

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DANIEL FALLEIROS BARBOSA LIMA

**EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SISTEMAS CONTENDO ÓLEO DE
OLIVA, ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ETANOL E ÁGUA**

CURITIBA
2014

DANIEL FALLEIROS BARBOSA LIMA

**EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SISTEMAS CONTENDO ÓLEO DE
OLIVA, ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ETANOL E ÁGUA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no curso do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profº. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll

Co-orientador: Profº. Dr. Marcelo Kaminski Lenzi

CURITIBA

2014

Lima, Daniel Falleiros Barbosa

Equilíbrio líquido-líquido em sistemas contendo óleo de oliva, ácidos graxos livres, etanol e água / Daniel Falleiros Barbosa Lima. – Curitiba, 2014.

55 f. : il.; tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Orientador: Fernando Augusto Pedersen Voll
Coorientador: Marcelo Kaminski Lenzi
Bibliografia: p. 50-55

1. Equilíbrio líquido-líquido. 2. Hidrólise. 3. Modelagem. I. Voll, Fernando Augusto Pedersen. II. Lenzi, Marcelo Kaminski. III. Título.

CDD 660.2969



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e nove dias do mês de maio de 2014, no Auditório Superior do Prédio de Engenharia Química no Centro Politécnico – UFPR foi instalada, pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll, professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a sexagésima quinta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída pelos doutores: Fernando Augusto Pedersen Voll (PPGEQ/UFPR), Marcelo Kaminski Lenzi (PPGEQ/UFPR), Everton Fernando Zanoelo (PPGEQ/UFPR) e Emerson Martim (DEQ/PUCPR). Às 13h30min, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Daniel Falleiros Barbosa Lima** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada *“Equilíbrio líquido-líquido em sistemas contendo óleo de oliva, ácidos graxos livres, etanol e água”*. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68º e 69º da Resolução 65/09 – CEPE/UFPR de 30.10.2009).

Curitiba, 29 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll
(PPGEQ/UFPR) – Orientador

Prof. Dr. Marcelo Kaminski Lenzi
(PPGEQ/UFPR) – Membro Titular Interno

Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo
(PPGEQ/UFPR) – Membro Titular Interno

Prof. Dr. Emerson Martim
(DEQ/PUCPR) – Membro Titular Externo

Dedico este trabalho aos meus filhos Daniel, Lucas e Pedro.

A minha esposa Cristina.

E aos meus pais Décio e Itelvina.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me guiar e me orientar em todos os momentos.

A minha família em especial, a minha esposa Cristina, pela paciência, e aos meus filhos Daniel, Lucas e Pedro, pela inspiração, pela força e pelas pessoas que eles se tornaram.

Aos meus pais, Décio e Itelvina, pela educação e os ensinamentos da vida.

Aos meus irmãos Décio, Douglas e Danilo, pelo companheirismo e amizade da vida toda.

Ao meu orientador Fernando Augusto Pedersen Voll, pela paciência, motivação e por ser o principal responsável pela conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador Marcelo Kaminski Lenzi, pelo apoio, confiança e pelo conhecimento passado em todas suas aulas que presenciei.

Ao Professor Carlos Itsuo Yamamoto, pelas conversas, pelas dicas e pela força nos momentos difíceis que enfrentei.

Ao Programa de Pós-graduação de Engenharia Química da UFPR, pela oportunidade e pelo precioso conhecimento repassado. À secretária do PPGEQ, Cintya Kuznharski pelo suporte durante o curso.

Ao aluno de iniciação científica Luís Fernando, pela assistência prestada durante a realização dos experimentos.

A empresa Araucária Nitrogenados S.A, pela confiança depositada e pela oportunidade cedida em realizar o Programa de Pós-graduação de Engenharia Química da UFPR.

Ao Engenheiro André Luís D. Bach pela ajuda incondicional oferecida durante a realização dos trabalhos e nos estudos das disciplinas que cursamos juntos no PPGEQ e pela amizade.

Aos Engenheiros e amigos de trabalho André, Leandro, Gabriel, Manduca e Thais que acreditaram e me ajudaram nos momentos que precisei.

As amigas que fiz durante todo este tempo de curso do PPGEQ, em especial ao Luís R. S. Kanda pela ajuda e conhecimento.

A todos aqueles que fizeram parte direta ou indiretamente de mais uma etapa em minha vida.

"Tenha em mente que tudo o que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e um dia deposite-a nas mãos de seus filhos".

Albert Einstein

RESUMO

Recentemente tem crescido o interesse na produção de gorduras e óleos com alto valor agregado pela indústria química e biotecnológica, por se tratarem de derivados de fontes renováveis e de tecnologias mais “limpas”. Com isto, a importância na produção de óleos enriquecidos com diacilgliceróis, os quais apresentam características organolépticas similares aos óleos vegetais comestíveis convencionais, também vem aumentando. Estes óleos surgem com uma conotação de mais saudáveis, pois não se acumulam no organismo da mesma forma que os óleos convencionais, e quando consumidos corretamente podem evitar a obesidade e o surgimento de doenças arterioscleróticas. Neste contexto, produtos com maior concentração de DAG têm se tornado o interesse das indústrias. A rota enzimática na produção de DAG a partir de um óleo vegetal (TAG) tem se destacado por apresentar produtos livres de reações indesejadas. Os acilgliceróis (TAG, DAG, MAG, AGL e glicerol) formados na reação enzimática seguem para uma etapa de purificação e separação. Este trabalho tem como objetivo avaliar a termodinâmica de equilíbrio de fases entre alguns produtos da hidrólise do óleo de oliva (triacilgliceróis + ácidos graxos livres) em um meio com água e etanol, a fim de fornecer informações complementares a um sistema oleoso mais complexo (triacilgliceróis + diacilgliceróis + monoacilgliceróis + ácidos graxos livres). Ácidos graxos livres foram produzidos via hidrólise completa do óleo de oliva em meio livre de solvente, a 50°C, 300 rpm, com a enzima imobilizada Lipozyme RM IM. Foi realizado o estudo do Equilíbrio Líquido-Líquido (ELL) de sistemas ternários, determinando as linhas de amarração para os sistemas TAG + etanol + água, AGL + etanol + água e TAG + AGL + etanol e para o sistema pseudo-ternário (TAG+AGL) + etanol + água a 25 °C e 55 °C. Os dados experimentais de ELL do óleo de oliva e ácidos graxos livres com etanol e água foram utilizados para a estimativa de parâmetros UNIQUAC. A modelagem matemática do ELL dos sistemas estudados foi realizada pelo método de minimização da energia livre de Gibbs. O modelo UNIQUAC mostrou-se adequado para a correlação dos dados experimentais obtidos para os sistemas estudados, apresentando valores do erro médio quadrático (EQM) menor do que 2%. Avaliou-se a capacidade preditiva do modelo com dados experimentais que não fizeram parte do ajuste de parâmetros, com resultados de EQM menores que 2%. Os dados gerados neste trabalho contribuem para a disponibilização de informações termodinâmicas de sistemas de interesse em processos de separação por extração líquido-líquido para a produção de óleos ricos em DAG, visto que, inevitavelmente, moléculas de triacilgliceróis e ácidos graxos livres estarão presentes neste processo.

Palavras-chave: diacilglicerol, equilíbrio líquido-líquido, hidrólise, lipase, modelagem, Óleo de Oliva, UNIQUAC.

ABSTRACT

The production of high added value fat and oils has been growing recently for the chemical and biotechnological industry. Due this they are derived from renewable sources and “clean” technologies. With that, the importance of the production of oils enriched with diacylglycerols similar to conventional edible vegetable oils also increased. With a healthy connotation, these oils do not accumulate in the body and when consumed properly they can combat diseases such as obesity and even prevent atherosclerosis. In this context, products with higher concentration of DAG have become the interest of industries and the enzymatic route for production of DAG from a vegetable oil (TAG) has become known for presenting products free of unwanted reactions. Glycerides (TAG, DAG, MAG, FFA and glycerol) formed in the enzymatic reaction follow to a step purification and separation. This work aims to evaluate thermodynamic phase equilibrium between the products of hydrolysis of olive oil in water and ethanol to provide LLE data from these systems. The partial hydrolysis of olive oil was carried out in a free solvent environment at 50°C, 300rpm with the immobilized Lipozyme RM IM. It was conducted the study of the Liquid-Liquid Equilibrium (LLE) of ternary systems and determined the tie lines for the system TAG + ethanol + water , FFA + ethanol + water, TAG + FFA + ethanol and for the pseudo-ternary system (TAG + FFA) + ethanol + water at 25°C and 55°C. Mathematical modeling of LLE of the systems studied was conducted by the method of minimization of free Gibbs energy. The experimental LLE data of olive oil (hydrolyzed oil) with ethanol and water were used to estimate UNIQUAC parameters. The UNIQUAC model proved to be adequate for the correlation of experimental data obtained for the systems studied. The mean square error (MSE) obtained was less than 2%. It was evaluated the robustness of the model with experimental data that were not part of the adjustment with results also less than 2% (MSE). A comparison of the results obtained for the LLE ternary and pseudo-ternary systems with literature values indicate that the analytical method is secure. The data obtained with this study contribute to the availability of thermodynamic information for liquid-liquid extraction for the rich DAG oils.

Keywords: diacylglycerol, liquid-liquid equilibrium, hydrolysis, lipase, modeling, Olive Oil, UNIQUAC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arranjos <i>cis</i> e <i>trans</i> de um ácido graxo insaturado.....	6
Figura 2 – Fórmula estrutural de alguns ácidos graxos.....	6
Figura 3 – Esquema das formas (1) 1,3-DAG; (2) 2,3-DAG e (3) 1,2-DAG.	7
Figura 4 - Estruturas gerais de monoacilglicerol. (a) 2-MAG; (b) 1 (3)-MAG	8
Figura 5 - Reação de formação de MAG.	9
Figura 6 - Estrutura geral de um triacilglicerol.	10
Figura 7 - Esquema de reações de hidrólise/esterificação para uma lipase 1,3-específica (o termo HID refere-se à hidrólise enquanto que o termo EST refere-se à esterificação).....	11
Figura 8 - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.....	13
Figura 9 - Desenho esquemático do <i>short path distillation</i> (SPD).	17
Figura 10 - Esquema do destilador molecular	18
Figura 11 - Composição do óleo de DAG final após última etapa de destilação. TE = 250 °C, Q = 10 mL/min, P = 0,15 mm Hg	20
Figura 12 - Diagrama de distribuição de dilaurina-trilaurina-etanol aquoso e monolaurina-dilaurina- etanol aquoso a 60°C. X_{AB} = Fração mássica de A na fase rica em B (livre de C); X_{AC} = Fração mássica de A na fase rica em C (livre de C) - Adaptado de Monick e Treybal (1956).	21
Figura 13 – Esquema utilizado no sistema de extração contínua em coluna de disco rotativo, adaptado de (Pina & Meirelles, 2000).....	23
Figura 14 - Diagrama ternário para representação das composições de um sistema ternário..	26
Figura 15 - Diagrama ternário a temperatura constante, adaptado de (Lobo & Ferreira, 2006)	27
Figura 16 – Alguns ácidos graxos presentes no azeite de oliva com sua respectiva concentração.....	29
Figura 17- Esquema do experimento de equilíbrio líquido-líquido: 1- banho termostático; 2 e 3- circulação da água do banho; 4- barra magnética; 5- ponto amostragem; 6- termômetro; 7- agitador magnético.....	33

