UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LARISSA DE FREITAS

Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicerídeos

Lorena
2009

LARISSA DE FREITAS

Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicerídeos

Tese apresentada a Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Lorena

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Freitas, Larissa
Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicerídeos / Larissa de Freitas; orientadora Heizir Ferreira de Castro.—Lorena: 2009.

154 p: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Lipase 2. Glicerólise 3. Esterificação 4. Óleo de Babaçu. I. Título.

577.152.9 - CDU

DEDICATÓRIA

A minha família, mãe, pai e Lud, e também ao Kleber, com muito amor e gratidão por todo apoio, incentivo, compreensão, e paciência que dedicaram a mim, durante o longo período de desenvolvimento deste trabalho. Sem o apoio de vocês, com certeza, tudo seria mais difícil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida e por ter me permitido concluir este trabalho, apesar de todas as dificuldades encontradas. Muito obrigada por consentir a conquista de mais uma etapa em minha vida.

A Profa. Dra. Heizir F. de Castro que durante os anos de convivência, muito me ensinou, concedendo-me oportunidade, orientação e dedicação ao longo de todo o trabalho realizado.

Aos meus pais, Valtair e Angela, e a minha irmã Ludmila, pelo enorme apoio, incentivo e amor dedicado durante todo esse período e em toda a minha vida.

Ao Kleber pelo carinho, amor, incentivo e paciência nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do laborátorio: Adriano, Ariela, Aline, Ana Paula, André, Gisele, Grazielle, José Roberto, Karine, Lívia, Murilo, Natália, Patrícia e Weriton pela ajuda, amizade e ótima convivência.

Aos alunos Matheus e Daniel pela ajuda e contribuição para a finalização deste trabalho.

Aos doutores Júlio César dos Santos e Victor Haber Perez pelo auxílio dedicado durante a realização do trabalho.

A Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

FREITAS, L. **Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicerídeos**. 2009. 154 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

O objetivo desta tese se insere nas prioridades nacionais relativas à destinação do glicerol residual gerado na produção do biodiesel, tendo como proposta a produção enzimática de monoglicerídeos (MAG), surfatantes amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos. Foram avaliadas duas rotas enzimáticas para a obtenção de monoglicerídeos (glicerólise e esterificação) visando atingir uma elevada produção de MAG e permitir um aproveitamento total do glicerol formado como subproduto na geração do biodiesel. As lipases microbianas de *Burkolderia cepacia* (lipase PS) e *Penicillium camembertii* (lipase G) adquiridas comercialmente na forma solúvel foram imobilizadas em suporte híbrido SiO_2-PVA e usadas como catalisadores, respectivamente, para mediar as reações de glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com ácidos graxos de diferentes tamanho de cadeia carbônica e grau de insaturação (C_{12}-$C_{18:1}$). Independente da rota utilizada, concentrações mais elevadas de monoglicerídeos foram obtidas em reações conduzidas em regime de batelada. No caso da glicerólise verificou-se uma formação máxima de 60% de MAG correspondendo uma produtividade de 25 mg MAG/g meio reacional. h, para meios reacionais constituídos de glicerol e óleo de babaçu numa razão molar de 15:1 e incubados a 50°C. A manutenção de atmosfera inerte por inserção de nitrogênio no meio reacional foi considerada uma estratégia fundamental para prevenir a oxidação da matéria-prima lidípica e evitar efeitos inibitórios da atividade lipolítica da lipase. As condições estabelecidas para as reações de esterificação incluíram razão molar glicerol/ ácido graxo da ordem de 8:1 e temperatura de reação entre 45 a 60°C, dependendo do ácido graxo empregado (C_{12}-$C_{18:1}$). Concentrações de MAG entre 33-60% foram obtidas, sendo contatada uma elevada afinidade da lipase G pelo ácido láurico atingindo uma concentração de 60% de monolaurina em apenas 12 h de reação. O aquecimento por irradiação de micro-ondas não foi efetivo para ambas as rotas, em função da interferência do campo magnético na atuação catalítica e seletividade das enzimas, com redução acentuada do produto alvo (monoglicerídeos). As reações foram também conduzidas em regime contínuo utilizando reatores de leito fixo e leito fluidizado, sendo constatado um comportamento altamente satisfatório com relação à estabilidade operacional dos derivados imobilizados da ordem de 50 dias para a lipase PS e de 21 dias para lipase G, em testes conduzidos em presença de substratos e produtos. Entre os reatores testados, para as reações de glicerólise o reator de leito fluidizado forneceu valores mais elevados de MAGs (34%), apesar desse sistema experimental ainda requerer estudos adicionais. Os testes de esterificação em regime contínuo em reator de leito fixo ficaram limitados ao uso de meio reacional constituído por glicerol e ácido oléico em função da dificuldade de operar o sistema com ácidos graxos saturados (C12 a C18). Das estratégias investigadas para remover água formada como subproduto da reação de esterificação do glicerol e ácido oléico, a utilização de uma coluna extratora de umidade contendo peneira molecular foi a mais efetiva, fornecendo uma concentração da ordem de 31% de monooleina o que correspondeu uma produtividade de 22 mg MAG/g meio reacional. h. O enfoque desta proposta de trabalho permitiu associar preocupações ambientais e econômicas, além de usar óleo vegetal não comestível e o subproduto glicerol para produção de produto de maior valor agregado. Desenvolvimento experimental é ainda necessário neste campo de rápida evolução tecnológica.

Palavras-chave: Lipase, Glicerólise, Esterificação, Óleo de babaçu.

ABSTRACT

FREITAS, L. **Strategies for developing an efficient operational system for the enzymatic production of monoglycerides**. 2009. 154 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

The objective of this thesis fitted up with the National priorities in finding new utilization for glycerol generated as a by product in the biodiesel production, having as a proposal the enzymatic synthesis of monoglycerides (MAG), surfactants largely used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Two enzymatic routes were evaluated to produce monoglycerolysis (glycerolysis and esterification) aiming at attaining high MAG production and allowing total utilization of glycerol formed as by-product generated from biodiesel. Microbial lipases of *Burkolderia cepacia* (lipase PS) and *Penicillium camembertii* (lipase G) commercial purchased in soluble form were immobilized in an hybrid support SiO_2-PVA and used as catalysts to mediate, respectively, the glycerolysis of babassu oil and the esterification of the glycerol with fatty acids having different carbon chain size and unsaturation degree (C_{12}-$C_{18:1}$). High concentrations of monoglycerides were obtained for both enzymatic routes under batch reactions. In the case of the glycerolysis reaction and using starting materials at glycerol-oil molar ratio of 15:1 at 50ºC, maximum MAG formation (60%) was achieved corresponding to a productivity of 25 mg MAG/g reaction medium h. The maintenance of inert atmosphere by sparging nitrogen gas into the feeding medium was considered to be an essential strategy to avoid the oxidation of the feeding feedstock and the negative influence of the oxidized oil on both enzymatic activity and reaction rate. For esterification reactions, the established conditions included glycerol to fatty acid molar ratio at 8:1 and reaction temperature in the range from 45 to 60ºC, depending on the tested fatty acid (C_{12}-$C_{18:1}$). Concentrations of MAG varying from 33 to 60% were attained and the lipase G showed high affinity for lauric acid achieving concentration of about 60% monolaurine at 12 h reaction. Heating system by micro-wave irradiation was not effective for both routes since magnetic field negatively interfered on the catalytic performance and selectivity for both enzymes, with accentuated reduction for the target product (monoglycerides). The reactions were also carried out under continuous mode using fixed bed and fluidized bed reactors being verified a good behavior regarding the operational stability of the immobilized derivative at about 50 days for lipase PS and 21 days for lipase G, under tests performed in presence of substrate and products. Among the tested reactors for glycerolysis reactions, higher MAGs values (34%) were obtained using fluidized bed reactor and despite of the promise results, this reactor configuration still requests additional studies. The esterification tests under continuous mode in packed bed reactor was restrained for using feeding medium formed by glycerol and oleic acid to overcome limitations for operating the system with saturated fatty acids (C_{12}-C_{18}). The utilization of a water column extractor containing molecular sieve was the best investigated strategy to remove water formed as by-product in the esterification reaction of glycerol with oleic acid. Under optimized conditions, monooleine concentration of 31%, corresponding to a productivity of 22 mg MAG/g reaction medium.h was attained. The approach proposed in this work allow associating environmental and economical concerns in addition to the use of non-edible vegetable oil and a by-product "glycerol" for production of high added value compound. More work is still necessary in this fast-moving field.

Keywords: Lipase, Glycerolysis, Esterification, Babassu oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Formas isoméricas dos monoglicerídeos 19

Figura 3.2. Fluxograma geral da síntese de MAGs por glicerólise química. 22

Figura 3.3. Fluxograma geral da síntese de MAGs por glicerólise enzimática. 22

Figura 3.4. Síntese de monoglicerídeos por hidrólise catalisada por lipase 1,3-específica. 23

Figura 3.5. Obtenção de monoglicerídeos por glicerólise enzimática. 26

Figura 3.6. Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos. 30

Figura 3.7. Obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol protegido e ácido graxo. 33

Figura 3.8. Representação esquemática de equipamentos de destilação molecular 36

Figura 3.9. Mecanismo da oxidação lipídica. 39

Figura 3.10. Representação esquemática do processo sol-gel. 43

Figura 3.11. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA) 44

Figura 3.12. Considerações importantes para seleção do biorreator 47

Figura 3.13. Configurações de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas. 48

Figura 3.14. Aplicações gerais do glicerol 60

Figura 4.1. Esquema do procedimento experimental de preparo do suporte e imobilização da lipase. 65

Figura 4.2. Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fixo. 70

Figura 4.3. Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fluidizado 71

Figura 5.1. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu sob diferentes condições operacionais 76

Figura 5.2. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA nas diferentes condições ensaiadas de acordo com o planejamento experimental central composto ortogonal. 77

Figura 5.3. Superfície de resposta para a formação de monoglicerídeos de acordo com a Equação 5.1. 79

Figura 5.4. Montagem do sistema de reação empregado na glicerólise do óleo de babaçu (reator cilíndrico). 80

Figura 5.5. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator cilíndrico. 81

Figura 5.6. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada no reator cilíndrico. 81

Figura 5.7. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator cilíndrico sob atmosfera inerte. 82

Figura 5.8. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu sob atmosfera inerte em diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 11). 83

Figura 5.9. Distribuição dos produtos formados nas reações de glicerólise do óleo de babaçu sob atmosfera inerte catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA nas diferentes condições ensaiadas no planejamento fatorial 2^2 de face centrada. 84

Figura 5.10. Superfície de resposta para a formação de monoglicerídeos de acordo com a Equação 5.2. 86

Figura 5.11. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator cilíndrico empregando diferentes agentes antioxidantes e emulsificantes. 88

Figura 5.12. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos nas reações de glicerólises do óleo de babaçu sob diferentes condições operacionais: a) Controle 1, b) Controle 2(sob atmosfera inerte, c) BHT, d) tocoferol, e) lecitina e f) Triton-100X. 89

Figura 5.13. Distribuição dos produtos formados nas reações de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada empregando diferentes estratégias para evitar a oxidação (agentes antioxidantes) e promover melhor homogeneização (emulsificantes) do meio reacional. 92

Figura 5.14. Esquema da reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator de micro-ondas Discover (reator esférico) sob atmosfera inerte; (a) vista externa do reator e (b) vista da câmara interna. 92

Figura 5.15. Comparação da porcentagem mássica de monos, dis e triglicerídeos obtidos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS sob irradiação de micro-ondas e aquecimento convencional. 93

Figura 5.16. Esquema da reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator de micro-ondas Discover (reator cilíndrico) sob atmosfera inerte; (a) vista externa do reator e (b) vista da câmara interna. 93

Figura 5.17. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada em reator de micro-ondas sob agitação mecânica e atmosfera inerte. 94

Figura 5.18. Perfil de formação dos diferentes monoglicerídeos formados na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada em reator de micro-ondas, sob atmosfera inerte. 94

Figura 5.19. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise controle (isenta de N_2) do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, realizada em reator de micro-ondas..... 95

Figura 5.20. Comparação da formação dos monoglicerídeos obtidos nas glicerólises do óleo de babaçu catalisadas pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA em reator de micro-ondas (6h de reação). 95

Figura 5.21. Comparação de diferentes formas de aquecimento (convencional e irradiação de micro-ondas) utilizando lecitina de soja como agente antioxidante, na formação de monoglicerídeos. 96

Figura 5.22. Comparação de diferentes formas de aquecimento na glicerólise do óleo de babaçu na formação de MAG+DAG 97

Figura 5.23. Comparação de diferentes formas de aquecimento na glicerólise do óleo de babaçu na formação de MAG. 97

Figura 5.24. Choque entre diferentes moléculas causado pelo aumento da entropia devido a ação das micro-ondas, levando a formação de diglicerídeos. (a) moléculas de monoglicerídeos, (b) moléculas de diglicerídeos e (3) moléculas de triglicerídeos. 98

Figura 5.25. Esquema da reação de glicerólise em reator de leito fixo operado em regime contínuo, sendo o frasco de alimentação mantido sob atmosfera inerte, pelo acoplamento de uma bexiga contendo N_2. 99

Figura 5.26. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte: (a) fluxo ascendente e (b) fluxo descendente..... 100

Figura 5.27. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator de leito fixo operado em regime contínuo, com meio de alimentação mantido sob atmosfera inerte por meio de uma linha contínua de N_2. 101

Figura 5.28. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte (22 dias de operação). 102

Figura 5.29. Ajuste do modelo de desativação da lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA na formação de MAG na glicerólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 50 ºC. 103

Figura 5.30. Perfil de formação dos monoglicerídeos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte, empregando diferentes vazões volumétricas..... 104

Figura 5.31. Variáveis do estado estacionário da produção contínua de monoglicerídeos pela glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo, empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, como biocatalisador. 105

Figura 5.32. Perfil de formação dos monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu (controle e sob atmosfera inerte) empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA. 106

Figura 5.33. Dados ajustados à Correlação de Richardson; Zaki (1954), para a determinação da velocidade mínima de fluidização na glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado, (a) Condição 1 e (b) Condição 2 109

Figura 5.34. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator de leito fluidizado operado em sistema contínuo, empregando terc-butanol como solvente no meio de alimentação, sendo esta mantida sob atmosfera inerte (linha de N_2). 110

Figura 5.35. Perfil de formação dos mono e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte (Condição 1). 110

Figura 5.36. Perfil de formação dos mono e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fluidizado empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte, conduzida por 76 h (Condição 2). 111

Figura 5.37. Esquema da reação de esterificação realizada em reator esférico operado em sistema descontínuo 112

Figura 5.38. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA na faixa de temperatura de 45-65°C: (a) Ácido láurico, (b) Ácido mirístico, (c) Ácido palmítico, (d) Ácido esteárico e (e) Ácido oléico. 113

Figura 5.39. Perfil de formação dos monoglicerídeos na reação de esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos, realizada em reator esférico, empregando a lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. 114

Figura 5.40. Especificidade da lipase G em relação a formação dos monoglicerídeos provenientes de diferentes ácidos graxos formados nas reações de esterificação com glicerol realizadas em reatores esféricos. 115

Figura 5.41. Esquema da reação da esterificação do glicerol com ácido láurico realizada em reator de micro-ondas Discover. 116

Figura 5.42. Perfil do consumo do ácido láurico e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA a 50°C, sob irradiação de micro-ondas: (a) Razão molar = 3:1 (glicerol/ácido), (b) Razão molar = 5:1 (glicerol/ácido), (c) Razão molar = 8:1 (glicerol/ácido). 117

Figura 5.43. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e concentração de ácido láurico nas reações de esterificação do glicerol com ácido láurico catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando diferentes tipos de aquecimento..... 118

Figura 5.44. Perfil do consumo do ácido láurico e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação da Lipozyme IM^{20} a 50°C, sob irradiação de micro-ondas: (a) Razão molar = 3:1 (glicerol/ácido), (b) Razão molar = 5:1 (glicerol/ácido), (c) Razão molar = 8:1 (glicerol/ácido)..... 120

Figura 5.45. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e concentração de ácido láurico nas esterificações do glicerol com ácido láurico em diferentes condições reacionais, sob irradiação de micro-ondas. 120

Figura 5.46 Esquema da esterificação do glicerol com ácido láurico em meio terc-butanol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. 123

Figura 5.47. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e consumo do ácido láurico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando terc-butanol no meio reacional. 123

Figura 5.48. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico com glicerol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo. 124

Figura 5.49. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. 125

Figura 5.50. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico com glicerol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo, empregando peneira molecular no interior do biorreator. 126

Figura 5.51. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando peneira molecular no interior do biorreator. 127

Figura 5.52. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico e glicerol em 3 colunas em série operando em regime contínuo, empregando coluna extratora de umidade. 128

Figura 5.53. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando peneira molecular em coluna extratora de umidade. 129

Figura 5.54. Perfil de formação da monooleina na esterificação contínua, empregando diferentes estratégias para remover a água do meio reacional formada durante a reação. 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Exemplos de monoglicerídeos e suas principais aplicações 20

Tabela 3.2 - Síntese de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando diferentes métodos..... 24

Tabela 3.3 – Exemplos de processos para a obtenção de monoglicerídeos via hidrólise ou alcoólise enzimática..... 26

Tabela 3.4 - Exemplos de processos para a obtenção de monoglicerídeos via glicerólise enzimática..... 29

Tabela 3.5 - Métodos para formação seletiva de MAG em reações de esterificação..... 31

Tabela 3.6 - Obtenção de monoglicerídeos via esterificação enzimática do glicerol e ácidos graxos. 33

Tabela 3.7 - Vantagens e limitações do uso de solventes orgânicos 38

Tabela 3.8 - Exemplos de trabalhos realizados empregando a matriz de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA) como suporte de imobilização de diferentes fontes de lipase 45

Tabela 3.9 - Comparação das caracteríticas dos reatores de leito fluidizado e leito fixo..... 50

Tabela 3.10 – Exemplos de configuração de reatores enzimáticos empregados em reações mediadas por lipases..... 53

Tabela 3.11 - Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas 56

Tabela 4.1 - Nomenclatura e códigos dos padrões glicéricos utilizados para estabelecimento do método cromatográfico..... 62

Tabela 4.2 - Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fixo 63

Tabela 4.3 - Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fluidizado..... 63

Tabela 4.4 - Propriedades catalíticas da lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) imobilizada em SiO_2-PVA..... 66

Tabela 4.5 - Valores reais e codificados das variáveis independentes propostas no planejamento central composto ortogonal..... 66

Tabela 4.6 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2^2 com face centrada 66

Tabela 5.1 - Matriz do planejamento experimental central composto ortogonal (2^2 com pontos estrelas) e resultados obtidos 78

Tabela 5.2 - Estimativa dos efeitos para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento experimental central composto ortogonal para um nível de confiança 95% 78

Tabela 5.3 - Análise de Variância para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento central composto ortogonal 79

Tabela 5.4 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com face centrada e resultados obtidos 84

Tabela 5.5 - Estimativa dos efeitos para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95% 85

Tabela 5.6 - Análise da variância para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada 85

Tabela 5.7 - Porosidade do leito em função da velocidade de ascensão do fluido no reator de leito fluidizado para as duas condições ensaiadas. 109

Tabela 5.8 - Seletividade para a formação de monoglicerídeos nas reações de esterificações do glicerol com diferentes ácidos graxos 115

Tabela 5.9 - Seletividade para a formação de monolaurina nas reações de esterificações empregando aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas 119

Tabela 5.10 - Seletividade para a formação de monolaurina nas reações de esterificações empregando Lipozyme IM^{20} e Lipase G imobilizada em SiO_2-PVA 121

Tabela 5.11 - Estabilidade operacional da lipase Penicillium camembertii imobilizada em SiO_2-PVA nas esterificações contínuas realizadas em reator de leito fixo. 130

Tabela 5.12 - Resumo dos testes realizados para a síntese de monoglicerídeos produzidos por glicerólise e esterificação enzimática em regime descontínuo 133

Tabela 5.13 - Resumo dos testes realizados para a síntese de monoglicerídeos produzidos por glicerólise e esterificação enzimática em regime contínuo 134

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVO 18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
3.1. Monoglicerídeos 19
3.2. Métodos de obtenção de monoglicerídeos (MAG) por via enzimática 23
3.2.1. Hidrólise ou Alcoólise 23
3.2.2 Glicerólise de triglicerídeos 26
3.2.3. Esterificação do glicerol com ácidos graxos 30
3.3. Métodos para purificação de MAGs 34
3.4. Meios reacionais 37
3.5. Antioxidantes 38
3.6. Lipases 40
3.7. Suportes para imobilização de lipases 41
3.7.1. Suportes híbridos 42
3.8. Biorreatores com enzimas imobilizadas 47
3.8.1.Reatores de tanque agitados 48
3.8.2. Reatores de leito fixo e fluidizado 49
3.8.3. Reatores com membrana 52
3.9. Micro-ondas 54
3.9.1. Diferenças do aquecimento convencional comparado ao aquecimento sob irradiação de micro-ondas 54
3.9.2. Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas 55
3.10. Matérias Primas 57
3.10.1. Óleo de babaçu 58
3.10.2. Glicerol 59
4. MATERIAIS E MÉTODOS 61
4.1. Materiais 61
4.1.1. Enzimas 61
4.1.2. Materiais de partida 61
4.1.3. Suporte de imobilização 61
4.1.4. Outros reagentes 61
4.1.5. Padrões cromatográficos 61
4.1.6. Coluna capilar 62
4.1.7. Biorreator de leito fixo 62
4.1.8. Biorreator de leito fluidizado 63
4.1.9. Reator de micro-ondas 64
4.2. Metodologia Experimental 64
4.2.1. Preparação do suporte híbrido (SiO_2-PVA) 64
4.2.2. Imobilização das lipases no suporte ativado 65
4.2.3. Planejamento estatístico 66
4.2.4. Densidade cristalina do suporte 67
4.2.5. Velocidade mínima de fluidização 67
4.2.6. Produção de monoglicerídeos 68
4.2.6.1. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu 68
4.2.6.2. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu em reator de micro-ondas 69
4.2.6.3. Glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo 69
4.2.6.4. Glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fluidizado 70
4.2.6.5. Esterificação descontínua do glicerol com ácidos graxos 71
4.2.6.6. Esterificação descontínua sob irradiação de micro-ondas 72

4.2.6.7. Esterificação em reator de leito fixo em regime contínuo 72
4.2.7. Separação dos produtos formados nas reações de glicerólise e esterificação 73
4.3. Métodos de Análises 73
4.3.1. Método cromatográfico para dosagem de glicerídeos 73
4.3.2. Atividade hidrolítica 73
4.3.3. Atividade sintética 73
4.3.4. Análise da viscosidade dos meios reacionais 74
4.3.5. Teor de umidade 74
4.3.6. Cálculo da seletividade na reação de esterificação 74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
5.1. Reações de glicerólise 75
5.1.1. Reações de glicerólise descontínuas do óleo de babaçu 75
5.1.1.1. Síntese de monoglicerídeos via glicerólise enzimática do óleo de babaçu: Maximização por planejamento de experimentos 75
5.1.1.2. Estudo da geometria do reator na síntese de monoglicerídeos via glicerólise enzimática do óleo de babaçu 80
5.1.1.3. Influência da atmosfera inerte na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu: Maximização por planejamento de experimentos 82
5.1.1.4. Influência da ação de diferentes agentes antioxidantes e emulsificantes na glicerólise do óleo de babaçu 87
5.1.1.5. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu assistida por irradiação de micro-ondas 92
5.1.2. Glicerólises contínuas do óleo de babaçu 99
5.1.2.1. Glicerólises contínuas realizadas em reator de leito fixo 99
5.1.2.1.1. Influência da orientação do fluxo de alimentação (ascendente ou descendente) 99
5.1.2.1.2. Estabilidade operacional do derivado imobilizado na glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fixo 100
5.1.2.1.3. Limites de operação do reator de leito fixo na reação de glicerólise do óleo de babaçu em meio isento de solvente 104
5.1.2.1.4. Atuação da lecitina de soja como agente antioxidante nas reações de glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo 106
5.1.2.2. Reações de glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado em regime contínuo 107
5.2. Reações de esterificação 112
5.2.1. Esterificação descontínua do glicerol com ácidos graxos 112
5.2.1.1. Influência do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação do ácido graxo na síntese de MAG via esterificação 112
5.2.1.2. Esterificação descontínua do glicerol com ácido láurico em reator de micro-ondas 116
5.2.2. Esterificação contínua do glicerol com ácidos graxos 121
5.2.2.1. Esterificação contínua do glicerol com ácido láurico 121
5.2.2.1.1. Esterificação contínua do glicerol com ácido láurico empregando terc-butanol como solvente no meio de alimentação 122
5.2.2.2. Esterificação contínua do glicerol com ácido oléico 124
5.3. Comparação das estratégias testadas 131
6. CONCLUSÕES 135
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 138
REFERÊNCIAS 139
APÊNDICE ..... **Erro! Indicador não definido.**

1. INTRODUÇÃO

No atual contexto nacional, com o lançamento do Programa de Produção e Uso de Biodiesel pelo Governo Federal, espera-se um aumento da oferta do glicerol, visto que para cada 100 litros de biodiesel produzidos, 10 quilos de glicerina bruta são gerados. Estima-se que, com o incentivo desta Política Nacional, a oferta do glicerol em 2010 seja da ordem de 250 mil toneladas por ano (com o uso do B5 – mistura obrigatória de 5% de biodiesel no óleo diesel), tornando-se estritamente necessário o desenvolvimento de alternativas que permitam a absorção desse excedente de glicerol. Diante desta realidade, o objetivo deste trabalho se insere nas prioridades nacionais relativas à destinação do glicerol residual gerado pela produção do biodiesel, visando à formação de monoglicerídeos.

Monoglicerídeos (MAG) são surfatantes não iônicos, sendo amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos, por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos. Tradicionalmente, estes compostos têm sido produzidos por via química pela glicerólise contínua de triglicerídeos empregando catalisadores alcalinos sob elevadas temperaturas. Recentemente a síntese de MAG catalisada por lipases tem sido estudada intensamente como alternativa ao método clássico, em função das vantagens oferecidas pela rota enzimática incluindo: condições reacionais brandas, produtos de melhor qualidade, menor custo energético e seletividade da reação.

Entre as rotas enzimáticas para a obtenção de monoglicerídeos (hidrólise, esterificação e glicerólise) as reações empregando glicerol em esterificações (glicerol e ácidos graxos) e glicerólises (glicerol e óleos vegetais), possuem relevância adicional no atual contexto das prioridades nacionais. Além disso, vários estudos têm sido realizados para investigar a possibilidade de implementar essas rotas em reatores contínuos, visando uma redução do custo do processo enzimático tornando-o competitivo com os processos químicos atuais. Sabe-se que a estabilidade operacional das lipases imobilizadas depende de vários parâmetros, tais como: do tipo do biocatalisador, da quantidade de água presente no meio reacional, da presença de oxidação dos produtos, entre outros. Ressalta-se que a configuração do biorreator e modo de operação afetam a estabilidade operacional do biocatalisador.

Com base neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema eficiente para sintetizar monoglicerídeos por duas vias enzimáticas, glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos, empregando lipases imobilizadas em matriz híbrida de polissiloxano álcool polivinílico como catalisadores,

visando o aproveitamento total do glicerol gerado na produção do biodiesel, agregando valor a este subproduto.

Para alcançar os objetivos propostos, foram realizadas reações contínuas e descontínuas sendo empregadas algumas estratégias para obter uma elevada produção de monoglicerídeos, como por exemplo: o emprego de atmosfera inerte (devido a oxidação do óleo), a utilização de agentes antioxidantes e emulsificantes, a remoção da água formada nas reações de esterificação e as sínteses de MAGs efetuadas em sistemas reacionais assistidos por micro-ondas, tratando-se de uma alternativa vantajosa na condução de reações enzimáticas, devido aos relatos de menores tempos de reação e rendimentos mais elevados.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um sistema operacional eficiente para a síntese enzimática de monoglicerídeos, compostos muito utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas, empregando estratégias para maximizar sua produção, utilizando lipases imobilizadas em SiO_2-PVA como catalisadores. Foram avaliadas duas rotas enzimáticas para a obtenção de monoglicerídeos (glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos), visando atingir uma elevada produção de MAG e permitir um aproveitamento total do glicerol formado como subproduto na geração do biodiesel. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

1. Obter dados experimentais referentes a glicerólise do óleo de babaçu, avaliando-se o uso de atmosfera inerte e o desempenho dos sistemas experimentais operados em regime descontínuo e/ou contínuo;

2. Obter dados experimentais referentes a esterificação de glicerol e ácido graxo, buscando-se estabelecer estratégias para remoção da água formada, bem como avaliando o desempenho dos sistemas experimentais operados em regime descontínuo e/ou contínuo;

3. Estabelecer parâmetros de irradiação de micro-ondas (potência, temperatura, tempo, velocidade de agitação) visando-se à maximização de formação do MAG.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Monoglicerídeos

Monoglicerídeos são surfatantes não iônicos, que possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drugs Administration-EUA), sendo amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos (DA SILVA et al., 2002), por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (MACHADO et al., 2000; FREITAS et al., 2008). Os monoglicerídeos são formados quando uma das três hidroxilas da molécula do glicerol é substituída por um radical de ácido graxo. Embora os ácidos graxos possam ser situados em qualquer uma das três posições (Figura 3.1), os grupos hidroxilas das laterais (1 ou 3-MAG) reagem em primeiro lugar. O grupo hidroxila intermediário (2-MAG ou β-MAG) é mais difícil de ser esterificado. Monoglicerídeos esterificados nas posições laterais são denominados de α-monoglicerídeos (MORRISON; BOYD, 1990).

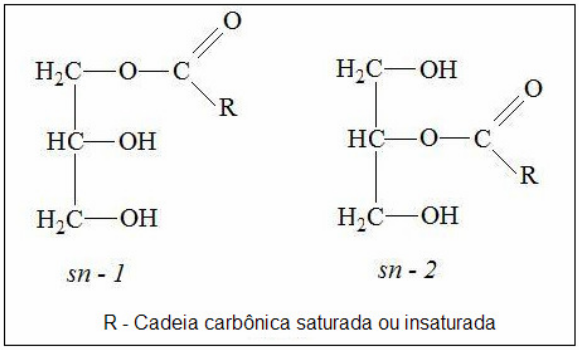


Figura 3.1. Formas isoméricas dos monoglicerídeos

Na indústria farmacêutica, os monoglicerídeos (MAG) são utilizados como emolientes para emplastos, liberando lentamente a medicação. Na indústria cosmética são usados como agentes texturizantes e para melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG et al., 2005). Na indústria alimentícia são mais comumente utilizados como emulsificantes em uma ampla gama de produtos de padaria, como margarinas, derivados do leite, doces e molhos. Na Tabela 3.1 são sumarizados diferentes tipos de monoglicerídeos e algumas de suas principais aplicações (FREITAS et al., 2008).

A produção mundial de monoglicerídeos é estimada em cerca de 180 mil toneladas por ano (BELLOT et al., 2001), das quais aproximadamente 85 mil são consumidos nos EUA, correspondendo a 70% do total de emulsificantes usados em produtos alimentícios (FREITAS et al., 2008).

Tabela 3.1 - Exemplos de monoglicerídeos e suas principais aplicações

Monoglicerídeos	Aplicações	Referência
Monoglicerídeos dos ácidos EPA e DHA	Previnem efeitos danosos em pessoas que possuem desordens vasculares.	LI; WARD, 1993.
Monopentadecanoato de glicerila	Tratamento de cabelos.	WEISS, 1990.
Monocaprina	Possuem propriedades antivirais, bacteriana e microbiana sendo utilizadas em emulsões para mucosa bucal, reduzindo os prejuízos causados por bactérias como *Candida albicans,* que se aloja entre a gengiva e os dentes (principalmente nas dentaduras).	THORGEIRSDOTTIR et al., 2006.
Monolaurina	Possuem propriedades antivirais, bacteriana, protozoal e microbiana.	COCONUT OIL, 2006.
Monooleína	Utilizada como sistema de liberação de drogas, carreador farmacêutico e emulsificante.	GANEM-QUINTANAR; QUINTANAR-GUERRERO; BURI, 2000.
Monoaracdonato de glicerila	Ligante endógeno receptor de canabinóides nos tecidos cerebrais e intestinais.	SUGIURA et al., 1995; MECHOULAM et al., 1995.
Monoacetato de glicerila	Podem melhorar a qualidade das gorduras, como por exemplo, a margarina.	MONOACYLGLYCEROLS, 2006.
Monolactato de glicerila	Usados para a produção de bolos, sobremesas e cremes industriais.	MONOACYLGLYCEROLS, 2006.
Monosuccinato de glicerila	Usados como agentes modificadores de massas e emulsificantes para a produção de bolos industriais.	MONOACYLGLYCEROLS, 2006.
Monocitrato de glicerila	São emulsificantes altamente hidrofílicos, sendo usados para a produção de margarinas e produtos lácteos. Também são utilizados como estabilizante de emulsões para maioneses e molhos.	MONOACYLGLYCEROLS, 2006.

Os monoglicerídeos produzidos comercialmente são sólidos, com um aspecto de "cera", com uma cor amarelada, sabor e gosto típico de gordura. São comercializados em diferentes formas: barra, flocos e pó, sendo insolúveis em água, etileno glicol e propileno glicol, mas solúveis em acetato de etila, metanol, acetona, óleos vegetais e minerais (MARTINELLO; MOLINA; PRAMPARO, 2005).

Normalmente os MAG são sintetizados quimicamente via glicerólise de triglicerídeos empregando catalisadores inorgânicos (Ca $(OH)_2$, NaOH) a 220-250°C (SONNTAG, 1982). Entretanto, a utilização de temperaturas elevadas, além de acarretar um alto consumo energético, é responsável pela parcial degradação dos produtos, com formação de subprodutos escuros e sabor de queimado (BERGER; SCHENEIDER, 1992). Desta forma, quando esta rota é usada (Figura 3.2), se obtém um produto constituído por uma mistura que contém cerca de 35-60% de monoglicerídeos, 35-50% de diglicerídeos, 1-20% de triglicerídeos, 1-10% de ácidos graxos livres, e o sal de metal alcalino resultante, implicando em múltiplas etapas adicionais de purificação do produto se comparada à rota enzimática (Figura 3.3).

Tanto fatores técnicos como regulatórios da FDA, da União Européia, entre outras, têm incentivado o desenvolvimento de melhores processos para a síntese de emulsificantes, especialmente daqueles usados em aplicações farmacêuticas ou relacionadas à área de alimentos (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004).

Recentemente a síntese de MAG catalisada por lipases tem sido estudada intensamente como alternativa ao método convencional, devido principalmente, à utilização de condições reacionais brandas que implica em baixo consumo energético, e à seletividade da enzima lipase que de forma integrada resulta em produtos de melhor qualidade. Além disso, a exploração da especificidade dessas enzimas possibilita a síntese de produtos que não poderiam ser obtidos pela rota química convencional. Cabe ressaltar que do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente limpo e seguro (BÖRJESSON; ÄRRÖD, 1999). Neste contexto, diferentes alternativas têm sido propostas com relação à síntese enzimática de monoglicerídeos. Algumas destas incluem a hidrólise seletiva usando lipases 1,3-específicas, a esterificação de ácidos graxos ou a transesterificação de ésteres com glicerol e a glicerólise de óleos e gorduras. Paralelamente, ambos os processos, batelada ou contínuo bem como, tipo, pureza e imobilização do biocatalisador, temperatura e sistema isento de solvente ou sistema à solvente, vêm sendo investigadas detalhadamente para produção de MAGs (FREITAS et al., 2008; XU, 2003; BORNSCHEUER, 1995).

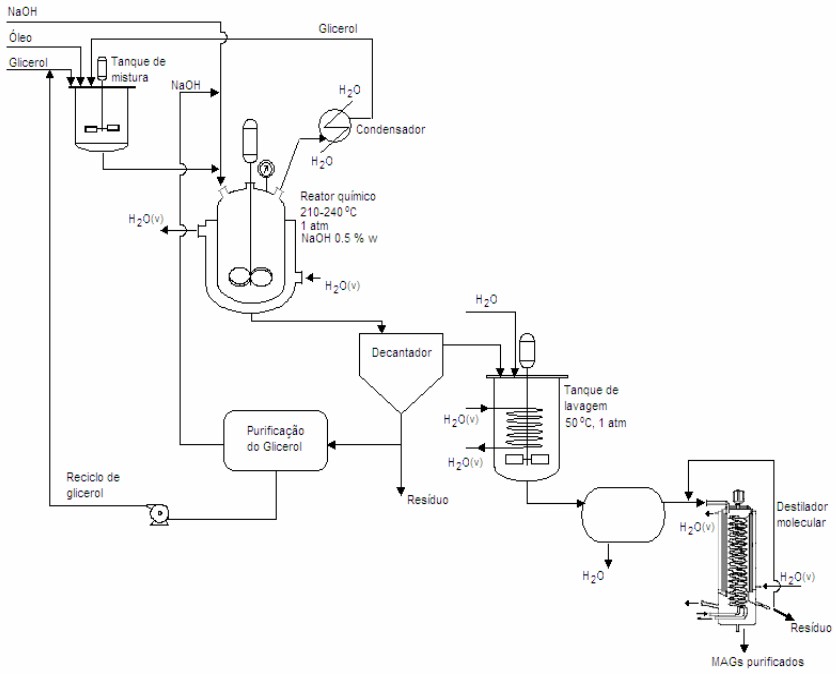


Figura 3.2. Fluxograma geral da síntese de MAGs por glicerólise química.

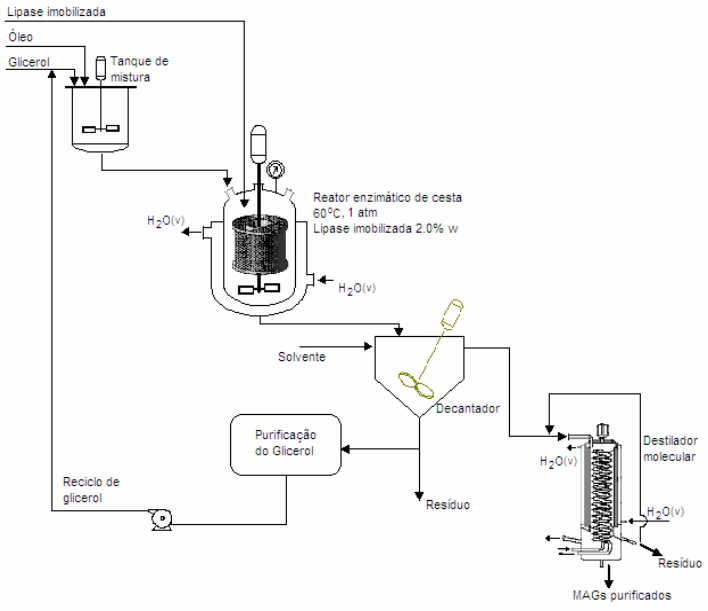


Figura 3.3. Fluxograma geral da síntese de MAGs por glicerólise enzimática.

3.2. Métodos de obtenção de monoglicerídeos (MAG) por via enzimática

São três as metodologias descritas para a obtenção de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando a enzima lipase: (1) hidrólise ou alcoólise de triglicerídeos, (2) glicerólise de triglicerídeos e (3) esterificação de glicerol com ácidos graxos. Alguns exemplos desses métodos são descritos na Tabela 3.2 (FREITAS et al., 2008).

O primeiro método fornece β-MAG, enquanto o segundo e terceiro métodos usualmente fornecem uma mistura de monoglicerídeos, na qual α-MAG é o composto predominante, geralmente obtido com um rendimento elevado.

3.2.1. Hidrólise ou Alcoólise

A hidrólise contínua de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos e glicerol é o processo padrão utilizado em escala industrial. As gorduras são hidrolisadas em tratamento contracorrente com vapor em elevadas temperaturas e pressões (LI; WARD, 1993). Hidrólises enzimáticas utilizando lipases não-especificas oferecem um processo alternativo para a produção de ácidos graxos em condições moderadas. Vários métodos estão descritos na literatura, incluindo reações na presença (VIRTO; LASCARY; SOLOZABL, 1991) ou na ausência (BAILLARGEON; SONNET, 1991) de solventes orgânicos.

Para obtenção de MAG por hidrólise enzimática, é necessário o controle da reação para evitar uma hidrólise completa. A maneira mais fácil de alcançar esse propósito é a aplicação de lipases 1,3-específicas resultando em β-MAG (2-MAG) (Figura 3.4).

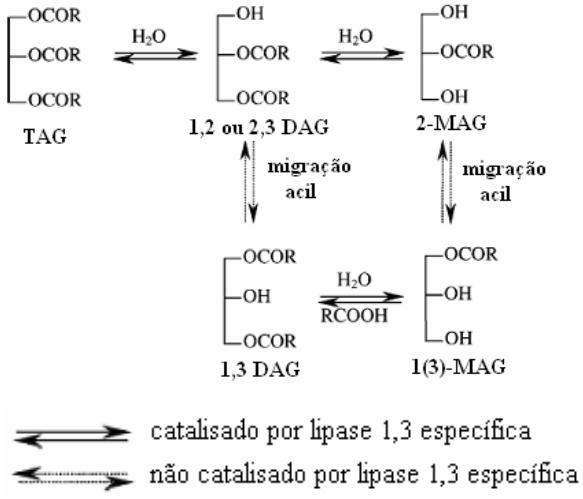


Figura 3.4. Síntese de monoglicerídeos por hidrólise catalisada por lipase 1,3-específica.

Tabela 3.2 - Síntese de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando diferentes métodos

Método	Receptador do grupo acila	Doador do grupo acila	Sistema reacional	Rendimento (%)	Lipase	Referência
1	Água	Óleo de palma	Micelas reversas	78	LRO	HOLMBERG; ÖSTERBERG, 1988.
1	Etanol	Trioleína	Etanol	84	LPF	ZAKS; GROSS, 1990.
1	Butanol	Tricaprína	Butanol / Duas fases	87	LHL	MAZUR ; HILLER ; EL-NOKALY, 1991.
1	Etanol	Tripalmitina	MTBE	97	LRO	MILLQVIST-FUREBY; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1994.
1	Etanol	Trilaurina	Etanol	75	LPC	MILLQVIST-FUREBY et al., 1997.
1	Água	Trioleina	Tampão fosfato	67	LPP	PLOU et al., 1996.
2	Glicerol	Óleo de palma	Micelas reversas	30	LRO	HOLMBERG; LASSEN; TARK, 1989.
2	Glicerol	Sebo bovino	Precipitado/ sem solvente	72	LPF	MCNEILL; SHIMIZU; YAMANE, 1990.
2	Glicerol	Trioleina	Micelas reversas	50	LCV	CHANG; RHEE; KIM, 1991.
2	Glicerol	Trioleina	Precipitado/ sem solvente	96	LCV	BORNSCHEUER; YAMANE, 1994.
3	Glicerol	Ácido palmítico	Precipitado/ sem solvente	95	LPcam	WEISS, 1990.
3	Glicerol	Ácido oléico	Peneira molecular/ sem solvente	74	LPcam	YAMAGUCHI; MASE, 1991.
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	55	LCR	HAYES; GULARI, 1991.
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	62	LRO	HAYES; GULARI, 1994.
3	Glicerol	Ácido oléico	Peneira molecular/ Hexano	72	Lpcam	AKOH; COOPER; NWOSU, 1992.
3	Glicerol	Laurato de vinila	MTBE	90	LRM	BERGER; SCHNEIDER, 1992.
3	Glicerol	Ácido oléico	Micelas reversas	42	LRM	SINGH; SHAD; HOLBERG, 1994.
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	11	LPC	BORNSCHEUER et al., 1994.
3	Glicerol	Oleado de etila	Acetona	68	LCA-B	PASTOR; OTERO; BALLESTEROS, 1995.
3	Glicerol	Ácido palmítico	Hexano	61	LRO	KWON; HAN; RHEE, 1995.

