tem grande valia pois pode-se prever se a enzima manteve sua atividade durante a reação. A atividade nesse trabalho foi monitorada nas microemulsões bem-sucedidas, no planejamento fatorial 2^3 e no DCCR 2^2 . Assim, pode-se avaliar o comportamento dos pontos ótimos de reações em todos esses casos e pode-se delimitar parâmetros entre atividade e temperatura, concentração de enzima e tempo de reação, quando necessário.

Na atividade enzimática das microemulsões, obteve-se os resultados observados na Tabela 19. E o cálculo de atividade foi obtido pela Equação 02, todos descritos a seguir. A unidade de atividade é dada em $U.g^{-1}$.

Tabela 19: Tabela de atividade para as microemulsões após a glicerólise

Amostra	Atividade (U.g⁻¹)
Enzima	132,8886
A3	65,0835
A6	66,8331
A7	72,9162
A9	72,7704
A11	82,2151
A12	70,4943
A14	73,3941
A15	75,6054
A16	70,4457
A18	66,3228
A20	68,1939
A22	72,6732

Fonte: O autor.

Observando a tabela acima, nota-se que os pontos que obtiveram maiores atividades e menores atividades foram coerentes com seus rendimentos, ou seja, os pontos 3 e 6 mostrou-se com uma menor atividade enzimática, enquanto que o ponto 14 e 11 apresentou-se com os maiores valores. O resultado foi coerente com a eficiência, uma vez que a amostra 14 e amostra 11 apresentaram eficiência de conversão superiores a 95% e as amostras 3 e 6 na faixa de 80%, e foram as maiores e menores porcentagens, respectivamente. Isso é explicado pela ligação da atividade com poder de catálise e conseqüentemente formação de produtos, no caso, MAG e DAG, quanto maior for a atividade, maior será a conversão e vice-versa (KRUGER et al., 2011). Contudo, algumas amostras apresentaram atividades semelhantes, porém a conversão de TAG não foi tão elevada, como por exemplo a amostra 16, que apresentou atividade de 70,45 U.g⁻¹ e uma eficiência de conversão de 92,6%, mesmo sendo uma conversão alta é inferior a conversão da amostra 14. Isso é dado pelo fato das demais condições estarem fora dos pontos ótimos, com relação ao equilíbrio das MO, logo, as proporções entre óleo, água, surfactante e co-surfactante foram diferentes, por conseqüência, a ação da enzima na glicerólise também foi e apresentou tais diferenças (CAI et al., 2016).

Analisando o trabalho de Bornscheuer (2018) percebe-se que o autor estudou a utilização de enzimas para alterar as características do lipídeo, que é o que o

presente trabalho tem por objetivo, além disso, traz a aplicação de várias enzimas como as monooxigenases, hidratases e lipoxigenases. Nesse conceito, trouxe as atividades enzimáticas dessas enzimas e todas apresentaram a mesma característica básica, se o valor da conversão da reação foi mais alto, tende-se o valor da atividade enzimática também ser mais alto. Esses estudos do autor foram interessantes para encontrar uma forma de melhorar a engenharia das proteínas e poder conseguir informações sobre como os biocatalisadores podem ser otimizados nas mais diversas aplicações de quebra, nas mais diversas matrizes.

Além da aplicação no azeite de oliva, óleo de soja, óleo de chia, girassol e demais gorduras conhecidas, o autor trouxe uma nova aplicação que tem por objetivo produzir um ácido graxo poli insaturado através da utilização de uma enzima sobre uma fonte renovável, por consequência, abre-se uma nova vertente que pode ser utilizada e otimizada (BORNSCHEUER, 2018).

4.9.1 Atividade enzimática das amostras do planejamento 2³ e DCCR 2²

Os resultados da atividade enzimáticas do planejamento fatorial 2³ e delineamento DCCR 2², são descritos e podem ser analisados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente. A unidade de atividade é dada em U.g⁻¹, de volume em mL, de tempo em “s” e de concentração em mmol.L⁻¹ para ambas as tabelas.

A atividade, como dito, é um parâmetro importante para poder-se mapear o comportamento da enzima submetida a reação, no caso, a Lipozyme TL 100, portanto, tal parâmetro fora definido nesse intuito e aplicado tanto no planejamento quanto no delineamento justamente para notar o comportamento da enzima nas mais diversas condições de processo, de mínimos e máximos, extrapolados ou não, e também nos pontos ótimos.

Além disso, a atividade é um parâmetro interessante e adequado para monitorar o comportamento da enzima, pois normalmente é medida em termos de unidades de atividade, U ou UI, e pode ser definida como a quantidade de enzimas que é capaz de catalisar e modificar 1 µmol de substrato por minuto de reação, obviamente, seguindo as condições experimentais pré-estabelecidas. Dessa forma, a comercialização das enzimas é realizada em termos de atividade ou pela atividade específica, UI.mg⁻¹ de proteína (FERREIRA, 2017).

Tabela 20: Atividade enzimática do planejamento fatorial 2³

Amostra	Atividade (U.g⁻¹)
Enzima	132,8886
P1	66,3633
P2	72,2601
P3	60,4503
P4	61,9407
P5	68,3802
P6	73,305
P7	61,2684
P8	63,2853
P1'	66,8655
P2'	70,9641
P3'	59,5836
P4'	62,5158
P5'	66,8817
P6'	72,5436
P7'	62,3214
P8'	63,6984

Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 20 percebe-se que os pontos que tem maior atividade enzimática são os P2, P2', P6 e P6' e que também foi coerente com os resultados de conversão, já que foram as amostras que apresentaram conversões mais elevadas, acima de 95%. Enquanto que as amostras P3, P4, P7, P3', P4' e P7' apresentaram as menores atividades e também menores concentrações. Como dito, são valores previstos pois a atividade está relacionada com a ação da Lipozyme TL 100 e consequentemente com a conversão de TAG para MAG e DAG (MILLER et al., 1988).

Tabela 21: Atividade enzimática DCCR 2²

Amostra	Atividade (U.g⁻¹)
Enzima	136,489
A1	47,113
A2	49,029
A3	55,845
A4	60,779
A5	50,279
A6	40,832
A7	45,953
A8	68,713
A9	73,531
A10	73,959
A11	73,392

Fonte: O autor.

Na Tabela 21 referente a atividade das amostras do DCCR 2², percebe-se o mesmo padrão das demais análises de atividade, as amostras que tiveram maiores conversões também apresentaram maiores atividades enzimáticas, no caso, os pontos centrais A9, A10 e A11, que foram as condições consideradas ótimas na pesquisa. Já os pontos extrapolados do delineamento P6 e P7 se mostraram as menores atividades, devido quantidade de enzima ser insuficiente e/ou a temperatura fora dos pontos ótimos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho se mostraram de forma efetiva e satisfatória, no intuito de otimizar a conversão de TAG em MAG e DAG, via glicerólise enzimática na presença do surfactante Tween 80 e co-surfactante, butanol. Essa condição ótima foi encontrada no ponto central do delineamento DCCR 2², com temperatura do sistema de 35°C, 7,5% (v/v) de enzima Lipozyme TL 100, razão molar 2:1 (Gly:óleo) e tempo de reação de 2 horas a 600 RPM.

Dentre os pontos de MO submetidos a glicerólise enzimática, nas condições iniciais de razão molar 2:1, 2 horas de reação e 600 RPM, obteve-se conversões altas de TAG em MAG e DAG, superiores a 86% (amostras 03 e 06), inclusive uma conversão de quase 99% (amostra 14). A partir daí, utilizou-se a amostra 14 para posteriores planejamentos fatoriais e então determinação do ponto ótimo, inicialmente citado.