Figura 18 – Linhas de Amarração para o sistema ternário AGL (2) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C	40
Figura 19 - Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C	41
Figura 20 - Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + AGL (2) + Etanol (3) na temperatura de 55°C	42
Figura 21 - Linhas de Amarração para o sistema ternário Óleo ácido (1+2) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C.....	46
Figura 22- Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 25°C	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura, nome e fórmula de ácidos graxos livres (Scrimgeour, 2005).....	5
Tabela 2 – Porcentagem mássica de TAG e DAG em óleos comestíveis. Adaptado de (Yanai, Tomono, Ito, Furutani, Yoshida, & Tada, 2007)	7
Tabela 3 – Aplicações da Lipase na Indústria Alimentícia.....	15
Tabela 4 - Recuperação de MAG a diferentes TE e vazões de alimentação.....	19
Tabela 5 – Critérios de equilíbrio e estabilidade para um sistema.	24
Tabela 6 - Dados encontrados na amostra do óleo de oliva	32
Tabela 7 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C	38
Tabela 8 - Parâmetros r_i e q_i para TAG (1), AGL (2), etanol (3) e água (4).....	39
Tabela 9 - Parâmetros A_{ij} e A_{ji} para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) ..	39
Tabela 10 - Dados calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C.....	43
Tabela 11 - Erro entre composição experimental e calculada do equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C, em porcentagem mássica.....	43
Tabela 12 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C.....	44
Tabela 13 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C (Razão de TAG(1):AGL(2) na composição global igual a 0,534:0,466)	44
Tabela 14 - Dados calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C (Razão de TAG(1):AGL(2) na composição global igual a 0,534:0,466)	44
Tabela 15 - Dados Calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C	44
Tabela 16 - Erro entre composição experimental e preditos pelo modelo no equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C, em porcentagem mássica	45

Tabela 17 - Erro entre composição experimental e preditos pelo modelo no equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG(1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C, em porcentagem mássica..... 45

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

A_{ij} , A_{ji} - parâmetros UNIQUAC de interação (K)

DAG - diacilglicerol

AGL - ácido graxo livre

ELL - equilíbrio líquido-líquido

EQM_i - erro médio quadrático (%)

G, GL ou Gly - glicerol

Gib - Energia livre de Gibbs (J/mol)

fob - função objetivo

H₂O - água na fase oleosa

MAG - monoacilglicerol

NOBS - número de observações

Q_k - parâmetro UNIQUAC de área do grupo k

Q_{CH_2} - parâmetro UNIQUAC de área do grupo CH_2

Q_{COOH} - parâmetro UNIQUAC de área do grupo $COOH$

Q_{CH_2COO} - parâmetro UNIQUAC de área do grupo CH_2COO

Q_{OH} - parâmetro UNIQUAC de área do grupo OH

q_i - parâmetro UNIQUAC de área do componente/pseudo-componente i

q_{AGL} - parâmetro UNIQUAC de área do ácido graxo livre do óleo de oliva

q_{DAG} - parâmetro UNIQUAC de área do diacilglicerol do óleo de oliva

$q_{Glicerol}$ - parâmetro UNIQUAC de área do glicerol

q_{MAG} - parâmetro UNIQUAC de área do monoacilglicerol do óleo de oliva

q_{TAG} - parâmetro UNIQUAC de área do triacilglicerol do óleo de oliva

R - Constante universal dos gases (J/mol.K)

R_N - percentual de recuperação do composto N

R_k - parâmetro UNIQUAC de volume do grupo k

R_{CH_2} - parâmetro UNIQUAC de volume do grupo CH_2

R_{COOH} - parâmetro UNIQUAC de volume do grupo $COOH$

R_{CH_2COO} - parâmetro UNIQUAC de volume do grupo CH_2COO

R_{OH} - parâmetro UNIQUAC de volume do grupo OH

rmsd - desvio médio quadrático

r_i - parâmetro UNIQUAC de volume do componente/pseudo-componente i

r_{OH} - Parâmetro UNIQUAC de volume do grupo OH

r_{AGL} - parâmetro UNIQUAC de volume do ácido graxo livre do óleo de oliva

r_{DAG} - parâmetro UNIQUAC de volume do diacilglicerol do óleo de oliva

$r_{Glicerol}$ - parâmetro UNIQUAC de volume do glicerol

r_{MAG} - parâmetro UNIQUAC de volume do monoacilglicerol do óleo de oliva

r_{TAG} - parâmetro UNIQUAC de volume do triacilglicerol do óleo de oliva

SPD - short path distillation

T - Temperatura (K)

TA - temperatura da alimentação (°C)

TC - temperatura do condensador (°C)

TD - temperatura do destilado (°C)

TE - temperatura do evaporador (°C)

TR - temperatura do resíduo (°C)

TAG - triacilglicerol

v_{ki} - Número de grupos k no componente i

v_{km} - Número de grupos k na molécula m

w_{io}^{exp} Fração mássica experimental do pseudo-componente i na observação o

w_{io}^{calc} Fração mássica experimental do pseudo-componente i nas condições da observação o

Símbolos gregos

μ_{if} - Potencial químico do componente/pseudo-componente i na fase f (J/mol)

μ_i^0 - Potencial químico de referencia do componente/pseudo-componente i (J/mol)

μ_i^{0L} - Potencial químico de referencia do componente/pseudo-componente i na fase líquida (J/mol)

γ_{if} - Coeficiente de atividade do componente/pseudo-componente i na fase f

Subscritos

f - Fase

i - Componente/pseudo-componente

j - Componente/pseudo-componente

k - Grupo UNIQUAC

N - componente de uma mistura

n - Linha de amarração

o - observação experimental

r - parâmetro cinético

Superescritos

0 - Estado de referência

$calc$ - calculado

exp - experimental

f - Fase

L - Fase líquida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Óleos e Gorduras	4
2.1.1 Ácidos Graxos Livres (AGL)	5
2.1.2 Diacilgliceróis (DAG)	6
2.1.3 Monoacilgliceróis (MAG)	8
2.1.4 Triacilgliceróis (TAG)	9
2.2 Reação para a produção de DAG	10
2.2.1 Hidrólise parcial de triacilgliceróis	11
2.2.2 Esterificação de glicerol com ácidos graxos	12
2.2.3 Glicerólise de triacilgliceróis	13
2.2.4 Lipases	14
2.3 Purificação do DAG	16
2.3.1 Destilação	16
2.3.2 Destilação Molecular	17
2.3.3 Extração líquido-líquido	20
2.4 Equilíbrio Líquido-Líquido (ELL)	24
2.4.1 Diagramas de equilíbrio líquido-líquido	26
2.5 Óleo de Oliva.....	28
2.6 Considerações Finais	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais	31
3.2 Métodos analíticos.....	31
3.2.1 Quantificação de acidez	31
3.2.2 Quantificação de água.....	32
3.3 Procedimentos Experimentais.....	32

3.3.1	Reação de hidrólise.....	32
3.3.2	Equilíbrio de fases líquido-líquido	33
3.4	Modelagem do Equilíbrio Líquido-Líquido do sistema TAG, AGL, Etanol e Água.....	34
3.4.1	Estimativa de parâmetros de Interação UNIQUAC.....	34
3.4.2	Predição do Equilíbrio Líquido-Líquido (Energia Livre de Gibbs de excesso).....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Equilíbrio Líquido-Líquido.....	38
4.1.1	Determinação dos parâmetros UNIQUAC	38
4.1.2	Dados experimentais e preditos de equilíbrio líquido-líquido.....	39
5.	CONCLUSÃO	49
5.1	Sugestões para trabalhos futuros	49
6.	BIBLIOGRAFIA	50

1. INTRODUÇÃO

Atualmente tem surgido nas indústrias químicas e de biotecnologia um grande interesse na conversão de gorduras e óleos em produtos de alto valor agregado. Isto se deve ao fato de que estes produtos são derivados de recursos renováveis (óleos vegetais e gordura animal) (Schmid, 1987); (Damstrup, Abildskov, Kill, Jensen, Sparso, & Xu, 2008). Além disso, há também o desenvolvimento de tecnologias limpas de fontes renováveis como a produção de biodiesel, considerado um combustível alternativo (Valério, 2009).

Os monoacilgliceróis (MAG) equivalem a 70% dos emulsificantes utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Além dos MAG, os diacilgliceróis (DAG) apresentam aplicação como emulsificantes não-iônicos e agentes texturizadores (Meng, Zou, Shi, Duan, & Mao, 2004). Além disso, os DAGs têm grande aplicação como aditivo funcional em alimentos, trazendo benefícios para saúde, tal como, a redução da gordura abdominal visceral (Cheong, et al., 2007). Estudos clínicos no Japão têm demonstrado que o uso de óleo de DAG em substituição ao óleo de TAG não somente reduz a gordura acumulada na região abdominal como previne doenças arterioscleróticas, obesidade e resistência à insulina (Shimizu, Moriwaki, Nishide, & Nakajima, 2004); (Yamamoto, et al., 2006)

Na indústria, os MAG são produzidos via glicerólise química de óleos e gorduras, esta reação requer altas temperaturas e deve ser realizada na presença de um catalisador alcalino (Sonntag, 1982). O alto custo de investimento, o alto consumo energético e os baixos rendimentos da reação são limitações deste processo (Yang T. , Rebsdorf, Engelrud, & Xu, 2005b).

Com o interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis, ou seja, produtos livres de reações de polimerização e de gorduras na configuração *trans*, a rota enzimática na produção de MAG e DAG vem se tornando mais atrativa que a rota química. De qualquer forma, convém registrar que a produção dos DAG via catálise enzimática ainda é limitada devido ao baixo rendimento e a complexidade deste processo (Seong-Koon, Chin-Ping, Kamariah, Mohd, & Oi-Ming, 2007).

Para separação e purificação dos acilgliceróis (TAG, DAG, MAG, AGL e glicerol) formados na reação enzimática, a técnica de destilação convencional não é recomendada, pois esses compostos podem sofrer degradação e oxidação quando expostos às elevadas temperaturas. O DAG pode ser separado do TAG por processos de destilação molecular (Ming, et al., 2007), o que exige um alto custo energético devido ao vácuo e às altas temperaturas exigidos no processo. No entanto, o processo de extração líquido-líquido pode ser aplicado a esta situação e apresenta algumas vantagens sobre o processo de destilação. A principal vantagem é o fato de a extração ocorrer em condições ambientes (temperaturas baixas), o que não compromete a qualidade destes compostos formados na reação.

Por isso, torna-se de suma relevância avaliar o comportamento de equilíbrio de fases do tipo líquido-líquido entre produtos obtidos nas reações de formação de diacilglicerol. Visto que os produtos deste tipo de reação formam naturalmente um sistema complexo, torna-se atraente a ideia de separar o mesmo em subsistemas mais simples, o que pode impedir o possível “mascaramento” de informações, causado pelo alto número de diferentes possibilidades de interações que as diferentes moléculas podem ter entre si. O princípio que permite que os diferentes produtos de reação sejam separados por extração líquido-líquido é a diferença de polaridade entre eles. Logo, os solventes escolhidos para o estudo foram água (para promover diferentes concentrações de materiais oleosos nas diferentes fases) e etanol (por possuir características polares e apolares, permite que a fase mais polar tenha uma quantidade significativa de componentes apolares).