Método 1: Hidrólise ou alcoólise de triglicerídeos. Método 2: Glicerólise de triglicerídeos que produzem 1(3) monoglicerídeos. Método 3: Esterificação ou transesterificação de glicerol com ácido graxo ou ésteres produzindo 1(3) monoglicerídeos. Abreviações: MTBE: Metil *terc*-butil éter, LPP: (lipase animal) de pâncreas de porco, LCR: (lipase fúngica) *Candida rugosa*, LPcam: (lipase fúngica) *Penicillium camembertii*, LRM: (lipase fúngica) *Rhizomurcor miehei*, LRO: (lipase fúngica) *Rhizopus oryzae*, LPC: (lipase bacteriana) *Pseudomonas cepacia*, LCA-B: (lipase fúngica) *Candida antarctica B*, LPF: (lipase bacteriana) *Pseudomonas fluorescens*, LCV: (lipase bacteriana) *Chromobacterium viscosum*, LHL: (lipase fúngica) *Humicola lanuginosa*.

O principal problema na reação de hidrólise é o baixo rendimento em MAG, pois são produzidos dois mols de ácido graxo livre por mol de MAG, e a migração do grupo acila (da posição 2 para a posição 1(3) do glicerol) deve ser suprimida (HOLMBERG; ÖSTERBERG, 1988). Por outro lado, a reação de alcoólise pode ser realizada na presença de solventes apolares, reduzindo a velocidade de migração do grupo acila. Por esta razão, a alcoólise de triacilgliceróis fornece rendimentos mais elevados que a hidrólise.

Adicionalmente as reações de alcoólise são mais rápidas por não ocorrer mudança do pH durante a reação, e também pelo fato da lipase não sofrer inibição pelos ácidos graxos livres. A adição do álcool em excesso desloca o equilíbrio para a formação de monoglicerídeos.

Hidrólises parciais de óleos de diversas sementes oleaginosas são descritas na literatura (BORNSCHEUER, 1995), como por exemplo, a hidrólise do óleo de mamona usando a lipase 1,3-específica de *Rhizophus arrhizus.* Nesse procedimento, rendimentos de 23% de MAG (principalmente monorricinoleína) e 66% de ácido ricinoleico foram alcançados em 3 h de reação. A precipitação do ácido pela adição de cloreto de sódio aumentou a quantidade de MAG para 65% (BORNSCHEUER, 1995).

Um procedimento mais específico de obtenção de 2-MAG em um sistema bifásico foi relatado por Mazur, Hiller e El-Nokaly (1991). O sistema consistia em hexano, butanol e uma solução aquosa tamponada contendo lipase 1,3-específica (Lipozyme). Numa segunda etapa uma maior seletividade da reação pôde ser induzida pela esterificação dos ácidos graxos livres (liberados pela hidrólise) com o butanol. O rendimento foi de 70% e o método é aplicável para triglicerídeos de $C_{8:0}$ até $C_{14:0}$ (MAZUR; HILLER; EL-NOKALY, 1991). Uma outra possibilidade para a indução da seletividade pode ser alcançada pela hidrólise do óleo na presença de surfatantes aniônicos. Em condições otimizadas Holmenberg e Österberg (1988) obtiveram um rendimento de 80% em 2- MAG. Na Tabela 3.3 estão sumarizados trabalhos recentes, referentes à produção de monoglicerídeos a partir da hidrólise ou alcoólise de óleos e gorduras.

Tabela 3.3 – Exemplos de processos para a obtenção de monoglicerídeos via hidrólise ou alcoólise enzimática.

Substrato		Reação	Fonte de lipase	MAG (%)	Referência
Álcool	**Triglicerídeo**				
Etanol	Óleo de peixe (atum e bacalhau)	Alcoólise	Novozym 435	63-65	ESTEBAN et al., 2009
n-butanol	tricaprilina	Alcoólise	*Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Celite	50	LEE et al., 2004.
isopropanol	trilaurina			48	
Isopropanol	tripalmitina			45	
Etanol	óleo de palma	Alcoólise	*Rhizopus delemar* imobilizada em Accurel EP-100	60	WONGSAKUL et al., 2003.
	óleo de atum		*Pseudomonas sp.* imobilizada em partículas cerâmicas	81	
Isento	óleo de palma	Hidrólise	*Rhizopus oryzae* imobilizada em membrana composta por PVA/Quitosana	32-50	TAN; WANG; ZANG, 2002.

3.2.2 Glicerólise de triglicerídeos

A desvantagem da reação de alcoólise é o desperdício de dois ácidos graxos do triglicerídeo, sendo, portanto, mais eficiente o método no qual o glicerol é usado como álcool, permitindo a conversão total dos três ácidos graxos (Figura 3.5), empregando lipases tanto específicas como não específicas (YAMANE et al., 1986). Na prática, usualmente as reações promovem a migração do grupo acila de tal forma que se estabelece um equilíbrio da concentração dos produtos formados na razão de 9:1 (α-MAG e β-MAG) (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

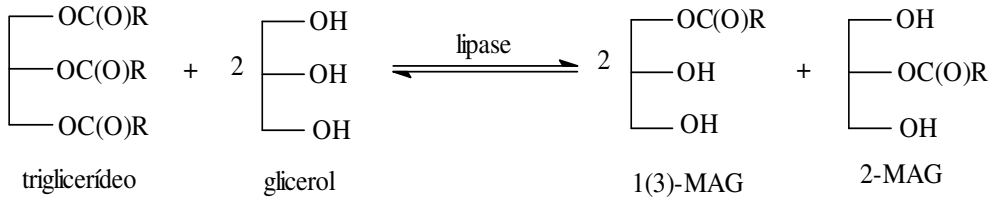


Figura 3.5. Obtenção de monoglicerídeos por glicerólise enzimática.

Como a glicerólise de triglicerídeos apresenta baixo rendimento em monoglicerídeos, devido ao equilíbrio desfavorável da reação, diversas estratégias são adotadas para deslocar o equilíbrio no sentido desejável da reação. O trabalho pioneiro foi desenvolvido por Yamane et al. (1986) e desde então a reação de glicerólise catalisada por lipases vem sendo intensamente pesquisada, sendo inúmeros os trabalhos realizados visando à obtenção de MAGs a partir de uma variedade de óleos e gorduras naturais. Reações de glicerólise já foram realizadas em micelas reversas (CHANG; RHEE; KIM, 1991; HOLMBERG; LASSEN; STARK, 1989), na presença e ausência de solventes orgânicos e em sistemas contínuos e descontínuos. Problemas envolvendo a hidrofilicidade do substrato glicerol em solventes orgânicos e problemas analíticos para a determinação quantitativa dos glicerídeos parciais foram descritos por Ferreira-Dias e Fonseca (1993).

Yamane et al. (1986) estudaram a reação de glicerólise do óleo de milho mediada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* em sistema batelada sem adição de surfatantes ou emulsificantes, e relataram a produção de 20,4% de MAG a 40°C. Em um outro trabalho, foi descrito que a lipase pode sofrer inibição ou desativação pela matéria-prima lipídica oxidada durante a glicerólise (batelada ou contínua) do óleo de girassol (OHTA; YAMANE; SHIMIZU, 1989).

Mcneill, Shimizu e Yamane (1990) desenvolveram um método, no qual a glicerólise foi realizada numa emulsão líquido–líquido, composta de glicerol e triglicerídeos, seguida de uma etapa de cristalização dos monoglicerídeos formados. Usando este método, foram obtidas elevadas proporções de MAG (70–99%) utilizando diferentes meios reacionais (BORNSCHEUER; YAMANE, 1994; FERREIRA-DIAS; FONSECA, 1993; MYRNES et al., 1995). A temperatura de reação também é crítica e precisa ser mantida abaixo da temperatura do ponto de fusão do monoglicerídeo, por exemplo, para sebo de boi a temperatura ótima foi de 42ºC fornecendo 72% 1(3) MAG usando lipase pancreática ou microbiana (MCNEILL; SHIMIZY; YAMANE, 1990). Um melhor desempenho do processo pode ser ainda obtido por meio do controle do teor de água do meio reacional, da razão entre triglicerídeos e glicerol e da quantidade e do tipo de lipase empregada (MCNEILL; YAMANE, 1991).

A atividade e a estabilidade das lipases de diferentes fontes também foram estudadas utilizando-se trioleína como modelo de triacilglicerol, sendo observado que lipases bacterianas foram muito estáveis, enquanto que as lipases fúngicas foram rapidamente inativadas (BORNSCHEUER; YAMANE, 1994). Uma melhoria na estabilidade operacional

foi descrita por meio da imobilização da lipase em Celite. Com lipase de *Chromobacterium viscosum*, 99% de MAG foi obtido após 120 h de incubação a 8°C (primeiras 8 h a 25°C).

Glicerólises contínuas foram realizadas empregando-se biorreatores com membrana de microporos hidrofóbicos, no qual óleo comestível foi glicerolisado por lipase de *P. fluorescens*, resultando na formação de 5-25% de MAG. O tempo de meia-vida da enzima foi de 3 semanas a 40°C. Em processos contínuos, podem ser usados reatores com membrana para remover os monoglicerídeos ao invés da estratégia da cristalização utilizada nos processos descontínuos (STEVENSON; STANLEY; FURNEAUX, 1993; CHANG; RHEE; KIM, 1991).

Chang, Rhee e Kim (1991) descreveram o uso biorreatores de mistura para efetuar glicerólises do óleo de oliva em AOT/isooctano utilizando lipase de *C. viscosum* imobilizada em lipossomos (pequenas vesículas lamelares). A fase estacionária foi detectada após 24 h de operação, resultando numa conversão de 80% do óleo de oliva durante 6 dias de operação do reator, sendo que a estabilidade operacional da lipase imobilizada em lipossoma foi calculada em 45 dias.

Em um outro exemplo, um elevado rendimento de formação de MAG foi obtido para reações conduzidas na presença de um álcool secundário ou terciário agindo na mistura reacional como solvente para todos os componentes incluindo o glicerol (BORNSCHEUER, 1995). Uma grande variedade de óleos e gorduras naturais foram glicerolisadas na presença de *n*-butanol. Após 3 h de reação a 70°C, 82-90% de MAG foram sintetizados pela lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Esse sistema também foi aplicado em reações de esterificação e transesterificação usando ácidos graxos e seus derivados (BORNSCHEUER, 1995).

Na Tabela 3.4 estão sumarizadas alguns trabalhos referentes à produção de monoglicerídeos a partir da glicerólise de diferentes óleos vegetais em processos operando de forma contínua e descontínua.

Tabela 3.4 - Exemplos de processos para a obtenção de monoglicerídeos via glicerólise enzimática.

Solvente/ Estratégia	Regime do Processo	Tipo de óleo ou gordura	Lipase	Razão molar (glicerol/óleo)	MAG (%)	Referência
Terc-butanol/ isopropanol	Batelada	Óleo de soja	Lipozyme TL IM	3,5:1	72	ZHONG et al., 2009.
2-metil – 2-butanol	Batelada	Óleo de palma	*Pseudomonas sp.* imobilizada em gel de alginato	10:1	54	CHEIRSILP; JEAMJOUNKHAW; KITTIKUN, 2009.
n-butano e Bis (2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio (AOT)	Batelada (reator pressurizado)	Óleo de oliva	Novozym 435	2:1	70	VALÉRIO et al., 2009a.
Isento de solvente	Batelada	Óleo de soja	*Thermomyces lanuginosus, C. antarctica B, C. rugosa, Aspergillus niger, Rhizomucor miehei*	4:1 – 8:1	28-30	FREGOLENTE et al., 2008.
Metil *terc*-butil éter (MTBE)	Batelada	Óleo de atum	*Pseudomonas fluorescence* imobilizada em Accurel EP100	3:1	24,6	PAWONGRAT; XU; H-KITTIKUM, 2007.
Terc-butanol/ *terc*-pentanol	Contínuo em reator de leito empacotado	Óleo de girassol	*Candida antarctica* imobilizada em PMMA	-	47-56	DAMSTRUP et al., 2006.
Isento	*Contínuo em tanque agitado **Reator de leito empacotado	Óleo de palma	*Burkholderia cepacia* imobilizada em Accurel EP100	2,7:1	*14,35 **14,01	KAEWTHONG et al., 2005.
Terc-butanol	*Batelada **Contínuo em reator de leito empacotado	Óleo de girassol	Novozym 435	*4,5:1 **4:1	*60-70 **70	YANG et al., 2005a.
Acetona/ isooctano	Batelada	Óleo de palma	*Burkholderia cepacia* imobilizada em Accurel EP100	8:1	55,75	KAEWTHONG; KITTIKUN, 2004.

3.2.3. Esterificação do glicerol com ácidos graxos

A esterificação também produz monoglicerídeos sem desperdiçar o ácido graxo, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG (diglicerídeo) e TAG (triglicerídeo), conforme especificidade da lipase (Figura 3.6). Na esterificação do glicerol com ácidos graxos utilizando lipases 1,3-específicas, o glicerol pode ser esterificado na posição 1 ou 3, podendo formar 1(3) MAG e 1,3 DAG. Quando lipases não específicas são empregadas, o glicerol pode ser esterificado em qualquer posição, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG e TAG. Deve-se levar em consideração que ainda pode ocorrer à migração do grupo acila, ocasionando mudanças de posições desse grupo na molécula do glicerol.

Para deslocar a reação para a formação de monoglicerídeos, diversas estratégias são usadas para remover a água formada durante a reação, como por exemplo, redução de pressão ou uso de agentes dessecantes (YAMAGUCHI; MASE, 1991; MILLQVIST-FUREBY; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1996).

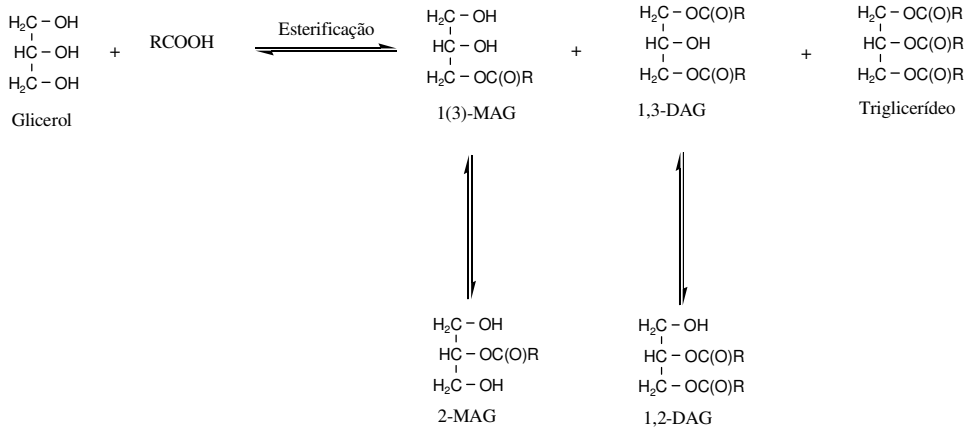


Figura 3.6. Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos.

A Tabela 3.5 lista outras estratégias descritas na literatura para atingir um elevado rendimento de formação de MAG e evitar a inversão da reação no sentido da hidrólise.

A influência do tamanho da cadeia dos ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol tem sido estudada por diversos grupos (TSUJISAKA; OKUMURA; IWAI, 1977; JANSSEN; VANDER PADT; VANTRIET, 1993).

Tsujisaka, Okumura e Iwai (1977) demonstraram a versatilidade das lipases para a reação de esterificação do glicerol com diversos ácidos graxos. Com lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*, a esterificação do ácido oléico ocorreu exclusivamente nas

posições 1 e 3 do glicerol. Por outro lado, lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* esterificaram somente ácidos graxos de cadeia longa e a esterificação ocorreu randomicamente (TSUJISAKA; OKUMURA; IWAI, 1977).

Tabela 3.5 - Métodos para formação seletiva de MAG em reações de esterificação.

Método	Princípio	Referência
Adição de peneira molecular	Remoção de água	YAMAGUCHI; MASE, 1991; GANCET, 1990.
Redução de pressão	Remoção de água	MILLER et al., 1988.
Adsorção do glicerol em um material suporte (sílica-gel)	Deslocamento do equilíbrio, Aumento da seletividade.	BERGER; SCHNEIDER, 1992, 1993.
Adsorção de MAG em uma coluna em série	Deslocamento do equilíbrio, Aumento da seletividade.	VAN DER PAT et al., 1992.
Adição do ácido fenil-boro	Aumento da solubilidade do glicerol, agente protetor.	STEFFEN et al, 1992.

Janssen, Vander Padt e Vantriet (1993) observaram que a maior formação de monoéster foi obtida para ácidos graxos de cadeias curtas na presença de solventes polares, ao passo que rendimentos mais elevados na síntese de di e triéster foram alcançados empregando ácidos graxos de maior tamanho de cadeia carbônica na presença de solventes orgânicos apolares.

Conversões elevadas de MAGs (80-90%) foram reportadas por Fletcher et al. (1987), empregando lipase não específica e ambos 1(3) e 2-MAG foram formados. Isto também foi relatado por Bornscheuer et al. (1994) para a reação entre glicerol e ácido láurico usando lipase purificada de *Pseudomonas cepacia* em microemulsões. A lipase de *Chromobacterium viscosum* apresentou elevada estabilidade em AOT em micelas reversas (FLETCHER et al., 1987), enquanto que a lipase de *R. delemar* mostrou-se menos estável no mesmo sistema.

A baixa solubilidade do glicerol em solventes apolares orgânicos reduz a velocidade reacional e favorece as reações paralelas, como a acilação dos monos e diglicerídeos mais solúveis. Para minimizar este problema, algumas técnicas têm sido propostas, como o uso de diferentes tipos de solventes (KWON; HAN; RHEE, 1995), micelas reversas (BORNSCHEUER et al., 1994) e condução do processo em reatores com membranas (VAN DER PADT et al., 1992; HOQ et al., 1985).

O alto rendimento de síntese de 1(3) MAG regioisomericamente puro em solventes orgânicos em escala laboratorial foi relatado por Berger e Schneider (1992). O problema da baixa solubilidade do hidrofílico glicerol em solventes orgânicos apolar foi superado facilmente pela adsorção do glicerol em um suporte sólido em pó (ex: sílica gel, Celite). Estas

preparações de glicerol foram colocadas em meio solvente orgânico, e um doador do grupo acila foi adicionado juntamente com a lipase 1,3-específica. Depois da reação concluída, enzima e suporte foram removidos simultaneamente por filtração simples, enquanto os produtos da esterificação permaneceram em solução. Em condições otimizadas, foi obtida uma concentração máxima de 70% de MAG. Rendimentos mais elevados não foram alcançados devido à alta concentração de 1(3) MAG que serviu como melhor substrato que o próprio glicerol (BERGER; SCHNEIDER, 1992). Desta forma, para obter rendimentos mais elevados, os autores desenvolveram um sistema de separação contínua constituída de 2 etapas: síntese e isolamento. Substratos não reagidos e subprodutos indesejados (ex; 2-MAG, DAG e TAG) foram completamente reciclados e 1(3) MAG foi congelado a baixas temperaturas. Lipases não específicas também foram utilizadas com sucesso neste procedimento (BERGER; SCHNEIDER, 1992).

A aplicabilidade do método desenvolvido por Berger e Schneider (1992) foi demonstrada para diferentes sistemas de esterificação usando vários doadores do grupo acila, tais como, ácidos graxos livres (C_5 a C_{18} saturados ou insaturados), metil éster de ácidos graxos, ésteres vinílicos, triacilgliceróis sintéticos, óleos e gorduras naturais. Vários monoacilgliceróis foram produzidos com alto rendimento e pureza isomérica sem a necessidade de etapas posteriores de purificação.

A produção contínua de glicerídeos em reator com membrana a partir de ácidos graxos e glicerol catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em microporos hidrofóbicos, foi relatada por Yamane et al. (1984) e Hoq et al. (1985). Com 80% de conversão, 32% de MAG (principalmente 1(3) MAG) foram produzidos, sendo o tempo de meia-vida da enzima de 54 dias (JANSSEN; VANDER PADT; VANTRIET, 1993). A aplicação de biorreatores com membrana para esterificação de ácidos graxos com glicerol e a hidrólise de óleos, foi revisada por Kloosterman, Vanwassenaar e Bel (1987).

Uma outra estratégia para superar o problema da acilação subseqüente, que pode ocorrer nas reações de esterificação com glicerol puro tem sido testada por vários grupos de pesquisa empregando glicerol protegido (Figura 3.7). Este método também oferece uma vantagem para a síntese de MAGs na posição específica ou enatiomericamente puro (WANG; WONG, 1988). Neste contexto, o ácido fenilboro (PBA) foi descrito como um solubilizante e agente protetor da esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos na presença de solventes orgânicos (STEFFEN et al., 1992). O rendimento mais elevado de MAGs foi de 84% usando o ácido hidroxiesteárico como substrato e Lipozyme como biocatalisador em meio à solvente orgânico (*n*-hexano).

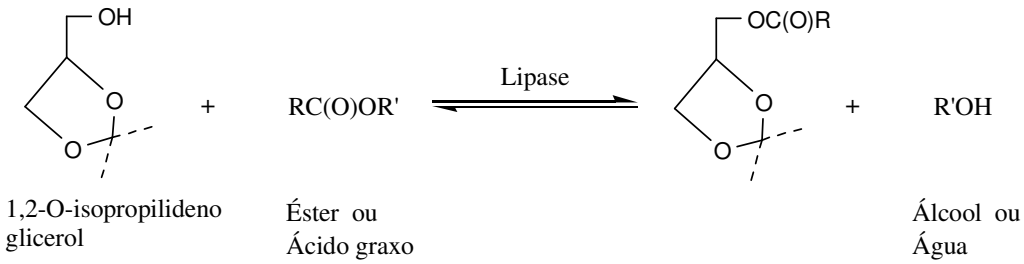


Figura 3.7. Obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol protegido e ácido graxo.

A Tabela 3.6 sumariza alguns trabalhos recentes referentes à produção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos.

Tabela 3.6 - Obtenção de monoglicerídeos via esterificação enzimática do glicerol e ácidos graxos.

Solvente	Ácido graxo	Lipase	Razão molar (glicerol/ ácido)	MAG %	Referência
Isento	Láurico	*C. antarctica* imobilizada em SiO_2-PVA	5:1	36	FREITAS et al., 2007.
Isento	Oléico	*Staphylococcus simullans* imobilizada em $CaCO_3$	5:1	71	GHAMGUI et al., 2006.
Isento	FFA-CLA*	*Penicillium camembertii*	5:1	87	WATANABE et al., 2004.
Hexano/ *terc*-butanol	Láurico	Lipozyme IM	5:1	65	MONTEIRO; NASCIMENTO; NINOW, 2003.
Isento	Cáprico/ Láurico/ Mirístico	Lipozyme IM	1:1	52-57	LANGONE et al., 2002.
Isento	Láurico	Lipozyme IM	1:1	61	DA SILVA et al., 2002.

*FFA-CLA - produto comercial composto por: ácido oléico conjugado e uma mistura de ácidos graxos.

Verifica-se uma tendência na investigação da síntese enzimática de monolaurina, o principal monoglicerídeo produzido a partir de óleos láuricos. Monolaurina é encontrada naturalmente no leite materno, sendo que, o recém nascido é totalmente dependente deste leite, tanto para sua alimentação quanto para sua proteção. Analisando a composição do leite materno, pesquisadores encontraram altas concentrações de monolaurina, motivando o estudo

da ação desse monoglicerídeo, como um agente anti-viral, bacteriano, protozoal e microbiano (MONOLAURIN, 2007).

Em medicamentos a monolaurina é usada para destruir a gordura revestida de viroses (ex. HIV e herpes), bactérias patogênicas (ex. *Listeria monocytogenes* e *Helicobacter pylori*) e protozoa (ex. *Giardia lamblia*) (COCONUT OIL, 2006). É também usada como um dos principais agentes penetrantes para aplicações em membranas mucosas, reduzindo o tempo necessário para o início da ação da droga, aumentando a quantidade da droga penetrante e causando menor ou nenhum efeito deletério à membrana mucosa (MATSON et al., 2006). A monolaurina rompe a ligação do lipídeo com o vírus, impedindo sua fixação às células hospedeiras, inibindo assim, a sua replicação e conseqüentemente prevenindo a infecção. A ligação da monolaurina ao revestimento virótico torna o vírus mais susceptível às defesas das células hospedeiras (MONOLAURIN, 2007).

3.3. Métodos para purificação de MAGs

Monoglicerídeos de acordo com a sua finalidade, como, por exemplo, empregados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, precisam ser altamente puros, para isso, são utilizadas algumas técnicas de purificação.

Sabe-se que a produção de monoglicerídeos obtida pela rota química gera resíduos tóxicos, implicando em múltiplas etapas adicionais de purificação do produto se comparada à rota enzimática. Neste contexto, estudos relatados na literatura para a concentração e purificação dos MAGs incluem uma diversidade de métodos físicos, tais como cromatografia de partição centrífuga (ALVAREZ; CAZES, 1990), adsorção em coluna (VANDER PADT et al., 1992), resfriamento por solvente (WATANABE et al., 2006) cromatografia líquida de alta eficiência (LÓPEZ-LÓPEZ; CASTELLOTE-BARDALLÓ; LÓPEZ-SABATER, 2001) e destilação molecular (KRISTENSEN; XU; MU, 2005). Além disso, a separação por outros métodos como cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de camada delgada, extração com fluido supercrítico e destilação flash, são alternativas normalmente utilizadas.

Particularmente a destilação molecular constitui um processo de grande potencial industrial na separação e purificação de produtos que possuem elevada massa molecular, são termicamente sensíveis e de substâncias com baixa pressão de vapor (MARTINS et al., 2006).

A destilação molecular pode ser de baixo custo e alto rendimento em grupos de compostos que incluem: vitaminas, resinas epóxidas, ácidos graxos altamente concentrados, plastificantes, compostos nitrogenados, e vários outros materiais termicamente sensíveis que requerem somente desodorização ou descoloração (THE UNIQUE, 2006). Além disso, esse

processo tem vantagens sobre outras técnicas que usam solventes como agentes de separação, evitando problemas de toxicidade.

De forma geral, existem dois tipos de destiladores moleculares: 1) destilador de filme descendente (Figura 3.8a), que quando dispõe de um sistema de agitação do filme é conhecido por destilador molecular de filme agitado e 2) destilador centrífugo (Figura 3.8b). Ambos os modelos têm como princípio de separação o alto vácuo, pequena exposição do líquido destilado à temperatura de operação e uma pequena distância entre o evaporador e o condensador (20-50 mm) (LUSITAN; CVENGROS; MICOV, 2002).

Com base nessas características, conseqüentemente, forma-se um filme líquido uniformemente distribuído sobre a superfície do evaporador, que no primeiro equipamento, é forçado rapidamente para baixo na superfície de evaporação. As paredes de aquecimento e o alto vácuo conduzem os componentes mais voláteis (destilados) para a porção interna do condensador e os compostos menos voláteis (resíduos) continuam na parte inferior do cilindro. Enquanto que, os destiladores moleculares centrífugos utilizam a força centrífuga para promoverem a distribuição do filme líquido sobre o evaporador. A combinação de uma pequena distância entre o evaporador e o condensador (cerca de 2 cm) e um alto vácuo na destilação resulta em um mecanismo eficiente de transferência de massa com rendimento/eficiência de evaporação de 20-40 $g.m^{-2}s^{-1}$ (CVENGROS; LUSITAN, MICOV, 2000), aproximadamente. As frações resultantes saem por meio de tomadas individuais de descarga e dependendo da aplicação, o produto desejado pode ser tanto o destilado quanto a fração residual.

Fregolente et al. (2005), otimizaram a produção de MAGs destilados usando a técnica de superfície de resposta, estudando como variáveis independentes à temperatura de evaporação (TEV) e fluxo de alimentação (Q). Em condições otimizadas (TEV = 250 ºC e Q= 5 mL/min), conseguiram recuperar 61% de MAGs. Enquanto que, Kaplon, Minkowski e Kaplon (2001) investigaram a influência da temperatura de destilação, fluxo de alimentação e velocidade do rotor na eficiência de separação dos monoglicerídeos, alcançando uma concentração de 85,6% de MAGs no destilado.

No entanto, quando a destilação molecular é usada na purificação de MAGs alguns problemas tem sido observados (TORRES; NETTEKOVEN; HILL, 2003), tais como perdas parciais de monoglicerídeos e migração da posição *sn*-2 para *sn*-1,3 (XU; SKANDS; ADLER-NISSEN, 2001). Ressalta-se também que a purificação de MAGs de ácidos graxos instáveis (ex: ácidos graxos conjugados) pela técnica de destilação molecular, não é recomendada, devido a instabilidade apresentada por estes compostos (WATANABE et al., 2006).

Entretanto, estes problemas podem ser minimizados trabalhando-se em condições de vácuo que resultem em temperaturas de destilação mais baixas possíveis.

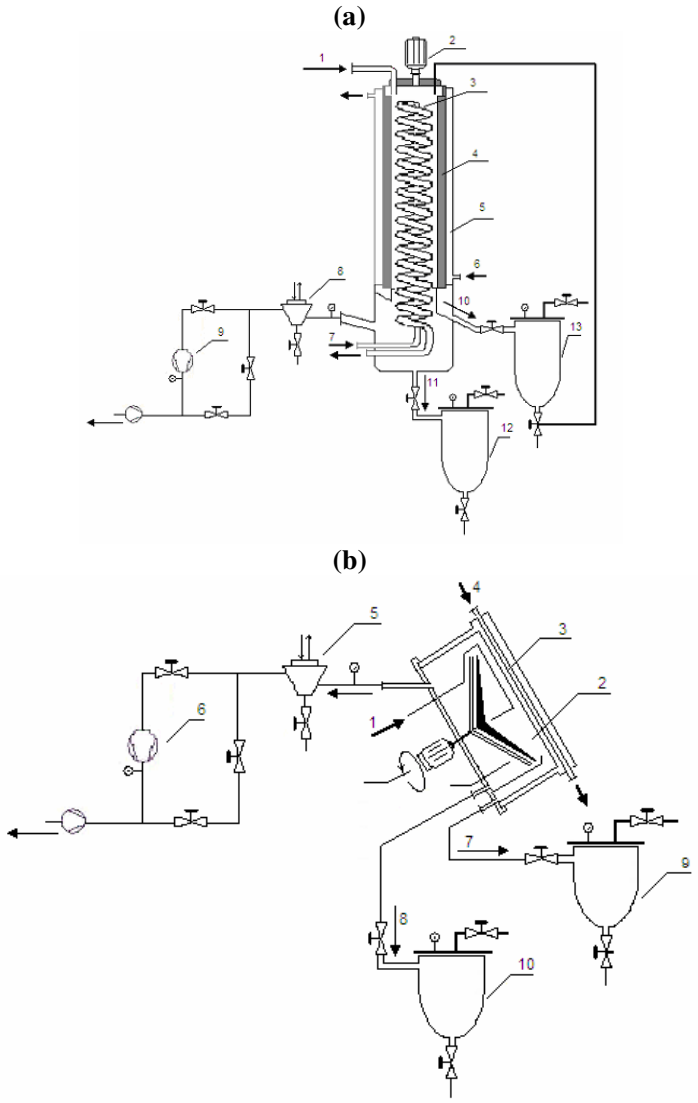


Figura 3.8. Representação esquemática de equipamentos de destilação molecular: **a) de filme descendente agitado** (1. Alimentação de mistura reacional, 2. Rotor acoplado ao sistema de agitação, 3. Câmara de evaporação constituída por superfície do evaporador de filme descendente e condensador, 4. Agitador para homogeneização do filme, 5. Sistema encamisado para aquecimento do evaporador, 6. Alimentação de vapor de água na camisa do evaporador, 7. Água de resfriamento no condensador, 8. Trap para proteção do sistema de vácuo, 9. Bombas de alto vácuo, 10. Descarga do resíduo, 11. Descarga do destilado, 12. Reservatório de MAGs de alta qualidade, 13. Reservatório do resíduo). **b) centrifugo** (1. Alimentação de mistura reacional, 2. Câmara de evaporação constituída por superfície do evaporador centrifugo, 3. condensador, 4. Água de resfriamento no condensador, 5. Trap para proteção do sistema de vácuo, 6. Bombas de alto vácuo, 7. Descarga do destilado, 8. Descarga do resíduo, 9. Reservatório de MAGs de alta qualidade, 10. Reservatório do resíduo).

3.4. Meios reacionais

Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico, destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica (LIMA; ANGNES, 1999).

Os métodos enzimáticos convencionais têm sido empregados em meio aquoso devido a concepção de que este é um bom ambiente para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa. Entretanto, essa concepção não é completamente verdadeira. Muitas enzimas tais como; lipases, esterases e desidrogenases são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela em soluções aquosas, ou em certos casos, até superior (LIMA; ANGNES, 1999).

As principais razões para a utilização de meios reacionais não-convencionais são essencialmente o fato de estes permitirem:

1) a solubilização de substratos e/ou produtos hidrofóbicos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada;

2) a redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte do substrato e/ou produto, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial de substratos e/ou produtos;

3) o deslocamento do equilíbrio químico, podendo ser deslocado no sentido do favorecimento de reações de síntese, por meio do controle do teor de água. O equilíbrio da reação pode ser também deslocado no sentido do favorecimento da formação do produto, mediante a remoção contínua deste para a fase orgânica (AIRES BARROS, 2002).

Os meios não convencionais para biocatálise podem ser solventes orgânicos, fluídos supercríticos, sistemas em que não são utilizados solventes orgânicos (fases sólidas, líquidas e gasosas) e recentemente fluídos iônicos (AIRES BARROS, 2002).

A síntese de ésteres catalisada por lipases tem sido tema para muitos estudos (TORRES; OTERO, 1999; GUBICZA et al., 2000). Em princípio, esses processos podem ser realizados em um sistema reacional contendo quantidades apropriadas de álcool e ácidos graxos em presença ou ausência de solventes orgânicos apolares (LANGRAND et al., 1990; GUBICZA et al., 2000). A Tabela 3.7 mostra as vantagens e as desvantagens associadas ao uso desses sistemas (AIRES BARROS, 2002).

A eliminação de solventes é tecnicamente possível e oferece inúmeras vantagens, tais como: evita o custo adicional dos solventes, os produtos formados são facilmente separados e os substratos não convertidos são prontamente reciclados. Além disso, a ausência de solventes

geralmente promove processos produtivos ambientalmente limpos, já que a maioria dos solventes orgânicos é tóxica e poluente. Por outro lado, nestes sistemas, a ausência de um solvente que solubilize reagentes e produtos, e que diminua a viscosidade do sistema, dificulta o seu controle e determina a influência dos vários parâmetros que afetam o processo (FORESTI; FERREIRA, 2005).

Tabela 3.7 - Vantagens e limitações do uso de solventes orgânicos

Características do processo	Vantagens (+) e desvantagens (-)
Operação do reator	**(+)** solubilização de substratos/produtos hidrofóbicos
	(+) redução da inibição/toxicidade de substratos/produtos
	(+) deslocamento do equilíbrio químico
	(-) limitações à transferência de massa
	(-) toxicidade para biocatalisador
Isolamento e purificação	**(+)** concentrações elevadas de produto
	(-) formação de emulsões

3.5. Antioxidantes

Quando se utiliza matéria-prima lipídica, deve-se levar em consideração o processo oxidativo que esses materiais de partida estão sujeitos, em função dos lipídios serem constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes compostos é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006). Os peróxidos são compostos considerados substâncias nocivas, podendo ser cancerígenas, causar arteriosclerose e acelerar o envelhecimento (OHTA; YAMANE; SHIMIZU, 1989). Desta forma, com a finalidade de inibir ou retardar o processo de oxidação lipídica de óleos e gorduras, são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os lipídeos podem ser oxidados por diferentes mecanismos:

- Reações hidrolíticas: catalisadas pelas lipase ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres.

- Oxidação enzimática: ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada, formando peróxidos e hidroperóxidos.

- Fotoxidação: esse mecanismo é promovido pela radiação de UV em presença de fotossensibilizadores (ex. clorofila) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível, gerando o oxigênio no estado "singlete". Este reage com as ligações duplas formando hidroperóxidos e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos.

- Autoxidação: é o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras. A autoxidação dos lipídios está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: *Iniciação, Propagação e Término* (Figura 3.9), levando à formação de produtos estáveis de oxidação (produtos secundários do processo de oxidação). Para evitar esse processo é necessário diminuir a incidência dos fatores que o favorecem como: diminuir os níveis de energia (temperatura e luz), evitar o contato com oxigênio e bloquear a formação de radicais livres por meio de antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006).

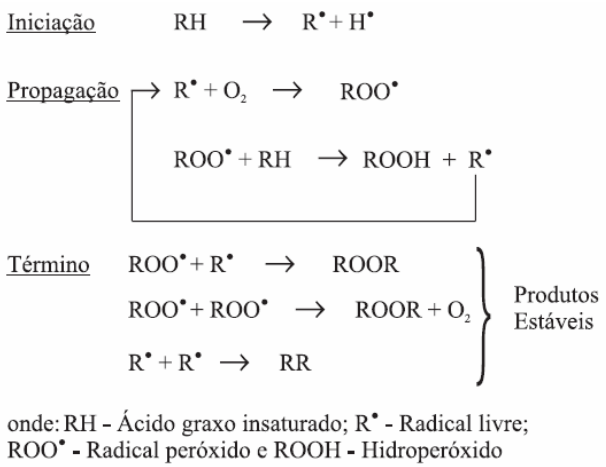


Figura 3.9. Mecanismo da oxidação lipídica.

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados. Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deteriorização oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para o consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor e no sabor, compatibilidade com o produto e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006). Dentre os antioxidantes mais utilizados nas indústrias de alimentos estão: sintéticos: BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propil galato) e TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona) e naturais:

tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (RAMALHO; JORGE, 2006).

No entanto, poucos são os trabalhos publicados que tratam do estudo da influência da oxidação das matérias–primas lipídicas na atividade lipolítica e velocidade de reação. Ohta, Yamane e Shimizu (1989), em trabalho pioneiro relacionaram o índice de peróxido da matéria-prima com atividade lipolítica da lipase de *Pseudomonas fluorescens* e concluíram que valores superiores 5 meq/kg afetam de maneira marcante atuação da lipase em reações de glicerólise, sendo recomendado a inserção de gás (nitrogênio ou argônio) no meio reacional para garantir ambiente de atmosfera inerte ou ainda a adição de agentes antioxidantes no meio reacional. Recentemente, Ibrahim et al. (2008) recomendaram para as reações conduzidas em reatores de leito fixo, a inserção de uma pré-coluna de purificação contendo agentes de adsorção como, por exemplo, carvão ativo, peneira molecular ou ainda enzima imobilizada inativada, para garantir uma matéria-prima totalmente isenta de componentes que podem comprometer atuação da lipase na reação de glicerólise.

3.6. Lipases

Lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos e também a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos. São encontradas extensamente na natureza, mas, no entanto, a maioria das lipases comerciais é de origem microbiana. São enzimas que não requerem co-fatores, são de custo moderado e atuam em uma ampla faixa de pH (SHARMA; CHISTY; BANERJEE, 2001).

Ao contrário das esterases, que atuam apenas nas ligações éster em substratos solúveis em água, as lipases são ativas na presença de substratos insolúveis em água, ou seja, na presença de uma interface óleo-água (MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995).

Em eucariontes, as lipases são envolvidas em vários estágios do metabolismo dos lipídeos incluindo: a digestão das gorduras, absorção, reconstituição e também no metabolismo da lipoproteína. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos que contenham reserva de energia (SHARMA; CHISTY; BANERJEE, 2001).

As lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes, não apenas pela capacidade de atuarem em substratos pouco solúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, como as de hidrólise de óleos e gorduras, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. A diversidade de propriedades das lipases propicia a utilização destas enzimas em diferentes campos promissores de aplicação, como: formulações de detergentes, síntese de biossurfatantes, na indústria oleoquímica, indústria de

laticínios, indústria agroquímica, fabricação do papel, nutrição, cosméticos e no processamento de fármacos (SHARMA; CHISTY; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Um número significativo de livros textos e artigos referentes à produção de lipases e suas aplicações estão disponíveis (GANDHI, 1997; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; PANDEY et al., 1999; SHARMA; CHISTY; BANERJEE, 2001; DE CASTRO et al., 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As características das duas lipases selecionadas (FREITAS, 2006) para o desenvolvimento experimental do presente trabalho são descritas a seguir, tomando por base as informações fornecidas pelo fabricante (AMANO ENZYME, 2006).

Lipase de Burkholderia cepacia (lipase PS)

Lipase PS é uma nova preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc. Esta enzima é manufaturada por cultivo submerso de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*. Ela é muito utilizada para a separação de compostos ópticos ativos em síntese química. A enzima possui massa molar de 45 kDa, elevada atividade lipolítica e é uma lipase não específica (AMANO ENZYME, 2006).

A lipase PS possui elevada atividade em uma ampla faixa de pH (3,5-11), sendo que o seu valor ótimo varia de 7 a 8. Sua temperatura ótima é de 50 ºC.

Lipase de Penicillium camembertii (lipase G)

Lipase G é uma preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc e manufaturada por cultivo submerso de uma linhagem selecionada proveniente de *Penicillium camembertii.* É específica para monos e diglicerídeos, mas não para triglicerídeos. O fato desta lipase hidrolisar especificamente monos e diglicerídeos, produzindo glicerol e ácidos graxos, mas não triglicerídeos, melhora a qualidade de alguns óleos, que por apresentarem elevados níveis de monos e diglicerídeos, tem qualidade reduzida. Esta lipase possui massa molar de 37 kDa e alta atividade de esterificação (AMANO ENZYME, 2006).

A lipase G atua numa faixa de pH que varia de 4 a 7, sendo o seu valor ótimo = 5, e temperatura ótima de 45 ºC.