Obteve-se sucesso no estudo da influência da temperatura, tempo de reação e porcentagem de enzima no meio, para evidenciar a significância das variáveis, através do planejamento fatorial 2³, pois determinou-se que uma mudança leve nessas condições, altera consideravelmente a catálise dos TAG e obteve-se conversões de 73 a 99% de eficiência. O ponto com maior conversão foi o ponto central 06 nas condições de razão molar 2:1, 35°C, 2 horas de reação, 600 RPM e 7,5% de enzima com conversão de aproximadamente 99%. Destaca-se também o ponto 02 com 98% de eficiência, que utilizou razão molar 2:1, 35°C, 4 horas de reação, 600 RPM e 7,5% de enzima. Portanto, conclui-se que as três variáveis foram significativas para o processo, através da ANOVA e que a temperatura trouxe um efeito negativo para a reação.

Já no DCCR 2² a conversão variou de 66% a 98%, e foi possível determinar os pontos ótimos da reação através do gráfico de superfície de resposta, ditos no início desse capítulo. Os pontos de melhores conversões foram os pontos centrais 9, 10 e 11 que foram conduzidos a 35°C, com razão molar 2:1, 600 RPM, 2 horas de reação e 7,5% de enzima com eficiências superiores a 98%. Ou seja, traçou-se rotas de otimização das variáveis para poder-se chegar ao ponto ótimo, e obteve-se os resultados esperados, pode-se encontrar a melhor rota analítica e melhores condições de processo para as maiores conversões de TAG em MAG e DAG.

Com relação a cinética e ordem de reação, as metodologias empregadas também foram eficazes, uma vez que determinou-se em quanto tempo a reação começa a se estabilizar e a caracterizou-se a ordem das reações do sistema.

Ao analisar a atividade enzimática as amostras os estudos também foram satisfatórios, pois os teores de atividade estão relacionados a conversão de TAG para MAG e DAG pela ação da enzima Lipozyme TL 100, portanto, as maiores atividades foram das amostras com maiores conversões e vice-versa. Portanto, esse trabalho comprovou que o uso da Lipozyme TL 100 L nas condições otimizadas é eficiente para a obtenção dos emulsificantes MAG e DAG, mostrando-se uma alternativa para os processos convencionais.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos e apresentados neste trabalho, sugere-se a sequência de pesquisa para trabalhos futuros, com por exemplo, a utilização de outros surfactantes, por exemplo o AOT que é amplamente empregado em glicerólises enzimáticas. Com a utilização dos padrões majoritários presentes no azeite de oliva, assim, pode-se quantificar todos os picos dos cromatogramas, e por consequência monitorar o comportamento da reação por inteiro, com relação a concentração dos MAG, DAG e TAG individualmente, já que, no presente trabalho os seis padrões em teste foram quantificados de forma suficiente e satisfatória.

Seria interessante a utilização de outra enzima afim de comparar com a eficiência de conversão da Lipozyme TL 100, uma vez que a presente apresentou resultados realmente elevados em parâmetros de conversão, chegando a 98%, considerando a área de pico dos compostos. Pode-se também utilizar uma enzima imobilizada e testá-la nessas condições ótimas obtidas no presente trabalho e verificar a reutilização da mesma enzima com outras MO submetidas a glicerólise enzimática, afim de monitorar a atividade da enzima, se ela mantém a mesma atividade ou se diminui nas próximas reações. As enzimas a serem utilizadas pode ser comercial ou sintética, e imobilizadas em diversos suportes a fim de comparar a conversão de TAG em MAG e DAG, já que, sabe-se que o produto obtido é um produto nobre com propriedades emulsificantes.

A aplicação do produto obtido no presente estudo é um possível estudo que pode ser feito, afinal, obteve-se elevadas conversões e o produto não fora testado na produção de algum fármaco, alimento ou demais produto que venha a utilizar emulsificantes. Portanto, o estudo da toxicidade do emulsificante formado também é um viés interessante a ser abordado para, posterior utilização no lugar de emulsificantes comerciais, primeiro em ordem laboratorial, piloto e futuramente, industrial.

REFERÊNCIAS

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**, doi: 10.1002, 2018;

AOAC. Association of Official Agricultural Chemists - Official Method 993.24. **Triglycerides (by Partition Numbers) in Vegetable Oils**. Liquid Chromatographic Method. Oficial Method, 993.24, 1996;

ARAÚJO, Cynthia Kérzia Costa de. **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**. 2016. 81 f. Dissertação (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. **Editora Bookman**, 3ª Edição, Rio de Janeiro, p. 184-224, 2007;

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**. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG; 2010. Disponível em: <<http://www.congressosp.fipecafi.org/artigos102010/261.pdf>> Acesso em: 10 ago. 2017, as 09:35;

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

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-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;

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;

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. **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. 3336–7, 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, Paloma Souza. **Cinética enzimática da hidrólise do óleo de oliva em sistemas batelada e batelada alimentada**. 2014. 67 f. Dissertação (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. **Editora Manole**, ABDR, Barueri, São Paulo, p. 56-86, 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. Editora Interciência, p. 48-67, 2006.

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

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;

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;

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**, nº 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;

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. Anais da **14ª Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa**, CONGREGA URCAMP, 2017;

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**. v. 433, p. 25-33, Belgrado, Sérvia, 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;

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 a interfacial activation. **Journal of Molecular Biological**, v. 376, 109-119, 2008;

FELTES, Maria Manuela Camino. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe**. 2011. 223 f. Tese (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 catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Delft, v.44, p.8-13, 2007;

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. 02, n. 03, p. 90-93, 2013;

FERREIRA, Matheus Moreira. **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 (Engenharia Química). 2017. 97 f. 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**, vol 302, p. 233-241, 2017;

FIAMETTI, Karina Graziella. **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**. 2012. 122 f. Tese (Engenharia química). Programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012;

FIAMETTI, Karina Graziella. **Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de óleo de oliva na presença de surfactante**. 2009. 163 f. Dissertação (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;

FOCKING, Andriele Magarinos. **Estudo da hidrólise do óleo de soja catalizada pela enzima lipozyme TL IM**. 2017. 103 f. Dissertação (Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017;

FONSECA, Sthéphanie Baía Cancela. **Aspectos técnicos e avaliação de metodologia para o acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo derivado enzimático lipozyme TL IM**. 2015. 97 f. Dissertação (Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015;

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**. 2006. 89 f. Dissertação (Engenharia química). Programa de pós-graduação em engenharia química, UNICAMP, 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;

GAO, W.W.; ZHANG, F.X.; ZHANG, G.X.; ZHOU, C.H. 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**, vol. 19, nº 5, set/out 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, 421-430, 2008;

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. 05, n. 03, 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**, v. 38, n. 06, São Paulo, 2015;

GOUVINHAS, I.; ALMEIDA, J.M.M.M.; CARVALHO, T.; MACHADO, N.; BARROS, A.I.R.N.A. Discrimination and characterisation 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;

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;

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

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;

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;

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, Hares. **Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial**. 2017. 117 f. Tese (Tecnologia de Fermentações) - Programa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-16112017-171553/>>. Acesso em: 12/02/2018, as 17:00;

JUNIOR, Ivaldo Itabaiana. **Rotas biotecnológicas para síntese de monoacilgliceróis**. 2013. 266 f. Tese (Ciências farmacêuticas). Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, p. 32-46, 2013;

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**, Lavoisier Publishing. Paris, França, v. 2, p. 1432-1469, 1996;

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

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**. Editora Blucher, São Paulo, 1ª edição, p. 130-150, 2006;

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus sp.* e sua Aplicação na Síntese de Monoacilgliceróis**. 2003. 129 f. Tese (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, nº 3, p. 331-351, 2011;

KRUGER, Roberta Letícia. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva**. 2010. 154 f. Tese (Engenharia de alimentos). Programa de pós-graduação em engenharia química e engenharia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010;

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**. John Wiley & Sons Inc., Blucher, Eua, p.10-36, 2000;

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, Joana Filipa Figueiras. **Aplicação e definição de metodologias para melhoria contínua no processo de produção na área das margarinas**. 2015. 153 f. Dissertação (Tecnologia e segurança alimentar). Programa de pós-graduação em Engenharia Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT, Lisboa, Portugal, 2015;

LIMA, Rafaela Tavares. **Produção de células íntegras de *Penicillium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja**. 2017, 81 f. Dissertação (Engenharia química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017;