1.1 Objetivo geral

Em vista do apresentado, o objetivo principal do presente trabalho é levantar, com base em dados experimentais, o equilíbrio líquido-líquido do sistema formado por ácidos graxos livres (obtidos através da hidrólise do óleo de oliva), óleo de oliva (majoritariamente triacilgliceróis), etanol e água. Obtêm-se assim, dados de equilíbrio relevantes para estudos de purificação de DAG, o que contribui para o desenvolvimento e otimização de novos processos de separação.

1.2 Objetivos específicos

Com o intuito de avaliar o processo de separação por extração líquido-líquido do DAG é necessário ter em posse dados que permitam estudar esta separação. Portanto, o estudo do óleo não hidrolisado, do ácido graxo livre formado após a hidrólise e da mistura desses compostos com o solvente empregado se faz necessário.

Conhecer as condições de equilíbrio desse sistema é essencial para um melhor entendimento do processo de separação e purificação destes compostos. A determinação dos dados do equilíbrio líquido-líquido (ELL) é de fundamental importância uma vez que a etapa de separação dos produtos formados é uma das etapas de maior impacto na qualidade do produto que será comercializado.

As etapas que envolvem os objetivos específicos são:

- Modelagem matemática do equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG + AGL+ etanol + água.

- Reações de hidrólise completa do óleo de oliva na presença de lipase *Lipozyme* RM IM.
- Experimentos de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG + AGL + etanol + água.
- Obtenção dos parâmetros binários de interação UNIQUAC para predição do equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG + AGL + etanol + água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos e Gorduras

Os lipídios constituem um grupo de substâncias que normalmente são chamadas de óleos e gorduras, essas substâncias podem ter a sua origem tanto animal como vegetal (Riegel, 2002). Óleos e gorduras comestíveis são insolúveis em água e são representadas pelos triacilgliceróis (ésteres de glicerol com ácidos graxos), fosfolipídeos e colesterol (Tirapegui, 2006). Suas características físicas variam com a estrutura e a distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis (Babicz, 2009).

De acordo com a definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os óleos vegetais são líquidos à temperatura de 25°C e as gorduras vegetais se apresentam de forma sólida ou pastosa nesta mesma temperatura.

A estrutura de óleos e gorduras é formada por cadeias de ácidos orgânicos lineares, denominados ácidos graxos, que diferem pelo número total de átomos de carbono na cadeia e também pela presença de insaturações (duplas ligações entre os átomos de carbono) em sua cadeia hidrofóbica.

Os lipídeos podem ser divididos em duas classes de compostos, os mais simples como os ácidos graxos, acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) e nos mais complexos como as ceras, fosfolipídeos, esfingolipídeos, lipoproteínas, esteróis e vitaminas lipossolúveis. Os lipídeos ainda são reconhecidos como nutrientes essenciais na alimentação humana e animal. São fontes de energia e servem como veículo para algumas vitaminas lipossolúveis como as vitaminas A, D, E e K, assim como fonte de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico, contribuindo para a palatabilidade dos alimentos (Ziller, 1996).

Os lipídeos ainda possuem uma aplicação industrial limitada devido à distribuição e composição de seus ácidos graxos. Para a sua utilização são necessários processos de modificação de suas características, tais como hidrogenação, interesterificação e fracionamento (Rousseau & Marangoni, 1996). Dentre os óleos e gorduras, o óleo de oliva produzido a partir da azeitona, fruto da oliveira, tem se destacado nas áreas relacionadas à saúde, devido sua alta quantidade de gordura insaturada, polifenóis (antioxidante) e ácido oleico (70%) (Aparicio & Harwood, 2003).

2.1.1 Ácidos Graxos Livres (AGL)

Ácidos graxos, por sua vez, são quase que inteiramente ácidos carboxílicos com cadeia alifática linear, onde os mais comuns apresentam entre 4 e 22 carbonos. A cadeia é formada a partir de duas unidades de carbono e as ligações duplas *cis* são inseridas por enzimas dessaturases em posições específicas em relação ao grupo carboxila (Scrimgeour, 2005). Na Tabela 1 são apresentadas a nomenclatura, o nome e a fórmula dos ácidos graxos mais comuns encontrados em óleos e gorduras.

Tabela 1 - Nomenclatura, nome e fórmula de ácidos graxos livres (Scrimgeour, 2005)

Nomenclatura	Nomenclatura	Fórmula
4:0	Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6:0	Capróico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8:0	Caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10:0	Cáprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
12:0	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Estearico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18:1 9c	Oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2 9c12c	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3 9c12c15c	α -Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
22:1 13c	Erúico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

O ponto de fusão dos ácidos graxos aumenta de acordo com o aumento da cadeia e decresce com o aumento do número de insaturações (quando esta apresentar isomeria *cis*). Dentre os ácidos graxos saturados, os de cadeias ímpares apresentam menores ponto de fusão comparados aos de cadeias pares adjacentes (Blasi, Cossignani, Simonetti, & Damiani, 2007). Ácidos graxos *trans* possuem pontos de fusão muito próximos aos dos ácidos graxos correspondentes (Scrimgeour, 2005).

Os ácidos graxos *trans*, normalmente são produzidos pelo processo de hidrogenação (Quintaes, 2005), não são sintetizados pelo organismo humano. As formas *cis* dos ácidos graxos podem ser convertidas por processos industriais na forma *trans* por aquecimento na presença de catalisadores.

A Figura 1 mostra os arranjos *cis* e *trans* de um ácido graxo insaturado.

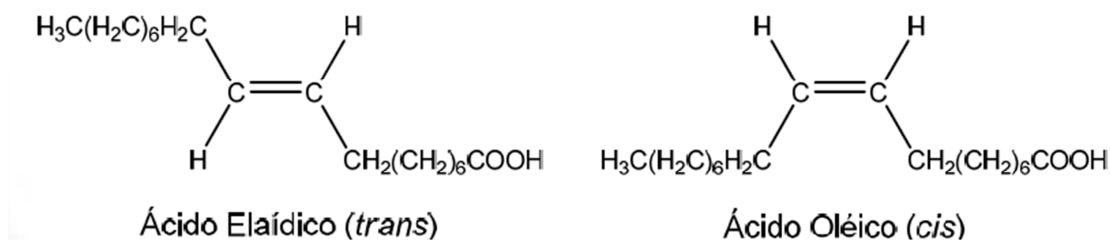


Figura 1 – Arranjos *cis* e *trans* de um ácido graxo insaturado.

A Figura 2 mostra a fórmula bem como a estrutura de alguns ácidos graxos comumente encontrados em óleos vegetais.

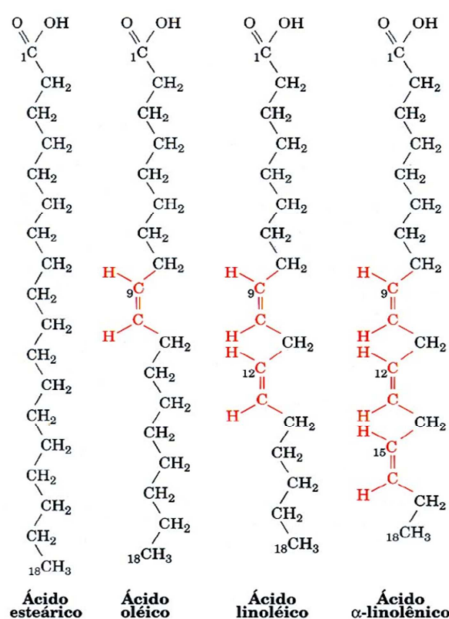


Figura 2 – Fórmula estrutural de alguns ácidos graxos.

2.1.2 Diacilgliceróis (DAG)

Diacilgliceróis são ésteres de glicerol que possuem dois grupos hidroxila esterificados por ácidos graxos, podendo existir em duas formas estereoquímicas conhecidas como *sn*-1,2-DAG (ou 2,3) e *sn*-1,3-DAG cuja relação isomérica natural é de 3:7 em função da migração do grupo acil durante o processo de refino do óleo (Sambanthamurthi, Sundram, & Tan, 2000). Um esquema ilustrativo de DAG pode ser visto na Figura 3.

A isoforma 1,2-DAG é considerada como um intermediário metabólico que é formado após a ingestão de triacilglicerol. A 1,3-DAG é responsável pelo efeito benéfico, pois é metabolizado por uma via diferente do TAG e do 1,2-DAG.

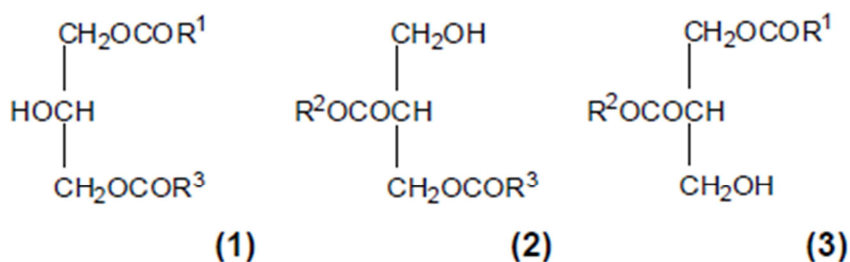


Figura 3 – Esquema das formas (1) 1,3-DAG; (2) 2,3-DAG e (3) 1,2-DAG.

O DAG está presente na composição de vários óleos e gorduras comestíveis, podendo chegar a níveis próximos a 10% (Cheong, et al., 2007). São aditivos funcionais empregados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosmética, podendo ainda ser empregado junto à monoacilgliceróis (Krüger, 2010). As quantidades de DAG comumente encontradas em óleos vegetais podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem mássica de TAG e DAG em óleos comestíveis. Adaptado de (Yanai, Tomono, Ito, Furutani, Yoshida, & Tada, 2007)

Óleo	TAG	DAG
Soja	97,9	1,0
Algodão	87,0	9,5
Palma	93,1	5,8
Milho	95,8	2,8
Açafrão	96,0	2,1
Oliva	93,3	5,5
Colza	96,8	0,8
Banha	97,9	1,3

O uso de diacilglicerol ao invés de triacilglicerol, presente em óleos e gorduras vegetais, teve início na década de 80. Seu uso foi baseado em dois importantes benefícios à saúde: o primeiro refere-se à supressão da elevação pós-prandial dos triglicerídeos no soro e a segunda é a supressão do acúmulo de gordura corpórea (Sundram, 2014).

Estudos mostram que óleos compostos com alta concentração (mínimo 80% (m/m)) de DAG promovem um efeito benéfico à saúde humana com relação à prevenção da obesidade, na redução e prevenção do acúmulo de gordura no corpo, uma vez que o DAG é metabolizado de forma diferente do MAG pelo organismo (Yamamoto, et al., 2001). Ainda no Japão em 1999 e nos Estados Unidos em 2000, óleos rico em DAG foram reconhecidos como “*Food for Special Health Use*, ou seja, “*Alimento para Uso Especial na Saúde*” (Takase, 2007) e

aprovados como “*Generally Recognized As Safe*” , ou seja, “*Geralmente Reconhecido Como Seguro*” (Voll & Brito, 2010) respectivamente.