3.7. Suportes para imobilização de lipases

As lipases são muito empregadas em processos biotecnológicos, por apresentarem elevada estabilidade em meio orgânico/ aquoso, versatilidade catalítica e disponibilidade

comercial (REIS et al., 2009; DE CASTRO et al., 2008). No entanto, sua utilização tem sido limitada por alguns fatores como instabilidade enzimática, dificuldade de recuperação e insolubilidade da enzima. Para contornar esses problemas, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e matrizes para a imobilização de enzimas.

A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (ZANIN; MORAES, 2004; DE CASTRO et al., 2008). Considerando a compatibilidade com a enzima, inúmeros materiais têm sido testados como matrizes de insolubilização de enzimas, como por exemplo, Eupergit C, Celite, quitosana e quitina, agarose, Chromosorb e Sepharose, no entanto, alguns desses suportes apresentam como limitação a baixa resistência mecânica (DE CASTRO et al., 2008).

Recentemente matrizes de insolubilização híbridas vêm sendo utilizadas, combinando os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos melhorando de modo geral as suas propriedades (GILL; BALLESTEROS, 1998; JOSÉ; PRADO, 2005).

3.7.1. Suportes híbridos

Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Normalmente as características desejadas não são encontradas em um único constituinte e a combinação adequada dos componentes tem levado à formação de materiais que apresentam propriedades complementares, que não são encontradas em uma única substância (JOSÉ; PRADO, 2005).

Híbridos orgânicos são materiais de grande interesse em aplicações comerciais devido às suas propriedades mecânicas, ópticas e térmicas, que combinam a estabilidade térmica e química dos materiais cerâmicos, com a processabilidade e a flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos. O desenvolvimento desta área acelerou-se desde a década de 80, destacando-se a preparação de géis inorgânicos impregnados por polímeros orgânicos (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995).

Uma das principais rotas de obtenção de materiais híbridos orgânicos/ inorgânicos é o processo sol-gel. O sol é constituído de uma suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 1000 nm) e um líquido, o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou por cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobilizam a fase líquida nos

seus interstícios (JOSÉ; PRADO, 2005). As reações químicas envolvidas num processo sol-gel convencional, são compostas pela hidrólise e condensação de alcóxidos de silício, sendo um método relativamente barato e conveniente para a produção de silicatos, que podem ser finamente dispersos em diferentes matrizes poliméricas. A reação de síntese é mostrada na Figura 3.10 (COELHO et al., 2003). A etapa (a) corresponde a *hidrólise*, enquanto a (b) corresponde à *policondensação* do silano.

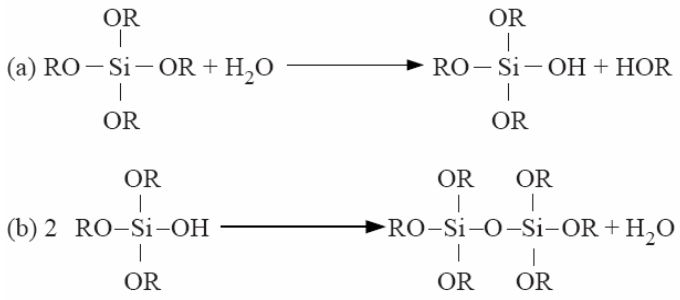


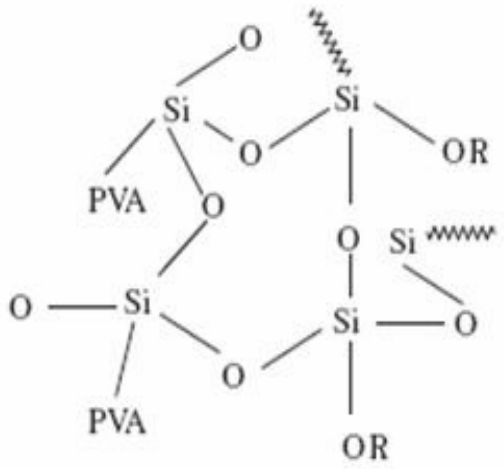
Figura 3.10. Representação esquemática do processo sol-gel.

O processo sol-gel é relativamente complexo, envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação, homogeneidade do produto, entre outros. Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades. Tais aditivos podem ser agentes estabilizantes ou agentes químicos controladores de secagem, que em muitos casos permitem a obtenção do produto na forma de um monolito livre de trincas (HENCH; WEST, 1990; SANCHEZ et al., 1988).

A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia fortemente a cinética de reação, assim como, a estrutura final do gel (FONSECA; AIROLDI, 2003; HENCH; WEST, 1990; SANCHEZ et al., 1988). Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar por meio de uma substituição nucleofílica, e a velocidade de hidrólise será maior que a velocidade de condensação, levando à formação de cadeias mais ramificadas no início do processo. Se a hidrólise for catalisada por ácido, ocorre uma reação eletrofílica, e a velocidade da condensação será maior que a hidrólise, levando à formação de cadeias mais longas e menos ramificadas no início do processo (JOSÉ; PRADO, 2005).

A grande versatilidade destas matrizes associada às suas propriedades ópticas, estabilidade química e termomecânica permite que esses materiais apresentem grande potencial para diferentes aplicações, como para construção de sensores químicos, aplicações ópticas, biomateriais, em catálise, revestimento, aplicações cromatográficas, preparação de membrana e materiais compósitos (JOSÉ; PRADO, 2005).

Dentre essas matrizes, o compósito polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA) tem apresentado consistentemente um bom desempenho como suporte para imobilização de diferentes fontes de lipase, como demonstrado em diversos trabalhos publicados, os quais são listados na Tabela 3.8. Considerando esses resultados promissores, este suporte foi selecionado para imobilizar as duas fontes de lipases testadas no presente trabalho. A estrutura desta matriz híbrida é representada na Figura 3.11.



R– Grupo alquil

Figura 3.11. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA)

Tabela 3.8 - Exemplos de trabalhos realizados empregando a matriz de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA) como suporte de imobilização de diferentes fontes de lipase (Continua)

Fonte de lipase	Método de imobilização	Agente de ativação	Substrato	Reação empregada/ou Aplicação	Rendimento (%)	Observações	Referência
pancreática	ligação covalente	glutaraldeído	*óleo de babaçu etanol, propanol e butanol	*transesterificação (síntese de biodiesel)	* 75-95	O biocatalisador apresentou boa estabilidade térmica e propriedades catalíticas adequadas, alcançando resultados promissores na síntese de surfatantes e biodiesel.	PAULA et al., 2007.
			**glicose, frutose, sacarose e ácidos graxos: C_{12}, C_{16} e $C_{18:1}$	**esterificação (síntese de ésteres de açúcar)	**50%		
pancreática	ligação covalente	Glutaraldeído	glicose, frutose, sacarose e ácidos graxos: C_{12}, C_{16} e $C_{18:1}$	Esterificação (síntese de ésteres de açúcar)	> 50	O sistema constituído por frutose e $C_{18:1}$, empregando *terc*-butanol, foi o mais efetivo na obtenção de ésteres de açúcares	PAULA; BARBOSA; CASTRO, 2005.
C. antarctica, T. lanuginosa, C. rugosa, P.fluorescens, B. cepacia pancreática	ligação covalente	glutaraldeído, metaperiodato de sódio; carbonildiimi-dazol	glicerol e ácido láurico (C_{12})	Esterificação (síntese de ésteres glicéricos)	40-80	Foi verificado que o agente de ativação não teve efeito sobre o rendimento da reação; meios reacionais contendo excesso de glicerol favoreceram a síntese dos ésteres, e o derivado imobilizado da lipase Calb L foi o que apresentou a maior conversão molar.	FREITAS et al., 2007.

Tabela 3.8 - Exemplos de trabalhos realizados empregando a matriz de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2-PVA) como suporte de imobilização de diferentes fontes de lipase (Conclusão)

Fonte de lipase	Método de imobilização	Agente de ativação	Substrato	Reação empregada/ou Aplicação	Rendimento (%)	Observações	Referência
Pseudomonas fluorescens	ligação covalente	glutaraldeído	óleo de oliva	Hidrólise/ imobilização de lipase	16	A ativação do suporte com epicloridrina resultou em um sistema imobilizado com maior afinidade pelo substrato em relação à enzima imobilizada em suporte ativado com glutaraldeído.	SANTOS et al., 2008a.
		epicloridrina			32		
T. lanuginosus, P. fluorescens, B.cepacia, P. camembertii, C. antarctica pancreática.	ligação covalente	glutaraldeído	óleo de palma e etanol	Alcoólise (síntese de biodiesel)	6-85	Dentre as enzimas testadas a lipase de *P. fluorescens* forneceu valores mais elevados de formação em monoésteres, rendimento e produtividade da reação.	MOREIRA et al., 2007.
C. rugosa	*adsorção	Glutaraldeído	butanol e ácido butírico	Esterificação (síntese do butirato de butila)	*52	Não foi possível recuperar a atividade da lipase imobilizada por encapsulação. Entre os outros dois derivados, a lipase imobilizada por ligação covalente mostrou características mais interessantes, como: tempo de meia-vida satisfatório (80 h) e boa estabilidade de estocagem.	PAULA et al., 2008.
	**ligação covalente				**63		
	Encapsulação				-		
Burkolderia cepacia	ligação covalente	epicloridrina	*glicerol e óleo de babaçu	*Glicerólise (síntese de MAG)	*25%	As condições otimizadas para a síntese de MAG foram: RM = 1:15 (óleo: álcool), T = 55ºC (6h). Para síntese de biodiesel as condições foram: RM = 1:7 (óleo: álcool), T = 39ºC (48h de reação).	FREITAS et al., 2009b.
			**etanol e óleo de babaçu	**Alcoólise (síntese de biodiesel)	**98%		

3.8. Biorreatores com enzimas imobilizadas

Biorreator é qualquer recipiente usado para realizar reações bioquímicas, convertendo substrato em produto. As reações que ocorrem em um biorreator são conduzidas por biocatalisadores, tais como: enzimas, microorganismos, células animais ou vegetais ou estruturas sub-celulares como mitocôndria e cloroplastos (CHISTI, 2006). A seleção do reator mais apropriado para um dado bioprocesso depende das características da conversão e das condições reacionais, cinéticas e referentes ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo (Figura 3.12) (AIRES-BARROS, 2002).

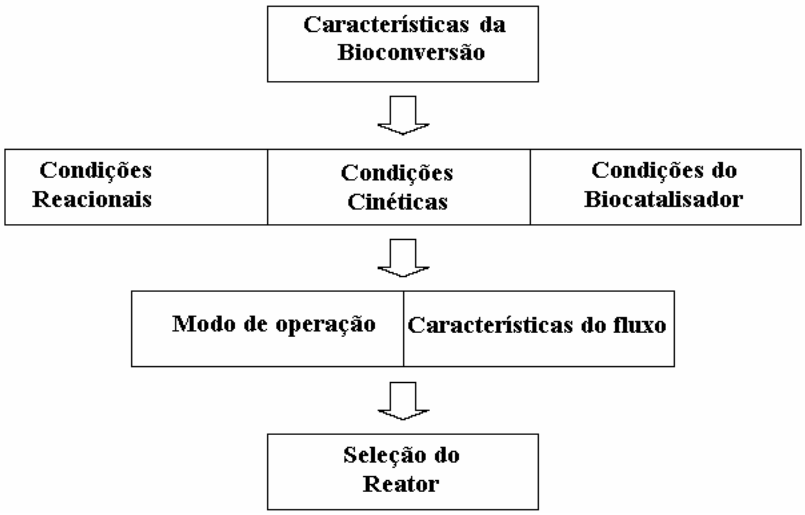


Figura 3.12. Considerações importantes para seleção do biorreator.

Em todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. O emprego desses biocatalisadores em processos industriais é realizado nos reatores químicos clássicos. Estes podem abranger desde grandes colunas industriais com diversos metros cúbicos de capacidade, a pequenos eletrodos que incorporam microgramas de enzima. Embora haja essa amplitude de possíveis escalas os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (ZANIN; MORAES, 2004).

A seleção do tipo de biocatalisador a ser utilizado em processos com enzimas imobilizadas depende da análise criteriosa de uma série de fatores, tais como: a forma da enzima imobilizada (partículas, membranas, fibras); a natureza do substrato (solução, sólidos em suspensão, coloidal); os requisitos operacionais de reação (controle de pH, temperatura); a cinética da reação (inibição por substrato, por produto, ou por ambos); superfície catalítica por

unidade de volume de reator; as características de transferência de massa externa e interna, e quando aplicável, a transferência de calor; a facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração; a facilidade de construção e custo do biorreator. Nessa análise os pontos fundamentais são a natureza da solução de substrato e a cinética da reação enzimática (ZANIN; MORAES, 2004).

Várias configurações de reatores têm sido usadas em estudos com lipases imobilizadas. Dois tipos de fases estão invariavelmente presentes - uma fase sólida (isto é, o suporte no qual a enzima está imobilizada) e uma ou duas fases líquidas. Dentre os reatores usados em sistemas multifásicos destacam-se, os reatores agitados mecanicamente (contínuos ou descontínuos), os reatores com membranas e os reatores de leito fixo e fluidizado. Na Figura 3.12, são mostrados alguns modelos desses reatores (AIRES-BARROS, 2002).

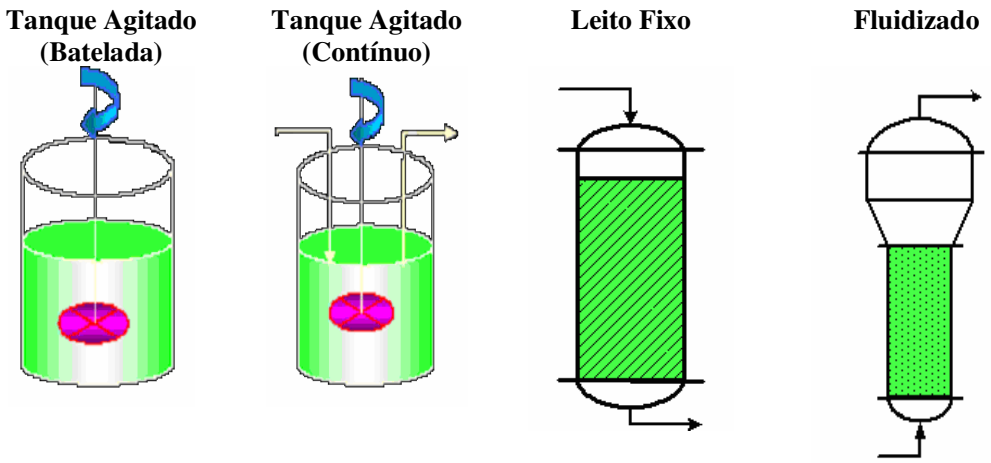


Figura 3.13. Configurações de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas.

3.8.1.Reatores de tanque agitados

Biorreatores de tanque agitado têm sido os mais comumente descritos na literatura para estudos com lipases. Deve-se destacar que reatores de tanque agitado podem ser operados em modo contínuo (CSTR) ou em batelada (BSTR), apresentando este último a desvantagem da imposição de tempos mortos de operação, relativos a carga, descarga e limpeza do sistema (ZANIN, 1989; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Estes reatores consistem de um vaso no qual a mistura dos reagentes é efetuada por meio de agitação mecânica (barra magnética, pás de agitação) de tal forma que são evitados a formação de gradientes de temperatura e concentração. Permitem um controle adequado da área interfacial por meio da velocidade de agitação (e da vazão volumétrica das fases), de

forma a obterem velocidades de transferência de massas elevadas (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Normalmente esses reatores são equipados com chicanas, cuja função é evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 1998).

O reator batelada com agitação é o tipo de configuração mais comumente usada, sendo responsável por mais de 75% dos sistemas descritos na literatura. A enzima imobilizada é separada do meio reacional no final da reação por filtração ou centrifugação (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Tais processos de separação geralmente provocam perdas das partículas de catalisadores, bem como a desativação parcial da enzima imobilizada. Além disso, nesse tipo de reator alguns suportes quebram-se devido ao atrito do agitador.

O reator contínuo com agitação consiste de um tanque com entrada de substrato e saída de produtos separados. A enzima imobilizada é retida dentro do reator por meio de um filtro disposto na saída do reator (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). O grau de conversão pode ser controlado pelo volume do reator, vazão volumétrica, quantidade e atividade da enzima imobilizada (ZANIN, 1989). Esses reatores são muito utilizados para a produção de antibióticos e ácidos orgânicos (CHISTI, 2006).

Várias condições influenciam a escolha do tipo do reator para uma aplicação particular. Por exemplo: a utilização de um CSTR não é aconselhável quando a reação sofre inibição pelo produto, já que sua alta concentração está sempre em contato direto com o catalisador. No entanto, quando ocorre inibição pelo substrato, a melhor opção seria o CSTR (FERNANDES; CABRAL, 2006).

3.8.2. Reatores de leito fixo e fluidizado

Nos reatores de leito fixo e fluidizado (reatores mais utilizados no caso de biocatalisadores imobilizados), o biocatalisador é mantido no interior do reator (em uma coluna recheada com partículas de enzima imobilizada) enquanto o fluido é passado através do leito. Os suportes para o biocatalisador devem ser partículas poliméricas compressivas ou materiais mais rígidos (CHISTI, 2006). Uma comparação das características desses reatores é apresentada na Tabela 3.9 (ZANIN, 1989).

Tabela 3.9 - Comparação das características dos reatores de leito fluidizado e leito fixo

Variável	Reator de Leito Fluidizado	Leito Fixo ou Empacotado
Diâmetro da partícula	Partículas pequenas	Partículas grandes
Queda de pressão para a mesma vazão	Baixa	Alta
Gradiente de concentração	Ausência	Presença
Alimentação do catalisador novo	Fácil	Difícil
Concentração do catalisador por volume de reator	Relativamente alta	Alta
Velocidade	Baixa	Baixa
Distribuição da temperatura no leito	Temperatura constante e uniforme; fácil controle	Verificam-se maiores gradientes de temperatura; difícil de controlar.
Fluxo de calor e massa no leito	Eficiência para uma dada razão e altura	Ineficiência
Obstrução do leito	Muito difícil	Facilmente ocorre
Caminhos preferenciais	São evitados com Distribuição uniforme do fluido	Pode ocorrer facilmente
Sólidos em suspensão no substrato, e substrato viscoso.	Não causam problemas	Problemas sérios
Distribuição do tempo de residência	Intermediário	Pequena
Taxa de conversão	Eficiente	Razoável, depende do comprimento do reator.
Área superficial relativa por unidade de volume do reator	Alta	Baixa
Controle de pH	Fácil	Difícil (impossível)
Problemas com inibição pelo substrato	Não causa problemas sérios	Maiores que no caso do leito fluidizado
Contaminação microbiológica	Possível	Pode ocorrer facilmente

Fonte: ZANIN, 1989.

Reator de leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Esse tipo de reator usualmente proporciona uma maior área superficial para a reação, por unidade de volume, do que um reator com membrana e tem sido empregado para a hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipases e para reações de interesterificação, por um grande número de

pesquisadores. Quando apenas uma fase está presente, o bombeamento pode ser realizado descendentemente (tendo a vantagem da força gravitacional) ou ascendentemente (evitando extensos caminhos preferenciais), nesse caso a velocidade máxima do fluxo é limitada, pois esta não pode exceder a velocidade de fluidização mínima, ou o leito irá fluidizar (CHISTI, 2006). Em uma situação bifásica, as duas fases podem ser bombeadas em direções opostas (fluxo contra-corrente) ou numa mesma direção (fluxo concorrentes) (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). A concentração do substrato diminui com a movimentação do fluido ao longo do leito, sendo aumentada à concentração dos produtos. Deste modo, o ambiente de um reator de leito fixo não é homogêneo, mas a variação da concentração ao longo do reator pode ser reduzida pela elevação da velocidade do fluxo de alimentação (CHISTI, 2006).

São cineticamente mais favoráveis que os reatores contínuos com agitação, e não têm a desvantagem das elevadas tensões de corte devido à agitação mecânica. No entanto, sua aplicação é limitada pelo tipo de substrato e pela forma do biocatalisador imobilizado (AIRES-BARROS, 2002). Existem dois obstáculos que devem ser considerados quando se opera com reatores de leito fixo: limitações difusionais intraparticulares que afetam a velocidade global de reação e alta queda de pressão no escoamento do fluido do leito. Limitações difusionais podem ser diminuídas se forem utilizadas partículas de suporte de menor tamanho. Contudo, tais suportes podem resultar em maiores quedas de pressão. Quando a reação é conduzida na ausência de solvente, o efeito da viscosidade do óleo só poderá ser minimizado pela utilização de altas temperaturas. Por outro lado, temperaturas elevadas promovem um aumento na velocidade de desativação das lipases (MALCATA et al., 1990). Reatores de leito fixo são amplamente empregados em reações de síntese de ésteres, mono, di e triglicerídeos catalisadas por lipases de diferentes fontes (AIRES-BARROS, 2002).

Outra opção que permitiria melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, é o reator de leito fluidizado. Esses reatores são apropriados para reações que envolvem partículas suspensas num fluido, tais como enzimas imobilizadas, partículas de células ou flocos microbianos. (CHISTI, 2006).

Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator pode ser considerado um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Conforme se aumenta à velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e

movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização) acima do qual as partículas são carregadas para fora do reator (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

3.8.3. Reatores com membrana

Este tipo de reator opera de forma contínua, sendo que a membrana funciona como uma interface entre as duas fases líquidas imiscíveis (orgânica e aquosa), evitando o seu contato. Ela também atua como suporte para a imobilização do biocatalisador (aumentando a área interfacial de contato entre enzima/substrato). As principais desvantagens destes reatores são: a diminuição da atividade catalítica do biocatalisador por perdas da enzima na membrana e diminuição da eficiência de transferência de massa devido à diminuição de fluxo de permeado. Os dois fenômenos responsáveis por esta diminuição são: a concentração de polarização e o *fouling* da membrana, que levam aos baixos coeficientes de transferência de massa e ao entupimento da membrana (AIRES-BARROS, 2002).

Membranas podem ser consideradas como películas poliméricas ou inorgânicas semipermeáveis, que atuam como barreiras seletivas, separando duas fases. As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes distintas de material: os polímeros, na sua grande maioria materiais orgânicos (poliamidas, polissulfonas, poliacrilonitrila, polifluoreto de vinilideno) e inorgânicos, como metais e cerâmicos (alumina, zircônia e sílica) (CARMINATTI, 2001).

A eficiência do sistema de membrana depende de vários fatores, tais como: propriedades da membrana, do substrato, da polarização e das condições operacionais. A estrutura morfológica, por sua vez, refere-se essencialmente à densidade e porosidade (tamanho, número e distribuição dos poros) das camadas constituintes da membrana (CARMINATTI, 2001).

A Tabela 3.10 lista trabalhos recentes empregando lipases como biocatalisadores em vários processos enzimáticos operados em diferentes modos e biorreatores.

Tabela 3.10 – Exemplos de configuração de reatores enzimáticos empregados em reações mediadas por lipases

Modo de operação	Tipo de biorreator	Reação	Substrato	Fonte de lipase	Produto	Conversão	Referência
Batelada Contínuo	Tanque agitado Leito fixo	Alcoólise	Óleo de peixe (atum e bacalhau) e etanol	Novozym 435	Monoglicerídeos	63-65% 53%	ESTEBAN et al., 2009.
Batelada	Frasco fechado	Glicerólise	Óleo de soja e glicerol	Lipozyme TL IM	Monoglicerídeos	72%	ZHONG et al., 2009.
Batelada	Frasco fechado Agitação (shaker)	Glicerólise	Óleo de palma e glicerol	*Pseudomonas sp.* imobilizada em gel de alginato	Monoglicerídeos	54%	CHEIRSILP; JEAMJOUNKHAW ; KITTIKUN, 2009.
Batelada (pressurizado)	Frasco fechado	Glicerólise	Óleo de oliva e glicerol	Novozym 435	Monoglicerídeos	70%	VALÉRIO et al., 2009a.
Contínuo	Leito fixo	Metanólise	Óleo de canola	Novozym 435	Biodiesel	< 90%	HAJAR et al., 2009.
Batelada	Frasco fechado em shaker	Metanólise	Óleo de pinhão manso e metanol	*Enterobacter aerogenes* imobilizada em sílica	Biodiesel	94%	KUMARI et al., 2009.
Batelada Contínuo	Tanque agitado Leito fixo	Metanólise	Óleo de girassol e metanol	Novozym 435	Biodiesel	<99% 96%	OGNJANOVIC et al., 2009.
Contínuo	Leito fixo	Esterificação	Ácido láurico e hexanol	Lipozyme IM	Hexil laurato	82 μmol/min	JU et al., 2009.
Batelada	Tanque agitado	Esterificação	Ácido adípico e oleil álcool	Novozym 435	Éster adípico	96%	CHAIBAKHSH et al., 2009.
Contínuo	Leito fixo	Interesterificação	Gordura do leite, estearina de palma e óleo de linhaça.	Lipozyme RM IM	Incorporação de ácido α-linoleico na gordura do leite	25%	SHIN et al., 2009.
Contínuo	Leito fluidizado	Interesterificação	Estearina de palma e óleo de palma	*Candida parapsilosis* imobilizada em Accurel MP 100	Incorporação de ácidos graxos poliinsaturados em blendas de gordura	Aumento de ECN 42-44 Diminuição de ECN 46-50	OSÓRIO et al, 2009.

3.9. Micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes, que possuem uma freqüência que vai de 300 a 300.000 MHz e que corresponde a comprimentos de onda de 1 mm a 1 m. A região de micro-ondas situa-se entre a região de infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético. Uma aplicação recente é a obtenção de produtos orgânicos em escala de laboratório usando o aquecimento por irradiação de micro-ondas, onde as reações são conduzidas em forno de micro-ondas de cozinha ou em reatores especificamente desenhados para esta finalidade (SANSEVERINO, 2002).

Os princípios envolvidos no aquecimento por micro-ondas englobam conceitos físicos, tais como, temperatura, ligação química, estrutura molecular, momento dipolo, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica (ROSINI; NASCENTES; NÓBREGA, 2004).

O aquecimento por micro-ondas, também denominado aquecimento dielétrico, pode ocorrer por meio de dois mecanismos. O primeiro, denominado rotação dipolo, relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida nestes dipolos é dissipada na forma de calor. No segundo o mecanismo, denominado condução iônica, o calor é gerado por perdas de fricção, que acontecem pela migração de íons dissolvidos sob ação de um campo magnético. Estas perdas dependem do tamanho, da carga, da condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente (ROSINI; NASCENTES; NÓBREGA, 2004).

3.9.1. Diferenças do aquecimento convencional comparado ao aquecimento sob irradiação de micro-ondas

O aquecimento por micro-ondas é completamente diferente daquele que ocorre em um forno de cozinha convencional (seja a gás ou elétrico), onde o aquecimento de alimentos ocorre por condução, irradiação e convecção. Em um forno de micro-ondas doméstico, as ondas eletromagnéticas geradas pelo magnetron (um aparelho a vácuo que converte energia elétrica alternada em micro-onda), são guiadas para a cavidade do forno e refletidas para as paredes deste. Ao contrário do aquecimento convencional, no qual uma substância é aquecida de fora para dentro, no interior do forno de micro-ondas o que ocorre é uma transferência de calor dos diversos pontos que absorvem a energia da parte interna para externa (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

Vários trabalhos vêm sendo publicados sobre aplicações de energia de micro-ondas em química (FANG; HUANG; XIA, 2008; ROY; GUPTA, 2003) e na adaptação de fornos

domésticos para este fim (PECORARO; DAVOLOS; JAFELICCI, 1997; CADDICK, 1995). Nestes casos, observa-se que várias reações "clássicas" podem ser bastante aceleradas (muitas vezes por um fator de 10^3) quando o aquecimento é realizado por meio de um forno de micro-ondas caseiro ao invés do aquecimento convencional (placa de aquecimento, bico de Bunsen, etc). Além disso, os rendimentos de reações efetuadas sob irradiação de micro-ondas são geralmente mais elevados, há menor formação de subprodutos e não ocorrem decomposições de materiais (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

O surgimento de reatores de micro-ondas para condução de reações orgânicas ocorreu como conseqüência direta do estudo das reações em forno doméstico, que demonstrou o grande potencial desta técnica. Estes aparelhos têm algumas vantagens sobre o forno doméstico de micro-ondas, tais como: possibilidade de realização de refluxo, utilização de pressão, controle de temperatura e pressão (que não é possível no forno de cozinha). Outro fator importante, é que esses reatores operam de forma diferente que um forno doméstico, onde a distribuição de micro-ondas no interior do forno não é homogênea (forno multimodo). Nestes reatores, a distribuição é homogênea (monomodo). Além disso, a potência em um forno de micro-ondas não é, na realidade, possível de variação, pois o que ocorre é uma interrupção seqüencial da irradiação que corresponde aos níveis de potência do seletor (a amostra está submetida sempre a mesma potência, mas por períodos de tempo diferentes). Deste modo, os reatores de micro-ondas são mais eficientes do ponto de vista energético, e garantem uma maior reprodutibilidade de experimentos (SANSEVERINO, 2002).

3.9.2. Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas

Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas ainda estão em fase inicial de investigação, apesar de constituírem tema de relevante importância principalmente para aplicação em sistemas não aquosos, nos quais as enzimas apresentam uma elevada estabilidade térmica quando comparada com aquela observada em sistemas aquosos.

Trabalhos publicados sugerem a possibilidade dos campos magnéticos de alta freqüência influenciarem não apenas a velocidade inicial das reações, mas também a enantiosseletividade das enzimas quando comparado com sistemas submetidos ao aquecimento convencional (GUPTA; ROY, 2004).

A Tabela 3.10 apresenta de forma resumida exemplos de diversas reações enzimáticas assistidas por micro-ondas, com enfoque particular nos tipos de enzimas e substratos usados, bem como nos parâmetros de operação do equipamento gerador de micro-ondas.

Tabela 3.11 - Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas

Tipo de reação	Substrato	Enzima	Parâmetros das micro-ondas (Potência/ temperatura)	Referência
Transesterificação (solvente orgânico)	Acetato de metila e *n*-propanol	Lipase de *Candida antarctica*	35-300W 50-70°C	LEADBEATER; STENCEL; WOOD, 2007.
*Hidrólise **Síntese	Triolina	Lipase de *Aspergillus carneus*	*175W 38-40°C **800W 90°C	SAXENA et al., 2005.
*Esterificação **Transesterificação (solvente orgânico)	*n-Acetil-L-fenilalanina e etanol **n-Acetil-L-fenilanina etil ester e propanol	*α-Quimotripsina **Subtilisina Carlsberg	Não especificadas	ROY; GUPTA, 2003
Síntese	p-nitrofenil-β-D-galatopiranoside e lactose	B-galatosidase de *Kluyveromyces lactis*	12W 40°C	MAUGARD et al., 2003.
Acilação (solvente orgânico)	a) 1,2,3,4-Tetrahidro-1-naftol b) Mentol e ácido palmítico	Lipase de pâncreas de porco (LPP)	700W 25-35°C	LIN; LIN, 1998.
Interesterificação	Butanol etilbutirato	*Fusarium solani* Cutinase	2,45 Ghz 50°C	PARKER et al., 1996.
Hidrólise	P-nitrofenil poliéster e carboidratos	Celulase	750W 75°C	KABZA et al., 1996.
Transesterificação	Feniletanol	Lipase de *Candida antarctic*a e *Pseudomonas cepacia*	30-90 W 70-100°C	CARRILLO-MUÑOZ et al., 1996.
Esterificação	Ácido Caprílico e glicerol	Novozyme 435	200-400W 65°C	FANG; SUN; XIA, 2008.
Esterificação	Ácido Caprílico e pentanol	Lipozyme RM IM	200W 50ºC	FANG; HUANG, XIA, 2008.

O mecanismo de interação da irradiação das micro-ondas com os sistemas enzimáticos ainda não está claramente definido, entretanto alguns autores sugerem que o efeito das micro-ondas na velocidade de reação é creditado não apenas ao efeito térmico (KABZA et al., 1996). De uma maneira geral, considera-se que a velocidade de reação é acelerada desde que as moléculas absorvam energia por dois mecanismos distintos: rotação de dipolo e movimento iônico (ROY; GUPTA, 2003). Esses pesquisadores testaram o efeito de micro-ondas em

reações de esterificação usando quimiotripsina e constataram incrementos de 2 a 5 vezes nas velocidades reacionais. Combinando a ativação com sais e ajuste de pH e usando subtilisina *Carlsberg*, sob micro-ondas, foram obtidas velocidades de transesterificação 20 vezes superiores ao experimento controle (sistema não exposto ao campo).

Resultados não menos importantes foram reportados por Parker et al. (1996), enfatizando a importância da otimização da atividade da água para obter incrementos na velocidade de reação. Nesse trabalho, a enzima foi previamente hidratada e ressuspensa em meio orgânico a 50ºC por irradiação em micro-ondas, alcançando velocidades de reação de duas a três vezes superiores as obtidas sob aquecimento convencional. Finalmente, especial destaque deve ser dado ao trabalho descrito por Maugard et al. (2003) que reportaram, incrementos da ordem de 217 vezes na síntese de oligossacarídeos a partir de lactose usando β-galactosidase sob micro-ondas.

3.10. Matérias Primas

As matérias-primas utilizadas para produção de monoglicerídeos neste trabalho foram: glicerol e ácidos graxos (reações de esterificação) e glicerol e óleo vegetal (reações de glicerólise).

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres resultantes da condensação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos graxos (triacilgliceróis ou triglicerídeos), constituídos de cadeias curtas ou longas de ácidos graxos cujo grau de saturação ou insaturação é função do tipo da semente que originou o óleo. Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (ricos em ácido láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura de 20-25° C; aqueles cujo teor de insaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoléico/oléico) apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente ou inferior (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2005).

A diferença entre óleos e gorduras resume-se basicamente na aparência física (COSTA NETO et al., 2000). A resolução 20/77 do CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) define a temperatura de 20 ºC como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo todos os lipídeos de ponto de fusão inferior a essa temperatura.

Conforme a espécie de oleaginosa, variações na composição química do óleo vegetal são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura. Portanto, a análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro

procedimento para a avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e isto pode ser obtido por meio de vários métodos analíticos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e de fase gasosa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Para o desenvolvimento deste trabalho foi selecionado o óleo de babaçu, por apresentar uma composição rica em ácidos graxos saturados (aproximadamente 80%), possuir uma grande disponibilidade comercial e custo acessível.

3.10.1. Óleo de babaçu

O babaçu (O*rbignya speciosa*) destaca-se entre as palmeiras encontradas em território brasileiro pela peculiaridade, graça e beleza da estrutura que lhe é característica, chegando a atingir entre 10 a 20 metros de altura, suas folhas mantêm-se em posição retilínea, pouco se voltando em direção ao solo; orientando-se para o alto (ALBIERO et al., 2007). Seus frutos são pequenos cocos que ficam suspensos em cachos nas palmáceas, contendo de 15-20 frutos cada um (TEIXEIRA, 2008).

Atualmente, encontram-se no Brasil, vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, onde a floresta úmida cede lugar à vegetação típica dos cerrados. São os estados de Maranhão, Piauí e Tocantins que concentram as maiores extensões de matas onde predominam os babaçus, formando muitas vezes e espontaneamente, agrupamentos homogêneos, bastante densos e escuros, tal a proximidade entre os grandes coqueiros (ALBIERO et al., 2007).

O principal produto do babaçu é o óleo da amêndoa, constituindo 65% do peso da amêndoa, esse óleo pode ser usado na fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível, mais tarde transformando em margarina, e de uma torta utilizada na produção de ração animal e de óleo comestível (ALBIERO et al., 2007).

No Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar e as plantações de eucalipto são as duas principais fontes de biomassa para energia renovável. No entanto, há outras espécies que geralmente não são exploradas, como por exemplo, o babaçu. O óleo extraído dessas palmeiras pode ser usado para produzir o biodiesel, e sua exploração sustentável poderia além de gerar energia, ocasionar benefícios sócio-econômicos e ambientais para a região onde elas se encontram. Depois da crise do óleo em 1973, o Governo Federal brasileiro considerou estas palmeiras, juntamente com a cana de açúcar e a mandioca, como possíveis fontes de energia para substituir o óleo importado. Uma vez, o país decidido a basear-se no programa da cana-de-açúcar como combustível renovável, poucos estudos foram feitos utilizando-se o babaçu

como biomassa (BARUQUE et al., 1998). No entanto, há agora um interesse renovado no uso do babaçu no Brasil (TEIXEIRA, 2008).

Apesar da extraordinária potencialidade do babaçu, medida pela dimensão de ocorrência já disponível e nobreza das varias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu ainda é realizada, em grande parte do nordeste, de forma artesanal, no entanto, ressalta-se que já se dispõe de equipamentos para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes (PARENTE, 2008).

O esmagamento do coco produz dois tipos de óleos: um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico). A utilização do óleo de babaçu para fins comestíveis tem sofrido declínio constante, em virtude de duas razões: a substituição por óleos mais acessíveis, e a tendência dos consumidores a optarem por óleos e gorduras não saturadas (ALBIERO et al., 2007).

O óleo de soja é o principal concorrente do óleo de babaçu no mercado de óleos comestíveis. O mercado brasileiro formal para o óleo de babaçu comestível é estimado em 5,5 mil toneladas/ano, predominantemente para o mercado nordestino. Além deste, existe um mercado informal caracterizado pelo autoconsumo das famílias de baixa renda localizadas nas regiões de ocorrência das palmeiras. O mercado brasileiro de óleos láuricos constitui-se atualmente no principal mercado para o óleo de babaçu. As indústrias do segmento de higiene, limpeza e cosméticos absorvem cerca de 35 mil toneladas anuais de óleo de babaçu bruto (ALBIERO et al., 2007).

3.10.2. Glicerol

O glicerol, um álcool trihidroxilado, é um líquido claro, higroscópico, viscoso e de gosto adocicado. O glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como os glicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais e pode ser produzido por fermentação microbiana. O glicerol é também recuperado como co-produto no processo de manufatura de sabões, redução de ácidos graxos, ou quando óleos e gorduras são transesterificados com metanol (ou outro álcool) para a produção de metil ésteres (KNOTHE et al., 2006).

Atualmente, indústrias que produzem glicerol estão em plena decadência e outras que utilizam o glicerol como matéria-prima estão surgindo, devido ao grande excedente de glicerol formado como subproduto na produção do biodiesel, pois 10% de toda produção corresponde à formação deste álcool. A Figura 3.14 ilustra as diferentes aplicações para o glicerol.

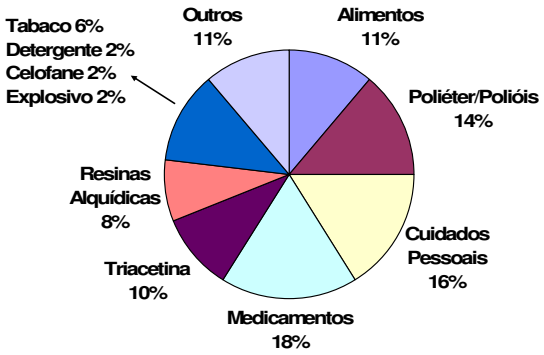


Figura 3.14. Aplicações gerais do glicerol.

Fonte: PAGLIARO et al., 2007.

Com o incentivo do Governo Federal à Política do Biodiesel e a entrada em vigor do B3, mistura obrigatória de 3% do biodiesel ao óleo diesel, em 2008, o Brasil produziu cerca de 100 mil toneladas de glicerina geradas a partir da fabricação do biodiesel. No entanto, o aspecto ecológico desta iniciativa pode ser arranhado se não for encontrada uma destinação para esse excedente. Em 2010 está previsto o aumento deste percentual para 5% (B5), gerando cerca de 250 mil toneladas de glicerina por ano (VEDANA, 2009). Esses valores são muito superiores ao consumo e produção nacional atual, estimado em cerca de 30 mil toneladas anuais (MOTA; DA SILVA; GONÇALVES, 2009). Ressalta-se ainda que embora não haja definida na política Nacional de Biodiesel uma alternativa para absorver todo este volume extra de glicerina, torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas que agreguem valor a este subproduto.

Desta forma, novas aplicações para o glicerol estão sendo desenvolvidas visando a aplicação na indústria de alimentos, polímeros (poliglicerol e poliuretano), no campo de estabilizantes da madeira e na produção de pequenas moléculas, tais como: dihidroxiacetona, ácidos glicéricos e hidroxipirúvicos e carbonato de glicerol (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Dentre as possíveis aplicações do glicerol, está a utilização deste álcool como fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano fornecendo produtos biotecnológicos, como por exemplo: 1,3-propanodiol, dihidroxiacetona, succinato, propionato, biossurfatantes, entre outros (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

O objetivo deste trabalho se insere nas prioridades nacionais relativas à destinação do glicerol residual gerado pela produção do biodiesel, tendo como proposta a síntese enzimática de monoglicerídeos (surfatantes) utilizados amplamente em produtos alimentícios, fármacos e cosméticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Enzimas

Os experimentos foram realizados empregando duas preparações comerciais de lipases livres: *Burkholderia cepacia* (Lipase PS, AMANO – Lote: 01022TD) e *Penicillium camembertii* (Lipase G – AMANO – Lote: 08122HI) e uma preparação comercial de lipase imobilizada: *Mucor miehei* (Lipozyme IM^{20}).

4.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: glicerol (Merck), ácidos graxos, como: ácido láurico (C_{12}), mirístico (C_{14}), palmítico (C_{16}), esteárico (C_{18}) e oléico ($C_{18:1}$) (Riedel-de Haën). O óleo de babaçu foi gentilmente cedido pela COGNIS (Jacareí-São Paulo), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de 3,5% Octanóico, 4,5% Decanóico, 44,7% Láurico, 17,5% Mirístico, 9,7% Palmítico, 3,1% Esteárico, 15,2% Oléico e 1,8% Linoléico.

4.1.3. Suporte de imobilização

Como suporte foi selecionada a matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (SiO_2-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (EUA). A matriz possuia as seguintes propriedades: diâmetro médio de poros de 22,91 Å, área de superfície (BET) de 461,00 $m^2.g^{-1}$ e volume de poros de 0,275 $cm^3.g^{-1}$ (SANTOS et al., 2008b).

4.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona - Synth, etanol – Nuclear, hexano – Quimex, clorofórmio - Cromoline, ácido acético glacial - Synth), peneira molecular 3,2 mm (Peneira molecular 3A - Sigma Aldrich), álcool polivinílico (Across), HCl (Isofar), epicloridrina (Sigma), polietilenoglicol (Synth - MM 1500), Tetraetilortossilicato (Sigma – Aldrich), *Terc*-butanol (Cromoline), Lecitina de soja (Olleman), Hidroxitolueno Butilado (Sigma-Aldrich), Tocoferol (Sigma-Aldrich), Triton X100 (Colleman Chemicals).