LIMA, Valéria Marta Gomes de. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. 2004. 168 f. Tese (Ciências biológicas). Programa de pós-graduação em bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004;

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;

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 rattfish 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 rattfish liver oil at stirred tank basket reactor: A kinetic approach. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 38-45, 2018;

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

MEHMOOD, T.; AHMAD, A.; AHMED, A.; AHMED, Z. Optimization of olive oil based O/W nanoemulsions 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;

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**. Editora Varela, São Paulo, 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;

MOURA, S.L.; LEAL, J.S.; SILVA, F.C.M.; SANTOS, J.A.V. Microestruturas da linha binodal e ties-lines do equilíbrio líquido-líquido de sistema ternário. **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Química – CBQ**, 2011;

MULLER, Rosana Louzada. **Obtenção de mono e diacilgliceróis via glicerólise enzimática como alternativa para aproveitamento da glicerina obtida na produção de biodiesel**. 2013. 67 f. Dissertação (Tecnologia ambiental). Programa de pós-graduação em concentração em gestão e tecnologia ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, 2013;

- 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, Brasil 2004;
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002;
- 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;
- 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, Brasil, 2016;
- RAIZER, Eduardo. **Uso de ultrassom na síntese de diacilglicerol via hidrólise enzimática de óleo de girassol**. 2015. 69 f. Dissertação (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 (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;
- 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;
- RUÍZ-GUTIÉRREZ, V.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. **Journal of Chromatography**. A. Amsterdam, v. 885, p. 321 – 341, 2002;
- 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, nº2, p.296-299, 2004;
- 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, nº1, p. 46-51, 2013;

SANTOS, Joanna Silva. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. 2011. 155 f. Dissertação (Engenharia química). Pós-graduação em engenharia química e engenharia de alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011;

SAUER, Ticiane. **Degradação fotocatalítica de corante e efluente têxtil**. 2002. 108 f. Dissertação (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**. Synergia, 2ª Edição, p. 75-148, 2010;

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 (3), p. 223-233. 2007;

SILVA, Leila Maria Santos da. **Avaliação voltamétrica da conversão do óleo de babaçu (*orbignya phalerata*) em biodiesel**. 2017. 102 f. Tese (Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017b;

SILVA, João Antônio Pessoa da. **Desenvolvimento de poliuretano empregando polioli de óleo de andiroba obtido via catálise enzimática**. 2017. 82 f. Dissertação (Engenharia química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017a;

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**, v. 38, nº 9, São Paulo, nov 2015;

SILVA, Rute Ribeiro da. **Desenvolvimento de soluções para aproveitamento de subproduto da produção de Biodiesel e outras matérias-primas com acidez livre**. 2015. 82 f. Dissertação (Engenharia química) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2015;

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. Cengage Learning, 9ª edição, Editora Trilha, p. 860-930, 2014;

SOLAESA, A.G.; SANZ, M.T.; BELTRÁN, S.; MELGOSA, R. Kinetic study and kinetic parameters of lipase-catalyzed glycerolysis of sardine oil in homogeneous medium. **Chineses Journal of Catalysis**, v. 37, p. 596-606, 2016;

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**. Editora Átomo, Campinas – SP, p. 20 – 45, 2008;

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

SU, E.; WEI, D. Improvement in lipase-catalysed 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, nº1, 2014;

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. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**, anais do evento, Unicamp, Campinas, São Paulo, 2015;

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, Alexandra. **Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes de grau alimentício em sistemas livre de solvente**. 2009. 83 f. Dissertação (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;

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J., HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: 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;

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. **Academic Press**, San Diego – California, EUA, Ed. 6, p. 863, 1992;

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;

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;

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

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;

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

ANEXO A

METODOLOGIA 993.24 AOAC

41.1.66

AOAC Official Method 993.24
Triglycerides (by Partition Numbers)
in Vegetable Oils

Liquid Chromatographic Method
 First Action 1993
 Final Action 1996

IUPAC-AOCS-AOAC Method

(Applicable to determination of triglycerides of long-chain fatty acids in vegetable oils.)

See Table 993.24 for the results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

Triglycerides in vegetable oils are separated according to equivalent carbon number by reversed-phase liquid chromatography and

refractometer, with full-scale sensitivity, at least 10^{-4} unit of refractive index; and recorder and/or integrator.

(b) *LC column*.—250 × 4.5 mm id stainless steel, packed with 5- μ m-diameter silica, reacted with octadecylsilane to obtain 22–23% carbon loading. (Lichrosorb RP18 Art 50333, Lichrosphere 100 CH18 Art 50377, E. Merck, Darmstadt, Germany, are suitable.)

C. Reagents

(a) *Solvents*.—Chloroform, acetone, and acetonitrile; LC grade.

(b) *Elution solvent*.—Acetonitrile–acetone; begin with 50 + 50 mixture and adjust proportions to obtain desired separation. Elution solvents may be degassed and recycled several times without effect on separations.

(c) *Solubilization solvent*.—Acetone or acetone–chloroform mixture (1 + 1, v/v).

(d) *Reference triglycerides*.—Use commercial triglycerides (tripalmitin, triolein, etc.), plotting retention times vs equivalent carbon number; or, alternatively, prepare reference chromatogram from soybean oil (see Figure 993.24A). Note: With several reference triglycerides (i), resolution (α) can be calculated with respect to triolein:

$$\alpha_i = \frac{RT'_i}{RT'_{\text{triolein}}}$$

using reduced retention time $RT'_i = RT_i - RT_{\text{solvent}}$. Determine retention values for all triglycerides of fatty acids contained in reference triglycerides (see Figure 993.24B) by graphing $\log \alpha$ vs n (number of double bonds).

detected by differential refractometry. Quantitation is by area normalization.

Elution order is determined by calculating equivalent carbon numbers, ECN, often defined as $CN - 2n$, where CN is carbon number and n is number of double bonds. To calculate ECN more precisely, origin of the double bond is taken into account.

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

where n_o , n_l , and n_{ln} are number of double bonds of oleic, linoleic, and linolenic acids, respectively, and coefficients d_o , d_l , and d_{ln} are calculated from reference triglycerides. Under conditions in this method, ECN approximates:

$$ECN = CN - (2.60 \times n_o) - (2.35 \times n_l) - (2.17 \times n_{ln})$$

B. Apparatus

(a) *Liquid chromatographic (LC) system*.—Equipped with thermostatic control of column temperature; 10 μ L injection unit; differ-

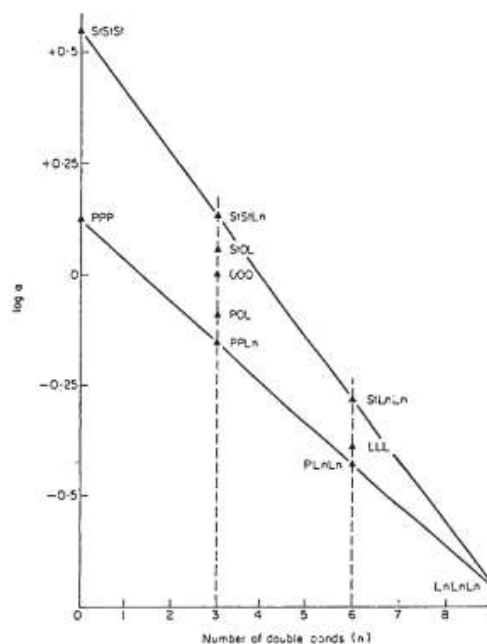


Figure 993.24B—Graph of $\log \alpha = f(n)$ where α is resolution of reference triglyceride with respect to triolein ($\alpha_i = RT'_i / PT'_{\text{triolein}}$) and n is number of double bonds in triglyceride. Graph determines retention values for all triglycerides of fatty acids contained in reference triglycerides.