2.1.3 Monoacilgliceróis (MAG)

Monoacilgliceróis ou monoglicerídeos são compostos formados por uma molécula de glicerol ligada a uma de ácido graxo. Podem apresentar duas formas isoméricas (2-MAG e 1 (3)-MAG). A Figura 4 mostra as duas estruturas do MAG.

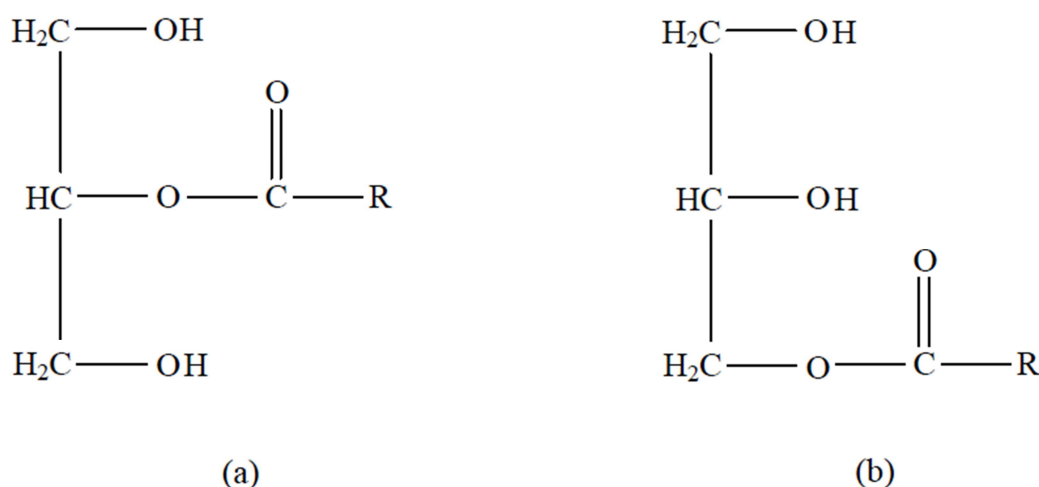


Figura 4 - Estruturas gerais de monoacilglicerol. (a) 2-MAG; (b) 1 (3)-MAG

A demanda em aplicações industriais pelo MAG de alta concentração é devido às suas excelentes propriedades emulsificantes pois a cadeia apresenta um balanço hidrofílico-hidrofóbico em suas estruturas, o glicerol hidrofílico e o ácido graxo hidrofóbico (Ferreira-Dias, Correia, Baptista, & Fonseca, 2001).

MAGs são emulsificantes utilizados amplamente nas indústrias farmacêutica e de alimentos. Na indústria de alimentos são usados em produtos de panificação, margarinas e derivados do leite. Na indústria de cosmético os MAGs são usados pra dar textura aos cremes, pastas e loções. Esta gama de aplicações atribuídas aos MAGs se deve a sua característica aniônica e estabilidade em meio ácido ou meio básico (Boyle & German, 1996). Na química orgânica sintética são utilizados como intermediários sintéticos e como blocos de construção quiral (Pawongrat, Xu, & H-Kittikun, 2007). Devido à importância mundial dos MAGs e os seus derivados como aditivos ativos na superfície em uma gama extensiva de alimentos, considerável atenção foi dada recentemente para melhorar sua síntese.

O MAG pode ser produzido por esterificação direta do glicerol com ácidos graxos, transesterificação de ésteres de ácido graxos com glicerol e glicerólise de triacilglicerol. Na indústria sua produção é feita por reações de glicerólise em temperaturas acima de 200°C, na presença de catalisadores químicos. Nestas condições obtém-se normalmente um mistura composta por 50% de MAG, 40% de DAG e 10% de TAG (Sonntag, 1982). A Figura 5 mostra de forma genérica a reação de produção de MAG (Fregolente L. , 2006).

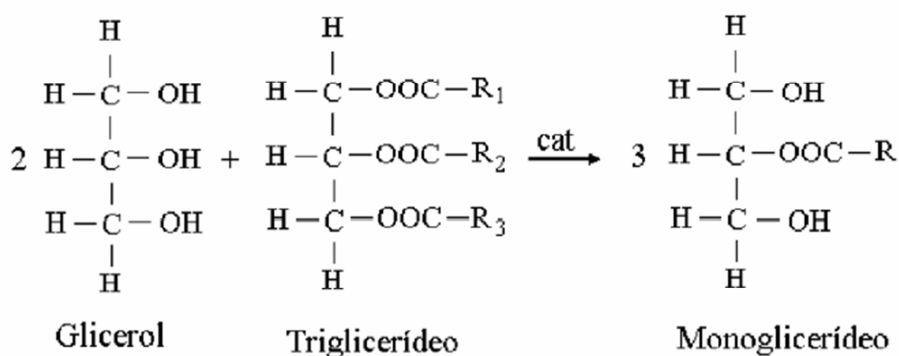


Figura 5 - Reação de formação de MAG.

Atualmente, tem-se aumentado o interesse no desenvolvimento de processos enzimáticos que possam substituir os processos químicos para a produção do MAG. Algumas vantagens nos processos enzimáticos podem ser destacadas, tais como as condições de temperaturas mais baixas (40-70°C) e o pH próximo ao neutro (Ferreira-Dias, Correia, Baptista, & Fonseca, 2001). Estas condições reduzem o consumo energético, a formação de subprodutos (muitas vezes indesejáveis), a coloração escura e o aroma desagradável. Assim possibilita-se a produção de MAG em maiores concentrações e rendimentos (Yang T. , Rebsdorf, Engelrud, & Xu, 2005a).

2.1.4 Triacilgliceróis (TAG)

Os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos com glicerol. A porção de ácido graxo presente nos ésteres lipídicos é designada grupo acila. O número de grupos hidroxila do glicerol esterificados com ácidos graxos nestes compostos são três por isso são denominados de triacilgliceróis ou triglicerídeos. A Figura 6 ilustra a estrutura geral de um triacilglicerol.

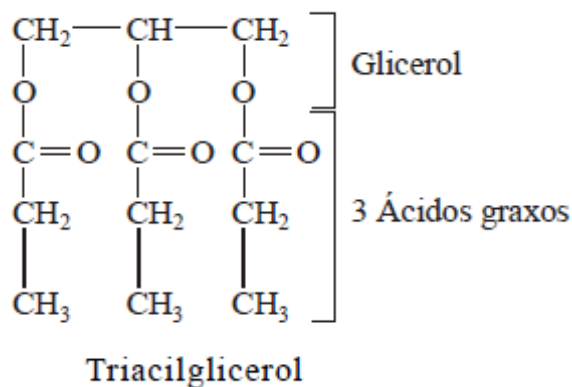


Figura 6 - Estrutura geral de um triacilglicerol.

Os ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis naturais podem ser iguais (triacilgliceróis simples) ou diferentes (triacilgliceróis mistos). A maioria dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis é mono ou poli-insaturados.

Nas plantas, os TAG constituem uma importante reserva de energia em frutas e sementes. Como essas moléculas contêm grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, tais como o oleico e linoleico, são chamados de óleos vegetais.

Óleos ricos em um determinado ácido graxo contém uma quantidade significativa de triacilgliceróis monoácidos. O óleo de oliva, por exemplo, é rico em ácido oleico, logo apresenta uma grande quantidade de trioleína em sua composição. Com apenas dois ácidos graxos, são possíveis um total de 8 isômeros (incluindo enantiômeros) de triacilglicerol. Uma vez que a quantidade de isômeros pode ser igual ao cubo do número de ácidos graxos, mesmo óleos com uma composição simples de ácidos graxos podem apresentar muitas espécies de moléculas de triacilglicerol (Scrimgeour, 2005)

O ponto de fusão dos TAG é um reflexo direto dos ácidos graxos que o compõem. Ou seja, TAG ricos em ácidos graxos de cadeia longa e saturados apresentam altos pontos de fusão, ao passo que TAG ricos em ácidos graxos poli-insaturados têm baixos pontos de fusão. No entanto, esta relação não é tão simples. Óleos com composição de ácidos graxos similares podem apresentar diferentes pontos de fusão como resultado de uma diferente composição de triacilgliceróis, visto que os ácidos graxos podem estar distribuídos em diferentes espécies moleculares (Scrimgeour, 2005).

2.2 Reação para a produção de DAG

Aqui serão apresentados os processos mais comumente encontrados na produção de DAG e estes são classificados de acordo com o tipo de reação empregada.

Alguns autores sugerem que os DAG podem ser obtidos através da reação de hidrólise de triacilgliceróis ou pela esterificação de glicerol com ácidos graxos livres (Watanabe, Sugiyura, Sato, Yamadab, & Nakanishi, 2005); ou ainda através da glicerólise (Tuter & Aksoy, 2000).

2.2.1 Hidrólise parcial de triacilgliceróis

A hidrólise dos óleos normalmente tem como resultado final os produtos glicerol e AGL, e os produtos intermediários DAG e MAG. O tempo de reação e disponibilidade de reagentes para a conversão definem se a reação será completa ou não (Awadallak, 2012).

A reação de hidrólise pode ser dividida em três etapas: na primeira, TAG é hidrolisado para formar DAG e AGL, na segunda etapa o DAG é hidrolisado para formar MAG e mais uma molécula de AGL. Na terceira etapa ocorre a hidrólise do MAG em glicerol e AGL. Esta última é a hidrólise completa do TAG, o que não é desejado para a produção de DAG ou MAG, sendo necessário o controle para evitar a hidrólise completa. Uma das opções utilizadas na produção de MAG é a hidrólise parcial com o uso de lipases 1,3-específicas, o que favorece a formação de 2-MAG, sem que o mesmo seja levado a glicerol (Freitas, Bueno, Perez, & Castro, 2008). A Figura 7 mostra o mecanismo de reações da hidrólise de TAG.

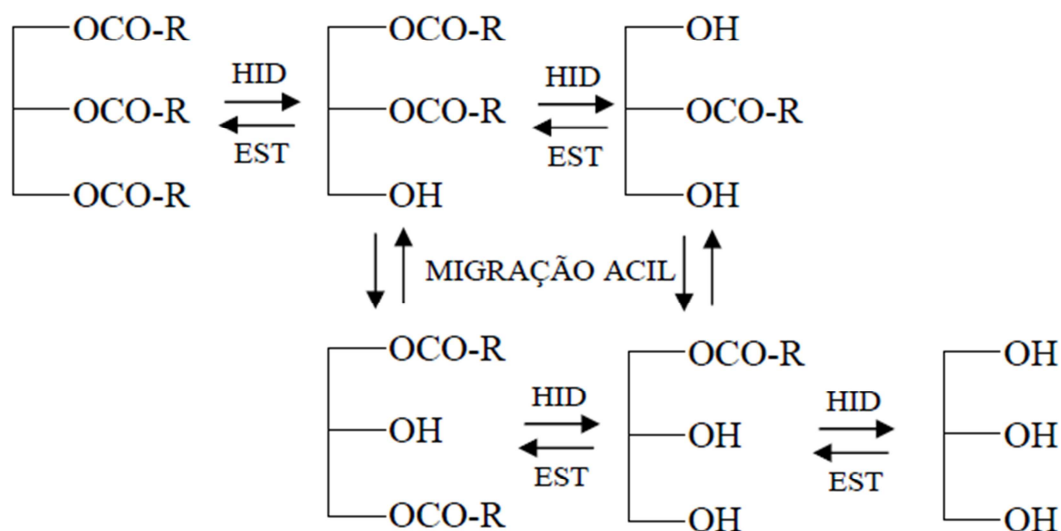


Figura 7 - Esquema de reações de hidrólise/esterificação para uma lipase 1,3-específica (o termo HID refere-se à hidrólise enquanto que o termo EST refere-se à esterificação).