4.1.5. Padrões cromatográficos

O método cromatográfico utilizado para a quantificação dos produtos, foi desenvolvido por Freitas, 2006. Os padrões utilizados (mono, di e triglicerídeos) foram

adquiridos da empresa AccuStandard, com exceção da trioleína, adquirida da CHEM SERVICE. Os padrões utilizados, bem como seus códigos, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Nomenclatura e códigos dos padrões glicéricos utilizados para estabelecimento do método cromatográfico

Monoglicerídeos	Cód.	Diglicerídeos	Cód.	Triglicerídeos	Cód.
Monocaprina	GS – 006N	Dicaprina	GS – 005N	Tricaprina	GS – 004N
Monolaurina	GS – 009N	Dilaurina	GS – 008N	Trilaurina	GS – 007N
Monomiristina	GS – 012N	Dimiristina	GS – 011N	Trimiristina	GS – 010N
Monopalmitina	GS – 015N	Dipalmitina	GS – 014N	Tripalmitina	GS – 013N
Monooleína	UG – 012N	Dioleína	UG – 011N	Trioleína	Pz – 880

4.1.6. Coluna capilar

A coluna capilar utilizada na análise cromatográfica foi a coluna CP Sil 5CB (10 m X 0,25 mm X 0,12 μm) fabricada pela Varian, descrita na literatura como adequada para a quantificação de monoglicerídeos (FREITAS, 2006).

4.1.7. Biorreator de leito fixo

Para a construção e adaptação do biorreator de leito fixo para a produção dos monoglicerídeos, foram adquiridos reatores de vidro, bomba peristáltica, placa de agitação, tubulações de silicone, banho termostatizado, aquecedor e resistências flexíveis. As especificações dos equipamentos adquiridos estão descritas na Tabela 4.2. As conexões foram feitas por tubos de silicone e de marprene com as seguintes especificações: WATSON MARLOW: 1.6 X 4.0 (WATON – 913. AJ40. 016); 1.6 X 3.2 (WATON – 913. AJ32. 016); 1.6 X 1.6 (WATON – 913. AJ16. 016); 1.6 X 0.8 (WATON – 913.AJ08.016); 1.6 X 0.5 (WATON – 913.AJ05.016); 1.6 X 1.6 (WATON – 913.AJ16.024); ALQUILABOR: de = 0,5 cm e di = 0,3 cm (cód. 200), de = 1,0 cm e di = 0,6 cm (cód. 203), de = 0,8 cm e di = 0,4 cm (cód. 201).

Tabela 4.2 - Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fixo

Equipamento	Descrição	Marca
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica SJ-1211	ATTO/Japão
Banho termostatizado	Banho Ultratermostato Criostato	NOVA ETICA
Reatores de vidro de coluna encamisado	1) Diâmetro = 15 mm, Comprimento = 55 mm e Volume = 10 mL 2) Diâmetro = 20 mm, Comprimento = 120 mm e Volume = 37,70 mL	Construído em oficina especializada (UNICAMP)
Reatores de vidro cilíndricos com três bocas	Volume = 100 mL	Construído em oficina especializada (DIST)
Agitador magnético	Agitador Magnético MA 085	MARCONI
Aquecedor	Aquecedor e Desumidificador de ar (2000W)	MONDIAL
Resistências flexíveis	Resistência flexível 2m/25W	KW Resistências Elétricas

4.1.8. Biorreator de leito fluidizado

Para a construção e adaptação do biorreator de leito fluidizado foram adquiridos um reator de coluna de vidro, reatores cilíndricos, placas de agitação, bombas peristálticas, tubulações de silicone, resistências flexíveis, aquecedor e banho termostatizado. As especificações dos equipamentos adquiridos estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Especificações dos itens adquiridos para a construção do biorreator de leito fluidizado

Equipamento	Descrição	Marca
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica 401U/DM2	WATSON MARLOW
Bomba peristáltica	Bomba Peristáltica MasterFlex C/L	COLE-PARMER INSTRUMENT Co.
Banho termostatizado	Banho Termostatizado TE - 2005	TECNAL
Agitador magnético	Agitador Magnético MA 085	MARCONI
Reator de vidro de coluna encamisado	Diâmetro = 15 mm, Comprimento = 21 mm e Volume = 37 mL	Construído em oficina especializada (PROVERMEX)
Reatores de vidro cilíndricos com três bocas	Volume = 100 mL	Construído em oficina especializada (DIST)
Aquecedor	Aquecedor e Desumidificador de ar (2000W)	MONDIAL
Resistências flexíveis	Resistência flexível 2m/25W	KW Resistências Elétricas

As conexões foram feitas por tubos de silicone e de marprene com as seguintes especificações: WATSON MARLOW: 1.6 X 4.0 (WATON – 913. AJ40.016); 1.6 X 3.2 (WATON – 913.AJ32.016); 1.6 X 1.6 (WATON – 913.AJ16.016); 1.6 X 0.8 (WATON – 913.AJ08.016); 1.6 X 0.5 (WATON – 913.AJ05.016); 1.6 X 1.6 (WATON – 913.AJ16.024); ALQUILABOR: de = 0,5 cm e di = 0,3 cm (cód. 200), de = 1,0 cm e di = 0,6 cm (cód. 203), de = 0,8 cm e di = 0,4 cm (cód. 201).

4.1.9. Reator de micro-ondas

Para a realização das reações de glicerólise do óleo de babaçu e de esterificação do glicerol com ácidos graxos empregando campos magnéticos, foi utilizado o reator de micro-ondas Discover/University-Wave (Cem Corporation), modelo PN # CE-925SB235-SPB-PLUG. Este reator possui câmara interna cilíndrica com as seguintes dimensões: 100 mm de altura, 75mm de diâmetro, dotado de agitação magnética, a qual pode ser ajustada em três níveis (baixo, médio e alto). A potência máxima de operação de 300W. O controle de temperatura é realizado com auxílio de ar comprimido direcionado para o interior da câmara; o fluxo de ar pode ser configurado para operar em diferentes níveis de pressão e/ou de modo intermitente. A temperatura da reação é monitorada por um sensor de infravermelho localizado na parte inferior da câmara. Um software ChemDriver foi utilizado para coleta de dados referentes a cada experimento, como por exemplo: variação de irradiação e temperatura em função do tempo. Destaca-se ainda que o formato cilíndrico da câmara interna propicia a irradiação homogênea em toda a extensão da mistura reacional, diferentemente dos reatores de micro-ondas construídos a partir de adaptações em fornos domésticos.

4.2. Metodologia Experimental

4.2.1. Preparação do suporte híbrido (SiO_2-PVA)

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi inicialmente sintetizado conforme metodologia descrita por Lima-Barros et al. (2002), pela mistura de 5 mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 5 mL de etanol e 6 mL de solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60 º C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado, sendo a agitação mantida nesta temperatura por mais 40 min. A mistura foi vertida em placas de Eliza e mantida à temperatura ambiente por 48h (aproximadamente) para completa solidificação (formação da rede interpenetrada de polissiloxano-álcool polivinílico – SiO_2-PVA). O sólido foi então submetido à moagem, até que o material passasse

completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 MESH e ficasse retido em uma peneira de 60 MESH (aproximadamente 0,231 a 0,308 mm de diâmetro de partículas), sendo em seguida ativado. Em seguida, o suporte foi embebido em solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7-8), na proporção massa de suporte: volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, sendo em seguida levado à estufa (60ºC) por 24 h (SANTOS et al., 2008a).

4.2.2. Imobilização das lipases no suporte ativado

O suporte ativado foi embebido em hexano (1:10) e mantido sob agitação durante 2 h. Após este período adicionou-se a lipase PS ou lipase G numa razão mássica enzima: suporte de 1:4. Polietilenoglicol (PEG-1500) foi adicionado como estabilizante da enzima. Os sistemas foram mantidos sob suave agitação a temperatura ambiente por 2h, seguido de contato estático por um período adicional de 18h a 4ºC. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração à vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados em valores abaixo de 15%. Na Figura 4.1 é mostrado o esquema do procedimento de imobilização. As atividades hidrolítica e sintética dos derivados foram determinadas, como descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3. A Tabela 4.4 apresenta as propriedades catalíticas da lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA estabelecidas por Da Rós (2009).

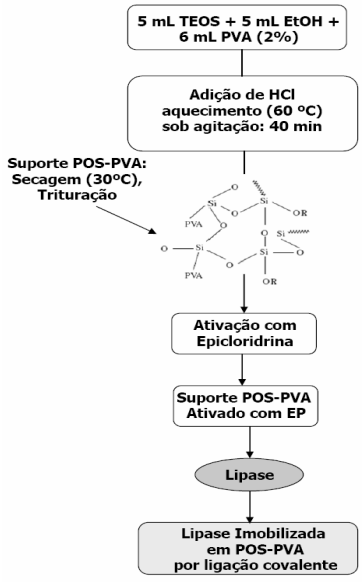


Figura 4.1. Esquema do procedimento experimental de preparo do suporte e imobilização da lipase.

Tabela 4.4 - Propriedades catalíticas da lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) imobilizada em SiO_2-PVA

Parâmetros	Valores
Rendimento de imobilização, (%).	30,27
Temperatura ótima, ºC	40-60
pH ótimo	8,5
Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) à 60ºC, (h)	6,24
Constante de desativação térmica (*Kd*), (h^{-1})	0,11
Parâmetros cinéticos *Km* (mM)	1883
Vmax (U/g)	3873

4.2.3. Planejamento estatístico

Visando otimizar a formação de monoglicerídeos, foi realizado um estudo do efeito das variáveis: temperatura e razão molar dos materiais de partida nas reações de glicerólises do óleo de babaçu. Para isso, foram propostos dois planejamentos experimentais: 1) planejamento central composto ortogonal e outro fatorial 2^2 com face centrada, cujas variáveis codificadas são apresentadas nas Tabelas 4.5 e 4.6. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA (versão 7.0), considerando como variável resposta a formação de monoglicerídeos. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão (teste t de Student's) e ainda em tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma quadrática dos fatores (SQF), soma média quadrática (SMQF), teste F e nível de significância (*p*).

Tabela 4.5 - Valores reais e codificados das variáveis independentes propostas no planejamento central composto ortogonal

Variáveis independentes	Níveis codificados				
	-1.41	**-1**	**0**	**+1**	**1.41**
X_1 - Razão molar glicerol/óleo	8:1	10:1	15:1	20:1	22:1
X_2- Temperatura, °C	41	45	55	65	69

Tabela 4.6 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2^2 com face centrada

Variáveis independentes	Níveis codificados		
	-1	**0**	**+1**
X_1 - Razão molar glicerol/óleo	5:1	10:1	15:1
X_2- Temperatura, °C	40	45	50

4.2.4. Densidade cristalina do suporte

A densidade cristalina ou densidade do esqueleto sólido foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Colocou-se uma massa conhecida de partículas no interior do balão e as mesmas foram imersas em água destilada sob vácuo, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi completado com água, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido por diferença após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (ZANIN, 1989).

4.2.5. Velocidade mínima de fluidização

A velocidade mínima de fluidização foi obtida conforme metodologia descrita por Zanin (1989). Os ensaios foram conduzidos pelo preenchimento do reator de leito fluidizado com meio reacional (quantidades adequadas de glicerol, óleo de babaçu e *terc*-butanol) empacotado com suporte polissiloxano-álcool polivinílico ativado com epicloridrina (sem enzima imobilizada). A vazão da bomba de recirculação foi gradativamente aumentada até seu máximo valor e, em seguida, gradativamente diminuída. Os valores de altura de leito correspondentes para cada vazão foram anotados. A vazão de recirculação foi medida por método direto, ou seja, cronometrando-se o tempo necessário para que a bomba preenchesse um determinado volume em uma proveta. A altura de leito foi medida usando-se uma escala graduada em mm.

A velocidade mínima de fluidização foi calculada a partir dos dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do líquido, aos quais ajustou-se a correlação de Richardson e Zaki (1954), citados por Zanin (1989), conforme descrito na Equação 4.1.

$$\frac{U}{U_{tc}} = \varepsilon^{n} \qquad (4.1)$$

Em que:

U... velocidade superficial do fluido
Utc... velocidade terminal corrigida da partícula, sendo log(Utc) = log(Ut)-dp/di, onde Ut é a velocidade terminal da partícula, dp é o diâmetro médio da partícula e di é o diâmetro interno da coluna
n... coeficiente de expansão
ε... porosidade do leito

A porosidade do leito foi calculada por meio da Equação 4.2.

$$\varepsilon = \frac{(V_t - V_S)}{V_t} = 1 - \frac{M_s}{(\rho_c . A . H)} \qquad (4.2)$$

Em que:

Vt... volume total do reator
Vs... volume do leito de partículas sólidas
Ms... massa de partículas sólidas
ρc... densidade cristalina da partícula
A... área do reator atravessada pelo fluido
H... altura do leito

A área (A) utilizada para o cálculo da porosidade do leito foi correspondente a área da seção transversal do reator atravessada pelo fluxo ascendente de líquido na região ocupada pelo leito.

Considerou-se como velocidade mínima de fluidização a velocidade superficial do fluido na Equação de Richardson; Zaki para a qual a porosidade do leito corresponde à altura do leito com velocidade superficial de fluido nula.

A densidade cristalina ou densidade do esqueleto sólido foi determinada conforme descrito no item 4.2.4.

4.2.6. Produção de monoglicerídeos

4.2.6.1. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu

As reações em batelada foram realizadas em reatores de vidro esféricos e cilíndricos (50 – 100mL) contendo óleo de babaçu e glicerol, numa razão molar variando de 5:1 a 20:1 (glicerol/óleo de babaçu). As misturas foram incubadas com lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA na proporção de 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 24 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 40 a 70 ºC. A atmosfera inerte, quando utilizada, foi garantida pela inserção de um ponto de N_2 em uma das entradas do reator, impedindo a exposição do meio reacional ao ar (presença de O_2). O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação dos produtos formados por cromatografia de fase gasosa.

4.2.6.2. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu em reator de micro-ondas

As glicerólises sob irradiação de micro-ondas foram realizadas em reatores esféricos (100 mL), utilizando agitação magnética (nível médio) e em reatores cilíndricos (50 mL), empregando-se agitação mecânica (400-450 rpm), sendo este sistema composto de um agitador mecânico contendo uma haste de vidro e uma pá de aço inox. Os reatores foram inseridos na câmara do reator de micro-ondas Discover, sendo utilizada uma irradiação praticamente constante de 15 W para manter a temperatura do meio reacional a 50 ºC. As sínteses foram realizadas numa razão molar de 15:1 (glicerol/óleo de babaçu), sob atmosfera inerte (N_2), incubadas com lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA na proporção de 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 6h. A conversão mássica dos produtos formados durante a reação foi obtida por análise cromatográfica.

4.2.6.3. Glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo

A mistura reacional de óleo de babaçu e glicerol (razão molar = 15:1 glicerol/óleo) foi mantida em um frasco de alimentação, sob agitação magnética e temperatura de 50 °C. O substrato foi bombeado através do reator de leito fixo (diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL) com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-HATTO), com vazões entre 0,017 a 0,045 mL/min. O reator encamisado consistia de uma coluna empacotada contendo 6,70g (massa seca) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA. A densidade cristalina do derivado imobilizado seco era de 1,865 g/mL. O esquema experimental está demonstrado na Figura 4.2. O tempo de residência foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.3 a 4.5:

$$\tau = \frac{V}{v_0} \tag{4.3}$$

$$V = V_{reator} - V_{catalisador} \tag{4.4}$$

$$V_{catalisador} = \frac{w}{\rho} \tag{4.5}$$

em que: τ = é o tempo de residência (min), V = volume útil do reator (mL), v_0 = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL/min), V_{reator} = volume total do reator, $V_{catalisador}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, w = peso do catalisador seco (g), ρ = densidade cristalina do biocatalisador seco (g/mL).

A temperatura do reator de leito fixo foi mantida a 50 °C pela circulação de água controlada em banho de aquecimento termoestabilizado. A coluna foi empacotada com uma suspensão do derivado imobilizado no meio reacional e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período equivalente a 3 tempos de residência. Esta metodologia também permitiu a eliminação de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. A atmosfera inerte foi garantida pelo acoplamento de uma bexiga contendo N_2 no frasco de alimentação, protegendo os substratos da exposição ao ar (presença de O_2). As amostras foram recolhidas e estocadas a -2 °C, até a realização das análises cromatográficas. Os resultados das análises de cromatografia gasosa foram expressos em porcentagens mássicas dos produtos obtidos: monos, dis e triglicerídeos.

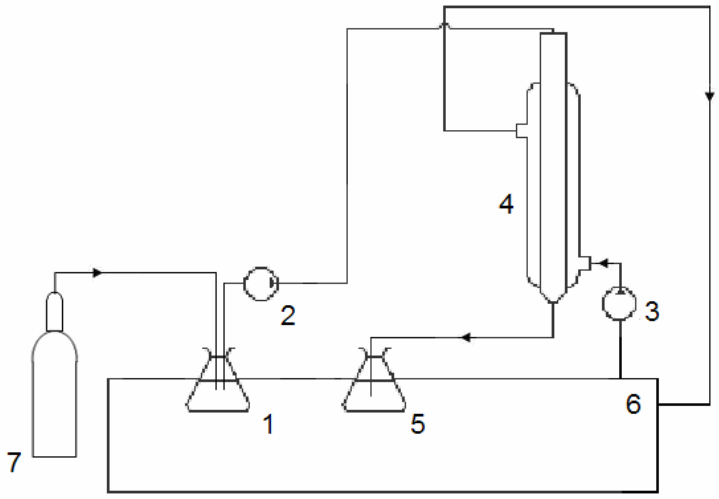


Figura 4.2. Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fixo.

4.2.6.4. Glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fluidizado

Para a condução do processo em reator de leito fluidizado em modo contínuo, utilizou-se uma coluna de vidro encamisada com volume total de 37 mL, correspondendo a 21 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. O meio reacional composto por glicerol e óleo de babaçu (razão molar = 15:1) e *terc*-butanol como solvente (razão de 1:1 ou 2:1 solvente/meio reacional total), foi armazenado em um frasco de alimentação, mantido sob agitação magnética e atmosfera inerte. O meio era bombeado para o reator de circulação numa vazão de 0,082 mL/min e recirculado na coluna através de uma bomba peristáltica, sendo o produto recolhido

pelo topo do reator. Na coluna, foram adicionados 12 g (massa seca) de lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) imobilizada em SIO_2-PVA, correspondendo a uma razão mássica do derivado imobilizado reacional de 17%. As vazões de alimentação e de fluidização foram, respectivamente, de 0,082 mL/min e 0,017mL/min, o que possibilitou a fluidização do derivado imobilizado na coluna até a altura de aproximadamente 12,5 - 14,5 cm. O reator foi mantido a 50°C. O esquema experimental está demonstrado na Figura 4.3. O tempo de residência foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme citado no item 4.2.6.3. Amostras foram retiradas para acompanhamento do processo por cromatografia em fase gasosa.

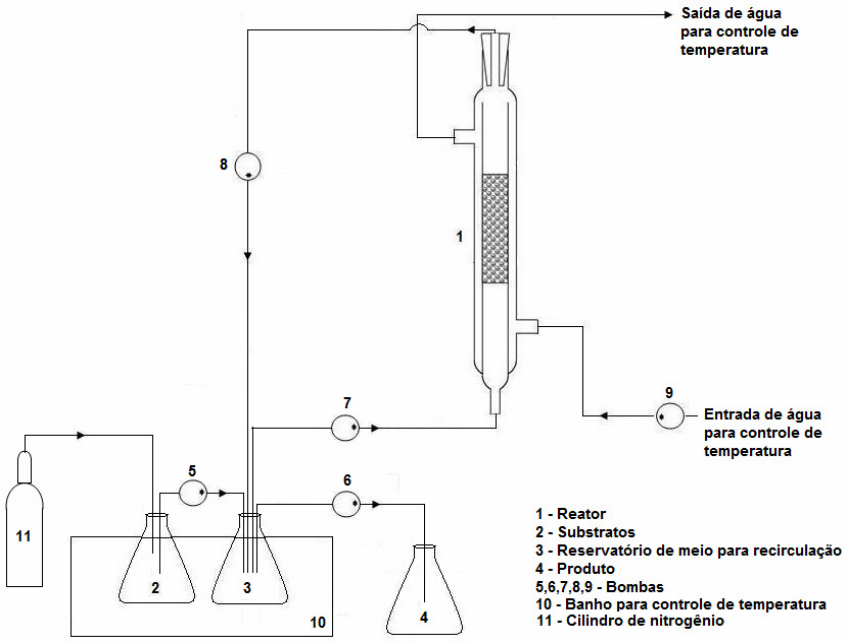


Figura 4.3. Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fluidizado.

4.2.6.5. Esterificação descontínua do glicerol com ácidos graxos

As sínteses foram realizadas em reatores de vidro esférico (50 mL) contendo misturas adequadas de glicerol, ácido graxo (C_{12} - $C_{18:1}$) e preparação de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, com agitação magnética na faixa de temperatura entre 45 a 65ºC, dependendo do ponto de fusão do ácido graxo empregado. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, quantificando o consumo do ácido graxo e as concentrações dos monos, dis e triglicerídeos por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo Varian 3800).

4.2.6.6. Esterificação descontínua sob irradiação de micro-ondas

As esterificações sob irradiação de micro-ondas foram realizadas em reatores esféricos (100 mL), utilizando agitação magnética (nível médio). Os reatores foram inseridos na câmara do reator de micro-ondas Discover, sendo utilizada uma irradiação praticamente constante de 15 W para manter a temperatura do meio reacional a 50 ºC. As sínteses foram realizadas empregando meios constituídos de glicerol/ácido láurico nas seguintes razões molares: 3:1, 5:1 e 8:1, incubadas com lipase G imobilizada em SiO_2-PVA ou Lipozyme IM[20] na proporção de 5% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 6h. Os produtos formados durante a reação foram quantificados por cromatografia de fase gasosa.

4.2.6.7. Esterificação em reator de leito fixo em regime contínuo

As reações de esterificação do glicerol com os ácidos láurico e oléico foram efetuadas em meio isento de solvente ou empregando *terc*-butanol na proporção de 1:1 *terc*-butanol/meio reacional. Em ambos experimentos, os meios reacionais eram compostos de misturas de glicerol e ácido graxo numa razão molar fixa de 8:1. As misturas reacionais foram mantidas em um frasco de alimentação, sob agitação magnética e temperatura de 50°C e bombeadas através do reator de leito fixo (diâmetro interno= 20 mm, comprimento = 120 mm e volume = 37,70 mL ou diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL) com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-HATTO), com vazões entre 0,018 a 0,024 mL/min. Para esta série de experimentos foi também utilizada resistências flexíveis envolvidas nas tubulações de silicone ou marprene (mangueiras de alimentação) para evitar a solidificação dos materiais de partida. O reator encamisado consistia de uma coluna empacotada contendo 6,70g (massa seca) de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. A densidade cristalina do derivado imobilizado seco era de 2,878 g/mL. O tempo de residência foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme descrito anteriormente no item 4.2.6.3.

A temperatura do reator de leito fixo foi mantida a 50 °C pela circulação de água controlada em banho de aquecimento termoestabilizado. A coluna foi empacotada com uma suspensão do derivado imobilizado no meio reacional e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período equivalente a 3 tempos de residência. Esta metodologia também permitiu a eliminação de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. As amostras foram recolhidas e estocadas a -2 °C, até a realização das análises cromatográficas. Os resultados das análises de cromatografia gasosa foram expressos em porcentagens mássicas dos produtos obtidos: monos, dis e triglicerídeos.

4.2.7. Separação dos produtos formados nas reações de glicerólise e esterificação

As reações foram finalizadas adicionando-se a cada grama de amostra do meio reacional, uma mistura de 9 mL de clorofórmio e 2,5 mL de ácido acético glacial, com homogeneização por 10 min sob agitação constante. Em seguida o conteúdo foi transferido para uma proveta de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. Posteriormente, o conteúdo da proveta foi transferido para um funil de decantação e deixado em repouso para a separação das fases (AOCS, 1990). A fase aquosa (contendo também glicerol) foi descartada e a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador Fisaton 801.

4.3. Métodos de Análises

4.3.1. Método cromatográfico para dosagem de glicerídeos

As concentrações de monos, dis e triglicerídeos foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna capilar (CPSil 5CB: 10 m X 0,25 mm X 0,12 μm, Varian), temperaturas do detector e injetor de 300 °C, fluxo da coluna de 2 mL/min (o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio), pressão da coluna de 10 psi, split de 1:20, atenuação = 1, temperatura de 80 °C no momento da injeção, variando-se a rampa de aquecimento para cada método de análise (FREITAS et al., 2007).

4.3.2. Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da enzima imobilizada PS foi determinada pela reação de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). As condições de incubação das reações de hidrólise foram: pH 7,0 (tampão fosfato) e temperatura de 37°C. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de produto por minuto de reação (U), nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (μmoles/g.min), sendo que grama refere-se à massa de biocatalisador.

4.3.3. Atividade sintética

A atividade sintética das lipases foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação com glicerol, com razão molar ácido: álcool de 3:1 à 60°C, com enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40 min. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética. Alíquotas de 150 μL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 min de reação e diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de

cessar a reação. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,03 N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1μmol de ácido láurico por minuto, nas condições experimentais (LANGONE et al., 2002).

4.3.4. Análise da viscosidade dos meios reacionais

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 50 °C, empregando 0,5 mL de fluido. Os dados obtidos foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 4.6), conforme descrito por Da Rós (2009).

$$T = K\gamma^{n} \qquad (4.6)$$

em que: T é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

4.3.5. Teor de umidade

Os teores de água nos suportes puro e ativado, bem como nos sistemas imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

4.3.6. Cálculo da seletividade na reação de esterificação

Os valores de seletividade obtidos nos sistemas reacionais testados foram determinados empregando-se a Equação 4.7.

$$\%\,Seletividade = \frac{\%\,MAG}{\%\,MAG + \%\,DAG + \%\,TAG} \qquad (4.7)$$

em que: %MAG = é a quantidade de monoglicerídeos formada na reação, %DAG = é a quantidade de diglicerídeos formada na reação e %TAG é a quantidade de triglicerídeos formada na reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento deste trabalho foram estudadas duas rotas enzimáticas para produção de monoglicerídeos: glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com ácidos graxos de diferente tamanho de cadeia carbônica e grau de insaturação (C_{12} a $C_{18:1}$). Para cada tipo de reação foi utilizada uma preparação de lipase comercial, tomando por base os resultados dos testes de triagem efetuados anteriormente (FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2009a). As reações de glicerólise foram catalisadas pela lipase de *Burkolderia cepacia* imobilizada em SiO_2-PVA empregando duas maneiras de operação: 1) glicerólises descontínuas realizadas em reatores esféricos, cilíndricos e em reator de micro-ondas e 2) glicerólises contínuas realizadas em reatores de leitos fixo e fluidizado. Para as reações de esterificação, foi utilizada a lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA como biocatalisador e também testadas em dois modos de operação: 1) esterificações descontínuas, realizadas em reatores esféricos e em reator de micro-ondas e 2) esterificações contínuas, realizadas em reatores de leito fixo. Em ambas as reações foram estudadas a influência de diferentes fatores que afetam a síntese de monoglicerídeos, preferencialmente em sistemas isento de solventes.

5.1. Reações de glicerólise

5.1.1. Reações de glicerólise descontínuas do óleo de babaçu

Em trabalho anteriormente realizado (FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2009b), de um universo de sete preparações de lipases microbianas testadas, a lipase de *Burkolderia cepacia* (lipase PS) imobilizada em SiO_2-PVA foi selecionada como a mais eficiente para a síntese de monoglicerídeos pela rota de glicerólise. Em função da baixa concentração de MAG obtida nesse ensaio de triagem (máxima 10%), testes adicionais foram realizados visando estudar a influência dos fatores mais importantes na síntese de MAGs, tais como: influência da razão molar entre os materiais de partida e da temperatura, emprego da atmosfera inerte, geometria do reator, utilização de agentes antioxidantes e emulsificantes e efeito da irradiação de micro-ondas.

5.1.1.1. Síntese de monoglicerídeos via glicerólise enzimática do óleo de babaçu: Maximização por planejamento de experimentos

O efeito da temperatura e da razão molar glicerol/óleo de babaçu no desempenho da reação de glicerólise foi avaliado por meio de um planejamento experimental central

composto ortogonal (2^2 com pontos estrelas), constituído de 8 experimentos e 3 pontos centrais para estimativa do erro experimental. Os experimentos foram efetuados em reatores esféricos contendo meios reacionais preparados em diferentes razões molares (glicerol/óleo) de 8:1 a 22:1 e incubados com 10% (m/m) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA ativado com epicloridrina (1300-1600 U/g) em temperaturas variando na faixa entre 41 a 69 °C. Todos os experimentos foram conduzidos por um período máximo de 24 h, retirando-se amostras em períodos pré-determinados. As faixas de variação de ambas variáveis foram baseadas em dados descritos na literatura (KAEWTONG; SIRISANSANEEYAKUL; PRASERTSAN, 2005; TUTER et al., 1999). O progresso das reações de glicerólise em função do tempo está ilustrado na Figura 5.1. A Figura 5.2 mostra a distribuição da mistura glicerídica formada nos ensaios experimentais (6 h de reação). A matriz experimental proposta juntamente com os resultados obtidos para a produção de MAG (%) é apresentada na Tabela 5.1.

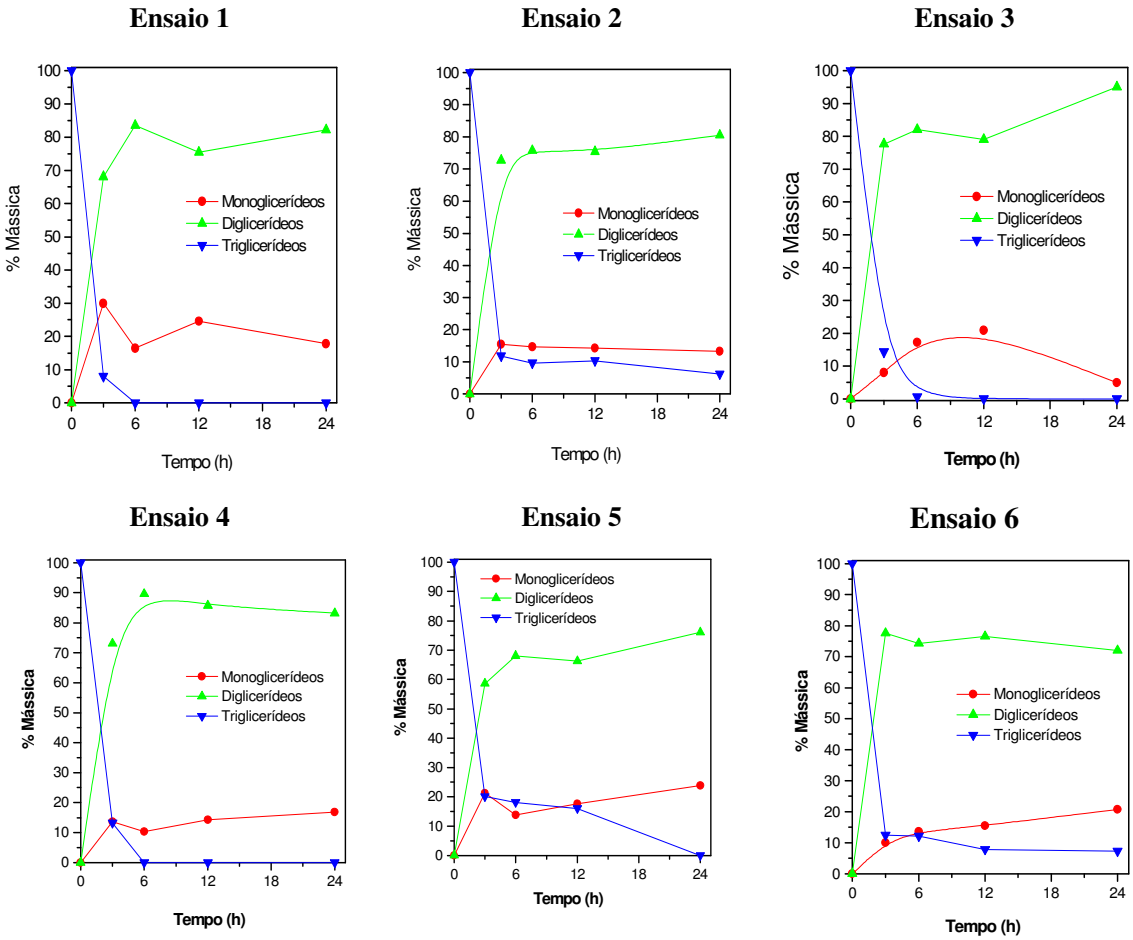


Figura 5.1. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 6).

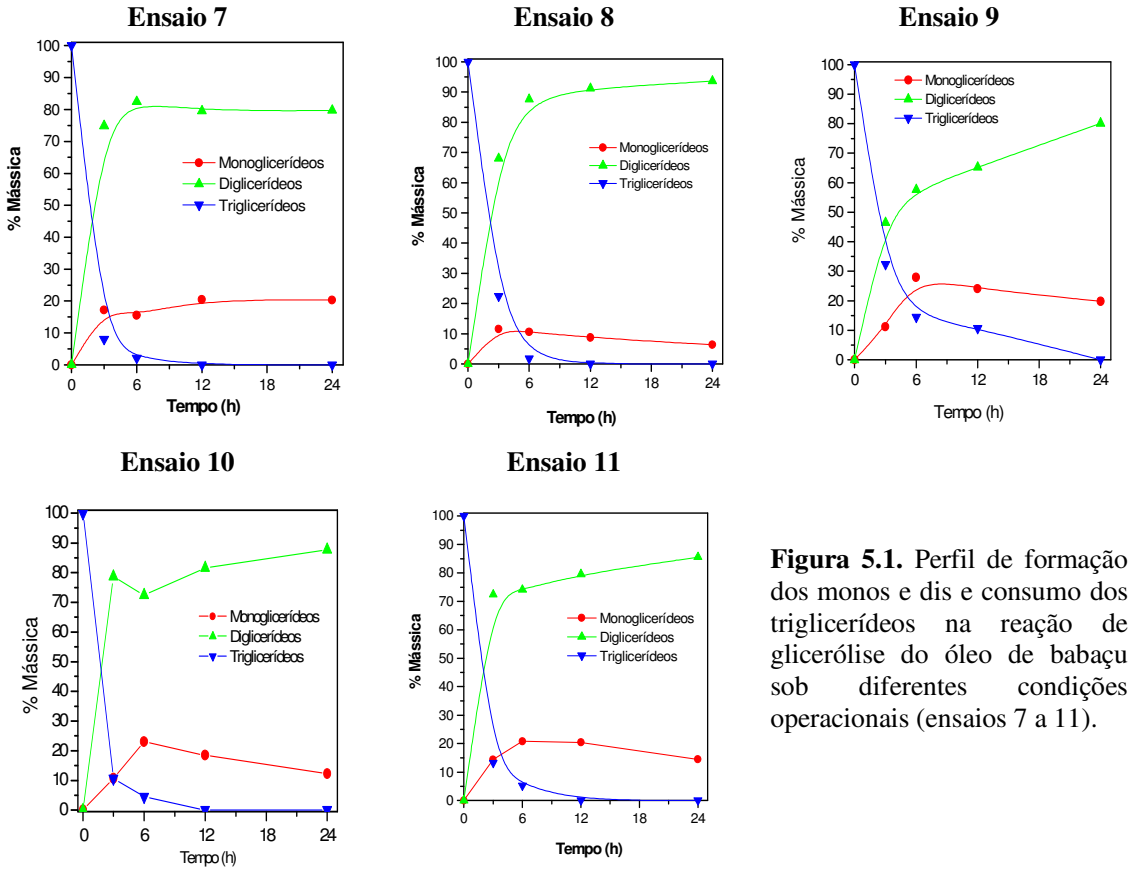


Figura 5.1. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu sob diferentes condições operacionais (ensaios 7 a 11).

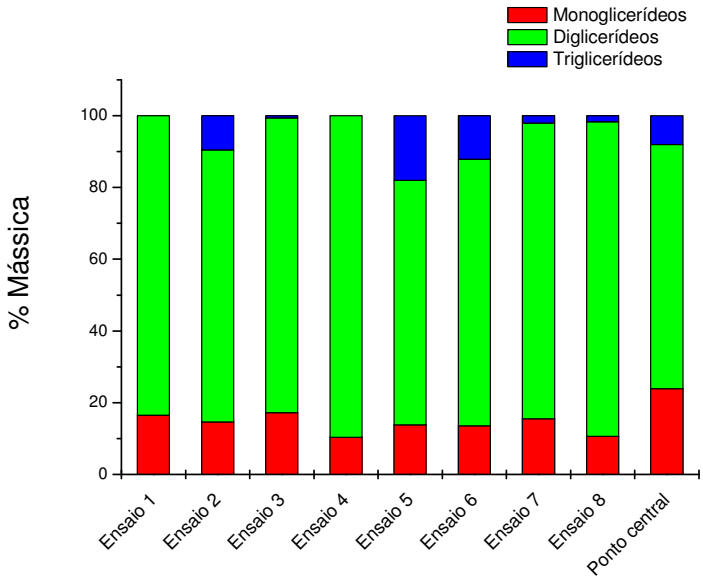


Figura 5.2. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA nas diferentes condições ensaiadas de acordo com o planejamento experimental central composto ortogonal.

Tabela 5.1 - Matriz do planejamento experimental central composto ortogonal (2^2 com pontos estrelas) e resultados obtidos

Ensaios	Valores codificados		Valores reais		Variável resposta MAGs (%)
	X_1	X_2	Razão Molar (Glicerol/óleo)	Temperatura (°C)	
1	-1	-1	10:1	45	16,48
2	-1	1	10:1	65	14,65
3	1	-1	20:1	45	17,24
4	1	1	20:1	65	10,37
5	-1,41	0	8:1	55	13,84
6	1,41	0	22:1	55	13,63
7	0	-1,41	15:1	41	15,53
8	0	1,41	15:1	69	10,59
9	0	0	15:1	55	27,94
10	0	0	15:1	55	23,07
11	0	0	15:1	55	20,77

Verifica-se na Tabela 5.1 que em todas as condições ensaiadas houve formação de monoglicerídeos, variando entre 10 a 27%. Os valores mais elevados foram obtidos nos ensaios 9 a 11 (razão molar glicerol/óleo de 15:1 e temperatura de 55 °C).

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, valor de *p* e valor de t para a resposta analisada apresentadas na Tabela 5.2, indicam que somente as variáveis quadráticas foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95%.

Tabela 5.2 - Estimativa dos efeitos para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento experimental central composto ortogonal para um nível de confiança 95%

Variáveis	Efeitos	Desvio padrão	Valor t	Valor *p*
Média	23,93	± 1,64	14,57	0,000*
X_1	-2,25	± 2,01	-1,12	0,3143
X_1^2	-9,55	± 2,40	-3,99	0,0105*
X_2	-2,63	± 2,01	-1,31	0,2485
X_2^2	-10,22	± 2,40	-4,27	0,009*
$X_1 X_2$	-2,52	± 2,84	-0,89	0,4163

X_1 = razão molar; X_2 = temperatura; *p<0, 05, R^2 = 0,8577

Os efeitos principais para a concentração de monoglicerídeos foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada pode ser demonstrada pela Equação 5.1.

$$y = 23,92 - 4,77x_1^2 - 5,11x_2^2 \qquad (5.1)$$

em que: y é a variável resposta (MAGs formados em %) e x_1 e x_2 representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente.

A validade do modelo proposto, verificada por meio da análise de variância (Tabela 5.3), constatou que a equação obtida foi estatisticamente significativa (p=0,004), ao nível de 95% de confiança, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,7513, justificando 75,13% a variação total da resposta.

Tabela 5.3 - Análise de Variância para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento central composto ortogonal

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	*p*
Modelo	213,67	2	106,83	12,09	0,004
X_1^2	128,70	1	128,70	14,56	0,005
X_2^2	147,54	1	147,54	16,69	0,004
Resíduo	70,71	8	8,84		
Falta de ajuste	43,91	6	7,32	0,55	0,760
Erro Puro	26,81	2	13,40		

X_1 = razão molar; X_2 = temperatura

Os valores preditos pelo modelo representados na superfície de resposta (Figura 5.3) sugerem que os rendimentos mais elevados de formação de MAGs pela rota da glicerólise, podem ser alcançados nos níveis médios de temperatura e razão molar, na faixa experimental usada neste estudo.

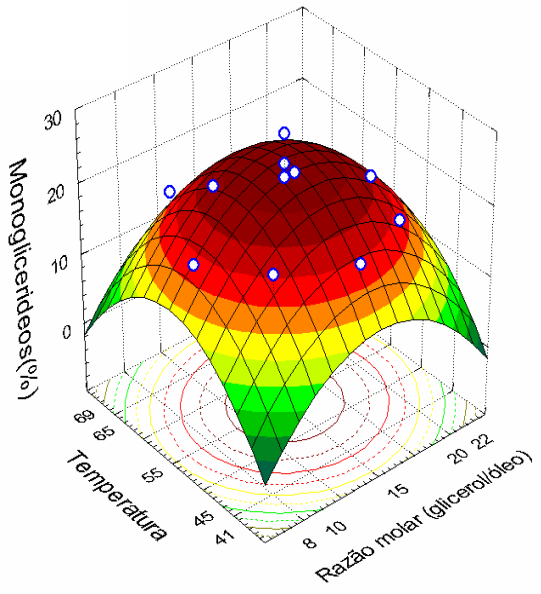


Figura 5.3. Superfície de resposta para a formação de monoglicerídeos de acordo com a Equação 5.1.

5.1.1.2. Estudo da geometria do reator na síntese de monoglicerídeos via glicerólise enzimática do óleo de babaçu

Visando estudar a influência da geometria do reator na síntese de monoglicerídeos pela rota de glicerólise, foi realizado um experimento em um reator cilíndrico empregando as condições preditas pelo modelo matemático anteriormente determinado, entretanto, reduzindo a temperatura de incubação para 50 °C. Esta estratégia foi adotada para garantir a manutenção da atividade enzimática durante a reação por períodos mais longos. Dados obtidos anteriormente indicaram que a lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA possui maior estabilidade térmica na faixa entre 40-50°C (DA RÓS, 2009).

O sistema experimental consistia de um reator cilíndrico de vidro encamisado (50 mL) conectado com tubulações de silicone em um banho termostatizado e agitação magnética conforme ilustrado na Figura 5.4.

O perfil de formação de monos e diglicerídeos, bem como o consumo dos triglicerídeos em função do tempo, está ilustrado na Figura 5.5. A Figura 5.6 mostra a distribuição da mistura glicerídica formada em função do tempo. Analisando-se os resultados, verifica-se uma formação média de 26% de MAGs em 3 h de reação. A continuidade da reação por um período adicional (21 h) não foi um fator decisivo para aumentar a produção de monoglicerídeos, sendo constatado um valor médio de 30% de MAGs ao final de 24h.