Table 993.24 Interlaboratory study results for determination of triglycerides in vegetable oils, based on results from 2 studies, 16 and 18 laboratories

Test sample	ECN-40	ECN-42	ECN-44	ECN-46	ECN-48	ECN-50
Soybean oil						
Mean, %	8.2	25.5	31.0	21.6	10.7	1.5
RSD _r	3.4	1.8	1.3	3.5	7.3	14.5
RSD _R	6.7	3.5	3.9	4.3	9.5	71.7
r	0.8	1.3	1.1	2.1	2.2	0.6
R	1.6	2.6	3.4	2.7	2.9	3.1
Almond oil						
Mean, %	0.1	2.2	13.0	30.7	50.4	4.4
RSD _r	—	18.8	4.4	1.7	1.6	5.4
RSD _R	—	27.8	6.9	2.3	2.7	9.1
r	—	1.2	1.6	1.5	2.3	0.7
R	—	1.8	2.6	2.0	3.9	1.1
Sunflower oil						
Mean, %	0.3	29.4	38.4	22.5	8.2	1.3
RSD _r	21.4	1.8	1.2	1.6	10.7	37.0
RSD _R	70.4	3.2	3.4	2.4	11.7	92.6
r	0.5	1.5	1.3	1.0	2.5	1.4
R	0.6	2.7	3.7	1.6	2.7	3.4
Olive oil						
Mean, %	—	0.6	5.9	21.2	64.7	7.2
RSD _r	—	16.2	1.5	1.3	0.8	3.6
RSD _R	—	21.1	3.0	1.6	1.6	8.5
r	—	0.3	0.3	0.8	1.5	0.7
R	—	0.3	0.5	1.0	2.9	1.7
Rapeseed oil						
Mean, %	3.1	9.8	22.9	28.7	31.2	3.0
RSD _r	5.3	1.8	0.7	1.7	1.7	13.2
RSD _R	8.5	2.3	2.8	2.4	2.5	40.8
r	0.5	0.5	0.5	1.4	1.5	1.1
R	0.7	0.6	1.8	2.0	2.2	3.4
Palm oil						
Mean, %	—	—	3.3	22.1	64.7	9.4
RSD _r	—	—	8.1	2.3	1.2	9.6
RSD _R	—	—	16.2	2.8	2.3	9.6
r	—	—	0.8	1.4	2.3	2.5
R	—	—	1.5	1.8	4.2	2.5

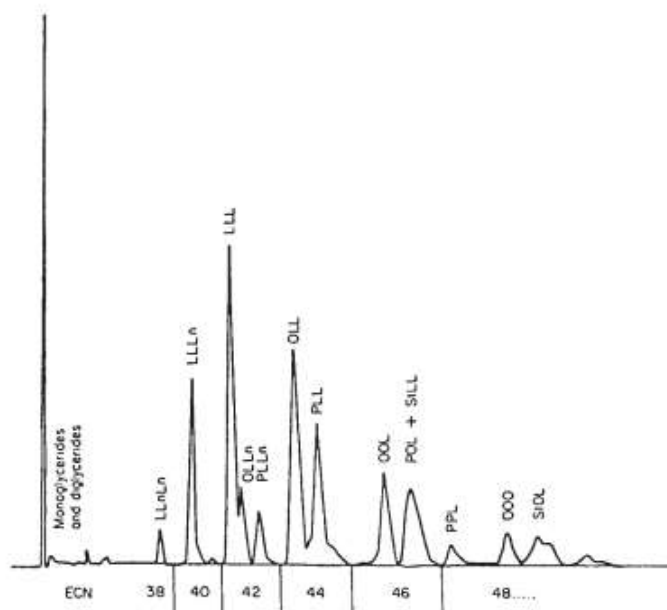


Figure 993.24A—Typical LC chromatogram for soybean oil as reference sample for identification of triglycerides: O, oleic acid; P, palmitic acid; L, linoleic acid; St, stearic acid; Ln, linolenic acid. Thus OOO represents triolein.

D. Sample Preparation

Accurately weigh 0.5 ± 0.01 g test portion to nearest 0.001 g into 10 mL graduated flask and dilute to volume with solubilization solvent, C(c).

E. Determination

Pump elution solvent, C(b), at 1.5 mL/min until stable baseline is obtained.

Inject 10 μ L of sample solution, D.

F. Calculation

Use graph from section C to identify triglycerides. Calculate triglycerides by area normalization, i.e., assume that sum of peak areas corresponding to various triglycerides equals 100%. Calculate relative percentage of each triglyceride to 1 decimal place, using formula:

$$\text{Triglyceride}_x, \% = \frac{\text{peak area}_{4x}}{\text{sum of all peak areas}} \times 100$$

References: *Rev. Fr. Corps. Gras* **30**, 279(1983).

Pure & Appl. Chem. **63** 1173(1991).

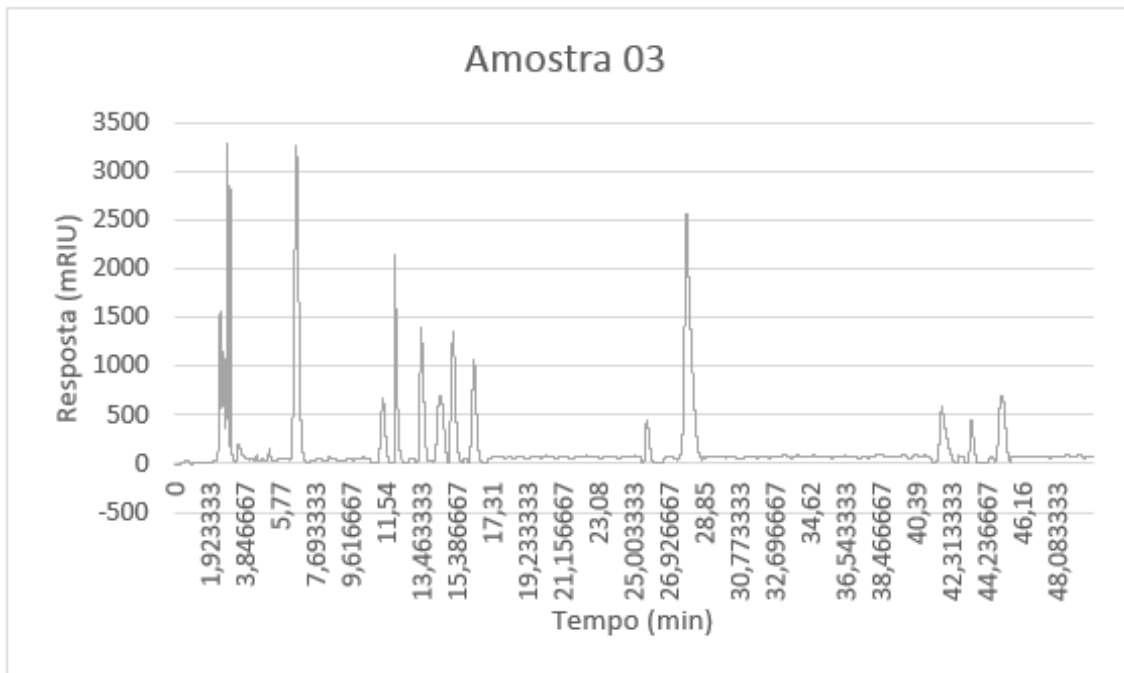
J. AOAC Int. **77**, 954 (1994).