A hidrólise apresenta vantagens como a fácil condução operacional e ainda não apresenta os problemas relacionados ao excesso de glicerol no meio quando comparada com a reação de esterificação (Voll F. , Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do óleo de Palma, 2011)

Voll F. (2011) estudou a cinética da hidrólise enzimática do óleo de palma para a produção de DAG, bem como a termodinâmica de equilíbrio de fases entre os produtos da hidrólise. A reação de hidrólise parcial do óleo foi realizada em meio livre de solvente, a 55°C, com agitação de 400 rpm, foi utilizado a enzima imobilizada *Lipozyme* RM IM como catalisador. As variáveis operacionais avaliadas neste estudo foram a concentração de enzima, a concentração inicial de água e o tempo de reação. Um óleo de palma com 35,91 m% em DAG foi obtido experimentalmente para as condições ótimas previstas pelo modelo cinético: 2,87 m% enzima/substrato, 2,10 m% água/óleo e com 72 horas de tempo de reação.

Awadallak (2012) estudou a hidrólise parcial do óleo de palma para produção de DAG em um meio livre de solvente, utilizando a lipase *Lipozyme* RM IM e utilizando o ultrassom como gerador de emulsões aumentando assim a taxa de reação quando comparado aos processos enzimáticos convencionais. Foi avaliado o efeito das variáveis tempo de exposição ao ultrassom, potência do ultrassom e razão água/óleo na conversão de AGL. Foi obtido DAG a 37,69% de concentração em massa, com a condições ótimas de 12 horas de reação, exposto ao ultrassom por 1,2 min na potência de 200W.

Costa (2009) estudou a hidrólise parcial do óleo de palma para produção de DAG em um meio livre de solvente, utilizando a lipase *Lipozyme* RM IM. As condições ótimas de reação foram obtidas por uma metodologia de superfície de resposta. As variáveis avaliadas neste estudo foram as seguintes: a influência da concentração de enzima no meio, a temperatura de reação, a concentração inicial de água e a velocidade de agitação mecânica. O tempo de reação foi mantido em 24 horas para todos os casos. Os dados de reação considerados ótimos obtidos neste estudo foram: 1,5% de enzima, 8% de água, temperatura de 45°C e agitação de 500 rpm. Foi obtido um produto com 39,27 m% em DAG.

2.2.2 Esterificação de glicerol com ácidos graxos

A esterificação de glicerol com AGL ocorre em três etapas principais, sendo essas reações inversas à hidrólise. Na primeira etapa, glicerol é esterificado com ácido graxo para formar MAG e água, e em seguida MAG é esterificado com ácido graxo formando DAG e água. Por fim, DAG é esterificado por mais um ácido graxo para formar TAG e água.

Segundo (Freitas, Bueno, Perez, & Castro, 2008), a esterificação tem um melhor aproveitamento do AGL na produção de MAG e DAG quando comparada com a hidrólise. O uso de lipases 1,3-específicas favorece a formação de 1-MAG e 1,3-DAG. TAG somente é produzido com uma enzima 1,3-específica quando ocorre migração acil do 1,3- DAG para 1,2 DAG. A Figura 7 mostra sequencia de reações de esterificação de glicerol com AGLs na presença da enzima 1,3 específica.

Sendo a esterificação uma reação que ocorre de forma inversa a reação de hidrólise, para que se desloque o equilíbrio da reação no sentido da formação de produtos MAG e DAG,

se faz necessário a remoção contínua da água do meio reacional (Freitas, Bueno, Perez, & Castro, 2008). A remoção pode ser feita por meio da redução da pressão do sistema (Watanabe, Sugiura, Sato, Yamadab, & Nakanishi, 2005) ; (Miller C., Austin, Posorke, & Gonzalez, 1988), adição de peneira molecular (Yamaguchi & Mase, 1991) ou uso de agentes dessecantes (Freitas, Bueno, Perez, & Castro, 2008).

Wang et al. (2011), a partir da esterificação de ácidos graxos com glicerol, como catalisador a enzima *phospholipase Lecitase* ultra, produziram um óleo concentrado em 78,4% em massa de DAG. O tempo de reação empregado foi de 6 horas. Foi utilizada a técnica de destilação molecular a 170°C onde obtiveram um óleo enriquecido em 83,1% em massa de DAG.

Watanabe (2005), através da esterificação de AGL e glicerol em um biorreator com leito recheado na presença de uma enzima *Lipozyme* RM IM, produziram 1,3-DAG. A reação de esterificação foi conduzida pela circulação da mistura entre uma coluna recheada e um sistema a alto vácuo foi utilizado para remover a água. Foi obtido 1,3-DAG com 70% em massa na condição de vácuo de 0,4 kPA, temperatura de 50°C, e uma razão molar de 1:2 AGL para glicerol. Foi observado que a diminuição do tempo reacional reduziu a quantidade de água na saída do biorreator, o que gerou um aumento da conversão de DAG.

2.2.3 Glicerólise de triacilgliceróis

A reação de glicerólise produz MAGs e DAGs a partir de moléculas de glicerol ligadas à moléculas de TAGs. As seis etapas da Figura 8 podem representar a glicerólise, as Equações 1, 2 e 3 indicam as reações envolvidas na glicerólise e as Equações 4, 5 e 6 indicam as reações de hidrólise que podem ocorrer paralelamente caso haja água suficiente no meio.



Figura 8 - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.

A reação de glicerólise de TAG tem sido amplamente empregada para a produção de MAG e DAG, o fato de não gerar água durante a reação permite um maior rendimento quando comparado com o método de esterificação, além de não ser necessária a utilização de uma técnica para a remoção dos produtos durante a reação.

Fregolente et al. (2009) produziram MAG e DAG a partir da glicerólise enzimática do óleo de soja, como catalisador utilizaram a enzima *Candida antarctica* B em sistema livre de solvente, com a proporção de 8:1 de TAG para glicerol e 2% de concentração em massa de enzima. A conversão reacional atingida foi de 46,63% em massa de DAG. A etapa de purificação dos produtos da reação foi realizada por destilação molecular e após consecutivas destilações a concentração final atingida foi de 54% em massa de DAG.

Valério (2009) produziu DAG e MAG a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva e glicerol na presença de n-butano comprimido como solvente e como catalisador a enzima lipase imobilizado Novozyme 435, Trion X-100 e Tween 65 como surfactantes. No trabalho foi avaliado o efeito dos parâmetros: razão molar de glicerol/óleo de oliva, solvente/substrato; concentração de enzima; pressão; temperatura e concentração de surfactante. A condição ótima para a produção de MAG e DAG foi para temperatura de 70°C, agitação de 600rpm, razão molar de glicerol/óleo de oliva de 6:1, 16% em massa de surfactante e 9% em massa de enzima. A produção de MAG+DAG nestas condições com 2 horas de reação foi de 37,4% para o Triton X-100 e 41,8% para o Tween 65.

2.2.4 Lipases

As aplicações de enzimas na indústria de alimentos são muitas e diversificadas, vão desde a textura ao aroma. Vários mercados químicos tradicionais estão aumentando com produtos derivados de bioprocessos ou processos químicos híbridos / biocatalíticos.

As lipases são indispensáveis para a bioconversão de lipídeos (triacilgliceróis) de um organismo para outro e dentro dos organismos. Possuem a característica singular de agir numa interface entre a fase aquosa e a fase não-aquosa (por exemplo orgânicos); esta característica que as distingue das esterases (Pandey, Benjamin, Soccol, Nigam, & Krieger, 1999).

A função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. As lipases possuem a característica singular de atuar na interface entre uma solução aquosa e uma fase não aquosa. Elas sintetizam ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e glicerol, quando a atividade da água é baixa. O crescimento de aplicação de enzimas comerciais é muito significativa e promissora, especialmente na indústria alimentar durante os últimos 35 anos (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999).

As lipases ocorrem amplamente na natureza, mas as lipases microbianas são comercialmente mais significativas, pois apresentam um menor custo de produção, maior estabilidade e maior disponibilidade de lipases vegetais e animais. Podem ser provenientes de fungos, bolores ou bactérias e a maioria é de formação extracelular. Esta disponibilidade imediata criou uma enorme cisão com respeito à hidrólise e formação de ésteres carboxílicos (IUPAC, 1997).

Um grande potencial biotecnológico das lipases microbianas está relacionado com a sua quimiosseletividade, regiosseletividade e estereosseletividade (Beisson, Tiss, Riviere, & Verger, 2000); (Venkata Rao & Lanxmanan, 1991). Estão facilmente disponíveis em grandes quantidades, porque podem ser produzidos com alto rendimento a partir de micro-organismos (Pandey, Benjamin, Soccol, Nigam, & Krieger, 1999). As estruturas cristalinas de diversas lipases têm sido determinadas, e isto facilita consideravelmente a concepção de estratégias racionais de engenharia. Finalmente, lipases geralmente não requerem cofatores, pois, não catalisam reações paralelas.

A maior parte da lipase microbiana industrial é derivada a partir de fungos e bactérias (Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001). Fungos são preferíveis, porque as enzimas de fungos são geralmente extracelular, facilitando a extração a partir de meios de fermentação (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999). Apesar de várias lipases microbianas serem produzidas comercialmente, o alto custo da lipase parece ser um fator importante na sua aplicação bem sucedida.

As lipases (triacilglicerol hidrolases; E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de TAG aos ácidos graxos correspondentes e glicerol na interface água e óleo. Estas enzimas podem catalisar as reações de esterificação ou transesterificação, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Costa, 2009).

A Tabela 3 mostra algumas das aplicações da lipase na indústria de alimentos, bem com sua ação no processo (Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001).

Tabela 3 – Aplicações da Lipase na Indústria Alimentícia.

Indústria Alimentícia	Ação	Produto de Aplicação
Laticínios	Hidrólise de leite gordura, de maturação do queijo, modificação de gordura de manteiga.	Desenvolvimento de agentes aromatizantes em leite, queijo e manteiga
Padaria	Melhoria no sabor	Aumento do prazo de validade
Bebidas	Melhoria aroma	Bebidas alcoólicas, por exemplo, saquê, vinho
Molhos	Melhoria na qualidade	Maionese e molhos
Alimentos saudáveis	Transesterificação	Alimentos saudáveis

Carne e peixe	Desenvolvimento de sabor	Produtos derivados de carne e peixe, remoção de gordura
Gorduras e óleos	Transesterificação e hidrólise	A manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, MAG e DAG

2.3 Purificação do DAG

O DAG pode ser separado de AGL, MAG e TAG por processos de destilação em condições de altas temperaturas e baixas pressões (Ming, et al., 2007) ; (Kristensen, Xu, & Mu, 2005), por destilação molecular (realizadas consecutivas destilações e levando-se em conta a diferença do peso molecular) (Fregolente, Pinto, Wolf-Maciel, Maciel Filho, & Batistella, 2009) ou ainda, por meio da extração líquido-líquido com etanol e água (este processo pode ser realizado em pressão ambiente e a baixas temperaturas) (Monick & Treyball, 1956).