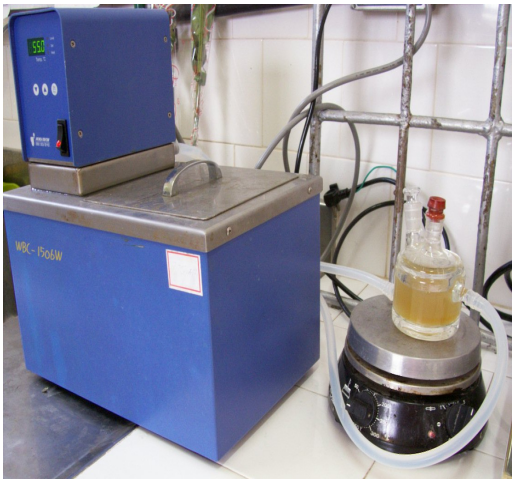


Figura 5.4. Montagem do sistema de reação empregado na glicerólise do óleo de babaçu (reator cilíndrico).

Comparando esse resultado com aqueles obtidos em reator esférico, verifica-se que o tempo de reação foi reduzido pela metade, o que corresponde a um aumento na produtividade do sistema. Desta forma, os resultados indicam que a geometria cilíndrica reator foi mais eficiente para a produção de MAGs do que o reator com geometria esférica, provavelmente

por permitir uma agitação mais uniforme do meio reacional e melhor controle da temperatura (reator encamisado) sendo, portanto, a configuração selecionada para dar continuidade aos testes experimentais deste trabalho.

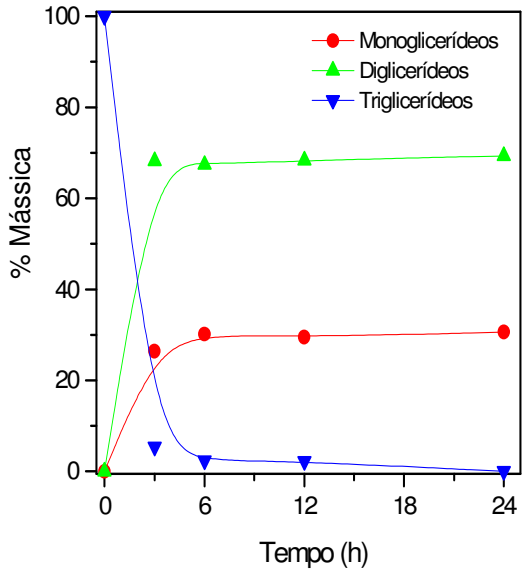


Figura 5.5. Perfil de formação dos monos e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator cilíndrico.

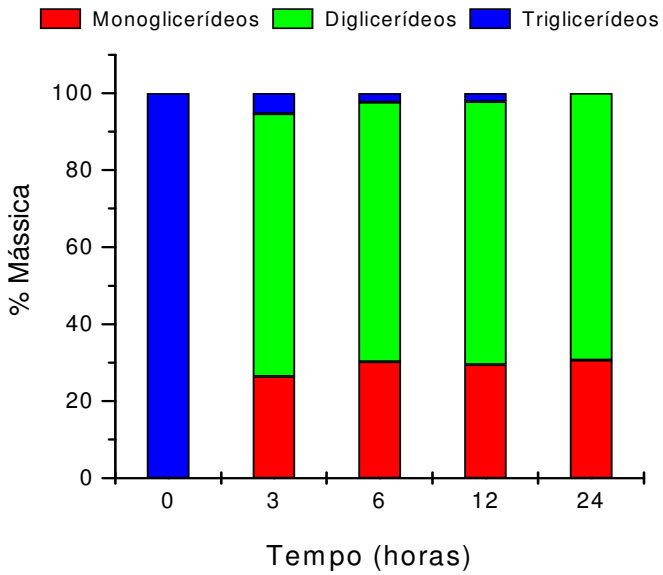


Figura 5.6. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada no reator cilíndrico.

5.1.1.3. Influência da atmosfera inerte na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu: Maximização por planejamento de experimentos

As reações catalisadas por lipases empregando óleos vegetais requerem um controle adequado do grau de oxidação da matéria-prima lipídica, tendo em vista que óleos oxidados podem afetar a atividade enzimática e a velocidade de reação (OHTA; YAMANE; SHIMIZU, 1989). Para evitar oxidação do substrato, a manutenção de atmosfera inerte no meio reacional tem sido recomendada e testada com sucesso para condução de reações mediadas por lipases (NUNES et al., 2009; AGUEDO et al., 2009; AGUEDO et al., 2008; BALCÃO; MALCATA, 1997).

Com base nestas informações e selecionando o reator com geometria cilíndrica para a realização desses testes, foi avaliada a influência da atmosfera inerte na síntese de monoglicerídeos por glicerólise do óleo de babaçu. Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com face centrada, constituído de 11 ensaios (3 no ponto central), considerando como variáveis independentes a razão molar (glicerol/óleo) na faixa entre 5:1 a 15:1 e temperatura entre 40-50° C. Todos os experimentos foram efetuados com 10% (m/m) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA (biocatalisador) por um período máximo de 24 h. A atmosfera inerte foi garantida pela inserção de um ponto de N_2 por uma das entradas do reator, conforme ilustrado na Figura 5.7. O progresso das reações de glicerólise em função do tempo está demonstrado na Figura 5.8 e a Figura 5.9 mostra a distribuição da mistura glicerídica formada nos ensaios experimentais (concentrações máximas). A matriz proposta juntamente com os resultados obtidos para a produção de MAG (%) é apresentada na Tabela 5.4.

Figura 5.7. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator cilíndrico sob atmosfera inerte.

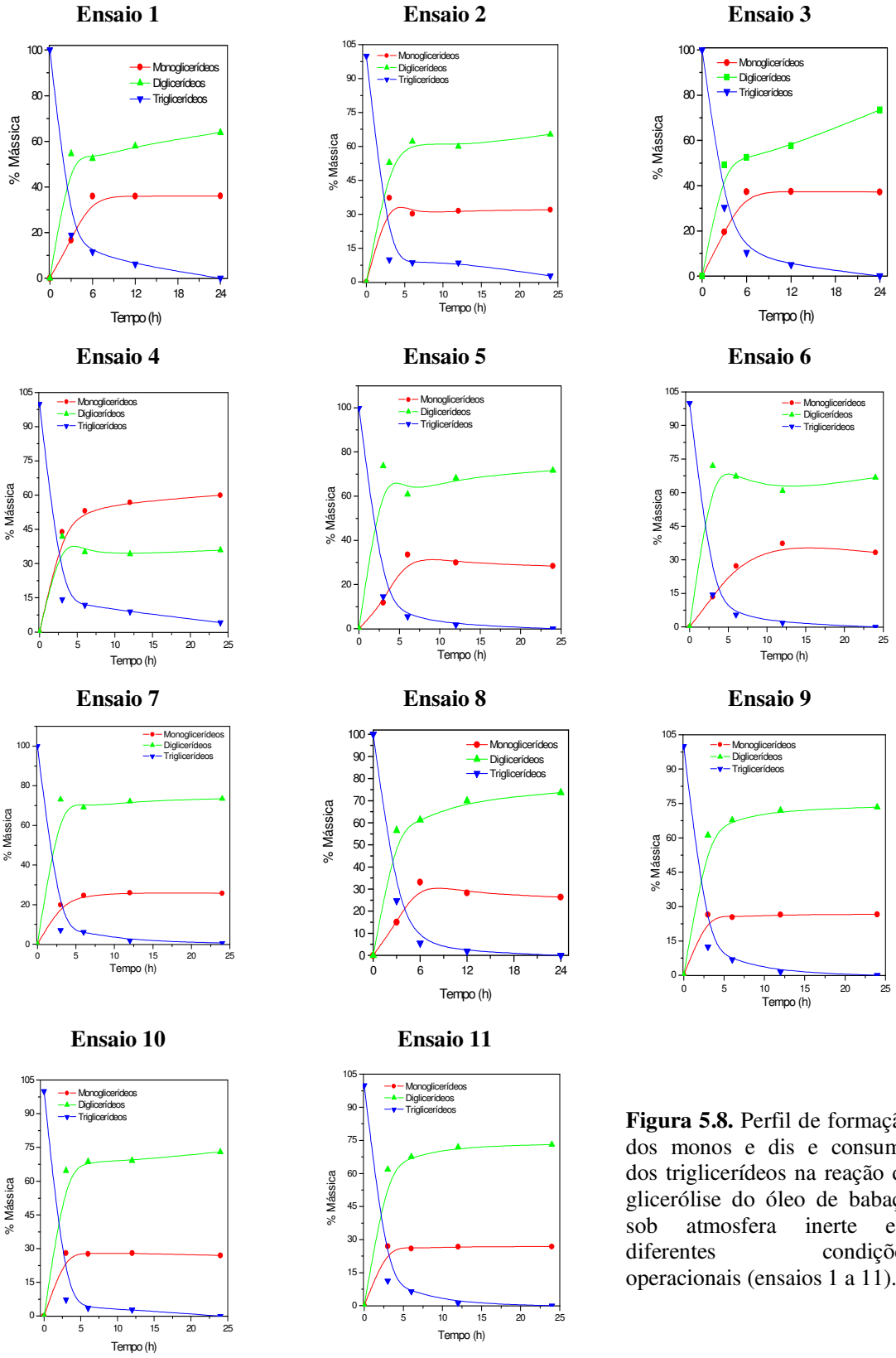


Figura 5.8. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu sob atmosfera inerte em diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 11).

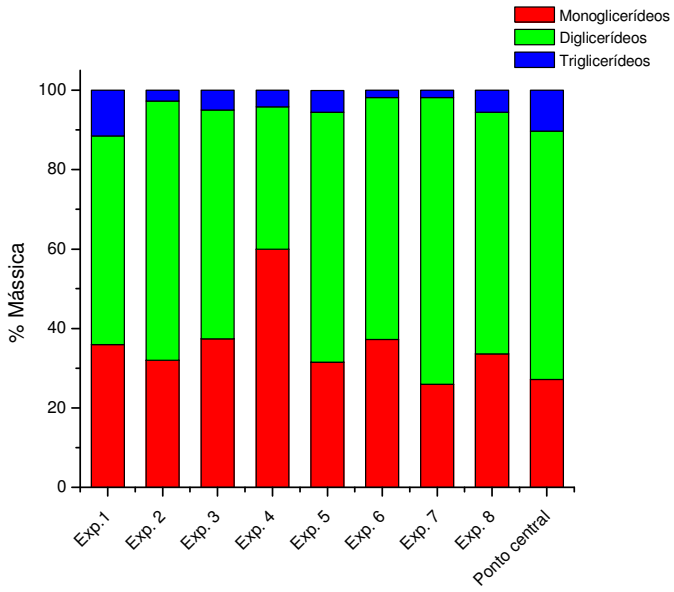


Figura 5.9. Distribuição dos produtos formados nas reações de glicerólise do óleo de babaçu sob atmosfera inerte catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA nas diferentes condições ensaiadas no planejamento fatorial 2^2 de face centrada.

Tabela 5.4 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com face centrada e resultados obtidos

Ensaios	Valores codificados		Valores reais		MAGs (%)
	X_1	X_2	Razão molar Glicerol/óleo	Temperatura (°C)	
1	-1	-1	5:1	40	36,00
2	+1	-1	15:1	40	31,99
3	-1	+1	5:1	50	37,37
4	+1	+1	15:1	50	59,90
5	-1	0	5:1	45	31,54
6	+1	0	15:1	45	37,30
7	0	-1	10:1	45	26,00
8	0	+1	10:1	50	33,59
9	0	0	10:1	45	26,49
10	0	0	10:1	45	28,02
11	0	0	10:1	45	26,96

Verifica-se na Tabela 5.4 que em todas as condições ensaiadas houve formação de monoglicerídeos, variando entre 26 a 60%. Os valores mais elevados foram obtidos empregando razão molar = 15 e temperatura de 50°C (ensaio 4).

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, valor de *p* e valor de t para a resposta analisada (Tabela 5.5), indicam que as variáveis quadráticas (x_1^2, x_2^2) e lineares (x_1, x_2), como também a interação (x_1x_2), foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95%.

Tabela 5.5 - Estimativa dos efeitos para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	t	*p*
Média	26,26*	±0,40	65,32	0,000*
(x_1) Razão Molar	8,09*	±0,64	12,65	0,006*
(x_1^2) Razão Molar	19,01*	±0,98	19,30	0,003*
(x_2) Temperatura	12,29*	±0,64	19,21	0,003*
(x_2^2) Temperatura	9,76*	±0,98	9,91	0,010*
Interação	13,27*	±0,78	16,93	0,003*

**p*: efeitos significativos para valores de $p < 0,05$
R^2: 0,9635

Os efeitos principais para a concentração de monoglicerídeos foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada pode ser demonstrada pela Equação 5.2.

$$y = 26,26 + 4,06\,x_1 + 9,50\,x_1^{\,2} + 6,15\,x_2 + 4,88\,x_2^{\,2} + 6,64\,x_1 x_2 \qquad (5.2)$$

em que: y é a variável resposta (MAGs formados em %) e x_1 e x_2 representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente.

A análise de variância (Tabela 5.6) foi realizada com o propósito de determinar a significância estatística dos efeitos principais e da interação dos fatores sobre a produção de monoglicerídeos.

Tabela 5.6 - Análise da variância para a formação de monoglicerídeos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada

Variáveis	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Media Quadrática	F	
				Valores	Prob>F
Modelo	879,59	5	175,92	26,40	0,001
$\mathbf{x_1}$	98,25	1	98,25	14,74	0,012
$\mathbf{x_1^2}$	22,81	1	228,81	34,00	0,002
$\mathbf{x_2}$	226.57	1	226,57	34,33	0,002
$\mathbf{x_2^2}$	60,30	1	60,30	9,05	0,030
$\mathbf{x_1\,x_2}$	176,09	1	176,09	26,42	0,004
Erro Residual	33,32	5	6,66		
Falta de ajuste	32,09	3	10,70	17,42	0,055*
Erro puro	1,23	2	0,61		
Cor Total	912,92	10			

* não significativo
X_1 = razão molar; X_2 = temperatura
F = Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo. O valor de F do modelo = 26,40, implica que o modelo é significativo (de acordo com programa estatístico Design Expert 6.0).

Os resultados obtidos indicaram significância estatística ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste para o modelo. Além disso, verifica-se pelo valor do coeficiente de determinação (R^2 = 0,9636) que a equação obtida está adequada para descrever a formação de MAG em função da razão molar e da temperatura.

Os valores preditos pelo modelo representados na superfície de resposta (Figura 5.10) indicam que os rendimentos mais elevados de formação de MAGs (60%) pela rota da glicerólise podem ser alcançados nos níveis máximos de temperatura (50º C) e razão molar (15:1 glicerol/óleo de babaçu), na faixa experimental usada neste estudo.

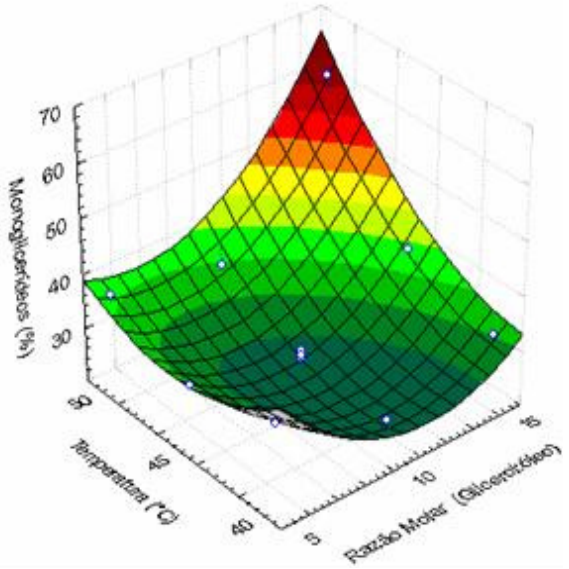


Figura 5.10. Superfície de resposta para a formação de monoglicerídeos de acordo com a Equação 5.2.

As condições preditas pelo modelo estão de acordo com dados descritos na literatura, tendo em vista que um excesso de álcool favorece o acúmulo de MAG no meio reacional, ao invés de diglicerídeos ou triglicerídeos (KAEWTHONG et al., 2005; TUTER et al., 1999). No entanto, cabe-se ressaltar que um elevado excesso de glicerol pode inibir a atividade da lipase e afetar negativamente o processo (FERREIRA DIAS et al., 2001).

Quanto a temperatura, neste processo, constata-se que baixas temperaturas prejudicam a homogeneidade do meio reacional, restringindo o contato entre a lipase e o substrato, que representa um obstáculo para melhorar o rendimento de MAG. Deste modo, 50 ºC foi o valor de temperatura ótima que resultou na produção mais elevada de MAG, sendo que este valor preveniu a lipase dos efeitos de desativação térmica. Dados obtidos anteriormente indicaram

que a lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA possui maior estabilidade térmica na faixa entre 40-55ºC (DA RÓS, 2009).

Desta forma, considera-se que o ponto ótimo para a formação de monoglicerídeos foi encontrado por meio da realização deste planejamento de experimento, sendo essas condições adotadas para realização dos ensaios subseqüentes.

Esses dados se comparam favoravelmente com os resultados publicados na literatura. Por exemplo, em trabalho realizado por Yang et al. (2005b), foi reportada a formação de cerca de 23% de MAGs na glicerólise do óleo de girassol realizada em reator batelada, empregando Novozym 435 como catalisador. Pawongrat, Xu e H-Kittikun (2007), verificaram a formação de 24,5% de MAGs enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados em 24h de reação, a partir da glicerólise do óleo de atum empregando lipase de *Pseudomonas fluorescences* imobilizada em Accurel-EP100. Em outro trabalho (FREGOLENTE et al., 2008) foi verificada a formação de 32% de MAG na glicerólise do óleo de soja empregando Novozym 435 como biocatalisador. Cheirsilp e colaboradores (2009) estudaram a glicerólise do óleo de palma catalisada pela lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em gel de alginato e verificaram uma formação máxima de 54% de MAG nas seguintes condições reacionais: razão molar = 10 (glicerol/óleo), 27 U da enzima imobilizada e 10% (m/v) do óleo em 2-metil 2-butanol, evidenciando-se que os dados obtidos no presente trabalho, estão de acordo com os dados reportados na literatura, atingindo cerca de 60% de monoglicerídeos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO_2-PVA.

5.1.1.4. Influência da ação de diferentes agentes antioxidantes e emulsificantes na glicerólise do óleo de babaçu

Conforme anteriormente descrito (item 5.1.1.3), modificações enzimáticas de óleos e gorduras requerem o uso de estratégias para evitar a oxidação dos materiais de partida, sendo recomendado o uso de atmosfera inerte (NUNES et al., 2009; BALCÃO; MALCATA, 1997). Entretanto, a inserção de linha de gás inerte (nitrogênio) durante o progresso da reação representa um custo adicional ao processo. Uma alternativa, ainda pouco explorada, é baseada na adição de agentes antioxidantes no meio reacional, como adotado na indústria de alimentos que incorpora em seus produtos diversos tipos de compostos antioxidantes (DOMINGOS et al., 2007; WARNER; NEFF; ELLER, 2003). Em reações enzimáticas de glicerólise, somente recentemente, a adição de agentes antioxidantes ou emulsificantes no meio reacional vem sendo proposta como estratégia para evitar a oxidação da matéria-prima lipídica ou promover maior homogeneidade para o sistema óleo/glicerol/enzima, com o descrito por Valério et al.

(2009b) que testaram a atuação de surfatantes de grau alimentício (Tween e Triton) na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de oliva.

Desta forma, nesta série de ensaios foi verificada a ação de agentes antioxidantes e emulsificantes no desempenho da reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA. Como agentes antioxidantes foram selecionados os seguintes compostos: lecitina de soja, BHT (butil-hidroxi-tolueno) e tocoferol e como agentes emulsificantes foram testados Triton X-100 e lecitina de soja. Esses compostos foram selecionados por serem utilizados na indústria alimentícia.

Esses experimentos foram realizados adotando como meio reacional glicerol e óleo de babaçu numa razão molar = 15:1, temperatura = 50 ºC e 10% (m/m) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA (condições estabelecidas anteriormente). O sistema experimental utilizado nesta série de testes está ilustrado na Figura 5.11. Para efeito de comparação, os resultados obtidos empregando esses agentes, foram comparados com o desempenho das reações de glicerólise isenta de qualquer artifício (Controle 1) e sob atmosfera inerte (Controle 2). O progresso dessas sínteses está ilustrado na Figura 5.12 (a – f).

Figura 5.11. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator cilíndrico empregando diferentes agentes antioxidantes e emulsificantes.

A Figura 5.12a ilustra o perfil de formação de monos e diglicerídeos no sistema reacional (Controle 1, ausência de qualquer técnica para inibir a oxidação da matéria-prima lipídica), no qual verifica-se que houve formação de cerca de 49% de MAGs em 12h de reação, não sendo constatado reversibilidade da reação. O perfil da reação conduzida em atmosfera inerte (Controle 2, Figura 5.12b), confirma que esta estratégia é altamente eficiente elevando a formação de MAGs para cerca de 57% em 12h de reação.

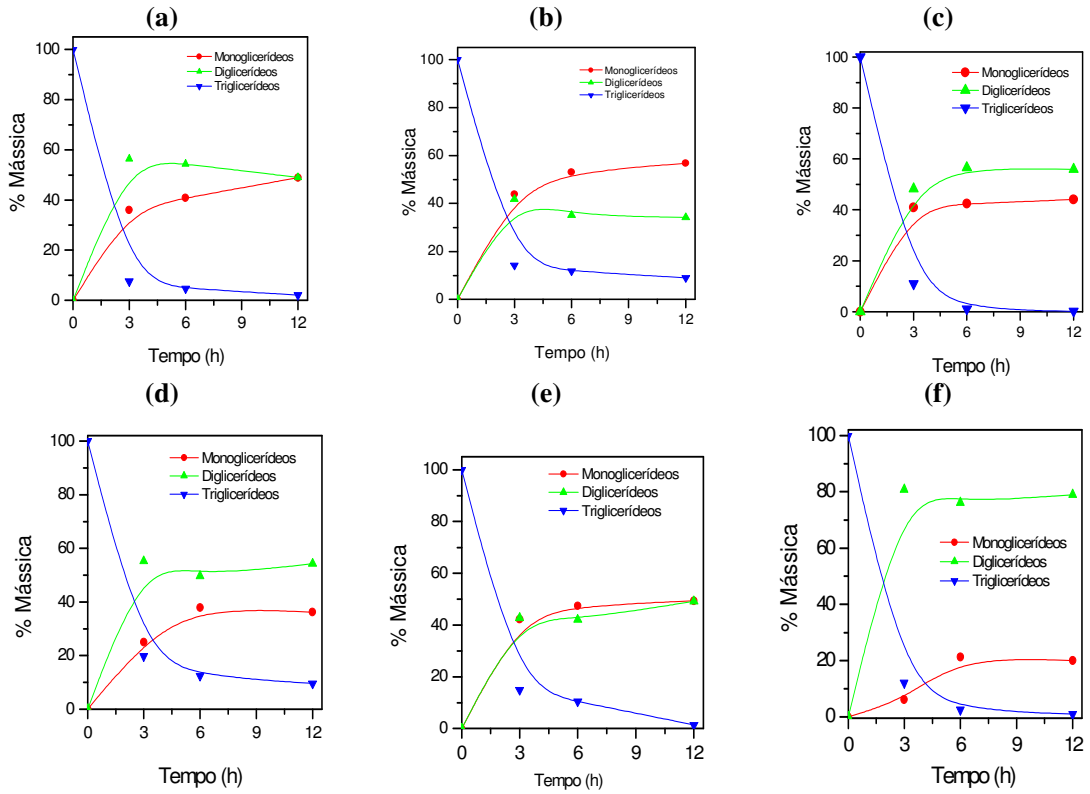


Figura 5.12. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos nas reações de glicerólises do óleo de babaçu sob diferentes condições operacionais: a) Controle 1, b) Controle 2(sob atmosfera inerte, c) BHT, d) tocoferol, e) lecitina e f) Triton-100X.

Os dois agentes antioxidantes testados foram BHT (Figura 5.12c) que é um polifenol, antioxidante sintético, muito efetivo no controle da oxidação em gorduras animais e de ácidos graxos de cadeia curta, como os contidos em óleo de coco e palma (RAMALHO; JORGE, 2006) e o tocoferol (Figura 5.12d), que é uma vitamina E lipossolúvel, antioxidante natural, utilizado para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (RAMALHO; JORGE, 2006). No entanto, a ação antioxidante desses compostos foi insatisfatória, sendo observada uma concentração em MAGs inferior daquela obtida nos controles (concentração máxima entre 37-44% de MAGs), ressaltando-se ainda que em ambas reações, constatou-se reversibilidade da reação de forma bem acentuada, ocorrendo um decaimento na concentração de MAGs após 12 h de reação (dados não mostrados). Além disso, verifica-se pelo perfil de formação dos mono e diglicerídeos uma alteração da atuação da enzima, com formação preferencial de diglicerídeos. Este fato pode estar associado a algum tipo de inibição exercido por esses dois compostos (BHT e tocoferol) sob a atuação da lipase.

A lecitina de soja é uma substância oleosa que tem propriedades emulsificantes, sendo usada comercialmente nas indústrias farmacêutica ou de alimentos (chocolate, margarina), além disso, alguns estudos (KURASHIGE; MATSUZAKI; TAKAHASHI, 1993; SOARES et al., 2003) descrevem o uso de lecitina como agente estabilizante para a lipase no processo de imobilização. Para o sistema reacional em estudo, a lecitina apresentou satisfatória capacidade antioxidativa, proporcionado a formação de 49% de MAGs em 12h de reação (resultado similar ao obtido no Controle 1). Além disso, foi verificado que a presença de lecitina no meio reacional aumentou a velocidade reacional em relação daquela manifestada na reação controle, sendo constatada a formação de 43% de MAGs em apenas 3h de reação (Figura 5.12e).

Dos agentes antioxidantes utilizados, apenas a lecitina de soja não interferiu no mecanismo de atuação da enzima, sendo obtido um perfil similar de formação de monos e diglicerídeos ao alcançado na reação controle, com vantagem adicional de aumentar a velocidade reacional, resultados que podem estar relacionados com o fato da lecitina também apresentar propriedades emulsificantes.

O uso de emulsificantes ou surfatantes no meio reacional pode proporcionar maior homogeneidade para o sistema óleo/glicerol/enzima, aumentando a área superficial, e promovendo aumento da velocidade de reação, bem como da eficiência do biocatalisador, principalmente para lipases (enzimas que atuam numa interface). A característica de um surfatante é a formação de um sistema micelar que aumenta a estabilidade enzimática em termos das condições do processo, tais como, temperatura e pH, além de aumentar a solubilidade entre o substrato, reduzindo as limitações de transferência de massa, promovendo desta maneira uma elevação na conversão (VALÉRIO et al., 2009b).

Nesta série de ensaios, Triton X-100 (tensoativo) foi testado, por ser relatado na literatura como o mais adequado para reações mediadas por lipases (VALÉRIO et al., 2009b). Triton é um surfatante não iônico, apresentando-se como um líquido viscoso na temperatura ambiente, com aparência amarela claro. Apresenta propriedades antimicrobianas, sendo freqüentemente utilizado em aplicações bioquímicas para solubilizar proteínas (SIGMA, 2009).

Como pode ser observado na Figura 5.12f o emprego do Triton no meio reacional não foi efetivo e promoveu uma redução acentuada na formação de MAG (valor máximo de apenas 20%) com relação as reações controles (Figuras 5.12 a, b) e da reação efetuada na presença de lecitina de soja (Figura 5.12 c), que também, como já descrito, apresenta propriedades emulsificantes. Esse resultado também difere daqueles descritos por Valério et

at. (2009b), entretanto deve ser considerado que esses autores utilizaram a preparação comercial Novozym 435 como catalisador da reação de glicerólise do óleo de oliva. A influência negativa do Triton X-100 na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, pode ser melhor compreendida com base no mecanismo complexo de interação entre o surfatante e o sistema imobilizado. O Triton, por ser um tensoativo, possui tanto a parte hidrofílica (cabeça) como a hidrofóbica (cauda), e quando em contato com a lipase, esta se dispõe na sua conformação aberta, deixando seu sítio ativo exposto. Segundo Fernandez-Lorente et al. (2007), a parte hidrofóbica do Triton adere-se ao sítio ativo da lipase, podendo ocasionar uma distorção da enzima ou uma inibição da sua atividade catalítica (inibição competitiva), ocorrendo uma competição entre o Triton e o substrato, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase e limitando a formação de produto. Entretanto, esse comportamento é dependente do tipo de suporte de imobilização usado no preparo do sistema imobilizado, como descrito no trabalho publicado por Cabrera et al. (2009). Neste trabalho, os autores descrevem uma análise comparativa dos efeitos do Triton em derivados imobilizados da lipase de *Candida antarctica* em diferentes suportes (butil-agarose, octadecil-agarose e octadecil-Sepabeads) e Novozym 435. Entre todos os derivados testados, somente Novozym 435 não sofreu efeitos de distorção ou dessorção em função da elevada hidrofobicidade do suporte empregado na manufatura desta preparação enzimática. Portanto, o uso de Triton como emulsificante de meio reacional, deve ser considerado com cautela, sendo provavelmente recomendado apenas para reações catalisadas com Novozym 435.

Para melhor visualizar a ação das diversas estratégias testadas, a Figura 5.13 ilustra a distribuição da mistura glicerídica para todos os experimentos realizados em 12h de reação, evidenciando que a utilização de atmosfera inerte foi a estratégia que apresentou o melhor desempenho para a formação de MAGs, provavelmente porque o N_2 inibiu a oxidação da matéria-prima oleosa sem interferir no mecanismo de ação da lipase. Esses dados comprovam resultados descritos na literatura (AGUEDO et al., 2009; AGUEDO et al., 2008; BALCÃO; MALCATA, 1997), sendo esta estratégia a mais utilizada para evitar a oxidação de óleos e gorduras, garantindo desta maneira, que a síntese enzimática ocorra sem interferência ou inibição por alterações nas condições reacionais.

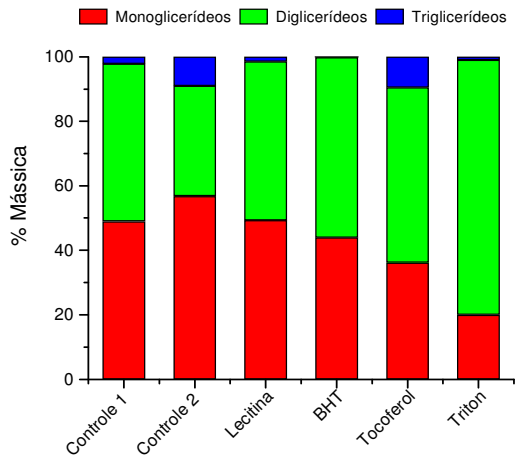


Figura 5.13. Distribuição dos produtos formados nas reações de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada empregando diferentes estratégias para evitar a oxidação (agentes antioxidantes) e promover melhor homogeneização (emulsificantes) do meio reacional.

5.1.1.5. Glicerólise descontínua do óleo de babaçu assistida por irradiação de micro-ondas

Campos magnéticos de alta freqüência podem influenciar não apenas a velocidade inicial das reações, mas também a seletividade e enantiosseletividade das enzimas quando comparado com sistemas submetidos ao aquecimento convencional (GUPTA; ROY, 2004). Baseados nessas informações e estabelecidas as condições reacionais (glicerol e óleo de babaçu numa razão molar = 15:1, temperatura = 50ºC e 10% (m/m) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA), foram efetuados testes catalíticos no reator de micro-ondas Discover. Os testes foram realizados em reator esférico e a atmosfera inerte foi garantida pelo acoplamento de uma bexiga contendo N_2 (Figura 5.14).

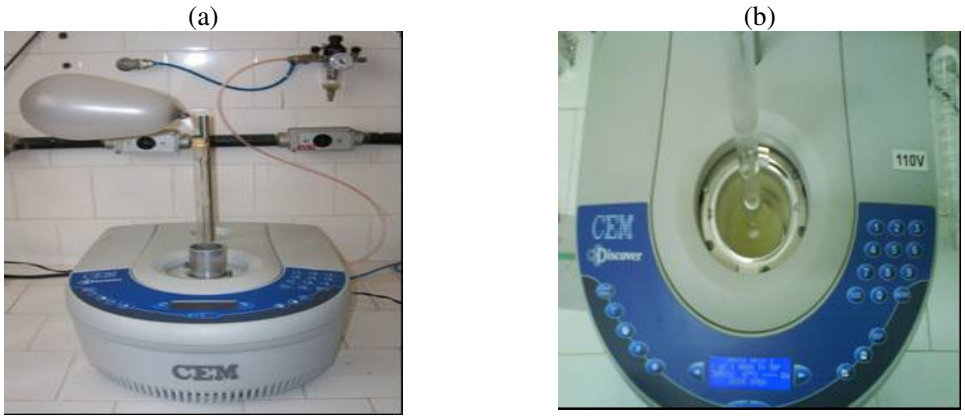


Figura 5.14. Esquema da reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator de micro-ondas Discover (reator esférico) sob atmosfera inerte; (a) vista externa do reator e (b) vista da câmara interna.

Os resultados obtidos em 6h de reação sob irradiação de micro-ondas foram comparados com o desempenho da reação obtido sob aquecimento convencional (item 5.1.1.3), como ilustrado na Figura 5.15.

Verifica-se que a irradiação de micro-ondas não forneceu resultados satisfatórios e modificou o perfil de formação de MAG, DAG e TAG, provavelmente em função de algumas limitações apresentadas pelo sistema reacional, tais como: 1) elevada viscosidade do meio, 2) geometria do reator e 3) baixa velocidade de agitação do meio reacional, indicando a necessidade de ajustes de alguns parâmetros do sistema experimental. Para tanto, adaptou-se um reator cilíndrico dotado de agitação mecânica, sendo a atmosfera inerte garantida pela inserção de um ponto de N_2 na entrada do reator, impedindo a exposição do meio reacional ao ar (Figura 5.16). O perfil de formação de monos e diglicerídeos, bem como o consumo dos triglicerídeos, em função do tempo de reação é apresentado na Figura 5.17. A Figura 5.18 ilustra o perfil de formação dos diferentes monoglicerídeos formados durante a reação.

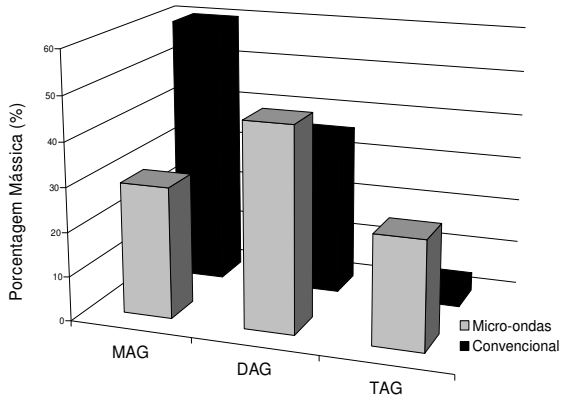


Figura 5.15. Comparação da porcentagem mássica de monos, dis e triglicerídeos obtidos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS sob irradiação de micro-ondas e aquecimento convencional.

Figura 5.16. Esquema da reação de glicerólise do óleo de babaçu realizada em reator de micro-ondas Discover (reator cilíndrico) sob atmosfera inerte; (a) vista externa do reator e (b) vista da câmara interna.

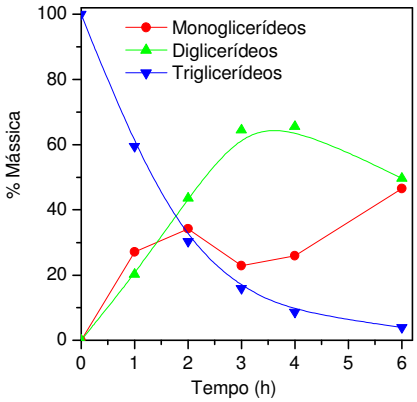


Figura 5.17. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada em reator de micro-ondas sob agitação mecânica e atmosfera inerte.

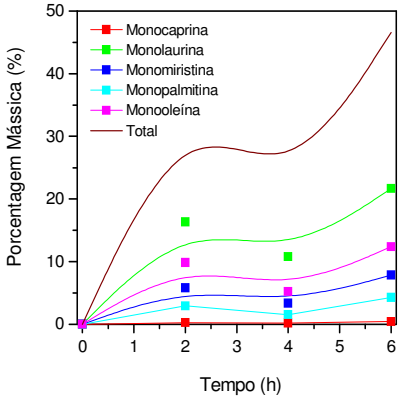


Figura 5.18. Perfil de formação dos diferentes monoglicerídeos formados na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA realizada em reator de micro-ondas, sob atmosfera inerte.

Analisando-se os resultados, verifica-se uma formação média de 46% de MAGs em 6h reação utilizando o reator cilíndrico, e comparando este resultado com o obtido em reator esférico, observa-se que a velocidade de formação de MAG foi aumentada em 1,6 vezes. Desta forma, pode-se concluir que a geometria cilíndrica do reator foi mais eficiente para a produção de MAGs sob irradiação de micro-ondas do que o reator esférico, provavelmente porque a agitação mecânica possibilitou uma agitação mais uniforme e eficaz do que a magnética. Além disso, a manutenção de uma linha contínua de nitrogênio no meio reacional pode ter garantido a permanência da atmosfera inerte sob o meio reacional, impedindo desta forma, a oxidação da matéria lipídica (óleo de babaçu).

Esse desempenho (46% em 6h de reação), entretanto, ainda é inferior ao obtido nas mesmas condições sob aquecimento convencional, contrariando a expectativa das vantagens da irradiação das micro-ondas, ou seja, em função de um sistema de aquecimento mais eficaz a irradiação deve, não apenas melhorar o rendimento, mas também aumentar a velocidade inicial de síntese (GUPTA; ROY, 2004; YADAV; LATHI, 2006).

Uma outra limitação que poderia ter influenciado a síntese de MAG pode estar relacionada com a eficiência do sistema usado para manutenção da atmosfera inerte no interior do reator, pois, mesmo usando uma linha contínua de N_2, eventuais vazamentos poderiam ter atuado como um fator limitante do processo (ocorrência de oxidação do meio reacional durante a reação). Na impossibilidade de verificar a eficiência do sistema em termos de assegurar um meio reacional em atmosfera totalmente inerte, foi efetuado um ensaio

controle sem injeção de nitrogênio com o objetivo de verificar a influência da oxidação do meio reacional na formação de MAGs sob irradiação de micro-ondas.

O resultado obtido revelou uma superioridade da síntese realizada no reator de micro-ondas sob atmosfera inerte, porém não muito significativa (aumento de aproximadamente 6% na produção de MAG). A Figura 5.19 mostra o comportamento desta reação e a Figura 5.20 apresenta uma comparação da atuação da lipase PS nas reações de glicerólise (Controle e em atmosfera inerte) sob irradiação de micro-ondas.

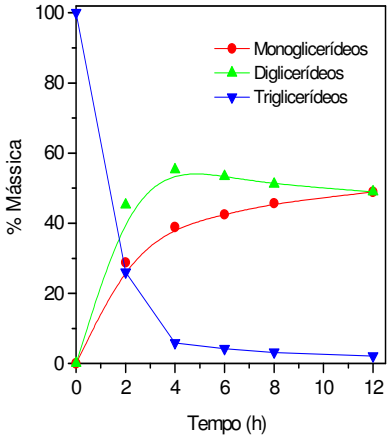


Figura 5.19. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na glicerólise controle (isenta de N_2) do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, realizada em reator de micro-ondas.

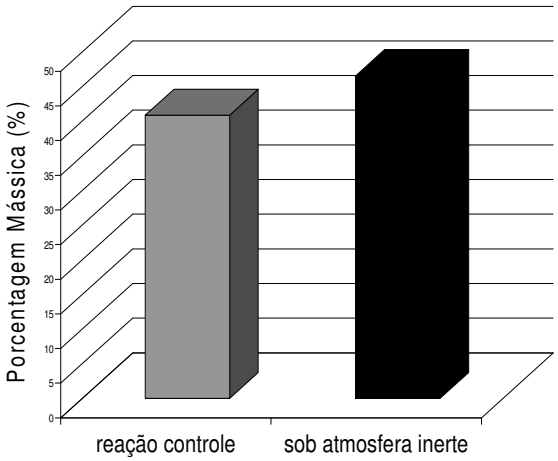


Figura 5.20. Comparação da formação dos monoglicerídeos obtidos nas glicerólises do óleo de babaçu catalisadas pela lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA em reator de micro-ondas (6h de reação).

Ainda com o objetivo de verificar a influência da oxidação da matéria-prima lipídica na síntese de monoglicerídeos sob irradiação de micro-ondas, foi realizado um experimento adicional empregando-se a lecitina de soja como agente antioxidante, visto que este agente foi o que apresentou o melhor desempenho nos testes efetuados em regime de batelada sob aquecimento convencional (item 5.1.1.4). No entanto, o resultado obtido não foi satisfatório, apresentando uma diminuição na formação de MAG (reduzindo cerca de 12% em 6h de reação) quando comparado com a reação realizada com lecitina de soja em aquecimento convencional (item 5.1.1.4). Esse fato pode estar associado a algum efeito inibitório a atuação da lipase causado pela lecitina de soja, ou ainda interferência na ação da lipase quando exposta a irradiação de micro-ondas, como alteração da seletividade da enzima. A Figura 5.21

mostra o perfil de formação de monoglicerídeos na síntese realizada sob aquecimento convencional e irradiada por micro-ondas em presença de lecitina.

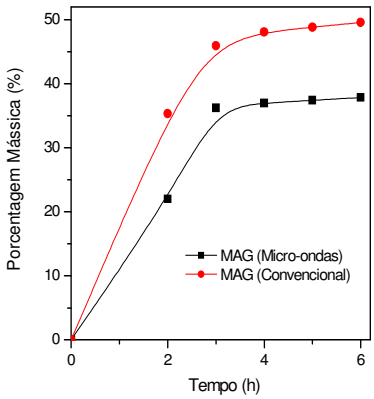


Figura 5.21. Comparação de diferentes formas de aquecimento (convencional e irradiação de micro-ondas) utilizando lecitina de soja como agente antioxidante, na formação de monoglicerídeos.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que vários fatores podem ter contribuído para o limitado desempenho alcançado na síntese de monoglicerídeos sob irradiação de micro-ondas, tais como: dificuldade de manutenção da atmosfera inerte no interior do reator (ocasionando uma provável oxidação do óleo de babaçu), a deficiência da agitação do meio reacional, possível migração dos grupos acila no decorrer da reação, entre outros fatores.