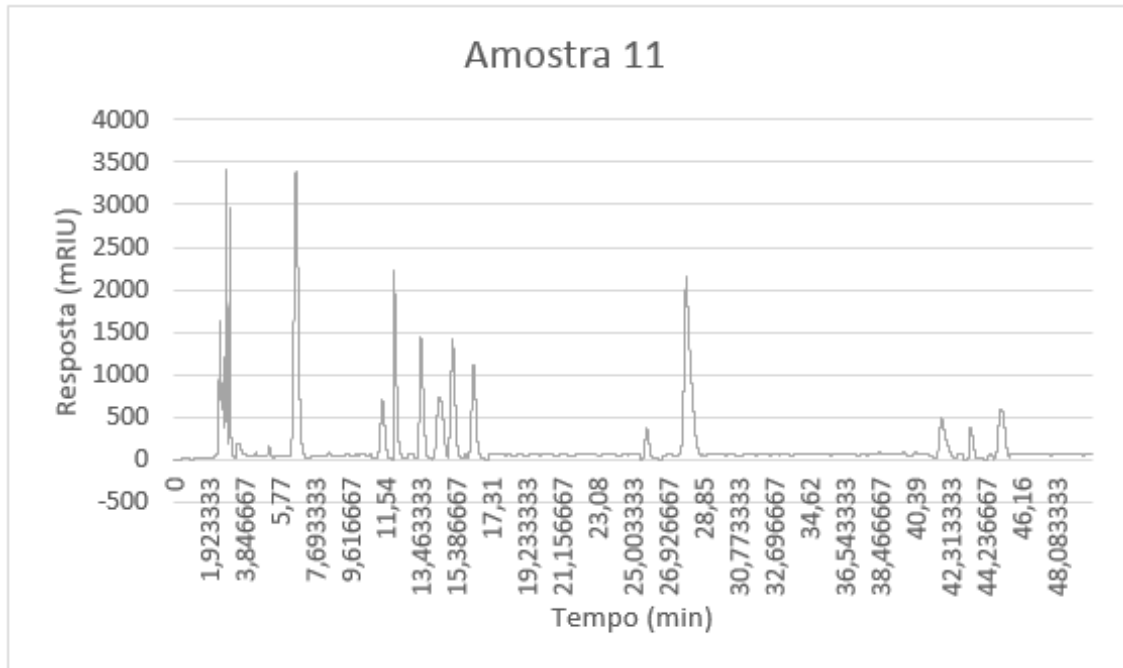
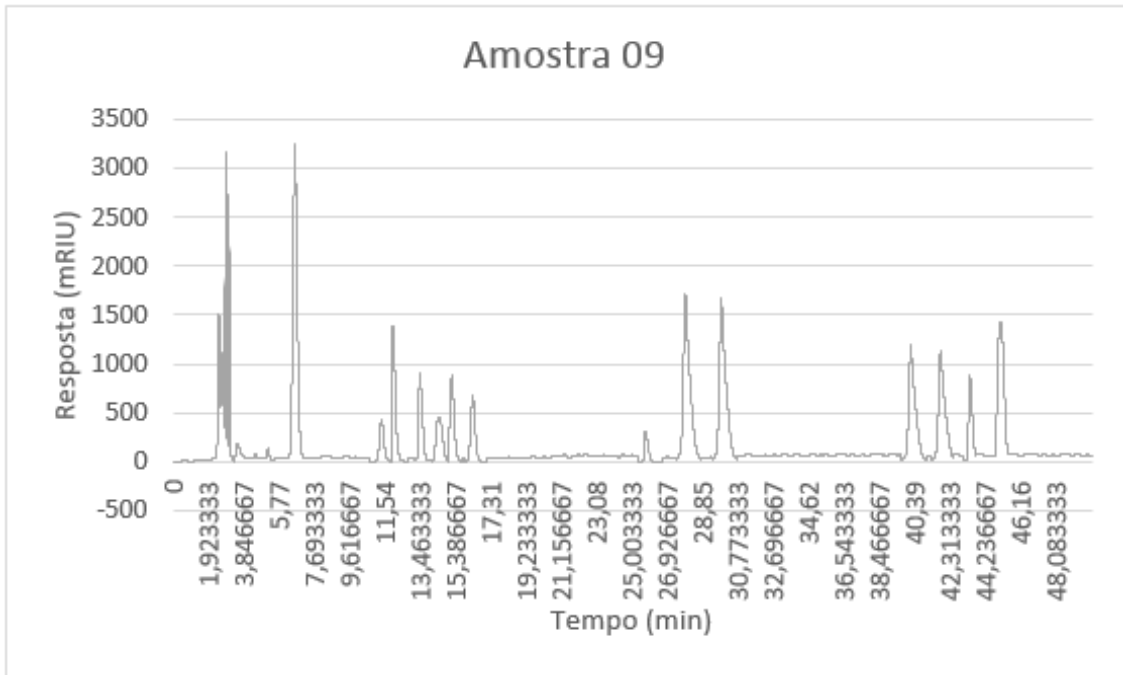
Revised: March 1997

APÊNDICE A

CROMATOGRAMAS

Neste anexo são apresentados, para exemplificar, alguns dos cromatogramas obtidos durante o estudo. Dentre eles são algumas das MO submetidas a glicerólise enzimática, ponto central, extrapolados do DCCR e pontos isolados da curva de calibração, para facilitar visualização dos resultados apresentados no decorrer do trabalho.





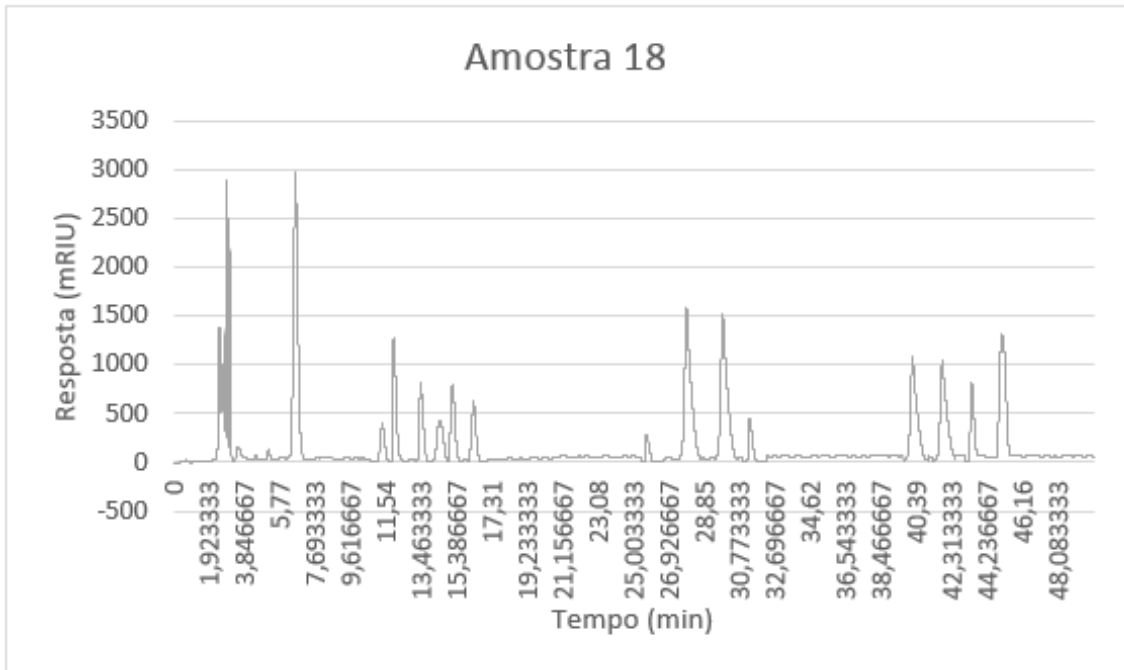
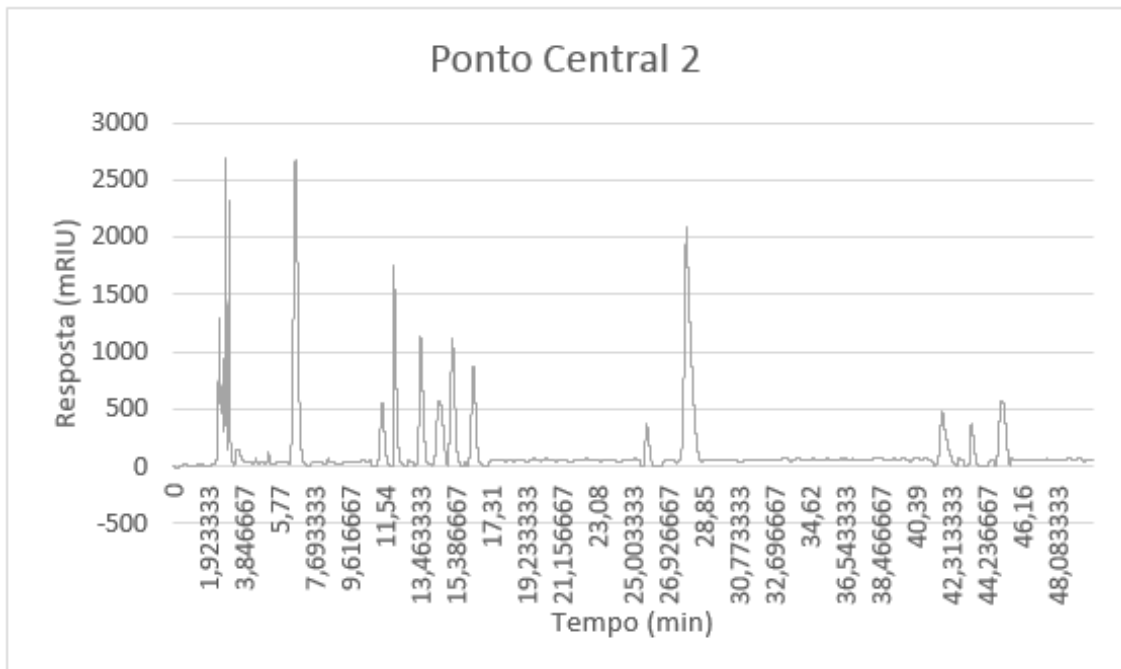