2.3.1 Destilação

Os produtos gerados na reação da hidrólise de TAG (bem como a esterificação de glicerol com AGL, ou glicerólise de TAG) são normalmente glicerol, TAG, DAG, MAG, AGL e água. Para aumentar a concentração de DAG no produto final desejado, se reduz na mistura a concentração dos outros componentes como, por exemplo, a quantidade de TAG, MAG e AGL. Pelo processo de destilação o MAG e AGL podem ser facilmente separados do óleo final, porém devido à pequena diferença da pressão de vapor entre DAG e TAG este processo de separação do TAG do óleo final se torna mais difícil (Watanabe, Sugiura, Sato, Yamadab, & Nakanishi, 2005). Assim, alguns autores (Watanabe, Sugiura, Sato, Yamadab, & Nakanishi, 2005) e (Cheong, et al., 2007) definem a pureza do DAG pela Equação 7, a qual considera os componentes restantes do óleo após a destilação de MAG e AGL.

$$Pureza\ DAG\ (\%) = \frac{DAG(\%)}{DAG(\%)+TAG(\%)} \quad (7)$$

Cheong et al. (2007) obtiveram uma oleína de palma rica em DAG com o processo de hidrólise enzimática. Os produtos mais voláteis da hidrólise (MAG e AGL) foram separados pela técnica de destilação SPD (short path distillation) a composição do óleo utilizado não foi informada, esta técnica de destilação utiliza alto vácuo e tempo de contato do destilado baixo. Os parâmetros da destilação, vácuo de 0,01 mbar, rotação de 350 rpm e temperatura do condensador de 60°C, foram mantidas fixas durante operação. Os parâmetros que variaram durante a operação da destilação foram: temperatura do evaporador a 175°C, taxa de alimentação a 2,5 l/h e temperatura do trocador de calor a 80°C. O produto final foi um óleo

composto por 60% de DAG e 40% de TAG, o qual é adequado, por exemplo, para a fabricação de margarinas.

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra o aparato utilizado no SPD, (Damstrup, Abildskov, Kill, Jensen, Sparso, & Xu, 2008).

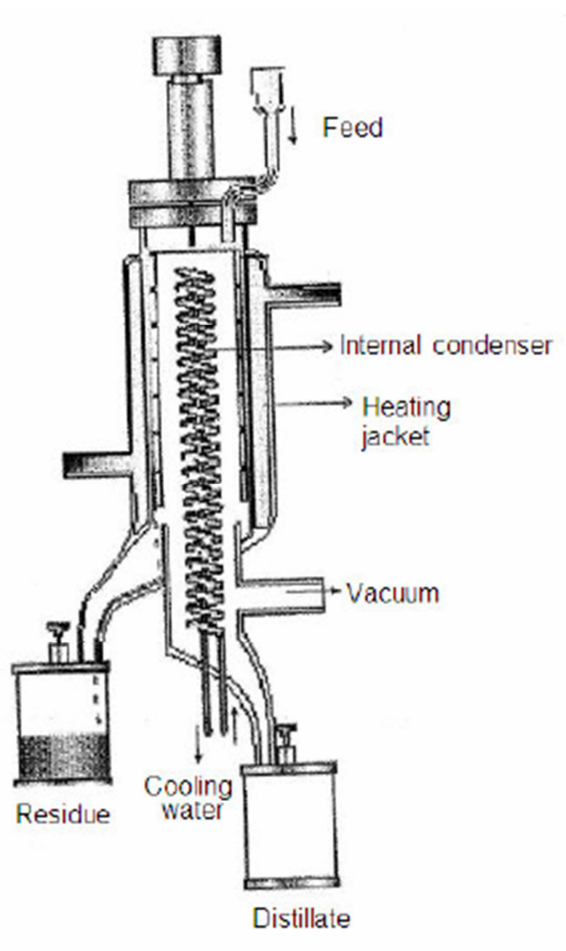


Figura 9 - Desenho esquemático do *short path distillation* (SPD).

2.3.2 Destilação Molecular

A destilação molecular consiste no processo de separação e purificação de substâncias termicamente sensíveis e com baixa pressão de vapor, assim como de líquidos. Este método de separação não se trata de uma destilação propriamente dita, pois a separação dos compostos ocorre por diferença de suas massas moleculares e não através de equilíbrio entre fases. Deste modo, a destilação molecular é considerada uma técnica de um processo de não equilíbrio.

Fregolente et al. (2009) estudaram a destilação molecular dos acilgliceróis produzidos pela glicerólise enzimática à partir do óleo de soja. A destilação molecular foi realizada em sistema tipo “cascata”, com realimentação do destilador com o material obtido na corrente de

resíduo. Assim, a máxima recuperação de MAG foi obtida na corrente de destilado resultando na diminuição gradativa da concentração deste composto na corrente de resíduo. (Fregolente, Pinto, Wolf-Maciel, Maciel Filho, & Batistella, 2009).

No trabalho de Fregolente et al. (2009) foi utilizado um destilador molecular centrífugo da marca *Myers Vaccum Inc.* com área de evaporação de 0,0046 m². Um esquema simplificado deste equipamento é mostrado na Figura 10. A mistura foi aquecida a uma temperatura de alimentação (TA) de 60°C e alimentado no centro do evaporador por uma bomba dosadora a uma vazão pré- estabelecida. Pela ação da força centrífuga um fino filme líquido é formado uniformemente na superfície do evaporador, que é aquecido por resistências elétricas. A velocidade de rotação do evaporador foi de 1350 rpm. A temperatura do evaporador (TE) variou de 100 a 250 °C. Uma fração mais leve do material a ser destilado foi evaporada na superfície do evaporador, a qual atingiu a superfície do condensador aquecida a uma temperatura do condensador (TC) de 60 °C, assim foram mantidas as temperaturas das correntes de saída de destilado e resíduo (TD e TR, respectivamente). A Pressão (P) da câmara de vácuo atingiu 0,10 mmHg.

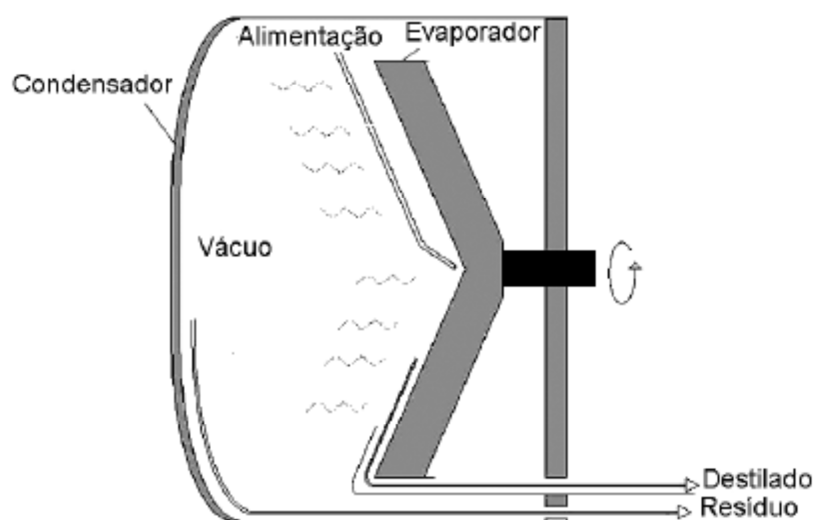


Figura 10 - Esquema do destilador molecular

A composição da corrente de alimentação foi continuamente alterada a cada aumento da temperatura do evaporador (TE). Sendo assim, a recuperação de MAG em cada etapa de destilação é diferente. O cálculo de recuperação de um determinado componente é determinado pela Equação 8:

$$\%R_N = \frac{100 \times \text{Destilado}_N}{\text{Alimentado}_N} \quad (8)$$

Onde N é o componente escolhido e R a porcentagem de recuperação de N .

As recuperações de MAG, bem como as concentrações de MAG destilado (DMG), a diferentes temperaturas e vazões de alimentação são apresentadas na Tabela 4, adaptada de (Fregolente, Pinto, Wolf-Maciel, Maciel Filho, & Batistella, 2009).

Tabela 4 - Recuperação de MAG a diferentes TE e vazões de alimentação.

Temperatura (°C)	Q (mL/min)	DMG (%)	Recuperação de MAG (%)
190	6,2	47,84	0,21
190	10,3	63,09	14,14
230	6,3	65,18	42
230	10,6	79,06	28,8
250	6,4	76,85	47,42
250	10,5	80,01	35,07

Observa-se que a recuperação de MAG é sempre maior quando a vazão (Q) é menor. Isto se deve ao tempo de residência na superfície do evaporador, a concentração de DMG é diminuída quando Q é menor porque todas as moléculas apresentam disponibilidade de evaporação, diluindo a concentração (%) de MAG na corrente de destilado. Quando Q é aumentada, o tempo de cada componente na superfície do evaporador diminui e tornando a condição mais favorável aos mais voláteis de evaporarem nas condições fixadas como, por exemplo, os MAG evaporam, aumentando assim a concentração e a recuperação dos compostos mais leves na corrente de destilado.

O óleo resultante da corrente de resíduo após todas as etapas de destilação, conforme pode ser observado na Figura 11, apresentou maior concentração de DAG, na ordem de 54%. A composição do óleo de DAG apresentou 30,57% de TAG, 54,03% de DAG, 14,19% de MAG, 1,21% de AGL e 0% de GL. Além disso, o óleo de DAG obtido após todos os estágios de destilação apresentou coloração e odor semelhante ao óleo de soja original, mesmo após os aquecimentos a que foi submetido durante o processo. As propriedades do óleo de DAG foram preservadas, uma vez que a destilação molecular realizada em destilador centrífugo permite que o óleo a ser destilado permaneça em contato com o evaporador durante o tempo equivalente a 0,2-1 segundo. Este curto tempo de exposição do óleo às altas temperaturas faz com que as moléculas a serem destiladas sejam evaporadas sem ocasionar degradação excessiva do material, oxidação demasiada ou perda das características que tornam o óleo de DAG um potencial substituto do óleo de TAG na dieta humana.