Fang et al. (2008) estudaram a seletividade da formação de monoglicerídeos na reação de esterificação do ácido láurico com glicerol sob aquecimento de micro-ondas. O trabalho mostrou redução da seletividade de α-MAG/β-MAG quando se comparou a forma de aquecimento convencional com a irradiação de micro-ondas. Estes autores atribuíram a diminuição dessa relação, em parte, ao aumento da entropia das moléculas polares do glicerol e da aceleração da oscilação dessas moléculas quando expostas à irradiação de micro-ondas. Estes efeitos gerados pela ação das micro-ondas favorecem o aumento das colisões entre os grupos hidroxilas e a lipase podendo levar a um acréscimo da velocidade de reação (uma das características do aquecimento sob irradiação de micro-ondas), o que não significa um aumento na velocidade de formação de monoglicerídeos. Além disso, o aumento da oscilação das moléculas pode aumentar a probabilidade de ligação entre substrato e o sítio ativo da lipase, debilitando ao mesmo tempo a força de ligação entre eles. Desta forma, alterações no perfil de formação dos produtos (mono e diglicerídeo) durante a reação podem ocorrer de maneira randômica. Esse fato é ilustrado nas Figuras 5.22 e 5.23 que mostram,

respectivamente, o comportamento de formação dos produtos (MAG+DAG) e de MAG alcançado na glicerólise do óleo de babaçu conduzida sob irradiação de micro-ondas e aquecimento convencional em função do tempo.

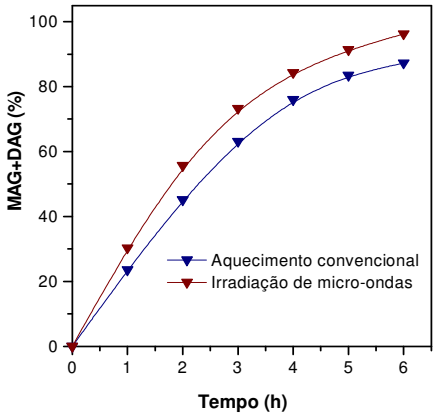


Figura 5.22. Comparação de diferentes formas de aquecimento na glicerólise do óleo de babaçu na formação de MAG+DAG

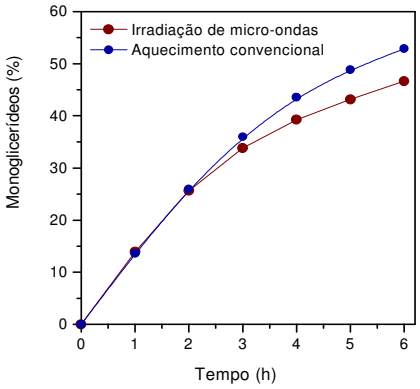


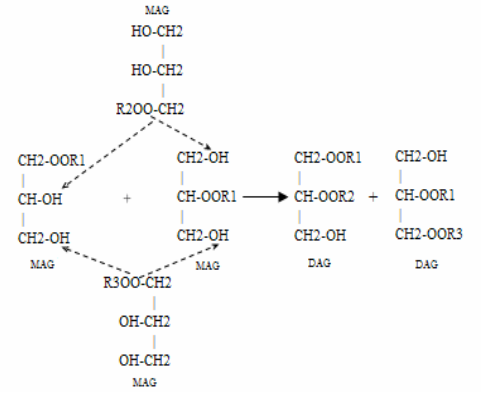
Figura 5.23. Comparação de diferentes formas de aquecimento na glicerólise do óleo de babaçu na formação de MAG.

Comparando os perfis das curvas (Figura 5.22) constata-se um aumento de 1,23 vezes na velocidade de formação dos produtos (MAG+DAG), elevando-se de 0,24 para 0,31 g produto/g meio.h. Comportamento inverso foi verificado na formação de MAG (Figura 5.23), sob irradiação de micro-ondas, apresentando uma redução de 0,11 para 0,10 g MAG/g meio.h, correspondendo a uma diminuição de 1,13 vezes na velocidade de formação de MAG.

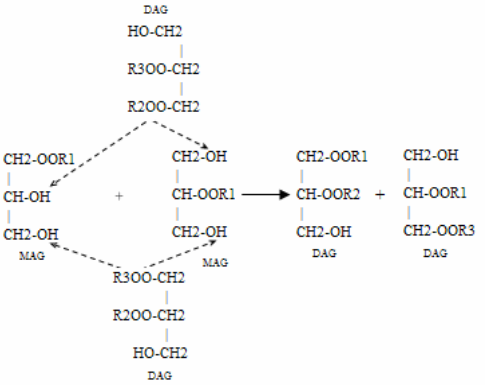
Uma possível explicação para esse resultado pode ser relacionada com o aumento da entropia do sistema reacional (aumento de choques entre as moléculas) favorecendo a formação de diglicerídeos em detrimento aos monoglicerídeos. A Figura 5.24 (a-c) mostra a possibilidade de um provável favorecimento na formação de diglicerídeos causado pelo aumento da entropia e da colisão entre as moléculas do substrato, ocasionados pela irradiação das micro-ondas (FANG et al., 2008).

Uma estratégia recomendada para solucionar limitações desta natureza é a proteção das hidroxilas presentes na molécula do glicerol, deixando livre apenas um radical OH, para favorecer a formação exclusiva dos monoglicerídeos. Este método também oferece uma vantagem para a síntese de MAGs na posição específica ou enatiomericamente puro (WANG; WONG, 1988). Esta técnica foi testada com sucesso por Rufino et al. (2009), para a formação de ésteres de xilitol.

(a)



(b)



(c)

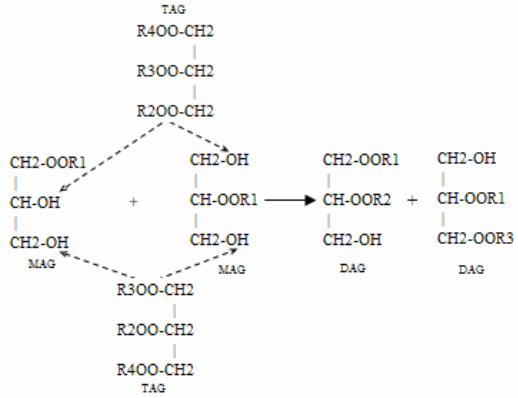


Figura 5.24. Choque entre diferentes moléculas causado pelo aumento da entropia devido a ação das micro-ondas, levando a formação de diglicerídeos. (a) moléculas de monoglicerídeos, (b) moléculas de diglicerídeos e (3) moléculas de triglicerídeos.

5.1.2. Glicerólises contínuas do óleo de babaçu

5.1.2.1. Glicerólises contínuas realizadas em reator de leito fixo

Nas glicerólises contínuas realizadas em reator de leito fixo empregando lipase de *Burkolderia cepacia* imobilizada em SiO_2-PVA, foram efetuados testes visando determinar parâmetros do processo, incluindo: orientação do fluxo de alimentação, estabilidade operacional do biocatalisador, limite de operação do reator e efeito da adição de agentes antioxidantes e emulsificantes na atuação da lipase.

5.1.2.1.1. Influência da orientação do fluxo de alimentação (ascendente ou descendente)

Os testes iniciais das glicerólises em reator de leito fixo foram realizados visando estudar a influência da orientação do fluxo de alimentação através da coluna. As condições experimentais adotadas foram aquelas que forneceram formação mais elevada de MAGs nos testes efetuados em reator cilíndrico (item 5.1.1.3), tais como: razão molar = 15:1 (glicerol/óleo), temperatura de 50°C e emprego de atmosfera inerte.

O reator foi empacotado com cerca de 6,70g (massa seca) de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA misturado com meio reacional e em seguida alimentado numa vazão volumétrica de 0,028 mL/min (ascendente ou descendente). A atmosfera inerte foi garantida pelo acoplamento de uma bexiga contendo N_2 no frasco de alimentação. A Figura 5.25. mostra o esquema experimental e os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.26 (a e b).

Figura 5.25. Esquema da reação de glicerólise em reator de leito fixo operado em regime contínuo, sendo o frasco de alimentação mantido sob atmosfera inerte, pelo acoplamento de uma bexiga contendo N_2.

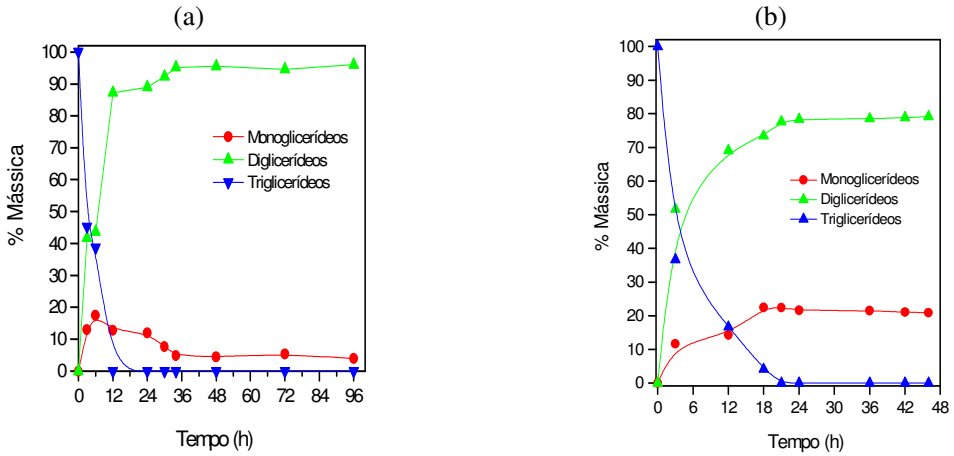


Figura 5.26. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte: (a) fluxo ascendente e (b) fluxo descendente.

Verifica-se que a orientação do fluxo de alimentação apresentou uma influência marcante na síntese de monoglicerídeos, obtendo-se uma produção média de 5% de MAGs para o fluxo ascendente (Figura 5.26a) e da ordem de 22% para o fluxo descendente (Figura 5.26b). Além disso, a orientação do fluxo também influenciou no alcance do estado estacionário, sendo necessárias 34 h para o sistema alimentado com fluxo ascendente. Para o fluxo descendente, o estado estacionário foi alcançado em apenas 18 h de operação em regime contínuo.

Esses resultados podem estar relacionados com algumas limitações inerentes ao substrato constituído basicamente de óleo de babaçu e glicerol na ausência de solventes, o que dificulta a homogeneidade do meio de alimentação, bem como o contato entre o substrato e a lipase imobilizada no reator de leito fixo quando alimentado em fluxo ascendente. Em função da heterogeneidade do meio de alimentação, é provável que nessas condições operacionais (Figura 5.26a), o glicerol, por ser mais denso que o óleo de babaçu, tenha ficado retido no interior do leito empacotado, atingindo concentrações elevadas de glicerol, podendo ocasionar à inibição da lipase (inativação de enzimas pelo excesso de álcool), como relatado por Ferreira-Dias et al. (2001).

5.1.2.1.2. Estabilidade operacional do derivado imobilizado na glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fixo

Um parâmetro de fundamental importância, quando se trabalha com processos que envolvem enzimas imobilizadas, é a sua estabilidade operacional. Esta estabilidade depende de uma série de fatores, tais como: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros

por impurezas ou produtos secundários, perda de suporte por atrito e obstrução do leito fixo, causando caminhos preferenciais (ZANIN; MORAES, 2004). Uma elevada estabilidade da lipase poderia tornar a glicerólise contínua mais atrativa para o uso industrial, principalmente devido ao elevado custo das lipases.

Visando estudar a estabilidade operacional do sistema contínuo, foi efetuado um teste nas condições já estabelecidas anteriormente (RM=15:1 glicerol/óleo e T=50 °C). O reator de leito fixo foi empacotado com 6,70g de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA misturado com meio reacional e em seguida alimentado numa vazão volumétrica de 0,028 mL/min e fluxo descendente. A atmosfera inerte foi garantida pela inserção de um ponto de N_2 no frasco de alimentação, garantindo a manutenção de uma linha contínua de nitrogênio no meio reacional, impedindo a oxidação da matéria-prima lipídica (óleo de babaçu). A Figura 5.27 mostra o esquema experimental utilizado para a realização dos testes contínuos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.28.

Figura 5.27. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator de leito fixo operado em regime contínuo, com meio de alimentação mantido sob atmosfera inerte por meio de uma linha contínua de N_2.

A formação de monoglicerídeos foi em média 28%, e o estado estacionário foi alcançado em 6 tempos de residência (24h). Durante os 6 primeiros dias, nenhum decaimento significativo na atividade inicial foi observado e a concentração de MAGs variou de 28 a 33%. Subsequentemente, um decaimento progressivo na atividade foi detectado, e uma redução de aproximadamente 20% na mistura foi obtida no final da reação. O sistema contínuo foi mantido durante 22 dias, apresentando pequenas oscilações esperadas em sistemas desta natureza, demonstrando uma boa estabilidade operacional do sistema experimental e da enzima imobilizada.

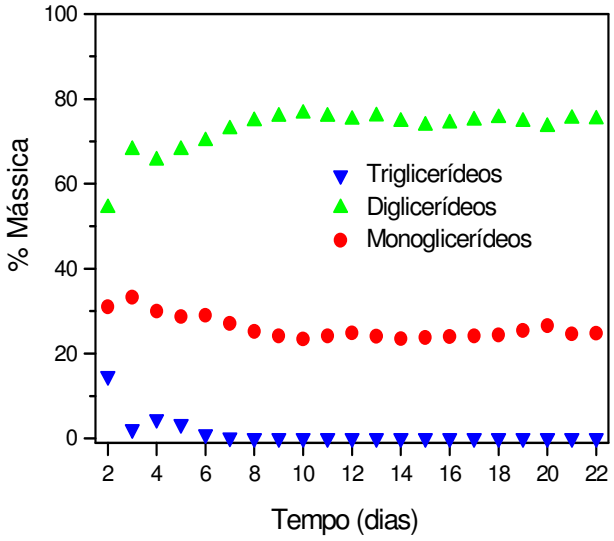


Figura 5.28. Perfil de formação dos monos e dis e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte (22 dias de operação).

Este resultado foi comparado com aqueles reportados na literatura usando reatores de leito empacotado (YANG et al., 2005a; YANG et al., 2005b; KAEWTHONG et al., 2005). Em trabalho realizado por Yang et al. (2005b) 12% de MAGs foram obtidos na glicerólise contínua do óleo de girassol, empregando-se como catalisador Novozym 435, sendo o sistema considerado estável por 30 dias. Em outro trabalho realizado por Kaewthong et al. (2005), 14% de MAGs foram produzidos a partir da glicerólise contínua do óleo de palma, empregando-se lipase PS imobilizada em Accurel EP100 como biocatalisador. Portanto, no presente trabalho pode-se constatar um comportamento altamente satisfatório do sistema experimental utilizado para a síntese contínua de MAGs.

Os resultados experimentais mostrados na Figura 5.28 foram ajustados para um modelo de desativação de primeira ordem (Equação 5.3) para estimar a constante de desativação térmica do biocatalisador (k_d), como mostrado na Figura 5.29.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-Kd*t} \qquad (5.3)$$

em que: k_d é o coeficiente de desativação, t é o tempo de reação, A_0 é a concentração máxima de MAG e A é a concentração de MAG no tempo "t" de operação.

O tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) foi calculado pela Equação 5.4:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{Kd} \tag{5.4}$$

Uma elevada estabilidade operacional do biocatalisador é necessária para a aplicação industrial das glicerólises contínuas catalisadas por lipases e realizadas em reatores de leito fixo. Neste trabalho, um tempo de meia-vida de 50 dias e um coeficiente de desativação de $1{,}37 \times 10^{-2}$ h^{-1} foi estimado. Este valor foi mais elevado que o reportado por Osório et al. (2005) que estimaram um tempo de meia-vida de 17 dias para Novozym 435, uma preparação comercial de lipase imobilizada, utilizando reator de leito fluidizado na glicerólise da estearina de palma com óleo de soja.

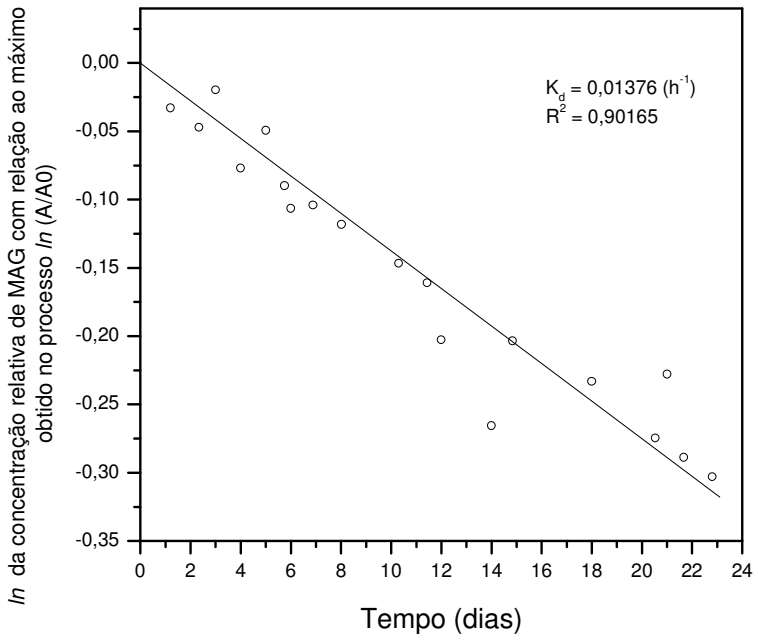


Figura 5.29. Ajuste do modelo de desativação da lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA na formação de MAG na glicerólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 50 ºC.

5.1.2.1.3. Limites de operação do reator de leito fixo na reação de glicerólise do óleo de babaçu em meio isento de solvente

Considerando a elevada estabilidade operacional do biocalisador ($t_{1/2}$= 50 dias) foi avaliado o desempenho do reator de leito fixo na reação de glicerólise do óleo de babaçu em meio isento de solvente, definindo os limites de operação em termos de vazão volumétrica crítica do substrato. Foram adotadas as condições estabelecidas anteriormente (RM=15:1 glicerol/óleo, T=50 °C, 6,70g de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte) e testadas vazões volumétricas variando entre 0,017 a 0,046 mL/min, correspondendo a tempos de residência entre 6,15 a 2,35 h, respectivamente. A Figura 5.30 mostra o perfil de formação dos monoglicerídeos em função do tempo, para cada vazão volumétrica testada.

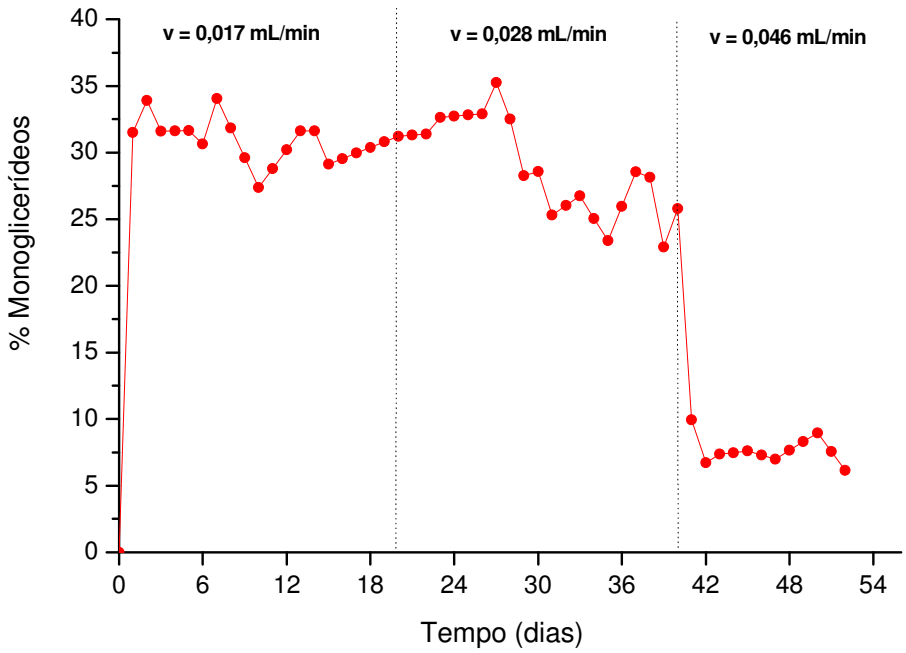


Figura 5.30. Perfil de formação dos monoglicerídeos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte, empregando diferentes vazões volumétricas.

Analisando-se os resultados, verifica-se que o aumento da vazão volumétrica, ou seja, com a diminuição do tempo de contato entre a lipase e o substrato no interior do reator de leito fixo, houve uma redução na formação de monoglicerídeos, sendo obtida uma média de 32, 25 e 8% de MAG, nos seguintes tempos de residência 6,15; 3,85 e 2,35 h, respectivamente. Uma condensação dos resultados obtidos pode ser observada na Figura 5.31,

onde são plotados os valores médios de produtividade, concentração de produto formado (monoglicerídeos) e triglicerídeo residual para as vazões volumétricas testadas. Verifica-se que quando a vazão volumétrica foi aumentada de 0,017 para 0,028 mL/min, embora tenha ocorrido uma redução na concentração de MAGs da ordem de 7%, houve um aumento da produtividade de 52 para 65 mg MAG/g meio reacional.h, sendo ainda constatados valores similares de triglicerídeos residuais (1,9 para 2,4%). Por outro lado, quando a vazão volumétrica foi aumentada de 0,028 para 0,046 mL/min, verificou-se uma redução acentuada da concentração de MAG (de 17%) e produtividade (de 65 para 34 mg MAG/g meio reacional.h), com conseqüente aumento da concentração dos triglicerídeos residuais (de 2,4 para 3,2%).

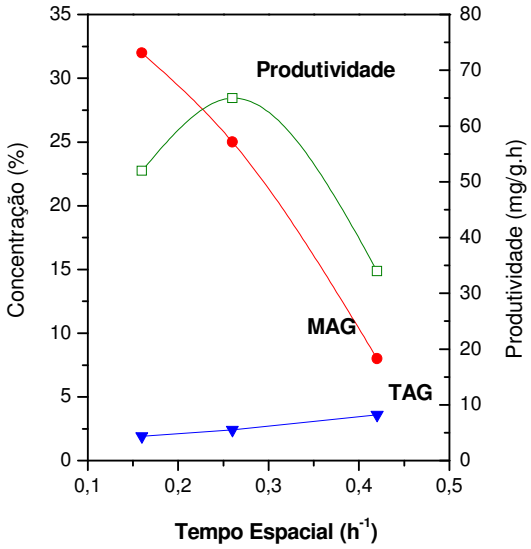


Figura 5.31. Variáveis do estado estacionário da produção contínua de monoglicerídeos pela glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo, empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, como biocatalisador.

Com base nesses resultados, verifica-se que o funcionamento do reator de leito fixo foi comprovado quantitativamente para tempos de residências iguais ou superiores a 3,85h (vazão volumétrica = 0,028 mL/min). Produtividades entre 34-65 mg MAG/g meio reacional.h foram alcançadas com elevada conversão do triglicerídeo (> 98%). O derivado imobilizado de lipase PS foi extremamente estável quanto suas propriedades catalíticas ($t_{1/2}$= 50 dias). O processo necessita de um controle permanente da qualidade da matéria-prima por meio do emprego de técnicas que previnam a oxidação da matéria-prima lipídica, como inserção de uma linha de gás inerte ou adição de agentes antioxidantes no meio de alimentação.

5.1.2.1.4. Atuação da lecitina de soja como agente antioxidante nas reações de glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo

Considerando que a lectina de soja foi o agente antioxidante mais eficaz nas reações de glicerólise conduzidas em regime de batelada (item 5.1.1.4), a ação deste emulsificante foi também testada em reator de leito fixo, empregando as condições experimentais estabelecidas anteriormente. Para efeito de comparação dos resultados obtidos, dois controles foram utilizados: Controle 1 (reação isenta de aplicação de técnicas antioxidantes) e Controle 2 (sob atmosfera inerte). A Figura 5.32 mostra o perfil de formação dos MAGs nas duas reações controle.

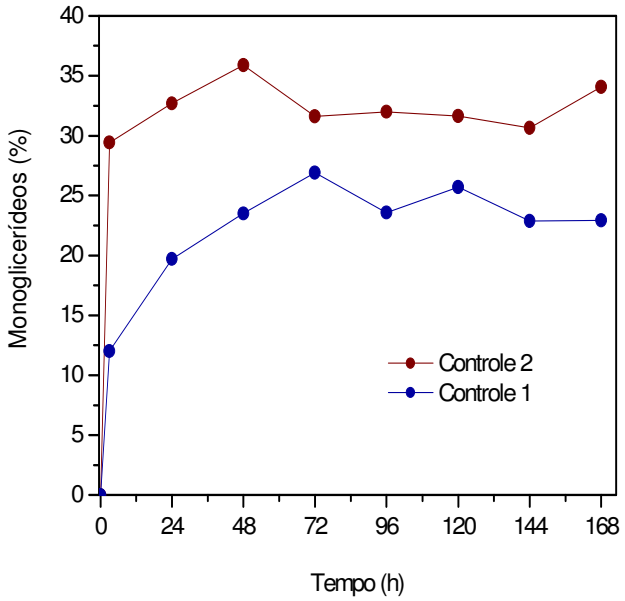


Figura 5.32. Perfil de formação dos monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu (controle e sob atmosfera inerte) empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA.

Independente da utilização de estratégias para inibir a oxidação lipídica (Controle 1 ou 2), foi constatada que a formação de MAG foi mantida durante a operação do sistema contínuo, demonstrando a boa estabilidade operacional do derivado imobilizado utilizado. O uso de atmosfera inerte (Controle 2), entretanto, forneceu concentrações mais elevadas de MAGs (variação entre 30 a 35%) em relação ao Controle 1 (variação entre 23 a 26%), comprovando mais um vez a eficiência do N_2 na inibição ou redução da oxidação do óleo de babaçu durante o progresso da síntese de MAGs.

No entanto, não foi possível operar o reator de leito fixo, quando a lecitina de soja foi adicionada ao meio de alimentação, devido à ocorrência de obstrução dos poros do derivado imobilizado, impedindo a passagem do substrato através do leito empacotado. Este fato pode

ser associado ao aumento da viscosidade do meio reacional causado pela adição de lecitina de soja, um surfatante anfótero e altamente viscoso. Além disso, há relatos na literatura que a lipase pode sofrer inibição da sua atividade catalítica em presença da lecitina de soja (Soares et al., 2003).

Para superar a elevada viscosidade nesses meios reacionais, trabalhos descritos na literatura (YANG et al., 2005b; DAMSTRUP et al., 2005; XU; KATO; ASANO, 2001) recomendam o uso de solventes, como *terc*-butanol, hexano, pentanol, isopropanol entre outros. Uma outra possibilidade seria a variação da razão molar entre os materiais de partida, pois com a redução da quantidade de glicerol no meio reacional, este tenderia a ficar menos viscoso (48,47 cp), devido à elevada viscosidade do glicerol (d = 1,22 g/cm^3).

5.1.2.2. Reações de glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado em regime contínuo

Embora inúmeros testes tenham sido realizados com o intuito de verificar possíveis influências na síntese de monoglicerídeos pela glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo, valores similares de concentração de MAG aos alcançados nos experimentos conduzidos em regime batelada (60%) não foram obtidos em função das limitações operacionais discutidas anteriormente. Desta forma foi proposta a avaliação do reator de leito fluidizado, que é a configuração mais indicada na literatura para operar sistemas reacionais que empregam substratos com elevada viscosidade. Além disso, reatores de leito fluidizado demonstram melhor desempenho que os reatores de leito fixo e geralmente fornecem conversões mais elevadas, provavelmente porque nos reatores de leito fixo parte da enzima não fica em contato com o substrato, devido a presença de caminhos preferenciais através do leito e obstrução da área de contato.

Osório et al. (2005), avaliaram esses dois sistemas contínuos na interesterificação da esterarina de palma com óleo de soja, empregando Novozym 435 como biocatalisador e verificaram que o reator de leito fluidizado foi mais eficiente que o reator de leito fixo, pois este apresentava elevada perda de pressão no decorrer da reação, mostrando-se inapropriado para o sistema reacional empregado.

No presente trabalho, inicialmente os testes de glicerólise em reator de leito fluidizado foram realizados empregando as condições experimentais que alcançaram os valores mais elevados de MAG em reator de leito fixo (item 5.1.2.1.3.), como: RM=15:1 glicerol/óleo, T=50°C, tempo de residência de 6,30 h e meio de alimentação mantido sob atmosfera inerte. O reator de coluna utilizado apresentava as seguintes dimensões: diâmetro interno= 15 mm,

comprimento = 210 mm e volume = 37 mL. A massa de lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA utilizada no interior do reator foi de 12g, correspondendo a uma razão mássica de sistema imobilizado/meio reacional de 17%, sendo a vazão de alimentação de 0,082 mL/min.

Na tentativa de operação do sistema contínuo do leito fluidizado em meios reacionais isento de solvente, muitos obstáculos foram detectados, tais como: fluidização insuficiente e não uniformidade no interior do reator de coluna, deslocamentos do leito (diferenças na altura do leito fluidizado), vazamentos nas conexões do sistema experimental (mangueiras, entradas e saídas de reatores), perdas do biocatalisador por arraste pelo substrato em função da elevada vazão de fluidização ocasionando entupimentos nas mangueiras do sistema experimental. Todos estes problemas podem estar relacionados com a elevada viscosidade do meio reacional da ordem de 48,47 cp.

Para superar essas limitações operacionais *terc*-butanol foi adicionado ao meio de alimentação, objetivando reduzir a viscosidade do meio reacional e possibilitar a operação do reator de leito fluidizado em regime contínuo. Ressalta-se que este solvente foi selecionado tomando por base dados descritos na literatura referentes as reações medidas por lipases (ZHONG et al., 2009; YANG et al., 2005a; YANG et al., 2005b; KUMARI et al., 2009; DAMSTRUP et al., 2005).

Foram testadas duas condições reacionais, variando a proporção do solvente no meio de alimentação, conforme a seguir descrito:

Condição 1: RM = 15:1 (glicerol/óleo), empregando *terc*-butanol como solvente no meio reacional na razão de 1:1 (volume de solvente: massa total do meio reacional), viscosidade= 13,00 cp.

Condição 2: RM = 15:1 (glicerol/óleo), empregando *terc*-butanol como solvente no meio reacional na razão de 2:1 (volume de solvente: massa total do meio reacional), viscosidade= 7,73 cp

A velocidade mínima de fluidização foi calculada, conforme descrito anteriormente (item 4.2.6) para as duas condições ensaiadas e a Tabela 5.7 apresenta os dados referentes a porosidade do leito em função da velocidade de ascensão do fluido no reator.

Tabela 5.7 - Porosidade do leito em função da velocidade de ascensão do fluido no reator de leito fluidizado para as duas condições ensaiadas.

Condição 1		Condição 2	
Velocidade (cm/s)	**Porosidade**	**Velocidade (cm/s)**	**Porosidade**
0,0798	0,7488	0,1026	0,7039
0,0685	0,7302	0,0672	0,6777
0,0566	0,6833	0,0492	0,6628
0,0475	0,6531	0,0403	0,6358
0,0276	0,6166	0,0314	0,6166
0,0184	0,5953	0,0172	0,5953
0,0096	0,5715	0,0112	0,5447
0,0040	0,5447	0,0040	0,5144

Os dados listados na Tabela 5.7 foram ajustados à correlação de Richardson e Zaki (1954), citados por Zanin (1989) conforme descrito na Equação 4.1, e plotados na Figura 5.33.

Com os dados apresentados na Tabela 5.7 e na Figura 5.33 os valores das velocidades mínimas de fluidização de $2{,}16 \times 10^{-3}$ e $4{,}17 \times 10^{-3}$ cm/s foram determinadas, correspondendo a uma vazão de e $3{,}81 \times 10^{-3}$ e $7{,}37 \times 10^{-3}$ mL/min, respectivamente para as condições 1 e 2. Para operação do reator, optou-se por trabalhar com uma vazão de 0,017 mL/min, capaz de promover uma fluidização mais intensa no interior do reator de coluna.

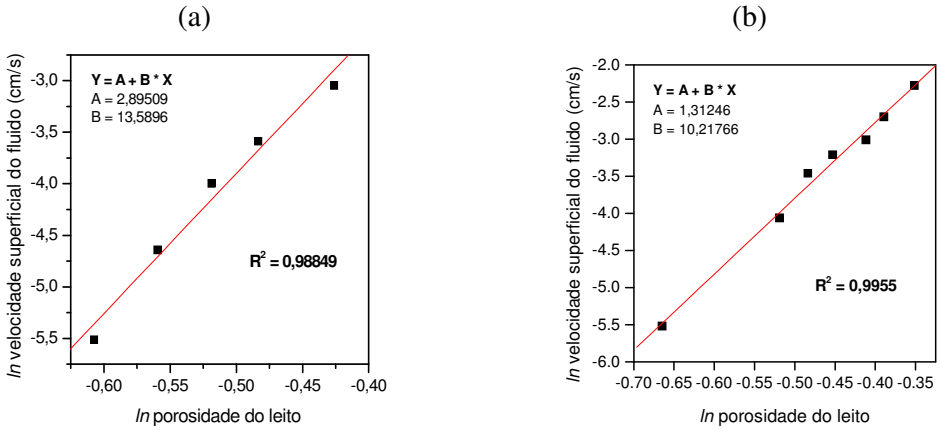


Figura 5.33. Dados ajustados à Correlação de Richardson; Zaki (1954), para a determinação da velocidade mínima de fluidização na glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado, (a) Condição 1 e (b) Condição 2.

A Figura 5.34 mostra o esquema experimental utilizado para a realização destes testes. O perfil de formação de mono e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos obtidos durante o progresso da reação empregando a Condição 1 é mostrado na Figura 5.35.

Figura 5.34. Esquema da reação de glicerólise realizada em reator de leito fluidizado operado em sistema contínuo, empregando terc-butanol como solvente no meio de alimentação, sendo esta mantida sob atmosfera inerte (linha de N_2).

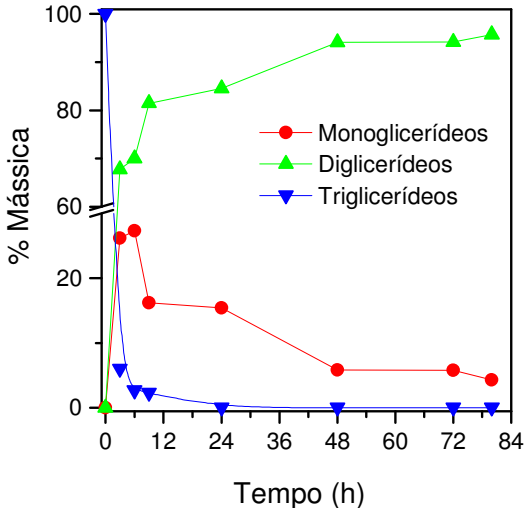


Figura 5.35. Perfil de formação dos mono e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fluidizado empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte (Condição 1).

De acordo com os dados plotados na Figura 5.35, pode-se observar que, embora tenha sido possível operar o reator de leito fluidizado, em função da diminuição da viscosidade do meio reacional (de 48,47 para 13,00 cp) limitações operacionais ainda foram constatadas, tais como: fluidização não adequada e o desprendimento da lipase do suporte (verificado visualmente pelo surgimento de uma nova fase sólida no interior do reator). Estas limitações resultaram em uma instabilidade do sistema, sendo alcançado um valor máximo de monoglicerídeo da ordem de 25% no primeiro tempo de residência (6,3 h), ocorrendo na sequência um rápido decréscimo dessa produção, até atingir uma concentração de apenas 5% em 8 tempos de residência.

Por outro lado, adotando a Condição 2 (Figura 5.36) foi possível operar o reator de leito fluidizado em regime contínuo de forma estável, sendo constatada uma formação média de 34% de monoglicerídeos, o que correspondeu a uma produtividade de 54 mg MAG/g meio reacional.h. Nota-se ainda que este sistema experimental atingiu o estado estacionário no primeiro tempo de residência (6,3 h), não sendo observado nenhum decaimento de desempenho do sistema até ao final de operação.

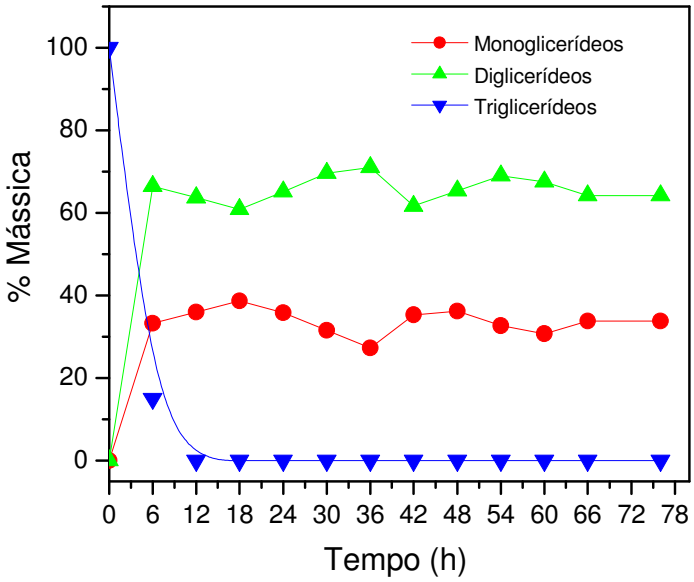


Figura 5.36. Perfil de formação dos mono e diglicerídeos e consumo dos triglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fluidizado empregando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, sob atmosfera inerte, conduzida por 76 h (Condição 2).

O desempenho satisfatório deste sistema experimental deve estar relacionado com a redução da viscosidade do meio de alimentação (7,73 cp), facilitando a fluidização do sistema contínuo.

5.2. Reações de esterificação

5.2.1. Esterificação descontínua do glicerol com ácidos graxos

As reações de esterificação descontínuas foram realizadas empregando-se a lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA como biocatalisador, sendo verificada a influência de alguns parâmetros na síntese de MAGs, tais como: influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo, a seletividade para a formação de MAG e efeito da irradiação de micro-ondas.

5.2.1.1. Influência do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação do ácido graxo na síntese de MAG via esterificação

Visando estudar a influência do tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação do ácido graxo na formação de monoglicerídeos via esterificação enzimática, foram realizados testes empregando diferentes ácidos graxos (presentes na composição do óleo de babaçu) como o ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oléico. Estes experimentos foram efetuados em reatores esféricos (Figura 5.37) em meio reacional contendo excesso de glicerol (razão molar glicerol/ácido graxo = 8:1), (FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2009a), 5% de lipase *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA e temperatura na faixa de 45 a 65°C, dependendo do ponto de fusão de cada ácido graxo empregado. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.38.

Figura 5.37. Esquema da reação de esterificação realizada em reator esférico operado em sistema descontínuo.

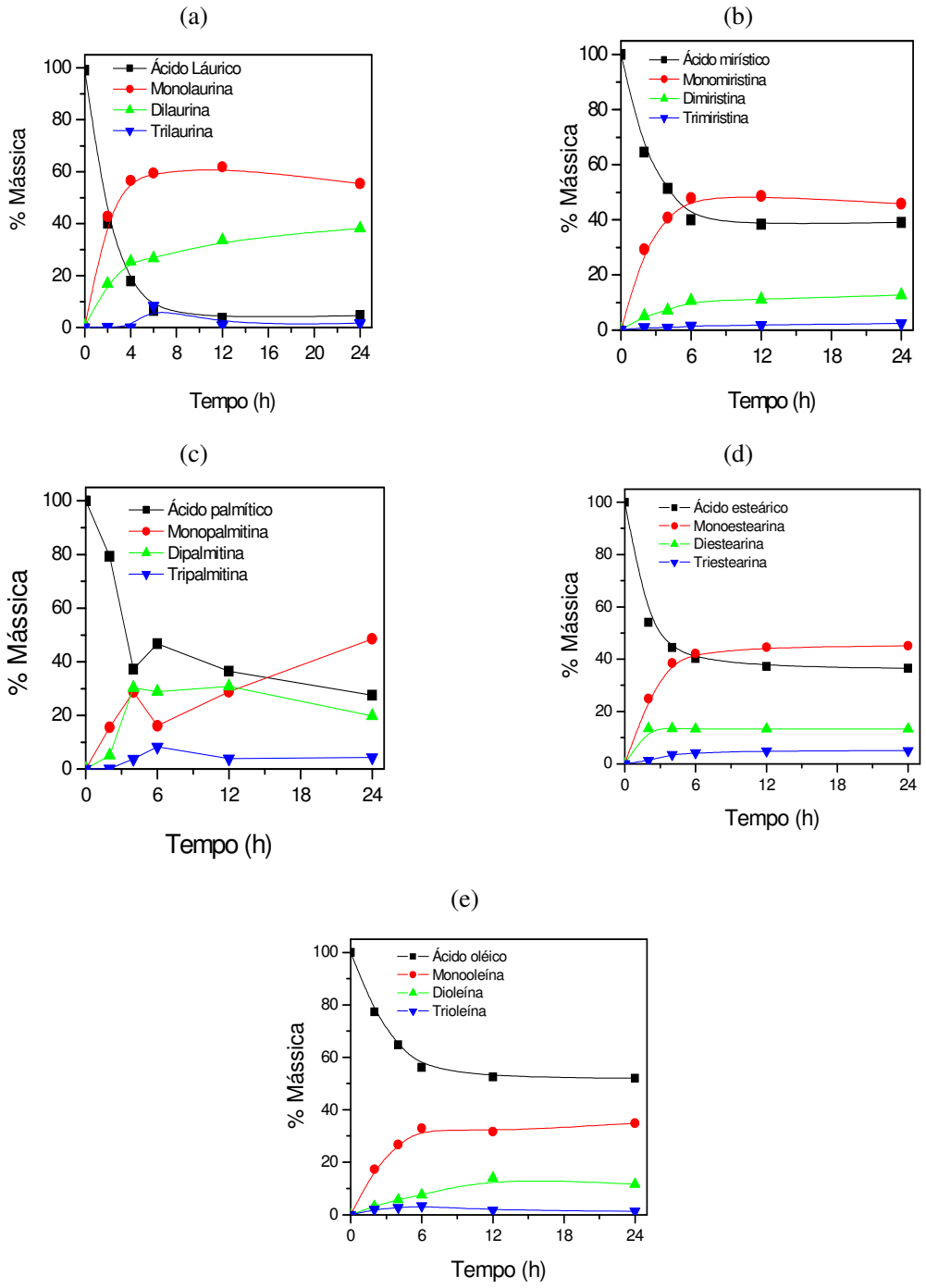


Figura 5.38. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol com diferentes ácidos graxos catalisada pela preparação da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA na faixa de temperatura de 45-65°C: (a) Ácido láurico, (b) Ácido mirístico, (c) Ácido palmítico, (d) Ácido esteárico e (e) Ácido oléico.

Na reação empregando o ácido láurico (C_{12}), como pode ser observado na Figura 5.38a, a obtenção máxima de monolaurina (60%) foi alcançada em apenas 6 h de reação, sendo também constatado um consumo praticamente total do ácido láurico (93%). A continuidade desta reação por um longo período (24 h) não favoreceu a formação da monolaurina.