Figura 1 A – Cromatogramas da reação de glicerólise enzimática das MO 03, 09, 11 e 18 em um sistema onde a reação foi realizada a 45°C, com uma razão molar glicerol:azeite de oliva de 2:1, 7,5%(m/m) de enzima em 2 horas de reação sob agitação constante de 600rpm. A primeira região de aproximadamente 1,9 a 7,7 min refere-se a região do glicerol, de 11 a 17 min a região dos MAG, 25 a 29 min DAG e de 41 a 46 min corresponde a região dos TAG.



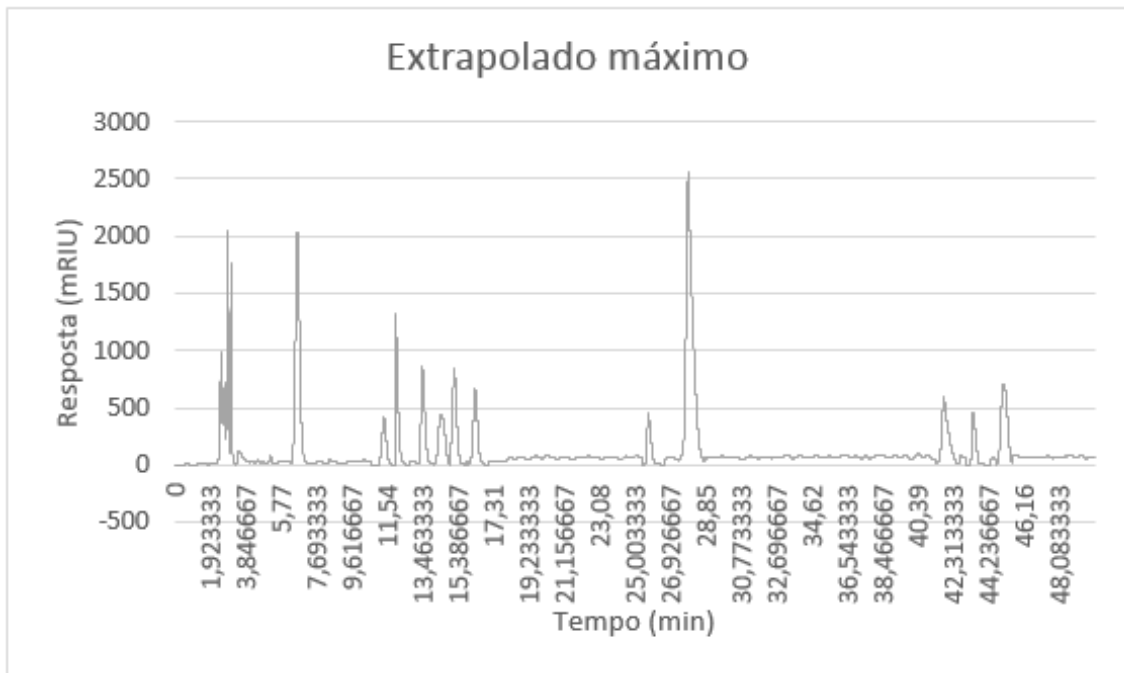
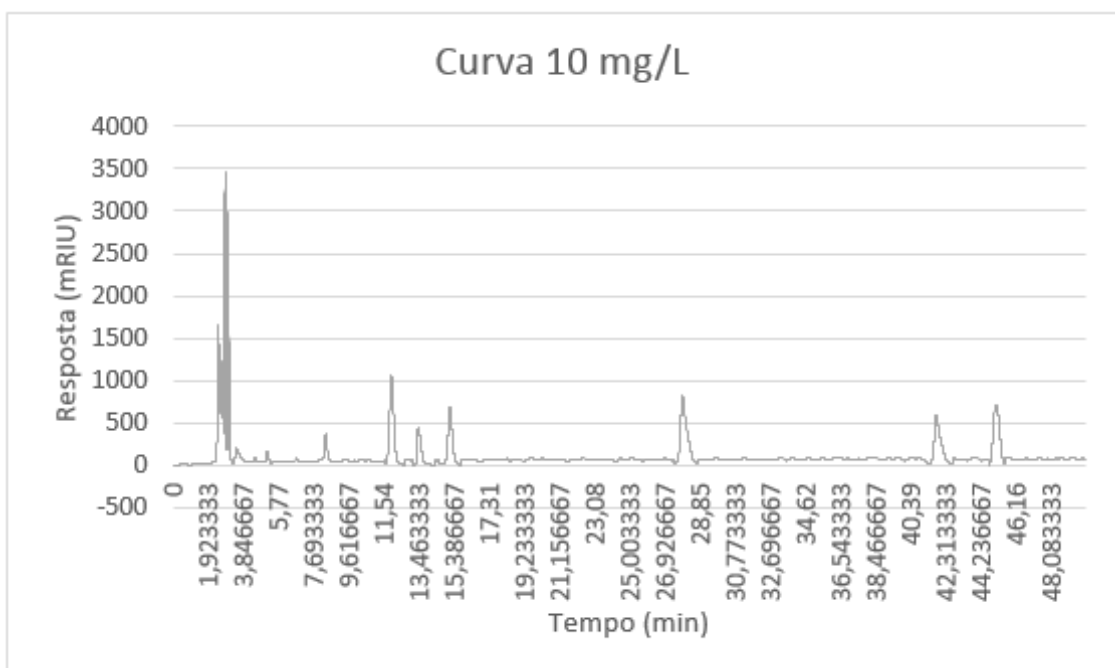


Figura 2 A – Cromatogramas da reação de glicerólise enzimática do Ponto central 02 e do valor extrapolado de máximo no DCCR 2^o, o primeiro a reação foi feita nas condições de 35°C, com uma razão molar glicerol:azeite de oliva de 2:1, 7,5%(m/m) de enzima em 2 horas de reação sob agitação constante de 600rpm, enquanto que o segundo fora realizado em 42°C, razão molar 2:1, 11,02% (m/m) de enzima durante 2 horas, a agitação constante de 600 RPM. Nos cromatogramas, a primeira região de aproximadamente 1,9 a 7,7 min refere-se a região do glicerol, de 11 a 18 min a região dos MAG, 25 a 29 min DAG e de 41 a 47 min corresponde a região dos TAG.