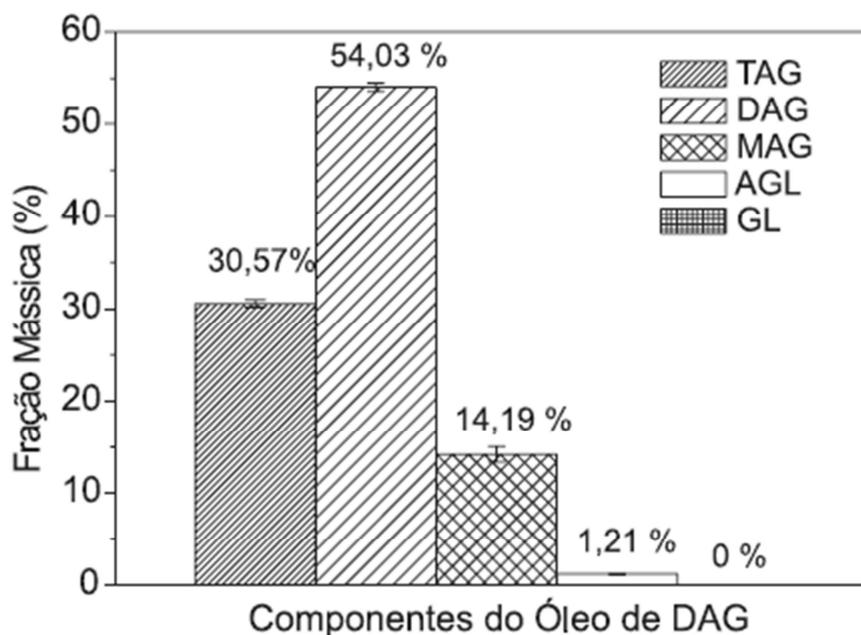


Figura 11 - Composição do óleo de DAG final após ultima etapa de destilação. TE = 250 °C, Q = 10 mL/min, P = 0,15 mm Hg

2.3.3 Extração líquido-líquido

O processo de extração por solventes está baseado no princípio de que o soluto se distribui entre dois solventes imiscíveis através do contato entre as fases. A distribuição do soluto depende de sua preferência por um ou outro líquido, que está diretamente relacionado com sua solubilidade em cada um deles. Uma separação parcial ocorre quando os componentes da mistura original têm solubilidades relativas diferentes na fase do solvente selecionado.

(Monick & Treyball, 1956) analisaram a extração líquido-líquido de MAG, DAG e TAG em solução aquosa de etanol. Os autores estudaram primeiro um sistema formado por trilaurina (TAG), dilaurina (DAG), etanol e água, e o outro formado por dilaurina (DAG), monolaurina (MAG) etanol e água, ambos foram avaliados a uma temperatura de 60°C. No equilíbrio, estes sistemas apresentaram duas fases, uma rica em etanol aquoso e a outra rica em acilgliceróis. Pode-se observar que as moléculas com maior número de hidroxilas (mais polares) tem mais afinidade com a fase rica em etanol aquoso quando comparadas com moléculas de menor número de hidroxilas (menos polares). A Figura 12 mostra os resultados obtidos neste estudo.

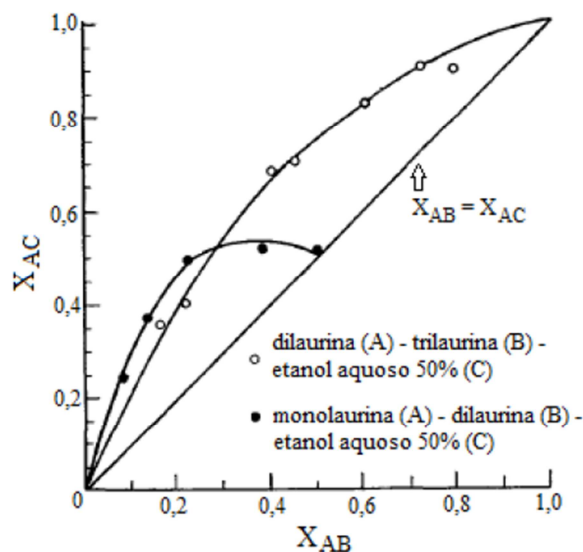


Figura 12 - Diagrama de distribuição de dilaurina-trilaurina-etanol aquoso e monolaurina-dilaurina-etanol aquoso a 60°C. X_{AB} = Fração mássica de A na fase rica em B (livre de C); X_{AC} = Fração mássica de A na fase rica em C (livre de C) - Adaptado de Monick e Treybal (1956).

Os autores também avaliaram o equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo MAG comercial, e puderam verificar que o sistema das misturas de TAG, DAG e MAG (“puros”) e os sistemas comerciais tiveram similaridade de distribuição. Por conveniência as misturas de TAG, DAG e MAG formados por um único tipo de ácido graxo foi chamado de sistema “puro”. Uma vez que os produtos comerciais que continham compostos insaturados e comprimentos de cadeias de ácidos gordos variaram de 8 a 18 átomos de carbono, concluiu-se que as diferentes estruturas entre os mono-, di-, e triacilgliceróis são os fatores de controle de extração líquido-líquido utilizando solventes polares. Esta conclusão é fundamental, pois nos permite admitir um conjunto de moléculas de MAG para uma mistura como um único pseudo-componente, podendo ser ampliado para a moléculas de TAG e DAG. Isto contribui para a realização de simulações de extração, visto que reduz consideravelmente o número de parâmetros estimados nos modelos de cálculo de coeficiente de atividade, por exemplo, UNIQUAC e NRTL.

Embora existam diversos estudos reportados na literatura relativos ao comportamento da cinética de reação seja por via química ou enzimática para a obtenção de DAG, ainda são escassos os trabalhos que reportam a etapa de purificação, sobretudo o comportamento do equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo DAG. Alguns autores sugerem o processo de extração líquido-líquido no refino de óleos vegetais em contrapartida da destilação (Gonçalves, Batista, & Meirelles, 2002); (Gonçalves & Meirelles, 2004) ; (Rodrigues, Antoniassi, & Meirelles, 2003) estudaram o equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo óleo de palma + ácido palmítico/oleico + etanol + água a 318.2 K. A concentração de água foi variada entre zero e 12,41 % em massa em relação ao etanol. No equilíbrio, havia a separação do sistema em duas fases, uma fase rica em etanol e a outra em óleo. Os autores ainda observaram que a adição

de água no solvente (entre zero e 6m% de água em etanol) provocava o aumento na seletividade do solvente podendo ser calculada pela Equação 9, e um decréscimo, ainda que pequeno no coeficiente de distribuição dos ácidos graxos livres obtidos pela Equação 10. O coeficiente de distribuição era fortemente alterado (decrécimo) quando a concentração de água era maior que 6m% com relação ao solvente (etanol).

$$k_i = \frac{w_i^{II}}{w_i^I} \quad (9)$$

$$S_{i/j} = \frac{k_i}{k_j} \quad (10)$$

onde, k_i é o coeficiente de distribuição do ácido graxo livre, k_j é o coeficiente de distribuição do óleo, w_i^{II} é a fração mássica de ácidos graxos livres na fase rica em etanol, w_i^I é a fração mássica de ácidos graxos livres na fase rica em óleo, e por fim $S_{i/j}$ é a seletividade do solvente para o ácidos graxo livre em relação ao óleo.

Pode-se concluir que a água no solvente faz com que este diferencie melhor os ácidos graxos livres dos triacilgliceróis. Os ácidos graxos livres são removidos sem que haja remoção significativa de óleo neutro. Notou-se ainda que os ácidos palmítico e oleico se distribuíram de forma bem similar.

Os autores ajustaram os parâmetros dos modelos NRTL e UNIQUAC, com dados experimentais obtidos. Ainda que o óleo de palma seja formado por uma mistura de diferentes moléculas de triacilgliceróis, o mesmo foi tratado como um único pseudo-componente onde a massa molar calculada por meio de média ponderada em relação à fração molar de triacilgliceróis presentes no óleo. Constatou-se que o sistema obtido estava bem ajustado para os modelos NRTL e UNIQUAC, o que permite a modelagem e simulação de extrator líquido-líquido que utilizam os solventes sugeridos no trabalho.

Kanda (2013) estudou o Equilíbrio Líquido-Líquido (ELL) de sistemas ternários, determinando curvas binodais e linhas de amarração para os sistemas palmitato de etila + etanol + água e palmitato de etila + etanol + glicerol a 25 °C, 40 °C e 55 °C; e para o sistema ácido palmítico + etanol + água a 65 °C. A consistência dos resultados das linhas de amarração foi testada através da utilização dos modelos de Othmer-Tobias e Hand. Os dados experimentais de ELL foram modelados com os modelos de NRTL, UNIFAC-LL, UNIFAC-Dortmund e UNIQUAC. Para os sistemas palmitato de etila + etanol + água (ou glicerol), o modelo UNIFAC-LL apresentou bons resultados, já para o modelo UNIFAC-Dortmund não, prevendo inclusive a formação de duas fases líquidas entre palmitato de etila e etanol. Os modelos NRTL e UNIQUAC mostraram-se adequados para a correlação dos dados. Para o sistema com ácido palmítico, todos os modelos apresentaram desvios maiores, com desvio médio quadrático (rmsd) e desvio absoluto (AD) entre 7% e 10% para os modelos UNIFAC, enquanto os modelos NRTL e UNIQUAC apresentaram estes desvios na faixa entre 2,5% e 4,5%. Os resultados de ELL obtidos neste trabalho para o sistema ternário palmitato de etila +

(Voll, Kanda, Filho, & Corazza, 2013) realizaram um estudo sobre o equilíbrio líquido-líquido do óleo de palma hidrolisado com etanol e água. A hidrólise foi realizada utilizando a lipase *Lipozyme* RM IM com tempo de reação de 72 horas. O óleo hidrolisado apresenta em sua composição final TAG, DAG, MAG e AGL. Os dados experimentais do ELL do sistema contendo (TAG+DAG+MAG+AGL) + etanol e água foram utilizados para obtenção dos parâmetros de interação do modelo UNIQUAC, onde as predições de equilíbrio líquido-líquido foram efetuadas por meio do cálculo da minimização da energia livre de Gibbs. O modelo UNIQUAC ajustou-se bem aos dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido deste sistema no qual apresentou valor do desvio médio quadrático (rmsd) menor do que 0,58%. O sistema inteiro envolveu 30 parâmetros de interação do modelo UNIQUAC e foi estudado considerando-se o sistema todo, isto é, sem que houvesse divisão em subsistemas. Assim há somente uma faixa de condições reacionais na qual os dados são válidos.

2.4 Equilíbrio Líquido-Líquido (ELL)

O equilíbrio de um sistema ocorre sempre como o estado final de um sistema fechado ao fluxo de massa calor ou trabalho através das suas fronteiras e é caracterizado pelas seguintes condições: (a) o estado não varia com o tempo; (b) o sistema é uniforme ou é formado por subsistemas uniformes, sem gradientes de temperatura, pressão, velocidade ou concentração; (c) os fluxos de massa, calor ou trabalho entre o sistema e suas vizinhanças é zero; (d) a taxa líquida de todas as reações químicas é zero (Sandler, 2000). Os critérios de equilíbrio e estabilidade de um sistema são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Critérios de equilíbrio e estabilidade para um sistema.