Com relação à esterificação do ácido mirístico (C_{14}) (Figura 5.38b), o equilíbrio da reação foi atingido no mesmo tempo reacional (6 h), no entanto houve formação de apenas 48% de monomiristina, ou seja, 20% a menos do que foi obtido de monolaurina. Também foi observado que apenas 60% do ácido mirístico havia sido consumido.

Para os ácidos palmítico (C_{16}) e esteárico (C_{18}) foram constatadas formações similares de monoglicerídeos (45-48%) em 24h de reação (Figuras 5.38c e 5.38d), enquanto que o ácido oléico ($C_{18:1}$) atingiu máxima formação de monooleína (33%) em 6h de reação, como demonstrado na Figura 5.38e.

A Figura 5.39 mostra o perfil de formação dos monoglicerídeos dos diferentes ácidos graxos estudados em função do tempo reacional.

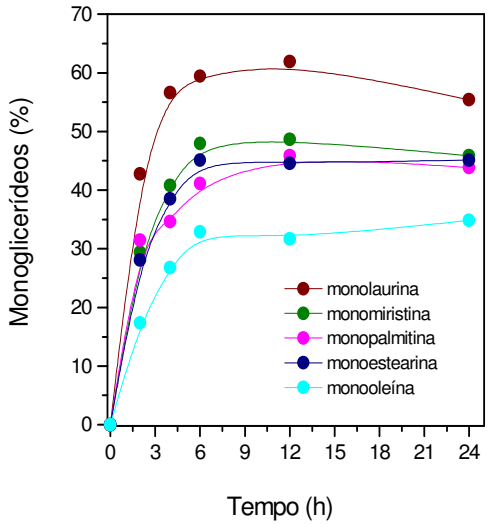


Figura 5.39. Perfil de formação dos monoglicerídeos na reação de esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos, realizada em reator esférico, empregando a lipase G imobilizada em SiO_2-PVA.

Observa-se na Figura 5.39 que as maiores formações de monoglicerídeos foram obtidas para os ácidos graxos com menor tamanho de cadeia carbônica (C_{12}), podendo estar relacionada com o fato do sítio ativo da lipase ter encontrado dificuldade em interagir com os ácidos graxos de cadeias mais longas (impedimento estérico), diminuindo assim, o poder

catalítico da lipase. Uma outra hipótese, é que essa influência pode estar relacionada com a especificidade da lipase de *Penicillium camembertii* para alguns ácidos graxos, conforme pode ser melhor visualizado na Figura 5.40.

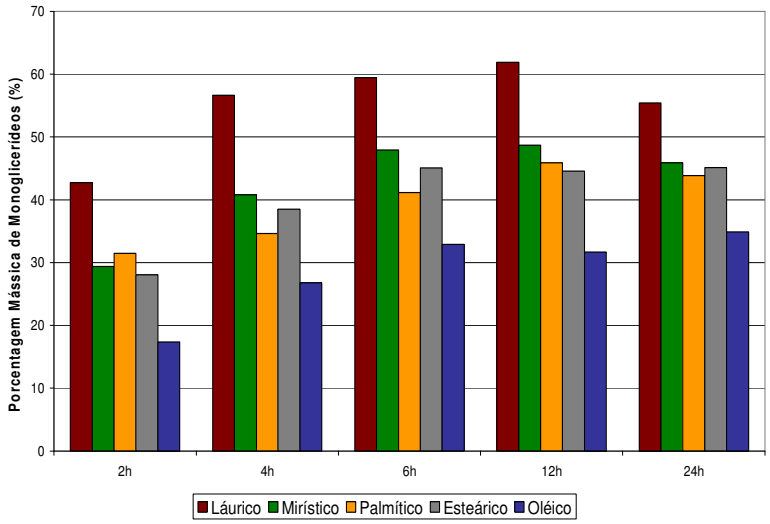


Figura 5.40. Especificidade da lipase G em relação a formação dos monoglicerídeos provenientes de diferentes ácidos graxos formados nas reações de esterificação com glicerol realizadas em reatores esféricos.

Com relação à seletividade dessas reações de esterificação (calculado como descrito no item 4.3.6) para a produção de monoglicerídeos (Tabela 5.8) observa-se que os ácidos mirístico e palmítico forneceram os valores mais elevados de seletividade (cerca de 80%).

Tabela 5.8 - Seletividade para a formação de monoglicerídeos nas reações de esterificações do glicerol com diferentes ácidos graxos

Ácido graxo	**Consumo do ácido graxo (%)**	**MAG (%)**	**Seletividade* (%)**
Ácido láurico (C_{12})	93,50	59,45	62,91
Ácido mirístico (C_{14})	59,96	47,92	79,92
Ácido palmítico (C_{16})	55,76	45,86	83,80
Ácido esteárico (C_{18})	59,73	45,08	75,47
Ácido oléico ($C_{18:1}$)	43,88	32,92	75,02

* Cálculos realizados em 6 h de reação.

Os resultados apresentados na Tabela 5.8 sugerem que a lipase de *Penicillium camembertii* (lipase G) possui uma elevada afinidade pelo ácido láurico (consumo praticamente total do ácido), formando diglicerídeos além dos monoglicerídeos, diminuindo assim a seletividade deste ácido graxo para a formação dos MAGs. Por outro lado, a

seletividade pode estar relacionada com o impedimento estérico, ou seja, pela dificuldade encontrada pelos monoglicerídeos provenientes dos ácidos graxos de cadeias mais longas (C_{14-18}) em formar os diglicerídeos, aumentando dessa forma, a seletividade destes ácidos para a formação dos monoglicerídeos.

Ressalta-se que os produtos formados na maioria das reações de esterificação realizadas atendem as exigências da Organização Mundial da Saúde, que exige os seguintes critérios: 1) apresentar mais de 70% de mono + diglicerídeos, 2) ter no mínimo 30% de monoglicerídeos e 3) apresentar quantidades de ambos, glicerol e triglicerídeos, abaixo de 10% (ARCOS; OTERO, 1996) para serem utilizadas em alimentos.

5.2.1.2. Esterificação descontínua do glicerol com ácido láurico em reator de micro-ondas

A partir dos resultados obtidos pelo *screening* dos ácidos graxos (item 5.2.1.1) selecionou-se o sistema reacional glicerol e ácido láurico para efetuar testes em reator de micro-ondas (Reator Discover). As reações foram efetuadas em reatores esféricos sob irradiação de micro-ondas (Figura 5.41) por um período máximo de 6h, utilizando as seguintes condições: 1) Substrato: glicerol e ácido láurico (razão molar de 3:1, 5:1 e 8:1), 2) temperatura = 50ºC e 3) 5% (m/m) de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. O perfil de formação de mono, di e triglicerídeos e consumo do ácido láurico nos testes catalíticos realizados é mostrado na Figura 5.42.

Figura 5.41. Esquema da reação da esterificação do glicerol com ácido láurico realizada em reator de micro-ondas Discover.

Na reação empregando materiais de partida na razão molar de 3:1 (Figura 5.42a), a obtenção máxima de monolaurina (33%) foi alcançada em apenas 2 h de reação, no entanto verificou-se reversibilidade da reação, ocorrendo tanto um decréscimo na formação do monoglicerídeo (atingindo 27% no final de 6h), como também um aumento da concentração de ácido láurico residual (cerca de 12%). Com relação as esterificações empregando meios reacionais em razões molares de 5:1 e 8:1 (Figuras 5.42b e 5.42c), foram observados perfis similares, sendo que ambos os testes formaram cerca de 35% de monolaurina em 6h de reação. Cabe-se ressaltar que a reação que empregou o maior valor de razão molar (8:1), apresentou velocidade reacional mais elevada, atingindo 31% de monoglicerídeo em 4h de reação.

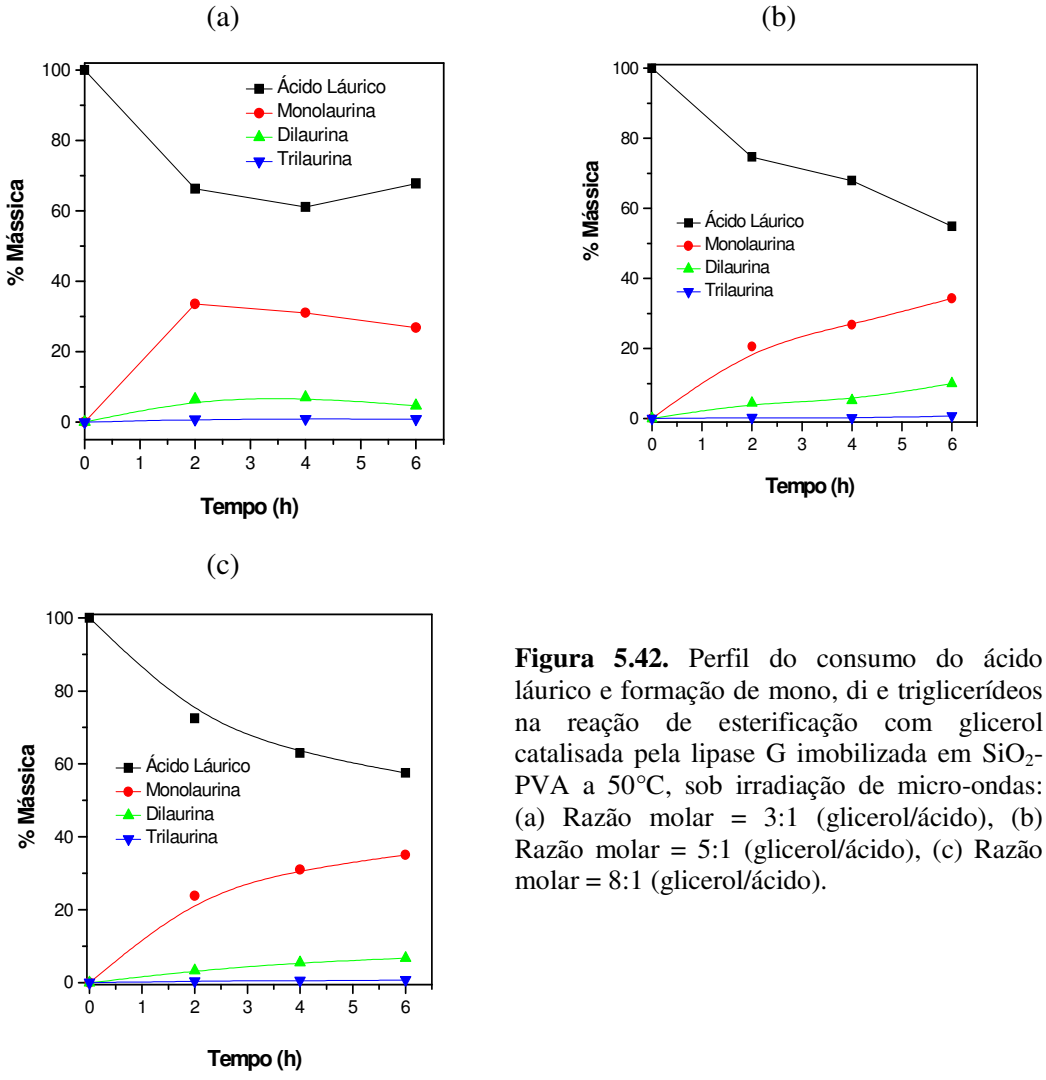


Figura 5.42. Perfil do consumo do ácido láurico e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA a 50°C, sob irradiação de micro-ondas: (a) Razão molar = 3:1 (glicerol/ácido), (b) Razão molar = 5:1 (glicerol/ácido), (c) Razão molar = 8:1 (glicerol/ácido).

Visando verificar a influência dos campos magnéticos na síntese de monolaurina via esterificação catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, os resultados obtidos na reação empregando razão molar = 8:1 (glicerol/óleo) sob irradiação de micro-ondas foram comparados com o desempenho obtido sob aquecimento convencional (item 5.2.1.1), como ilustrados na Figura 5.43.

Como pode ser observado na Figura 5.43, o tipo de aquecimento interferiu de forma marcante na formação dos produtos dos ensaios realizados. Na síntese empregando aquecimento convencional verificou-se um consumo praticamente total do ácido (93,50%) em 6h de reação, enquanto na reação assistida por irradiação de micro-ondas ocorreu um decréscimo deste consumo (42,52%), fato este que pode estar relacionado com a estabilidade da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA na presença de campos eletromagnéticos.

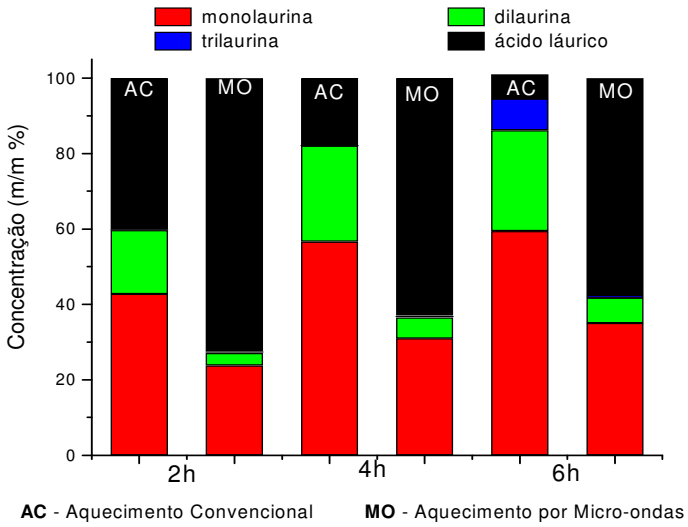


Figura 5.43. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e concentração de ácido láurico nas reações de esterificação do glicerol com ácido láurico catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando diferentes tipos de aquecimento.

Outro ponto importante que deve ser ressaltado, é que na síntese irradiada por micro-ondas, verificou-se um aumento da seletividade para formação de monolaurina (de 63 para 82%), refletindo numa redução da formação de dilaurina (queda de 20%) e trilaurina (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Seletividade para a formação de monolaurina nas reações de esterificações empregando aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas

Aquecimento	Ácido (%)	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)	Seletividade* (%)
Convencional	6,49	59,45	26,67	8,38	62,91
Micro-ondas	57,48	35,04	6,76	0,72	82,41

* seletividade calculada em 6h de reação

Esses resultados demonstraram que os campos magnéticos podem interferir na seletividade das enzimas, sendo este efeito altamente benéfico para a produção de monolaurina via esterificação enzimática catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. No entanto, a formação de monolaurina obtida sob irradiação de micro-ondas (35%), foi ainda inferior aos valores alcançados nas reações efetuadas com aquecimento convencional (60%).

Visando investigar se o comportamento observado era específico para a lipase G, foram realizados testes catalíticos no reator de micro-ondas Discover, empregando lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme IM^{20}), uma preparação comercial de lipase imobilizada bem documentada, apresentando comportamento definido em diversos sistemas reacionais (PASTORE; PARK, 1993; SELMI et al., 1998; LANGONE et al. 2002), permitindo dessa maneira, uma comparação dos resultados.

As sínteses foram realizadas empregando glicerol e ácido láurico como materiais de partida (razão molar de 3:1, 5:1 e 8:1), 5% (m/m) de Lipozyme IM^{20}, a 50ºC. O perfil de formação de mono, di e triglicerídeos e consumo do ácido láurico é mostrado na Figura 5.44.

Analisando os dados na Figura 5.44, observou-se que a razão molar entre os materiais de partida não apresentou influência significativa na composição dos produtos formados. Verifica-se ainda que em todos os ensaios a formação de monolaurina variou entre 31 a 37%, sendo o consumo de ácido da ordem de 70%. Ressalta-se que o experimento realizado com razão molar = 3:1 (Figura 5.44a) também foi constatado reversibilidade da reação, como no experimento realizado com a lipase G.

A Figura 5.45 compara o desempenho da atuação da Lipozyme IM^{20} e da Lipase G imobilizada em SiO_2-PVA na síntese da monolaurina sob irradiação de micro-ondas, empregando materiais de partida em diferentes razões molares, no final de 6h de reação.

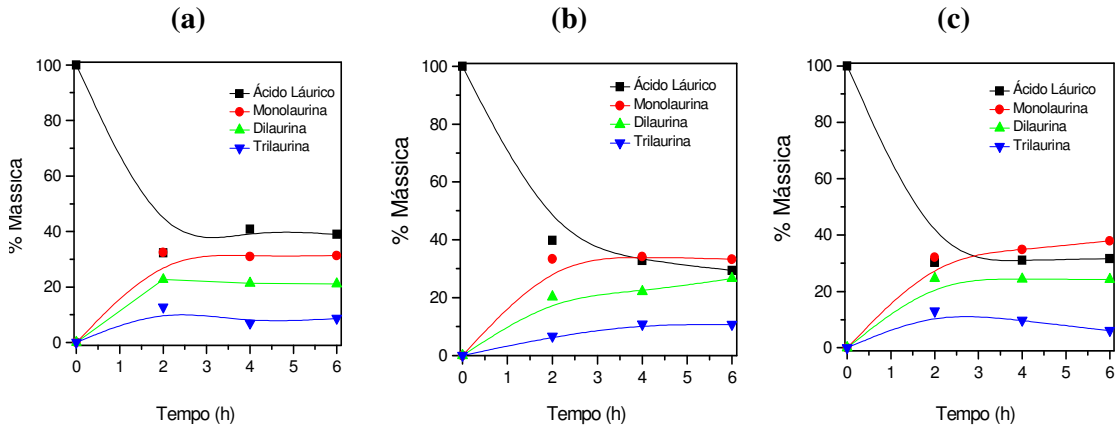


Figura 5.44. Perfil do consumo do ácido láurico e formação de mono, di e triglicerídeos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação da Lipozyme IM[20] a 50°C, sob irradiação de micro-ondas: (a) Razão molar = 3:1 (glicerol/ácido), (b) Razão molar = 5:1 (glicerol/ácido), (c) Razão molar = 8:1 (glicerol/ácido).

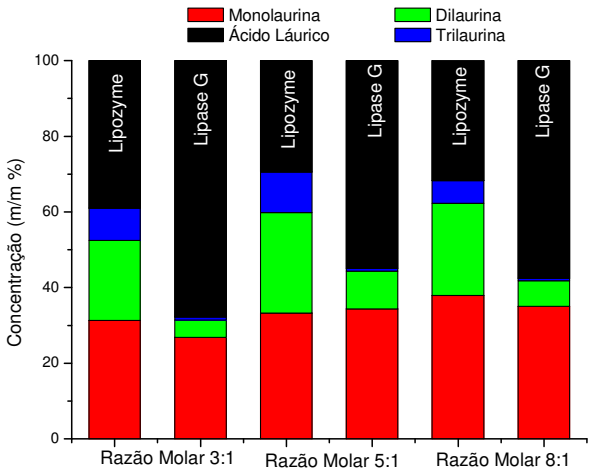


Figura 5.45. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e concentração de ácido láurico nas esterificações do glicerol com ácido láurico em diferentes condições reacionais, sob irradiação de micro-ondas.

Verifica-se que a irradiação de micro-ondas interferiu de forma distinta nas lipases testadas. De acordo com a Tabela 5.10, observa-se que para Lipozyme (empregando razão molar de 8:1), ocorreu uma redução da seletividade para formação de monolaurina e um aumento da formação de mono e dilaurina (MAG+DAG = 62.3%), refletindo num consumo de 70% do ácido láurico. No entanto, para a lipase G a seletividade para monolaurina foi aumentada (cerca de 27%), sendo constatado traços de dilaurina (7%) e menor consumo de ácido láurico (42%).

Tabela 5.10 - Seletividade para a formação de monolaurina nas reações de esterificações empregando Lipozyme IM[20] e Lipase G imobilizada em SiO_2-PVA

Razão Molar (álcool: ácido)	Lipozyme IM[20]					Lipase G				
	Ácido	MAG	DAG	TAG	S*	Ácido	MAG	DAG	TAG	S*
3:1	38,96	31,33	21,08	8,63	51,33	67,74	26,79	4,65	0,82	83,04
5:1	29,44	33,24	26,62	10,07	47,11	54,89	34,32	10,03	0,76	76,08
8:1	31,69	37,93	24,34	6,04	55,52	57,48	35,04	6,76	0,72	82,41

* Seletividade calculada em 6h de reação

Com base nesses resultados, verifica-se que as irradiações de micro-ondas alteraram a seletividade das lipases, sendo este efeito mais expressivo na atuação da lipase de *Penicillium camembertii* (Lipase G) do que da lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme) para a produção de monolaurina. Uma alternativa para a formação exclusiva de monoglicerídeos seria a proteção do glicerol (conforme item 5.1.1.6), uma técnica na qual apenas um radical OH permanece disponível para interagir/reagir com o ácido na presença de lipase (WANG; WONG, 1988).

Dentre os testes de esterificações descontínuas efetuados, as formações mais elevadas de monoglicerídeos foram obtidas empregando-se razão molar = 8:1 (glicerol/ácido graxo) e temperatura = 50ºC, atingindo em média 60% de monolaurina. Com relação à seletividade dessas reações para a produção de MAGs, observa-se que os ácidos mirístico e palmítico forneceram os valores mais elevados (cerca de 80%). Além disso, ressalta-se que a maioria dos produtos formados atende as exigências da Organização Mundial da Saúde. Os resultados das esterificações irradiadas com micro-ondas demonstraram que os campos eletromagnéticos podem interferir na seletividade das enzimas, sendo este efeito benéfico para a produção de monolaurina.

5.2.2. Esterificação contínua do glicerol com ácidos graxos

As reações de esterificação contínuas em leito fixo foram realizadas empregando-se a lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA como biocatalisador, sendo verificada a influência de alguns parâmetros na síntese de MAGs, tais como a seleção do ácido graxo e o emprego de diferentes estratégias para a remoção da água formada durante a reação.

5.2.2.1. Esterificação contínua do glicerol com ácido láurico

Os testes iniciais de esterificação em reator de leito fixo foram realizados adotando as seguintes condições experimentais (Substrato: glicerol/ácido láurico na razão molar = 8:1),

temperatura de 50°C, reator de coluna (diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL), vazão de alimentação de 0,020 mL/min, τ = 6,46 h e 6,70g (massa seca) de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, conforme metodologia descrita no item 4.2.6.7.

Durante a operação do reator, observou-se uma obstrução do leito, sendo verificado pequenos sólidos do ácido láurico em seu interior, impedindo desta maneira a passagem do substrato através da coluna. Uma tentativa para superar este obstáculo seria elevar a temperatura de reação para 60 ºC, no entanto a lipase G apresenta baixa estabilidade térmica esta estratégia não foi concluída com êxito. Desse modo, não foi possível operar o sistema contínuo nas condições experimentais testadas. Com base neste contexto, e visando reduzir a viscosidade do meio reacional, foram realizados testes empregando *terc*-butanol como solvente no meio de alimentação, com o intuito de possibilitar a operação do sistema contínuo.

5.2.2.1.1. Esterificação contínua do glicerol com ácido láurico empregando *terc*-butanol como solvente no meio de alimentação

Solventes podem ser utilizados em meios reacionais tanto para solubilizar os reagentes como também para diminuir a viscosidade do meio (conforme descrito no item 5.1.2.2.). Fundamentado neste contexto, foram efetuadas reações de esterificação do glicerol com ácido láurico catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando *terc*-butanol como solvente no meio reacional (ZHONG et al., 2009; YANG et al., 2005a; YANG et al., 2005b; KUMARI et al., 2009; DAMSTRUP et al., 2005) As condições reacionais utilizadas foram aquelas já estabelecidas (razão molar = 8:1 glicerol/ácido láurico, temperatura = 50ºC, vazão de alimentação de 0,0243 mL/min, τ = 5,30 h), sendo adicionado *terc*-butanol no meio de alimentação na proporção de 2:1 (volume de *terc*-butanol/massa total dos reagentes envolvidos no sistema). O esquema experimental e os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 5.46 e 5.47, respectivamente.

Figura 5.46 Esquema da esterificação do glicerol com ácido láurico em meio terc-butanol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA.

Como pode ser observado na Figura 5.47, foi possível operar o reator em regime contínuo provavelmente devido à solubilização do ácido láurico no solvente. No entanto, os resultados foram ainda insatisfatórios, atingindo um valor médio inferior a 2% de monolaurina, refletindo num baixo consumo de ácido láurico.

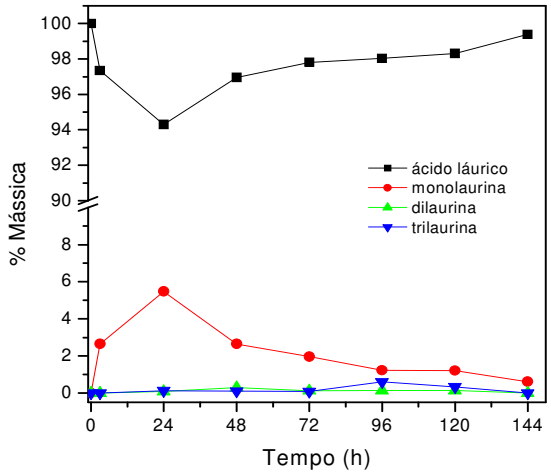


Figura 5.47. Perfil de formação de mono, di e trilaurina e consumo do ácido láurico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando terc-butanol no meio reacional.

Estes resultados podem estar relacionados com dois fatores: i) efeito da diluição da concentração do substrato, possibilitando a redução da velocidade da reação e ii) o caráter hidrofílico (logP =0,35) do solvente utilizado, podendo causar uma desnaturação/desativação

da lipase, ocasionada pela retirada da camada de hidratação que a envolve. Com base nesses resultados, uma sugestão para solucionar essas limitações, seria a realização de um *screening* de solventes, com polaridades e grupos funcionais diferentes, visando a maximização da formação de monolaurina.

5.2.2.2. Esterificação contínua do glicerol com ácido oléico

Tendo em vista os resultados insatisfatórios obtidos na esterificação contínua do ácido láurico, optou-se pela utilização do ácido oléico para dar continuidade aos testes em reatores de leito fixo, por ser um ácido graxo líquido a temperatura ambiente (Ponto de fusão = 13-14ºC), e, portanto não apresentaria problemas na operação do sistema contínuo. Estes ensaios foram realizados empregando as seguintes condições experimentais: glicerol/ácido oléico (razão molar = 8:1), temperatura de 50°C, reator de coluna (diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL), vazão de alimentação de 0,0182 mL/min, τ = 7,03h e 6,70g (massa seca) de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA. O esquema experimental está ilustrado na Figura 5.48 e os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.49.

Figura 5.48. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico com glicerol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo.

Observa-se na Figura 5.49 a presença de dois patamares na formação de monooleina, o primeiro ocorre entre 24 e 120h de reação, apresentando uma formação média de 22% de MAG, correspondendo a uma produtividade de 31,30 mg MAG/g meio reacional.h. O segundo patamar aparece a partir das 120h, apresentando uma formação média de 16% de MAG, correspondendo a uma produtividade de 22,70 mg MAG/g meio reacional.h. Durante os cinco primeiros dias, nenhum decréscimo significativo na produção de monooleina foi

observado, verificando-se uma queda de cerca de 28% a partir do quinto dia de operação do sistema contínuo. Essa queda na formação dos monoglicerídeos está relacionada com a reversibilidade observada nessa reação (reação de hidrólise), em função da presença da água no meio reacional formada como coproduto da reação de esterificação.

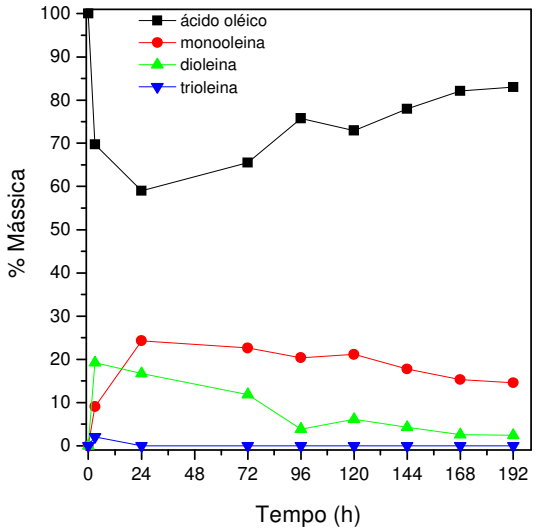


Figura 5.49. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA.

Ressalta-se que esses valores ainda são inferiores aos encontrados em regime batelada (item 5.2.1.1). Resultados similares foram verificados por Esteban et al. (2009), reportando uma produção mais elevada de MAG na alcoólise do óleo de peixe catalisada pela Novozym 435, quando foi usado um tanque agitado operado descontinuamente.

Sabe-se que nas reações de hidrólise ou de esterificação a quantidade da água afeta tanto na conversão dessas reações como também na distribuição dos produtos formados no meio reacional. Particularmente para as esterificações, quando a quantidade de água aumenta no meio, menores conversões são encontradas (FORESTI et al., 2007).

Desta forma, na literatura são descritas diversas estratégias para remover a água formada como subproduto do meio reacional visando minimizar a reação inversa de hidrólise, tais como: redução de pressão, utilização de agentes secantes (peneira molecular ou sílica gel), borbulhamento de ar seco, solventes hidrofílicos, sais secantes, entre outras (XU, 2003).

5.2.2.2.1. Estratégias para remoção da água formada na esterificação contínua do ácido oléico com glicerol realizada em leito fixo

Entre as técnicas preconizadas para remoção da água formada durante a reação de esterificação, selecionou-se o uso de peneira molecular. Inicialmente efetou-se um teste utilizando peneira molecular no interior do reator de leito fixo, dispondo-a em camadas alternadas com o derivado imobilizado (lipase G imobilizada em SiO_2-PVA). Este ensaio foi realizado empregando as seguintes condições experimentais: glicerol/ácido oléico (razão molar = 8:1), temperatura de 50°C, reator de coluna (diâmetro interno= 20 mm, comprimento = 120 mm e volume = 37,7 mL), vazão de alimentação de 0,0182 mL/min e τ = 9,78h. Como pode ser observado na Figura 5.50, o leito foi empacotado da seguinte maneira: 3 camadas da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA de 2,23g alternadas por 2 camadas de peneira molecular de 3,35g cada, o que correspondeu uma relação de 1:1 de massa do derivado imobilizado: massa de peneira molecular. Os resultados encontrados são apresentados na Figura 5.51.

Figura 5.50. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico com glicerol realizada em reator de leito fixo operado em sistema contínuo, empregando peneira molecular no interior do biorreator.

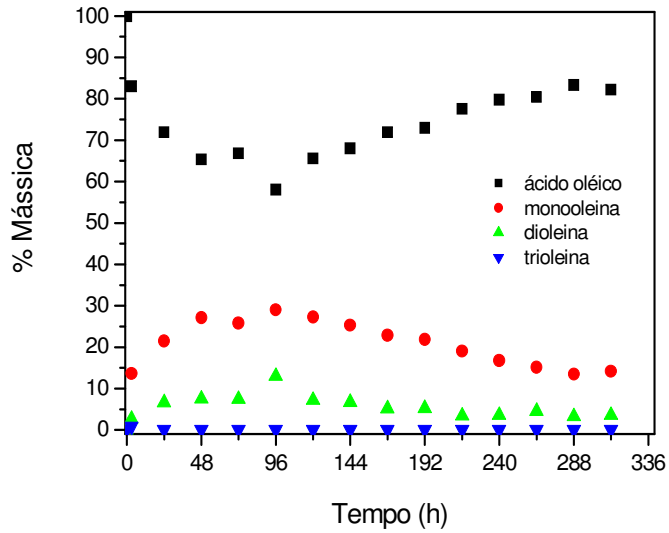


Figura 5.51. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando peneira molecular no interior do biorreator.

Observa-se que a formação de monooleina variou entre 21 a 27% nos seis primeiros dias de operação do sistema contínuo, correspondendo uma produtividade de 23,89 mg MAG/g meio reacional.h, sendo que o estado estacionário foi alcançado em 48 de reação (4 tempos de residência). A partir do sexto dia de operação em regime contínuo, observou-se um decréscimo na concentração de monooleina, ficando em média 18%, correspondendo uma produtividade de 18,40 mg MAG/g meio reacional.h. Uma redução de 30% na formação de monooleina ao final de 13 dias de operação foi contatada, em função da saturação da peneira molecular pela água.

Comparando esses resultados com os descritos no item 5.2.2.2, observa-se um aumento na concentração de monooleina, comprovando a eficiência da utilização da peneira molecular nesse sistema reacional. Monot et al. (1990), testaram diferentes estratégias para remover a água formada no meio reacional durante as sínteses de ésteres de polióis empregando lipase de *Mucor miehei* como biocatalisador. Uma delas foi o emprego de peneira molecular no interior de um reator de coluna (13X 255 mm) disposta em sete camadas alternadas com lipase e separada por camadas de algodão, no entanto observou-se uma diminuição na concentração dos triglicerídeos e uma elevação na formação dos diglicerídeos, esse comportamento foi justificado pela saturação da peneira molecular pela água.

Com base neste contexto, uma outra estratégia foi testada para evitar a saturação da peneira molecular e melhorar a produção de monooleina. Nessa segunda proposta, a reação de esterificação contínua foi efetuada em 3 colunas em série, intercalando as duas colunas

contendo lipase com uma coluna extratora de umidade (contendo peneira molecular), conforme demonstrado na Figura 5.52. Nesse esquema experimental é possível trocar, em tempos pré-determinados, a coluna contendo peneira molecular saturada por uma outra regenerada.

Este ensaio foi realizado empregando as seguintes condições experimentais: glicerol/ácido oléico (razão molar = 8:1), temperatura de 50°C, dois biorreatores de coluna (diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL), uma coluna (diâmetro interno= 20 mm, comprimento = 120 mm e volume = 37,7 mL) contendo peneira molecular, vazão de alimentação de 0,0182 mL/min e τ = 14,05h. Os dois biorreatores continham 6,70g (massa seca) de lipase G imobilizada em SiO_2-PVA em cada um deles e a coluna entre os biorreatores, continha 16,8g de peneira molecular, correspondendo a uma relação de 1:1,25 de massa do derivado imobilizado:massa de peneira molecular. A troca da coluna extratora de umidade foi realizada a cada 3 dias de operação do sistema contínuo. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 5.53.

Figura 5.52. Esquema da reação da esterificação do ácido oléico e glicerol em 3 colunas em série operando em regime contínuo, empregando coluna extratora de umidade.

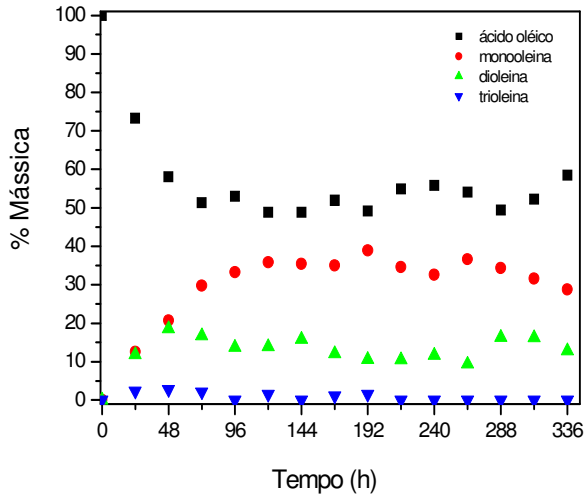


Figura 5.53. Perfil de formação de mono, di e trioleina e consumo do ácido oléico na esterificação contínua realizada em reator de leito fixo catalisada pela lipase G imobilizada em SiO_2-PVA, empregando peneira molecular em coluna extratora de umidade.

A Figura 5.54 mostra o perfil de formação da monooleina obtida nas 3 diferentes maneiras testadas: a) sistema contínuo isento de estratégias para remoção da água (controle), b) empregando peneira molecular no interior do biorreator e c) emprego da coluna extratora de umidade.

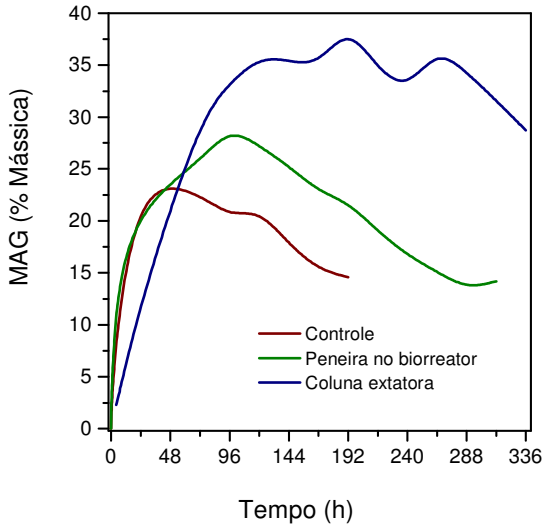


Figura 5.54. Perfil de formação da monooleina na esterificação contínua, empregando diferentes estratégias para remover a água do meio reacional formada durante a reação.

Analisando estes resultados observa-se a eficiência da utilização da coluna extratora de umidade neste sistema experimental, verificando-se uma crescente produção média de monoglicerídeo: 19, 20 e 31% na reação controle, empregando peneira molecular no interior do biorreator e coluna extratora, respectivamente.

Mukesh et al. (1997), reportaram a utilização de uma coluna extratora de umidade na esterificação do ácido oléico com diferentes álcoois, utilizando um reator tubular empacotado com recirculação. Esses resultados mostraram-se superiores aos encontrados em tanques agitados.

A Tabela 5.11 sumariza as propriedades da lipase G imobilizada em SiO_2-PVA obtidas nas 3 diferentes esterificações contínuas testadas.

Tabela 5.11 - Estabilidade operacional da lipase *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA nas esterificações contínuas realizadas em reator de leito fixo.

Condições experimentais	**Tempo de meia-vida (dias)**	**Constante de desativação (h^{-1})**
Controle	7,8	$3{,}71 \times 10^{-3}$
Recheio de peneira molecular	6,5	$4{,}44 \times 10^{-3}$
Coluna extratora de umidade	21,3	$9{,}78 \times 10^{-4}$

Com a utilização da coluna extratora de umidade, foram obtidos valores similares de monooleina aos encontrados em regime batelada (item 5.2.1.1), obtendo-se um tempo de meia-vida do biocatalisador de 21 dias, comprovando o bom desempenho deste derivado imobilizado. Além disso, o sistema contínuo é mais apropriado para aplicação industrial, devido a maior estabilidade do biocatalisador, elevada taxa de reação e maior produtividade do sistema.

Dentre os testes de esterificações contínuas realizadas em reator de leito fixo, as formações mais elevadas de monoglicerídeos foram obtidas empregando-se razão molar = 8:1 (glicerol/ácido oléico) e temperatura = 50ºC, atingindo em média 31% de monooleina, empregando uma coluna extratora de umidade entre dois biorreatores (esterificação contínua em série). Nessas condições, foi contatada uma elevada estabilidade operacional do biocatalisador ($t_{1/2}$ = 21 dias).

5.3. Comparação das estratégias testadas

Para o desenvolvimento deste trabalho foram estudadas duas rotas enzimáticas: glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com ácidos graxos, visando à produção de monoglicerídeos.

As reações de glicerólises foram realizadas utilizando a lipase de *Burkolderia cepacia* imobilizada em SiO_2-PVA empregando duas maneiras de operação: 1) glicerólise descontínua, avaliando alguns fatores que podem influenciar na produção de MAGs, tais como: razão molar entre os materiais de partida, emprego da atmosfera inerte, geometria do reator, utilização de agentes antioxidantes e emulsificantes e efeito da irradiação de micro-ondas; 2) glicerólise contínua realizada em reator de leito fixo, determinando a orientação do fluxo de alimentação, estabilidade operacional do biocatalisador e limite de operação do reator e 3) glicerólise contínua realizada em reator de leito fluidizado, estabelecendo as condições de operação do biorreator em meio reacional contendo solvente (*terc*-butanol).

Para as reações de esterificação, foi utilizada a lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA como biocatalisador e também testadas em dois modos de operação: 1) esterificação descontínua, estudando a influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo, a seletividade para a formação de MAG e efeito da irradiação de micro-ondas e 2) esterificação contínua em reator de leito fixo, testando diferentes estratégias para a remoção da água formada durante o progresso da reação.

As Tabelas 5.12 e 5.13 apresentam um resumo dos testes realizados ao longo do desenvolvimento do trabalho experimental para a síntese de monoglicerídeos (reações de glicerólise e esterificação), informando as condições operacionais estabelecidas bem como os resultados obtidos.

Verifica-se na Tabela 5.12 que as produções mais elevadas de monoglicerídeos via glicerólise descontínua foram obtidas em reatores cilíndricos mantendo o meio reacional sob atmosfera inerte (N_2), atingindo 53% de MAG o que corresponde a uma produtividade de 88 mg MAG/g meio reacional.h. Constatou-se ainda que o emprego dos campos eletromagnéticos como forma de aquecimento não apresentou efeito benéfico na síntese de monoglicerídeos, observando-se uma mudança na seletividade da lipase PS para a formação de diglicerídeos em detrimento da formação de monoglicerídeos.

Nas reações de glicerólise em regime contínuo (Tabela 5.13) em reator de leito fixo, também foi verificado que o emprego da atmosfera inerte (N_2) no meio de alimentação foi a estratégia que apresentou o melhor desempenho para a formação de MAGs, atingindo em

média 32% e produtividade de 52 mg MAG/g meio reacional.h, correspondendo a um aumento de 25% em relação ao sistema realizado em meio isento de N_2. O derivado imobilizado de lipase PS foi extremamente estável quanto suas propriedades catalíticas ($t_{1/2}$= 50 dias), o que permitiu operar o reator de leito fixo por 22 dias. O processo contínuo efetuado em reator de leito fluidizado também foi adequado para a síntese de monoglicerídeos, fornecendo cerca de 31% de MAG e produtividade de 54 mg MAG/g meio reacioanl.h. Entretanto, ressalta-se a necessidade do aprofundamento do estudo desta configuração de biorreator, visando otimizar as condições operacionais da produção de MAG pela via de glicerólise.

Na Tabela 5.12, verifica-se que as maiores produções de monoglicerídeos via esterificação descontínua foram obtidas empregando-se ácido láurico e glicerol, atingindo cerca de 60% de monolaurina, o que corresponde a uma produtividade de 99 mg MAG/g meio reacional. h. A obtenção de monolaurina sob irradiação de micro-ondas não foi uma técnica efetiva, em função da mudança da seletividade da lipase G sob irradiação de micro-ondas.

As reações de esterificação contínuas (Tabela 5.13) foram realizadas com ácido oléico e glicerol em reator de leito fixo. Entre as estratégias testadas para remoção da água formada no meio reacional, a utilização de uma coluna extratora de umidade contendo peneira molecular foi a metodologia mais efetiva. Nas condições estabelecidas, o reator foi operado de forma estável, fornecendo 31% de monoleina o que corresponde uma produtividade de 22,06 mg MAG/g meio reacional. h. Ressalta-se ainda que, o derivado imobilizado de lipase revelou uma elevada estabilidade operacional (tempo de meia-vida = 21 dias).