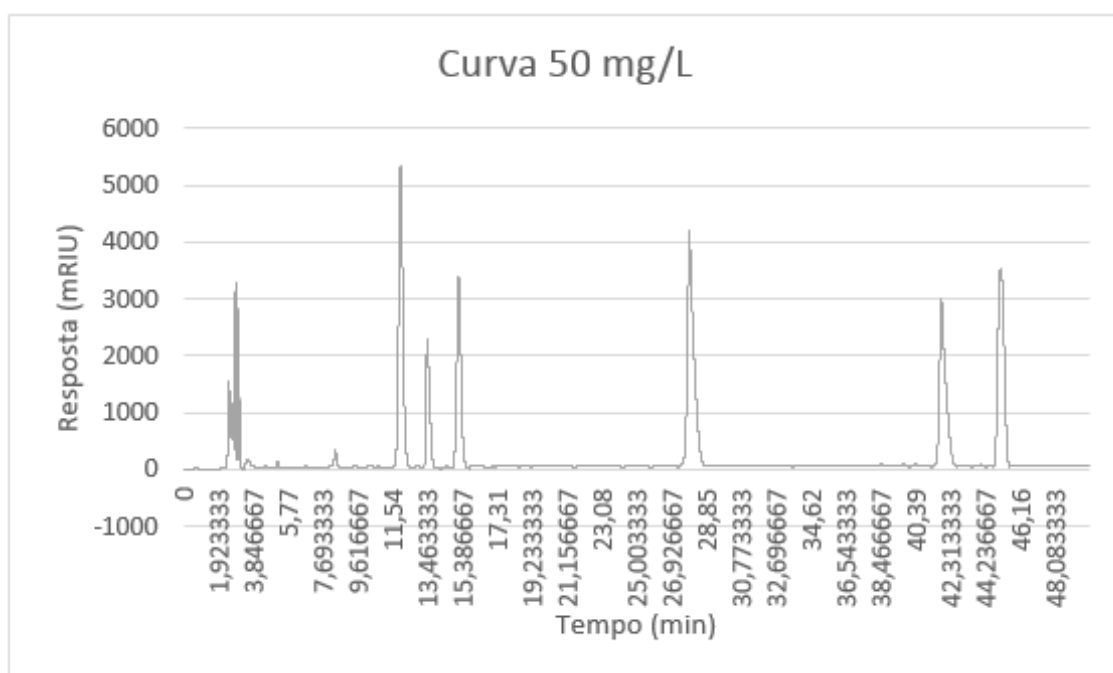


Figura 3 A – Cromatogramas da curva de calibração dos pontos de mínimo e máximo, 10 e 50 mg.L⁻¹, respectivamente, com a utilização dos seis padrões prepostos no trabalho. A primeira região de aproximadamente 1,8 a 3,9 min refere-se a região de estabilização do equipamento com a fase móvel de acetona/acetonitrila, 1:1, a região entre aproximadamente 11 e 16 min refere-se aos MAG, sendo eles os padrões de ácido oleico, linoleico e monopalmitol, o segundo padrão em aproximadamente 27 min é do padrão de DAG, dilinoleate, e os dois últimos picos entre 41 min e 46 min são referentes dos padrões de TAG, trioleate e trilinoleate.

APÊNDICE B

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Apresenta-se os gráficos da curva de calibração dos padrões de ácido linoleico, oleico, monopalmitico, trioleína, trilinoleína e ácido dilinoleico, nas concentrações de 10 a 50 ppm. Aplicou-se tais padrões na construção das curvas de calibração para posterior quantificação das amostras submetidas a glicerólise enzimática durante a pesquisa.

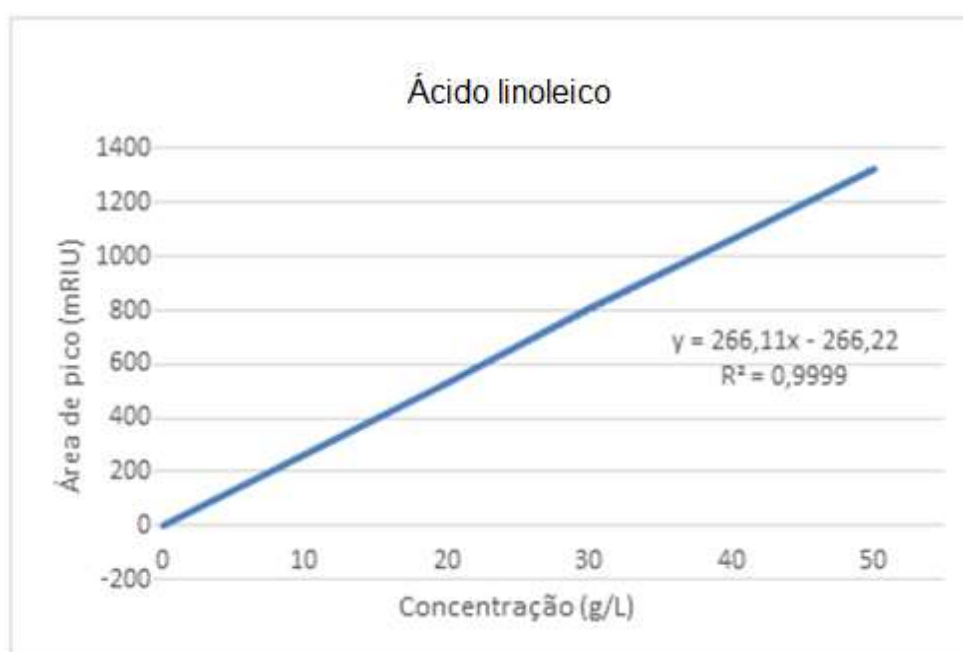


Figura 1 B - Curva de calibração do ácido linoleico

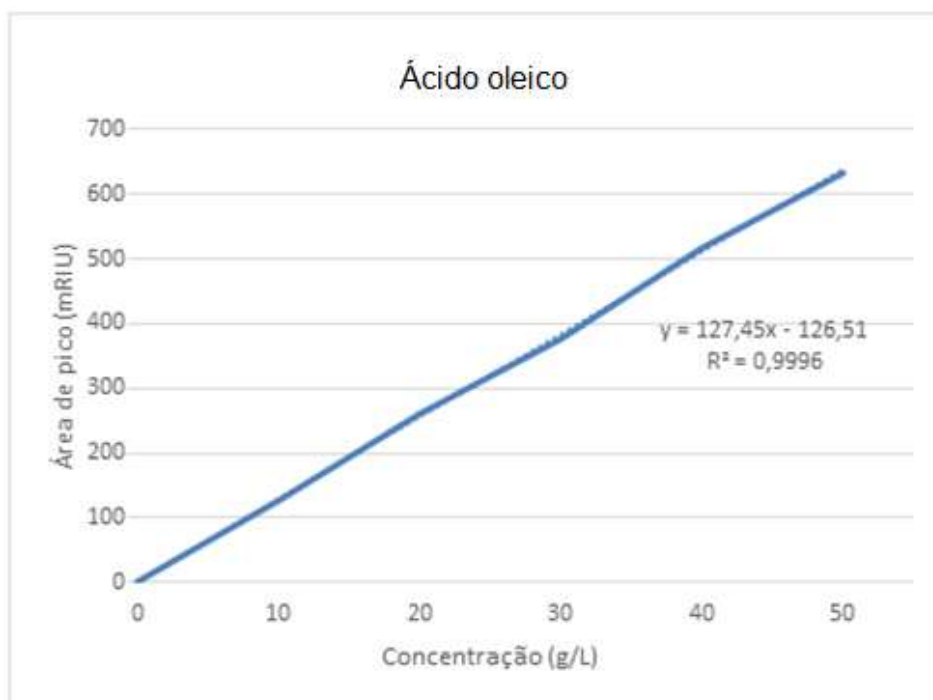


Figura 2 B - Curva de calibração do ácido oleico

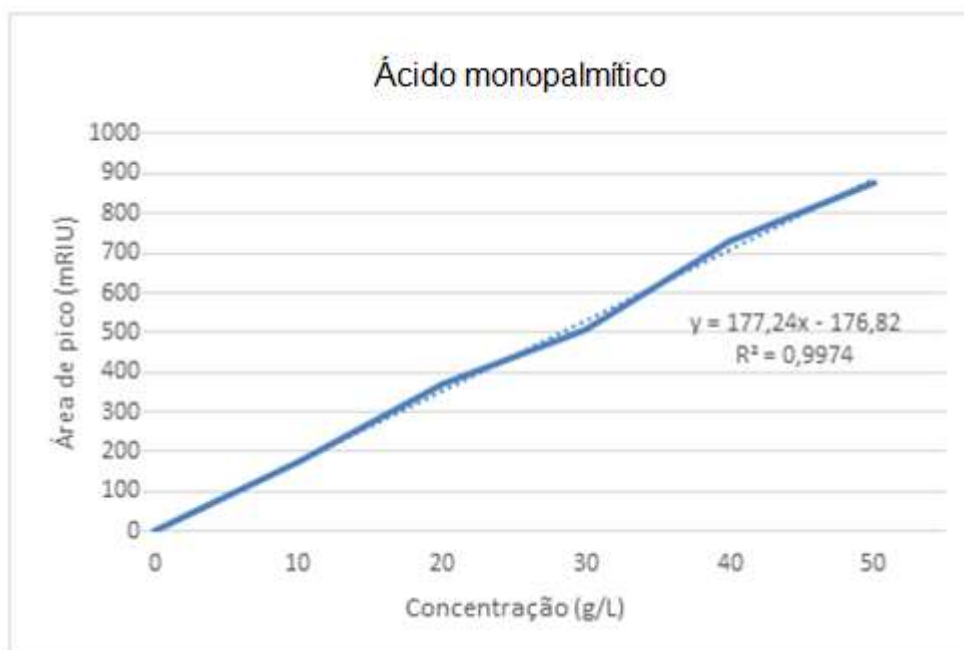


Figura 3 B - Curva de calibração do ácido monopalmitico

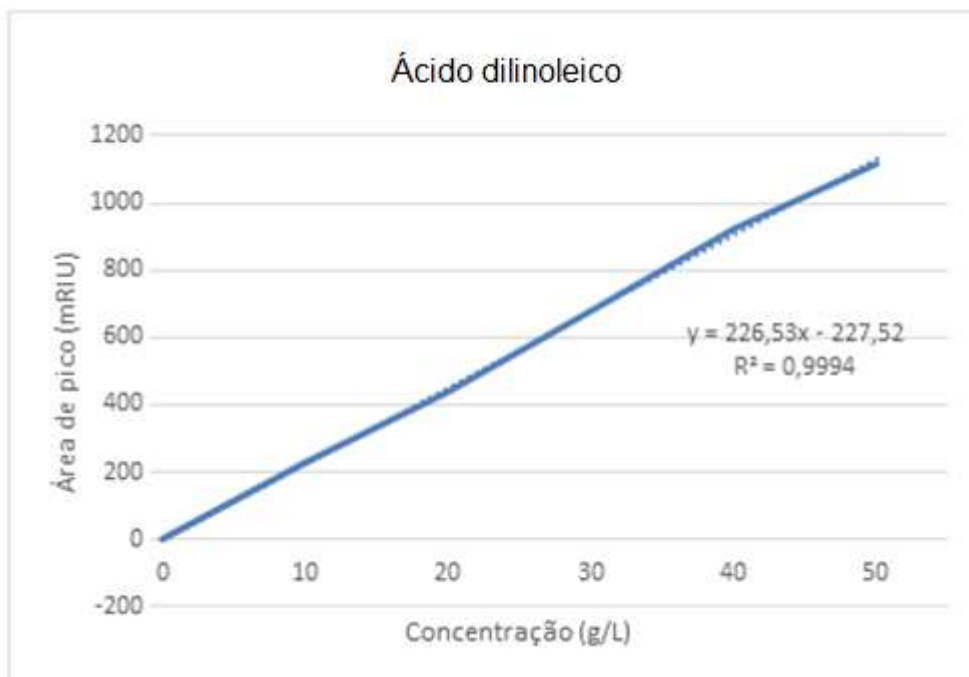


Figura 4 B - Curva de calibração do ácido dilinoleico

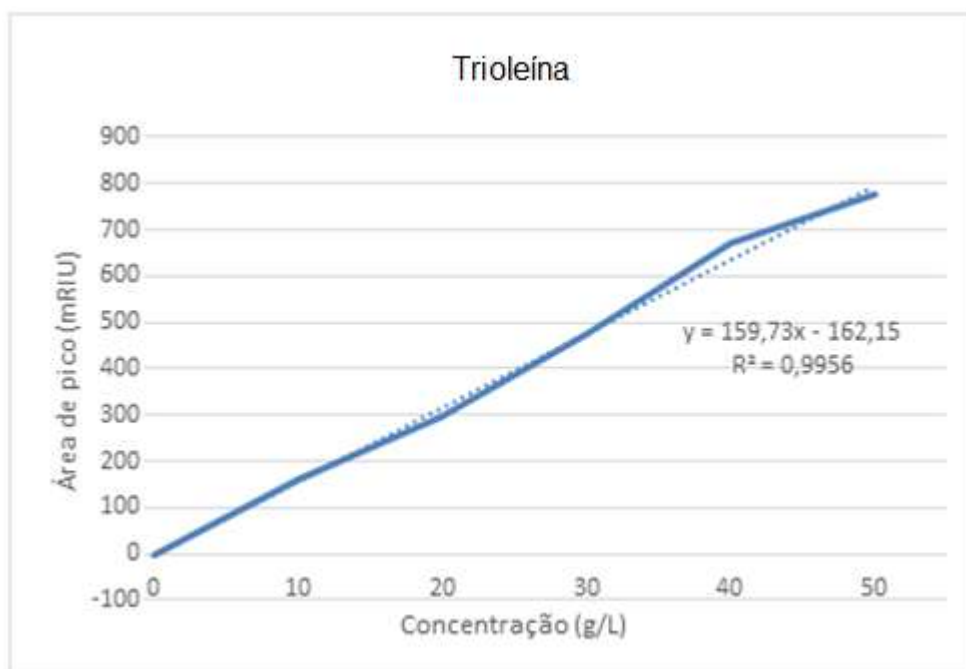


Figura 5 B - Curva de calibração da trioleína

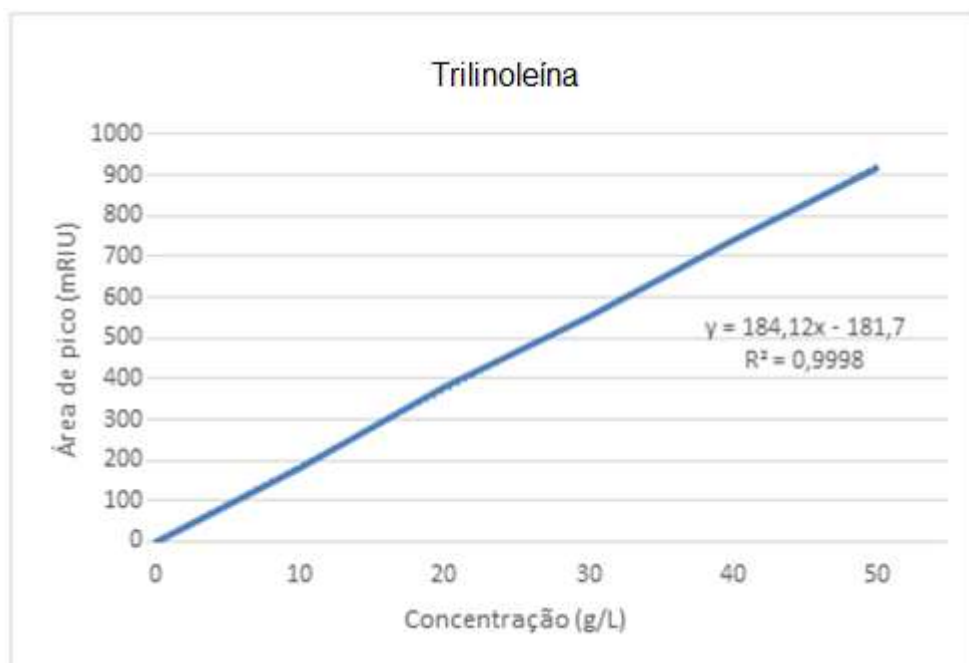


Figura 6 B - Curva de calibração da trilinoleína