Tabela 5.12 - Resumo dos testes realizados para a síntese de monoglicerídeos produzidos por glicerólise e esterificação enzimática em regime descontínuo

Reação	Lipase	Substrato	Reator	Condições reacionais	Estratégia	Tempo de reação (h)	MAG (%)	Seletividade (%)	Produtividade (mg MAG/g.h)
Glicerólise	*Burkolderia cepacia*	Óleo de babaçu e glicerol	esférico	RM =15:1 (glicerol/óleo) T = 55ºC	-	6	28	28	46,67
			cilíndrico		Atmosfera inerte		53	53	88,33
			cilíndrico		Micro-ondas		46	46	76,67
Esterificação	*Penicillium camembertii*	Ácido láurico e glicerol	esférico	RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 50ºC	-	6	60	63	99,08
				RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 50ºC	Micro-ondas	6	35	82	58,33
		Ácido mirístico e glicerol		RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 55ºC		6	48	80	79,87
		Ácido palmítico e glicerol		RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 60ºC		6	46	84	76,43
		Ácido esteárico e glicerol		RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 65ºC		6	45	75	75,13
		Ácido oléico e glicerol		RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 45ºC		6	33	75	54,87

Tabela 5.13 - Resumo dos testes realizados para a síntese de monoglicerídeos produzidos por glicerólise e esterificação enzimática em regime contínuo

Reação	Lipase	Substrato	Reator	Condições reacionais	Estratégia	Tempo de residência (h)	MAG (%)	Seletividade (%)	Produtividade (mg MAG/g.h)
Glicerólise	*Burkolderia cepacia*	Óleo de babaçu e glicerol	Coluna (leito fixo)	RM =15:1 (glicerol/óleo) T = 50ºC	-	6,15	24	24	39,02
					Atmosfera inerte	6,15	32	32	52,03
						3,85	25	25	64,93
			Coluna (leito fluidizado)	RM =5:1 (glicerol/óleo) T = 50ºC	Atmosfera inerte *terc*-butanol (2:1)	6,30	34	34	53,97
Esterificação	*Penicillium camembertii*	Ácido oléico e glicerol	Coluna (leito fixo)	RM = 8:1 (glicerol/ácido) T = 50ºC	-	7,03	19	71,75	27,03
					Recheio de peneira molecular	9,78	20	79,12	20,44
					Coluna extratora de umidade	14,05	31	70,07	22,06

6. CONCLUSÕES

Os termos biocatálise ou biotransformação abrangem os processos em que um catalisador bioquímico é utilizado para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. Para estabelecer um processo de biotransformação eficaz, é necessária a análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e a otimização de um processo biotecnológico. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases.

O presente projeto teve como objetivo utilizar lipases como catalisadores na biotransformação de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de mono glicerídeos. As lipases microbianas de *Burkolderia cepacia* (lipase PS) e *Penicillium camembertii* (lipase G) foram imobilizadas em suporte híbrido SiO_2-PVA e usadas como catalisadores, respectivamente, para mediar as reações de glicerólise do óleo de babaçu e esterificação do glicerol com ácidos graxos de diferentes tamanho de cadeia carbônica e grau de insaturação (C_{12}-$C_{18:1}$).

A motivação desse estudo foi também baseada no recente interesse de se encontrar utilizações comerciais para o glicerol gerado como subproduto na produção de biodiesel. Estima-se que a produção de glicerol alcançará cerca de 1,2 milhões de toneladas por volta de 2012, devido ao crescente aumento da produção de biodiesel. Estes valores são muito superiores ao consumo e produção nacional atuais, estimados em cerca de 30 mil toneladas anuais. Este cenário indica que a viabilização comercial do biodiesel passa pelo consumo deste volume extra de glicerina, buscando aplicações de larga escala e agregando valor à cadeia produtiva.

Portanto, este trabalho se insere nas prioridades nacionais visando agregar valor a esse subproduto, produzindo mono glicerídeos (surfatantes não iônicos) a partir da glicerólise do óleo de babaçu e da esterificação do glicerol com ácidos graxos, empregando diferentes estratégias para o desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para sua produção.

Para esta finalidade, foi desenvolvido um extenso trabalho, o que permitiu obter um conhecimento bem detalhado do processo enzimático de produção mono glicerídeos, incluindo desde a imobilização da preparação de lipase previamente selecionada para cada rota enzimática, bem como o estabelecimento de condições operacionais para condução das

reações em diferentes configurações de reatores. Um aspecto importante que deve ser enfatizado foi a adequação das preparações de lipase selecionadas, bem como do método de imobilização adotado, revelando tempos de meia-vida da ordem de 50 e 21 dias, para a lipase PS e G, respectivamente, valores determinados na presença de substratos e produtos. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios, e com base nos dados relatados neste trabalho pôde-se concluir que:

Reações de glicerólise mediada pela lipase de *Burkolderia cepacia* imobilizada em SiO_2-PVA

Glicerólise descontínua:

- Os resultados apontaram que a máxima formação de monoglicerídeos foi obtida empregando-se razão molar entre os materiais de partida de 15:1 (glicerol/óleo de babaçu) e temperatura de 50 ºC, sendo que a utilização da atmosfera inerte (N_2) foi a estratégia que apresentou o melhor resultado para a síntese de monoglicerídeos, alcançando cerca de 60% de MAGs. Verificou-se também que a utilização da irradiação de micro-ondas não foi efetiva para a síntese de monoglicerídeos, reduzindo a concentração de MAG para 45%, em função da interferência dos campos eletromagnéticos na seletividade da lipase de *Burkolderia cepacia.*

Glicerólises contínuas em reator de leito fixo:

- As formações mais elevadas de monoglicerídeos foram obtidas empregando-se razão molar entre os materiais de partida de 15:1 (glicerol/óleo de babaçu) e temperatura de 50ºC, fluxo de alimentação descente. Nessas condiçoes, o funcionamento do reator de leito fixo foi comprovado quantitativamente para tempos de residências iguais ou superiores a 3,85h (vazão volumétrica = 0,028 mL/min). Produtividades entre 34-65 mg MAG/g meio reacional.h foram alcançadas com elevada conversão do triglicerídeo (> 98%). O derivado imobilizado de lipase PS foi extremamente estável quanto suas propriedades catalíticas ($t_{1/2}$= 50 dias). O processo necessita de um controle permanente da qualidade da matéria-prima por meio do emprego de técnicas que previnam a oxidação da matéria-prima lipídica, como inserção de uma linha de gás inerte.

Glicerólises contínuas em reator de leito fluidizado:

- Devido a elevada viscosidade do meio reacional (razão molar de 15:1 glicerol/óleo de babaçu) a operação do reator de leito fluidizado foi somente viabilizada para meios diluidos com *terc*-butanol na razão de 2:1 (volume de solvente: massa total do meio reacional). Nas condições estabelecidas foi possível operar o reator de leito fluidizado em regime contínuo de forma estável, sendo constatada uma formação média de 34% de monoglicerídeos, o que correspondeu a uma produtividade de 54 mg de MAG/g meio reacional.h. O sistema experimental atingiu o estado estacionário no primeiro tempo de residência (6,3 h), não sendo observado nenhum decaimento de desempenho do sistema até ao final de operação.

Reações de esterificação mediada pela lipase de *Penicillium camembertii* imobilizada em SiO_2-PVA:

Esterificações descontínuas:

- As formações mais elevadas de MAG foram obtidas empregando-se razão molar entre os materiais de partida de 8:1 (glicerol/ácido láurico) e temperatura de 50 ºC, atingindo cerca de 60% de monolaurina. A seletividade da reação de esterificação com relação ao tipo e grau de insaturação do ácido graxo foi estudada e verificou-se que a lipase G apresentou maior afinidade pelo ácido láurico, no entanto os ácidos mirístico e palmítico foram os doadores do grupo acila que forneceram os valores mais elevados de seletividade (80%). Foi ainda constatada que a irradiação de micro-ondas não foi efetiva para incrementar a produção de MAG, sendo verificada a redução da produção de monolaurina para níveis de 35%, bem como a mudança da seletividade da lipase de *Penicillium camembertii* para formação de dilaurina em detrimento da monolaurina.

Esterificações contínuas:

- A operação do reator de leito fixo na reação de esterificação foi viabilizada somente para o ácido oléico (líquido a temperatura ambiente). O processo foi também dependente da aplicação de estratégias para remover a água formada durante o progresso da reação. A formação mais elevada de monooleina foi obtida empregando-se razão molar = 8:1 (glicerol/ácido oléico) e temperatura = 50ºC, atingindo em média 31% de monooleina, empregando uma coluna extratora de umidade contendo peneira molecular entre dois biorreatores (esterificação contínua em série). Nessas condições, foi contatada uma elevada estabilidade operacional do biocatalisador ($t_{1/2}$ = 21 dias).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos nos levam a uma posição bem definida e de franco otimismo perante o prosseguimento das investigações tanto no que se refere a síntese de monoglicerídeos por esterificação enzimática como por glicerólise do óleo de babaçu. Para dar continuidade e complementar os estudos de obtenção de monoglicerídeos, recomendam-se as seguintes etapas:

1) Caracterizar a lipase de *Penicillium camembertii* (lipase G) imobilizada em SiO_2-PVA quanto as suas propriedades bioquímicas e cinéticas;

2) Testar outros agentes antioxidante e emulsificantes na síntese de MAGs pela via glicerólise.

3) Empregar a técnica da proteção das hidroxilas presentes na molécula do glicerol, favorecendo a formação exclusiva de MAGs, principalmente nas reações realizadas sob irradiação de micro-ondas;

4) Aprofundar estudos de produção de MAG via glicerólise contínua em reator de leito fluidizado, em função dos resultados promissores obtidos.

REFERÊNCIAS

ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.aboissa.com.br>. Acesso em: 12 setembro 2005.

AGUEDO, M.; GIET, J.; HANON, E.; LOGNAY, G.; WATHELET, B.; DESTAIN, J.; BRASSEUR, R.; VANDENBOL, M.; DANTHINE, S.; BLECKER, C.; WATHELET, J. Calorimetric study of milk fat/rapeseed oil blends and their interesterification products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, n.4, p.376-385, 2009.

AGUEDO, M.; HANON, E.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; LOGNAY, G.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J.; BLECKER, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.5, p.1757-1765, 2008.

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, n.72, p.2-13, 2002.

AKOH, C. C.; COOPER, C.; NWOSU, C. V. Lipase G catalyzed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.69, n.3, p.257-260, 1992.

ALBIERO, D.; MACIEL, A. J. S.; LOPES, A. C.; MELLO, C. A.; GAMERO, C. A. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata Mart.*) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, v.37, n. 3, p.337-346, 2007.

ALVAREZ, J. G.; CAZES, J. C. L. Isolation and purification of lipids by centrifugal partition chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, n.18, p.3603-3614, 1990.

AMANO ENZYME Inc. Disponível em: <http://www.amano-anzyme.co.jp>. Acesso em: 12 junho 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaign: AOCS Press, 2004.

ARCOS, J. A.; OTERO, C. Enzyme, medium and reaction engineering to design a low-cost selective production method for mono and dioleyglycerols, **Journal of the American Oil Chemists Society'**, v.73, n.6, p. 673-682, 1996.

BAILLARGEON, M. W.; SONNET, P. E. Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL y-553 lipase. **Biotechnology Letters**, v.13, n.12, p.871-874, 1991.

BALCÃO V. M.; MALCATA, F. X. Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, n.1-4, p.161- 169, 1997.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.6, p.392-416, 1996.

BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: WILLAERT, R. G.; BARON, G. V.; BACKER, L. **Immobilised living cell systems: Modelling and experimental methods**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1996, p. 67-95.

BARUQUE FILHO, E. A.; BARUQUE, M. G. A.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Ethanol from babassu coconut starch: Technical and economical aspects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, p. 877-886, 1998.

BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, A.; MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, n.4-5, p.362-369, 2001.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Enzymatic esterification of glycerol. 2. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac-monoacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.69, n.10, p.961-965, 1992.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Regioisomerically pure mono-and diacylglycerols as synthetic building blocks. **Fat Science Technology**, v.95, n.5, p.169-175, 1993.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis Fundamentals and Applications**. Weinheim: Wiley VCH Verlag Gmbh, 2004. Cap.1 e 2, p. 611.

BÖRJESSON, I. E.; HÄRRÖD, M. Synthesis of monoglycerides by glycerolysis of rapeseed oil using immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.6, p.701-707, 1999.

BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n.7, p.578-586, 1995.

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, n.7, p.697-702, 1994.

BORNSCHEUER, U. T.; YAMANE, T. Activity and stability of lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.10, p.864-869, 1994.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G. ; LAFUENTE-FERNANDEZ, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, n.1-4, p.171–176, 2009.

CADDICK, S. Microwave assisted organic reactions. **Tetrahedron**, v. 51, n.38, p. 10403-10432, 1995.

CARMINATTI, C. A. **Ensaios de hidrólise enzimática de lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kleuyveromyces lactis***. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARRILLO-MUNOZ, J. R.; BOUVET, D.; GUIBE-JAMPEL, E.; LOUPY, A.; PETIT, A. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. Resolution of (±)-1-phenylethanol. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, n.22, p.7746-7749, 1996.

CHAIBAKHSH, N.; RAHMAN, M. B. A.; ABD-AZIZ, S.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. Optimized lipase-catalyzed synthesis of adipate ester in a solvent-free system. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.36, n.9, p.1149-1155, 2009.

CHANG. P. S.; RHEE, J. S.; KIM, J. J. Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobaterium viscosum* lipase immobilized on liposome in reversed micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n.10, p.1159-1165, 1991.

CHEIRSILP, B.; JEAMJOUNKHAW, P.; H-KITTIKUN, A. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.59, n.1-3, p.206-211, 2009.

CHISTI, Y. Bioreactor design. In: RATLEDE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 3rd ed., New York: Cambridge University Press, 2006. Cap.7, p.181-200.

COCONUT OIL, medicine properties, alternative medicine in belize. Disponível em: <http://ambergriscaye.bz/pages/medicine6.html>. Acesso em: 06 setembro 2006.

COELHO, R. A. L.; YAMASAKI, H.; PEREZ, E.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. The use of polysiloxane/polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG Anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.391-393, 2003.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v.23, n. 4, p.531-537, 2000.

CVENGROS, J.; LUSITAN, J.; MICOV, M. Feed temperature influence on the efficiency of a molecular evaporator. **Chemical Engineering Journal**, v.78, n.1, p.61-67, 2000.

DA RÓS, P. C. M. **Etanólise de oleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, p.30–39, 2009.

DA SILVA, M. A. M.; MEDEIROS, V. C.; FREIRE, D. M. G.; LANGONE, M. A. P. Síntese de monocaprina catalisada por lipase em meio sem solvente. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 14, 2002, Natal. CD ROM, p.6.

DAMSTRUP, M. L.; ABILDSKOV, J.; KIIL, K.; JENSEN, A. D.; SPARSO, F. V.; XU, X. Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.19, p.7113-7119, 2006.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO F. V.; KIIL, S.Z, JENSEN, A.D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, n.8, p.559-564, 2005.

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

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de Enzimas e sua Estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p.123-147.

DOMINGOS, A. K., SAAD, E. B.,VECHIATTO, W. W. D., WILHELMC, H.M., RAMOS, L.P. The Influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, n.2, p.416-423, 2007.

ESTEBAN, L.; MUNÍO, M. D.; ROBLES, A.; HITA, E.; JIMÉNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, P. A.; CAMACHO, B.; MOLINA, E. Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.2-3, p.271–279, 2009.

FANG, Y.; HUANG, W.; XIA, Y. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification. **Process Biochemistry**, v.43, n.3, p. 306–310, 2008.

FANG, Y.; SUN, S.; XIA, Y. The weakened 1,3-specificity in the consecutive microwave assisted enzymatic synthesis of glycerides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.55, n.1-2, p.6–11, 2008.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Biotransformations. In: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 3rd ed., New York: Cambridge University Press, 2006. Cap. 24, p.579-626.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, n.2, p.242-250, 2007.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; DA FONSECA, M. M. R. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.699–711, 2001.

FERREIRA-DIAS, S.; FONSECA, M. M. R. Enzymatic glycerolysis of olive oil: A reactional system with major analytic problems. **Biotechnology Techniques**, v.7, n.7, p.447-452, 1993.

FLETCHER, P. D. I.; FREEDMAN, R. B.; ROBINSON, B. H.; REES, G. D.; SHOMACKER, R. Lipase-catalysed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.912, n.2, p.278-282, 1987.

FONSECA, M. G.; AIROLDI, C. Inorganic-organic hybrids derived from the reaction of phyllosilicates with organosilanes. **Química Nova**, v.26, n.5, p.699-707, 2003.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, n.7, p.1408-1425, 2005.

FREGOLENTE, L. V.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL, R.; MACIEL, M. R. W. Response surface methodology applied to optimization of distilled monoglycerides production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, n.9, p.673-678, 2005.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; PINTO, G. M. F.; BATISTELLA, B. C.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis, **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v.146, n.1-3, p.165–172, 2008.

FREITAS, L. **Seleção de rota enzimática para a produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz híbrida obtida pela técnica sol-gel**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; De CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: Influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, n.7, p.1360-1366, 2007.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; De CASTRO, H. F. Monoglicerídeos: Produção por via enzimática e algumas aplicações**. Quimica Nova**, v.31, n.6, p.1514-1521, 2008.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V.; De CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação, **Química Nova**, (2009a) *in press.*

FREITAS, L.; DA RÓS, P. M.; SANTOS, J. C.; De CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp*), **Process Biochemistry,** v.44, n.10, p.1068-1074, 2009b.

GANCET, C. Catalysis by *Rhizopus arrhizus* mycelial lipase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.613, p.600-604, 1990.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists´ Society**, v.74, n.6, p.621-634, 1997.

GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monoolein: A review of the pharmaceutical applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.8, p.809-820, 2000.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; REBAI, A.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.4, p.717-723, 2006.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. **Journal of the American Chemical Society**, v.120, n.34, p.8587-8598, 1998.

GUBICZA, L.; KABIRI-BADR, A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO, K. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.2, p.193-196, 2000.

GUPTA, M.N.; ROY, I. Enzymes in organic media-forms, functions and applications. **European Journal of Biochemistry**, v.271, n.13, p.2575-2583, 2004.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, n.3, p.188–194, 2009.

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

HAYES, D. G.; GULARI, E. 1-Monoglyceride production from lipase-catalysed esterification of glycerol and fatty-acid in reverse micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n.5, p.507-517, 1991.

HAYES, D. G.; GULARI, E. Improvement of enzyme activity and stability for reverse micellar encapsulated lipases in the presence of short chain and polar alcohols. **Biocatalysis**, v.11, n.3, p.223-231, 1994.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v.90, n.1, p.33-72, 1990.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Sol-gel process – physicochemical aspects. **Química Nova***,* v.18, n.2, p.171-180, 1995.

HOLMBERG, K.; LASSEN, B.; STARK, M. B. Enzymatic glycerolysis of a triglyceride in aqueous and nonaqueous microemulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, n.12, p.1796-1800, 1989.

HOLMBERG, K.; ÖSTERBERG, E. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, n.9, p.1544-1548, 1988.

HOQ, M. M.; TAGAMI, H.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.11, p.335-342, 1985.

IBRAHIM, A. N.; NIELSEN, S. T.; WIGNESWARAN, V.; ZHANG, H.; XU, X. Online pre-purification for the continuous enzymatic interesterification of bulk fats containing omega-3 oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.85-95, 2008.

JANSSEN, A. E. M.; VANDER PADT, A.; VANTRIET, K. Solvent effects on lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty-acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, n.8, p.953-962, 1993.

JOSÉ, M. N.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v.28, n.2, p.281-288, 2005.

JU, H.; YANG, C.; YENA, Y.; SHIEHA, C. Continuous lipase-catalyzed synthesis of hexyl laurate in a packed-bed reactor: Optimization of the reaction conditions in a solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v.84, n.1, p.29-33, 2009.

KABZA, K.G.; GESTWICKI, J. E.; MCGRATH, J. L.; PETRASSI, H. M. Effect of microwave radiation on copper(ii) 2,2'-bipyridy-mediated hydrolysis of bis (*p*-nitrophenyl) phosphodiester and enzymatic hydrolysis of carbohydrates. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, n.26, p.9599-9602, 1996.

KAEWTHONG, W.; KITTIKUN, H. A. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.2-3, p.218-222, 2004.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1525-1530, 2005.

KAPLON, J.; MINKOWSKI, K.; KAPLON, E. Concentration of monoglycerides by molecular distillation. **Inzynieria Chemiczna I Procesowa**, v.22, n.3C, p.627-632, 2001.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases. In: REHM, H. J.; PIHLER, G.; STADLER, A.; KELLY, P. J. W. **A Multi-Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology**. New York: Wiley VCH Verlag, 1998. v.8, p. 37-192.

KLOOSTERMAN, J.; VANWASSENAAR, P. D., BEL, W. J. Membrane Bioreactors. **Fett Wissenschaft Technologie-Fat Scince Technology**, v.89, n.14, p.592-597, 1987.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel.** 1st ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006, p.352.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X. B.; MU, H. L. 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, n.18, p.7059-7066, 2005.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, n.1, p.1-7, 2009.

KURASHIGE, J.; MATSUZAKI, N.; TAKAHASHI, H. Enzymatic modification of canola/palm oil mixtures: Effects on the fluidity of the mixture. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.9, p.849-852, 1993.

KWON, S. J.; HAN, J. J.; RHEE, J. S. Production and separation of mono or diacylglycerol catalyzed by lipases in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n.8, p.700-704, 1995.

LANGONE, M. A. P.; ABREU, M. E. DE.; REZENDE, M. J. C.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.98, p.987-996, 2002.

LANGRAND, G.; RONDOT, TRIANTAPHYLIDES, N.; C. BARATTI, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters**, v.12, n.8, p.581-586, 1990.

LEADBEATER, N. E.; STENCEL, L. M.; WOOD, E. C. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.5, n.7, p.1052–1055, 2007.

LEE, G. C.; WANG, D. L.; HO Y. F.; SHAW, J. F. Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for short-chain monoglyceride production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n.6, p.533-536, 2004.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000. Cap. 5, p. 74-98.

LI, Z. Y.; WARD, O. P. Lipase-catalysed esterification of glycerol and *n*-3 polyunsaturated fatty-acid concentrate in organic-solvent. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.8, p.745-748, 1993.

LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v.22, n.2, p.229-245, 1999.

LIMA-BARROS, A.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO JÚNIOR.; L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaradehyde hybrid composite as solide phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.4, p.459-463, 2002.

LIN, G.; LIN, W.Y. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron Letters**, v.39, n.24, p.4333-4336, 1998.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Direct determination by high-performance liquid chromatography of sn-2 monopalmitin after enzymatic lipase hydrolysis. **Journal of Chromatography B**, v.760, n.1, p.97-105, 2001.

LUSITAN, J.; CEVENGROS, J.; MICOV, M. Heat and mass transfer in the evaporating film of a molecular evaporator. **Chemical Engineering Journal**, v.85, n.2-3, p.225-234, 2002.

MACHADO, M. D; PEREZ-PARIENTE, J; SASTRE E, CARDOSO D, de GUERENE, A. M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. **Applied Catalysis A-General**, v.203, n.2, p.321-328, 2000.

MALCATA, X. F.; REYES, R. H.; GARCIA, S. H.; HILL, JÚNIOR, G. C.; AMUNDSON, H. C. Immobilized lipases reactors for modifications of fats and oils – A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.12, p.890-910, 1990.

MARTINELLE M, HOLMQUIST M, HULT K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase, **Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism**, v.1258, n.3, p.272-276, 1995.

MARTINELLO, M. A.; MOLINA, F.; PRAMPARO, M. Purification of crude monoglycerides by two stages molecular distillation. In: 2nd MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING, 2., MERCOSUR CONGRESS ON PROCESS SYSTEMS ENGINEERING, 4., (ENPROMER), 2005, Rio de Janeiro. **Anais** p.10.

MARTINS, P. F.; ITO, V. M.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL, M. R. W. Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using molecular distillation process. **Separation and Purification Technology**, v.48, n.1, p.78-84, 2006.

MATSON, C. J.; CHEN, YEN-LANE.; RUTH, D. T.; BENES, L. R. M.; BURGAUD, S. G.; HORRIERE, F. L. R.; SEYLER, I. M. L. **Mucosal originated drug delivery systems and animal applications**, US Pat**.** 7,001,609, 21 feb. 2006.

MAUGARD, T.; GAUNT, D.; LEGOY, M.D.; BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lacti.* **Biotechnology Letters**, v.25, n.8, p.623-629, 2003.

MAZUR, A. W.; HILER, G. D. I.; EL-NOKALY, M. A. Preparation of 2-monoglycerides. In: EL-NOKALY, M. A.; CORNELL, D. **Microemulsions and Emulsions in Foods**. American Chemical Society, 1991. v.448. Cap.5, 268p.

MCNEILL, G. P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. Solid–phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n.11, p.779-783, 1990.

MCNEILL, G. P.; YAMANE, T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.1, p.6-10, 1991.

MECHOULAM, R.; BENSHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. R.; COMPTON, D. R.; PERTWEE, R. G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J.; VOGEL, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v.50, n.1, p.83-90, 1995.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZLEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, n.6, p.927-931, 1988.

MILLQVIST-FUREBY, A.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Glyceride synthesis in a solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, n.11, p.1489-1495, 1996.

MILLQVIST-FUREBY, A.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Lipase catalysed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.12, p.1042-1047, 1994.

MILLQVIST-FUREBY, A.; TIAN, P.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Preparation of diglycerides by lipase catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.198-206, 1997.

MONOACYLGLYCEROLS. Disponível em: <http://www.cyberlipid.org>. Acesso em: 22 outubro de 2006.

MONOLAURIN. Disponível em: <http://www.heranswer.com/monolaurin.asp>. Acesso em: 27 abril 2007.

MONOT, F.; BENOIT, Y.; BALLERINI, D.; VANDECASTEELE, J. P. Enzymatic synthesis of neopentylpolyol esters in organic media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24-25, p. 375-386, 1990.

MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. Lipase-catalysed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. **Biotechnology Letters**, v.25, n.8, p.641-644, 2003.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on Silica–PVA composite. **Energy & Fuels**, v.21, n.6, p.3689–3694, 2007.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 5 ed. México: Pearson Educación, 1990. 1479p.

MOTA, C. J. A.; DA *S*ILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Quimica Nova**, v.32, n.3, p.639-648, 2009.

MUKESH, D.; JADHAV, S.; BANERJI, A. A.; THAKKAR, K.; BEVINAKATTI, H. S. Lipase-catalysed esterification reactions: Experimental and modelling studies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, n.2, p.179-186, 1997.

MYRNES, B.; BATSTAD, H.; OLSEN, R. L.; ELVEOLL, E. O. Solvent-free enzymic glycerolysis of marine oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.72, n.11, p.1339-1344, 1995.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; SANOS, J. C. Desempenho da lipase de *Aspergillus niger* na interesterificação da gordura de leite com óleo de soja. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17, 2009, Natal.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v.100, n. 21, p.5146-5154, 2009.

OHTA, Y.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.7, p.1885-1890, 1989.

OSÓRIO, N. M.; DUBREUCQ, E.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Operational stability of immobilised lipase/acyltransferase during interesterification of fat blends. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, n.4, p.358-367, 2009.

OSÓRIO, N. M.; GUSMÃO, J. H.; FONSECA, M. M.; FERREIRA-DIAS, S. Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.107, n.7-8, p.455–463, 2005.

PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, K.; ROSSI, M.; DELLA PINA, P. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie International Edition**, v.46, n.24, p.4434-4440, 2007.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C, R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v.65, n.2, p.252-254, 1999.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. Disponível em: < http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel>. Acesso em: 12 maio 2008.

PARKER, M-C.; BESSON, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M-D. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. **Tetrahedron**, v.37, n.46, p.8383-8386, 1996.

PASTOR, E.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Synthesis of mono and dioleyglycerols using an immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, n.3, p.251-263, 1995.

PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Produção de monoleina por lipase microbiana. **Ciência e Tecnologia em Alimentos,** v.13, n.1, p.13-21, 1993.

PAULA, A. V.; BARBOSA, J. C. S.; De CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcar. **Química Nova**, v.28, n.5, p.792-796, 2005.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; De CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de C*andida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v.31, n.1, p.35-40, 2008.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; De CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, n.3, p.281-288, 2007.

PAWONGRAT, R.; XU, X.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. **Food Chemistry,** v.104, n.1, p. 251–258, 2007.

PECORARO, E.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JR, M.; Adaptações em forno de micro-ondas doméstico para utilização em laboratório. **Química Nova**, v.20, n.1, p.89-92, 1997.

PLOU, F. J.; BARANDIARAN, M.; CALVO, M. V.; BALLESTEROS, A.; PASTOR, E. High yield production of mono and di-oleylglycerol by lipase catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.1, p.66-71, 1996.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quimica Nova***,* v.29, n.4, p.755-760, 2006.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147–148, p.237-250, 2009.

ROSINI, F.; Nascentes, C.C.; NOBREGA, J. A. Experimentos didáticos envolvendo radiação micro-ondas. **Química Nova**, v.27, n.6, p.1012-1015, 2004.

ROY, I.; GUPTA, M.N. Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. **Tetrahedron***,* v.59, n.29, p.5431-5436, 2003.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Chemoenzymatic synthesis: A strategy to obtain xylitol monoesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.84, n.7, p.957-960, 2009.

SADICOFF, B. L.; AMORIM, M. C. V.; MATTOS, M. C. S. Uma demonstração simples e visual do efeito do aquecimento com micro-ondas em reações de poliadição. **Química Nova**, v.23, n.4, p.557-559, 2000.

SANCHEZ, C.; LIVAGE, L.; HENRY, M., BABONNEAU, F. Chemical modification of alkoxide precursors. **Journal of non-crystalline solids**, v.100, n.1-3, p.65-76, 1988.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. Química Nova, v.25, n.4, p.660-667, 2002.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52-53, p.49-57, 2008a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. J. F.; NUNES, J. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane–polyvinyl alcohol prepared by sol–gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.354, n.42-44, p.4823-4826, 2008b.

SAXENA, R. K.; ISAR, J.; SARAN, S.; KAUSHIK , R.; DAVIDSON, W.S. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. **Current Science**, v.89, n.6, p.1000-1003, 2005.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biotecnologia Industrial, In: SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Processos Fermentativos**. Vol.2. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 1998. Cap. 8. p.179-204.

SELMI, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology,** v.23, n.3-4, p.182-186, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, V. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SHIN, J.; AKOH, C. C.; LEE, K. Production and Physicochemical Properties of Functional-Butterfat through Enzymatic Interesterification in a Continuous Reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.57, p.888-900, 2009.

SIGMA. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/ Sigma/Product_Information_ Sheet/ 1/t8532pis.Par.0001.File.tmp/t8532pis.pdf. Acesso em : 17 setembro 2009.

SINGH, C. P.; SHAD, D. O.; HOLBERG, K. Synthesis of monoglycerides and diglycerides in water-in-oil microemulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.6, p.583-587, 1994.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-9, p.745-757, 1999.

SOARES, C. M. F; SANTANA, M. H. A; ZANIN, G. M; DE CASTRO, H. F. Covalent coupling method for lipase immobilization on controlled pore silica in the presence of nonenzymatic proteins. **Biotechnology Progress**, v.19, n.3, p.803-807, 2003.

SONNTAG, N. O. V. Glycerolysis of fats and esters-status, review and critique. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.59, n.10, p.795-802, 1982.

STEFFEN, B.; ZIEMANN, A.; LANG, S.; WAGNER, F. Enzymatic monoacylation of trihydroxy compounds. **Biotechnology Letters**, v.14, n.9, p.773-778, 1992.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R. A.; FURNEAUX, R. H. Glycerolysis of tallow with immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v.15, n.10, p.1043-1048, 1993.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylgylcerol - A Possible endogenous cannabinoid receptor-ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.215, n.1, p.89-97, 1995.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.18, n.4-6, p. 325–331, 2002.

TEIXEIRA, M. A. Babassu - A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, v.32, n.9, p.857-864, 2008.

THE UNIQUE principle behind a unique process, Disponível em: <http://www.myers-vacuum.com/mv1.shtml>. Acesso em: 23 novembro 2006.

THORGEIRSDOTTIR, T. O.; KRISTMUNDSDOTTIR, T.; THORMAR, H.; AXELSDOTTIR, I.; HOLBROOK, W. P. Antimicrobial activity of monocaprin: a monoglyceride with potential use as a denture disinfectant. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.64, n.1, p.21-26, 2006.

TORRES, C. F.; NETTEKOVEN, T. J.; HILL, JÚNIOR, C. Preparation of purified acylglycerols of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their re-esterification with conjugated linoleic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n.1, p.49-58, 2003.

TORRES, C.; OTERO, C. Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols. **Enzyme Microbial Technology**, v.25, n.8-9, p.745-752, 1999.

TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Glyceride synthesis by 4 kinds microbial lipase. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.489, n.3, p.415-422, 1977.

TUTER, M.; BABALI, B.; KOSE, O.; DURAL, S.; AKSOY, H, A. Solvent-free glycerolysis of palm and kernel oils catalyzed by a 1,3-specific lipase and fatty acid composition of glycerolysis products. **Biotechnology Letters**, v.21, n.3, p.245-248, 1999.

VALÉRIO, A.; FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic production of mono- and diglycerides in compressed *n*-butane and AOT surfactant. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.49, n.2, p.216-220, 2009a.

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic Glycerolysis of Olive Oil in Solvent-Free Systems using Food Grade Surfactants. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17, 2009b, Natal.

VAN DER PADT, A.; KEURENTJES, J. T. F.; SEWALT, J.J.W.; VAN DAM, E.M.; VAN DORP, L.J.; VANT RIET, K. Enzymatic synthesis of monoglycerides in a membrane bioreactor with an in-line adsorption column. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.69, n.8, p.748-754, 1992.

VEDANA, M. A. Cinética: B5 em 2010. **Biodieselbr**, v.3, n. 13, p.18, 2009.

VIRTO, M. D.; LASCARAY, J. M.; SOLOZABAL, R. Enzymatic-hydrolysis of animal fats in organic-solvents at temperatures below their melting-points. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.5, p.324-327, 1991.

WANG, Y. F.; WONG, C. H. Lipase-catalyzed irreversible transesterification for preparative synthesis of chiral glycerol derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, v.53, n.13, p.3127-3129, 1988.

WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with gamma-tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.623-627, 2003.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; KANATANI, S.; KOBAYASHI, T.; TERAI, T.; SHIMADA, Y. Purification of monoacylglycerol with conjugated linoleic acid synthesized through a lipase-catalyzed reaction by solvent winteriz. **Journal of Oleo Science**, v.55, n.10, p.537-543, 2006.

WATANABE, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SHIMADA, Y. Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.27, n.4-6, p.249-254, 2004.

WEISS, A. Enzymic preparation of solid fatty acid monoglycerides. **Fat Science Technology**, v.92, n.10, p.392-396, 1990.

WONGSAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; BORNSCHEUER, U. T.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.2, p.68-73, 2003.

XU, X. B.; SKANDS, A.; ADLER-NISSEN, J. Purification of specific structured lipids by distillation: Effects on acyl migration. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.78, n.7, p.715-718, 2001.

XU, J. H. ; KATO, Y. ; ASANO, Y. Efficient preparation of (R)-alpha-monobenzoyl glycerol by lipase catalyzed asymmetric esterification: Optimization and operation in packed bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.73, n.6, p.493-499, 2001.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.6, p. 289-304, 2003.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. **Enzyme and Microbial Technology,** v.38, n.6, p. 814-820, 2006.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T. High yield synthesis of monoglyceride by mono and diacylglycerol lipase from *Penicillium camemberti* U-150. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.72, n.3, p.162-167, 1991.

YAMANE, T.; HOQ, M. M.; ITOH, S.; SHIMIZU, S. Glycerolysis of fat by lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v.35, p.625-631, 1986.

YAMANE, T.; HOQ, M. M.; SHIMIZU, S.; ISHIDA, S.; FUNADA, T. Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane bioreactor. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.434, n.DEC, p.558-568, 1984.

YANG, T. K.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.5, p.1475-1481, 2005**a**.

YANG, T. K.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. **Journal of Food Lipids**, v.12, n.4, p. 299-312, 2005**b**.

ZAKS, A.; GROSS, A. T. **Production of monoglycerides by enzymatic transesterification**. World Patent WO 90/040333. Enzytech Inc. *Chemistry Abstr.* 113:76643, 1990.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 454 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap.4. p.35-85.

ZHONG, N.; LIN, L.; XU, X.; CHEONG, L.; LI, B.; HU, S.; ZHAO, X. An efficient binary solvent mixture for monoacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86, n.8, p.783–789, 2009.

APÊNDICE A

No desenvolvimento da parte experimental referente as reações de glicerólise (descontínuas e contínuas em reator de leito fixo), não houve a necessidade utilizar solventes no meio reacional, pois estes sistemas operaram perfeitamente em meio isento de solvente. No entanto, na tentativa de operar o sistema contínuo em reator de leito fluidizado, muitos problemas foram encontrados, tais como: fluidização insuficiente, deslocamentos do leito, perdas do biocatalisador, devido a elevada viscosidade do meio reacional e a presença de um sistema bifásico. Visando minimizar essas limitações *terc*-butanol foi testado com sucesso como solvente no meio reacional para condução das reações de glicerólise do óleo de babaçu, em reator de leito fuidizado.

Para efeito de comparação dos resultados obtidos no reator de leito fluidizado com o desempenho das outras configurações de reatores operando com meios reacionais diluídos com solventes, foram realizados testes adicionais. Esses ensaios foram realizados adotando as seguintes condições experimentais: RM=15, T=50ºC, mantendo-se o meio reacional sob atmosfera inerte (N_2) e adicionando-se *terc*-butanol no meio reacional como solvente numa proporção de 2:1 (volume de terc-butanol/massa de óleo de babaçu). Os resultados obtidos foram comparados com a reação controle (meio isento de solvente), mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, para o sistema descontinuo e contínuo em reator de leito fixo.

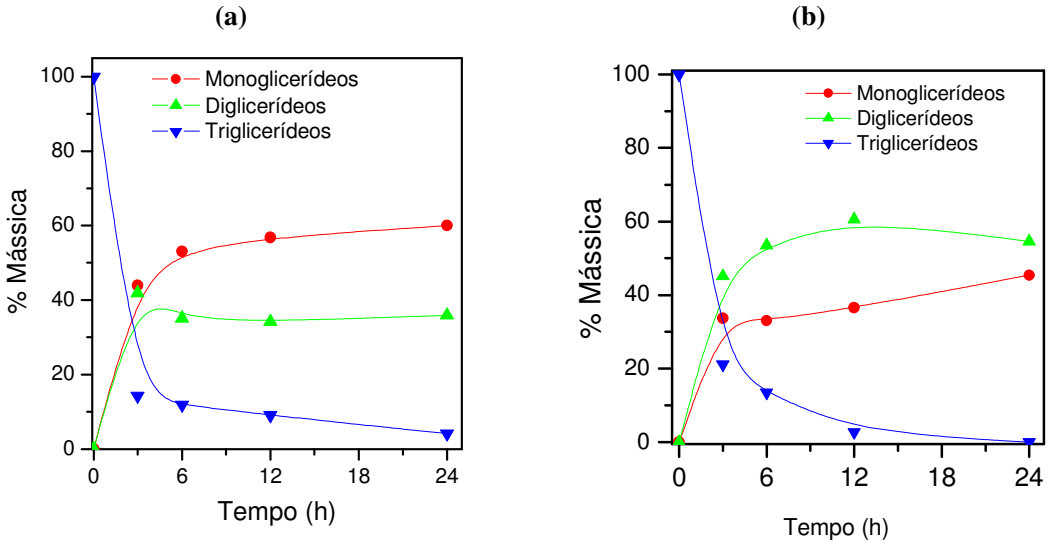


Figura 1. Perfil de formação dos produtos na glicerólise descontinua do óleo de babaçu utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, empregando diferentes condições reacionais: a) controle e b) empregando terc-butanol (2:1 v/m).

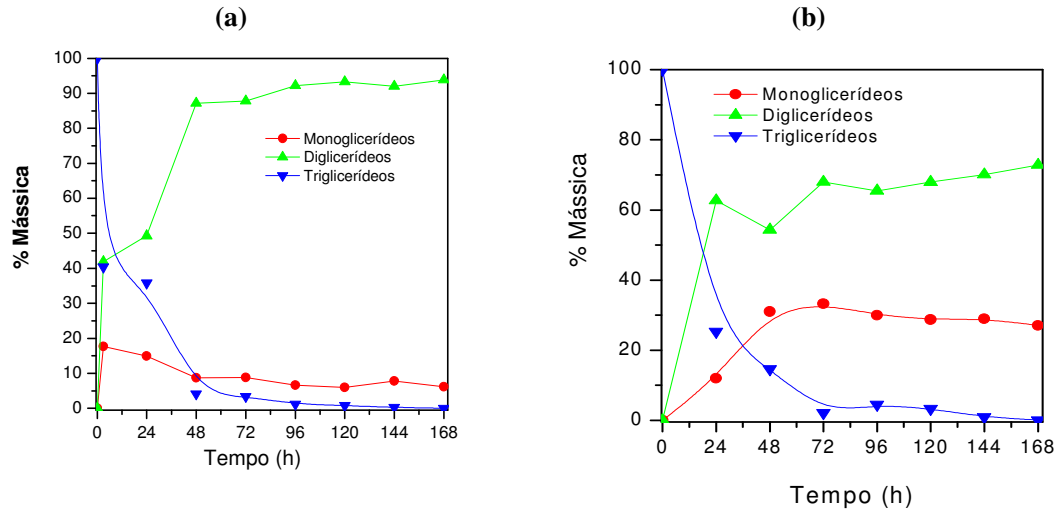


Figura 2. Perfil de formação dos produtos na glicerólise contínua do óleo de babaçu realizada em reator de leito fixo utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2-PVA, empregando diferentes condições reacionais: a) controle e b) empregando terc-butanol (2:1 v/m).

Analisando-se esses resultados verifica-se que a adição de solvente, reduziu a concentração de MAG no meio reacional em relação a reação controle. A Tabela 1 mostra a comparação desses resultados obtidos em termos de concentração de monoglicerídeos (produto alvo).

Tabela 1. Comparação da formação de monoglicerídeos nas glicerólises realizadas em meio isento de solvente e empregando *terc*-butanol no meio reacional

Modo de operação	**MAG (%)***	
	Isento de solvente	**Com solvente**
Batelada	60	45
Contínuo (leito fixo)	28	7

*Dados obtidos ao final de 24h da reação

Comparando-se os dados da Tabela 1 com os resultados obtidos no sistema contínuo realizado em reator de leito fluidizado (item 5.1.2.1), as maiores formações de monoglicerídeos foram obtidas no leito fluidizado, atingindo cerca de 34% de MAG. Esses dados evidenciam que essa configuração de reator foi adequada para a síntese do produto alvo, sendo ainda necessária a otimização das condições experimentais desse sistema.