Sistema	Restrição	Critério de Equilíbrio	Critério de Estabilidade
Sistema isolado, adiabático, como vizinhanças fixas	Energia interna e volumes constantes	$S=\text{máximo}$ $dS=0$	$d^2S<0$
Sistema isotérmico fechado com vizinhanças fixas	Temperatura e volume constantes	$A=\text{mínimo}$ $dA=0$	$d^2A>0$
Sistema isotérmico e isobárico	Temperatura e pressão constantes	$G=\text{mínimo}$ $dG=0$	$d^2G>0$
Sistema isotérmico e isobárico aberto, movendo-se na velocidade do fluido	Temperatura, pressão e massa constantes	$G=\text{mínimo}$ $dG=0$	$d^2G>0$

Aplicando-se os critérios anteriormente descritos para um sistema multicomponentes com presença de mais de uma fase, obtém-se o conjunto de Equações 11, 12 e 13:

$$T^I = T^{II} \quad (11)$$

$$p^I = p^{II} \quad (12)$$

$$G_i^{-I} = G_i^{-II} \quad \text{ou} \quad \mu^I = \mu^{II} \quad (13)$$

Algumas espécies químicas quando misturadas em determinadas concentrações podem não satisfazer o critério de estabilidade de $d^2G > 0$ e fazer com que o sistema se divida em duas ou mais fases líquidas de composições diferentes. Quando o sistema está em equilíbrio termodinâmico tem-se um caso de Equilíbrio Líquido-Líquido (Smith, Van Ness, & Abbott, 2007). Ou seja:

$$\frac{d^2(\Delta G / RT)}{dx_1^2} > 0 \quad (T, P)_{\text{constantes}} \quad (14)$$

Relacionando a fugacidade com o coeficiente de atividade, tem-se que:

$$\gamma_i = \frac{\hat{f}_i}{x_i \cdot f_i^0} \quad (15)$$

Duas ou mais fases líquidas podem coexistir no equilíbrio em temperaturas inferiores às observadas para o Equilíbrio Líquido-Vapor. E o efeito da pressão no coeficiente de atividade, γ , pode ser ignorado para a maior parte das aplicações práticas de ELL (Henley & Seader, 1981).

Assim, tratando-se de um caso binário a P constante e T reduzidas de tal forma que o

coeficiente de fugacidade possa ser desprezado, a

$$\frac{d^2(\Delta G / RT)}{dx_1^2} > 0 \quad (T, P)_{\text{constantes}}$$

(14) implica em:

$$\begin{cases} x_1^\alpha \gamma_1^\alpha = x_1^\beta \gamma_1^\beta \\ (1 - x_1^\alpha) \gamma_2^\alpha = (1 - x_1^\beta) \gamma_2^\beta \end{cases} \quad (16)$$

Especificando-se x_1^α, x_1^β ou T a resolução do sistema proposto pela Equação 16 é dado pelas Equações 17 e 18:

$$\ln \frac{\gamma_1^\alpha}{\gamma_1^\beta} = \ln \frac{x_1^\beta}{x_1^\alpha} \quad (17)$$

$$\ln \frac{\gamma_2^\alpha}{\gamma_2^\beta} = \ln \frac{1-x_1^\beta}{1-x_1^\alpha} \quad (18)$$

2.4.1 Diagramas de equilíbrio líquido-líquido

A representação mais usual de diagramas de equilíbrio líquido-líquido é a figura de um triângulo equilátero. Cada vértice representa um componente puro e cada lado representa uma mistura binária. Um exemplo pode ser visto na Figura 14.

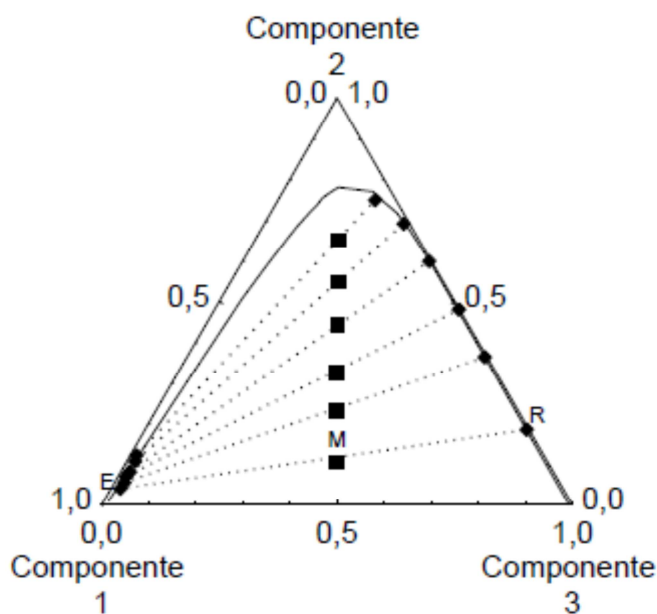


Figura 14 - Diagrama ternário para representação das composições de um sistema ternário

Neste diagrama pode-se visualizar a curva binodal, representada pela linha contínua, e que representa os limites de miscibilidade. Na região acima desta curva tem-se um sistema homogêneo e na região abaixo o sistema é heterogêneo e apresenta duas fases. Nesta região pode-se observar a presença das *tie-lines*. Estas linhas de amarração, representadas no diagrama pelas linhas tracejadas, indicam as composições das duas fases que estão em equilíbrio líquido-líquido (Sandler, 2000).

A Figura 15 representa um sistema ternário a temperatura constante em que se pretende separar, em seguida é relatado a forma de como é empregado o diagrama ternário para solução de problema de extração líquido-líquido.

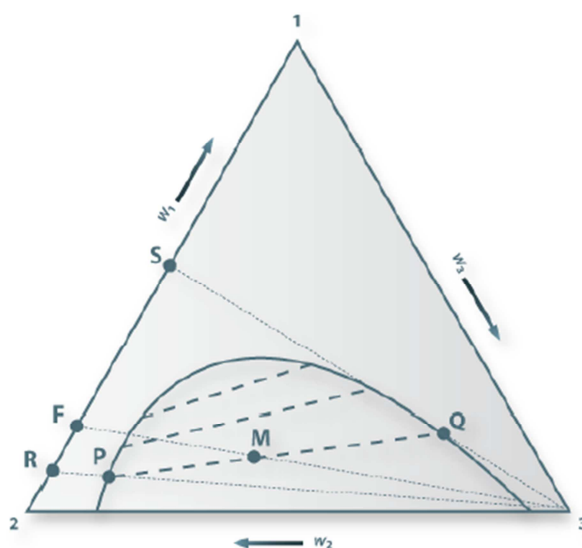


Figura 15 - Diagrama ternário a temperatura constante, adaptado de (Lobo & Ferreira, 2006)

A utilização do diagrama ternário em problemas de extração líquido-líquido: primeiro admite que se pretende separar as substâncias líquidas 1 e 2 existentes numa mistura (binária) inicial representada pelo ponto F. Adicionando quantidades crescentes de componente 3 (que se designa por solvente) à mistura F a composição global do sistema mover-se-á ao longo da reta [FM3]. Por adição de quantidade adequada do componente 3, a composição global do sistema (ternário) passa a ser representada pelo ponto M. Neste ponto o sistema é heterogêneo, separando-se em duas fases cujas composições são dadas pelos pontos P e Q.

A fase Q é mais rica no solvente (3). Esta fase, em terminologia de extração líquido-líquido, é chamada também de fase extrato (ou fase solvente). A fase P, que tem baixa concentração de solvente, denomina-se fase refinado (ou fase resíduo). Retirando gradativamente o solvente (3) da fase extrato (Q), por destilação ou outra operação equivalente, obtém-se um extrato livre de solvente de composição no ponto S na Figura 15, por exemplo. Do mesmo modo, o refinado (ou resíduo), R, é obtido da fase P pela retirada do solvente. Logo, a extração líquido-líquido começa pela adição de solvente à mistura binária inicial (F), com a separação das duas fases resultantes (P e Q) seguida de remoção do solvente (3) de cada uma das fases em equilíbrio, a mistura original (F) pode ser separada em duas outras misturas binárias (R e S). Comparando com a mistura inicial (F) a mistura S tem uma composição maior do componente 1 e a mistura R contém uma menor fração deste componente. Este princípio de separação pode ser repetido sequencialmente com vista à separação dos componentes 1 e 2 (completamente miscíveis) em extratos e refinados progressivamente mais ricos nos componentes (1 ou 2) que se querem separar por extração

líquido-líquido. É claro que a extensão do processo de extração está condicionada pela temperatura e pressão, pela área coberta pela curva de solubilidade e pela natureza do sistema ternário (Lobo & Ferreira, 2006).

2.5 Óleo de Oliva

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta frutífera da família botânica *Oleaceae*, sendo a única da espécie que origina frutos comestíveis, trata-se de uma planta de cultivo tão antigo quanto o trigo e a videira. O nome genérico olea vem do latim *oliva* (azeitona) ou do grego *elai* que significa óleo. O fruto maduro da oliveira, a oliva (azeitona), pode ser consumida ou usada para extração do azeite, um líquido amarelo-esverdeado, transparente e aromático, utilizado desde a antiguidade como ingrediente na culinária (Ramirez-Tortosa, Granados, & Quiles, 2006). A denominação azeite refere-se à extração do fruto, sendo que o óleo é proveniente da extração das sementes com auxílio de solventes (Boskou, 1996). Devido ao processo de extração, geralmente por prensagem mecânica, o azeite de oliva é considerado um produto natural de alta qualidade.

Há relatos de que a oliveira é originária de uma região geográfica não definida que se estende desde o sul do Cáucaso até as altas planícies do Irã, Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se pelo Chipre até o Egito. Posteriormente a espécie disseminou-se por muitos países da Europa e do Oriente Médio (Coutinho, Ribeiro, & Cappellaro, 2009); (Gomes, 1979).

O azeite de oliva é o principal produto obtido dos frutos da oliveira (*Olea europaea* Linné). Por suas características organolépticas é muito apreciado sendo largamente utilizado na dieta dos países situados na região do mar Mediterrâneo (Peixoto, Santana, & Abrantes, 1998)

Nos últimos anos, o cultivo de oliveiras adquiriu especial relevância em todo o mundo pelas propriedades benéficas do azeite de oliva à saúde humana (Oliveira, 2001b). Por exemplo, um dos fatores associados à baixa mortalidade por doenças cardiovasculares observada nas populações da região mediterrânea é a elevada ingestão de ácido oleico presente no azeite de oliva (Vognild, et al., 1998).

As características físico-químicas do azeite de oliva variam de acordo com o tipo de solo, clima, práticas culturais, variedades, estado de maturação do fruto e com as técnicas de extração. É importante enfatizar que o azeite de oliva, para ser comercializado, precisa apresentar-se dentro dos padrões da legislação vigente, com base em análises físico-químicas que o qualificarão dentro de determinadas classes específicas (Aued-Pimentel, Takemoto, Minazzi-Rodrigues, & Badolato, 2002).

No contexto mundial, o Brasil se posiciona entre os maiores importadores de azeite de oliva, não possuindo uma produção agrícola para atender ao mercado interno. Entre 1996 e 1998 houve um aumento de 44% nas importações, sendo a Argentina, Espanha e Portugal os principais fornecedores (Aued-Pimentel, Takemoto, Minazzi-Rodrigues, & Badolato, 2002) ; (Pio, et al., 2005).

O óleo de oliva contém aproximadamente 90% de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico o componente predominante e destes aproximadamente 10% são ácidos graxos poliinsaturados (Krüger, 2010). Quanto ao teor de acilgliceróis, o óleo de oliva tem 93,3% de TAG e 5,5% de DAG (Yanai, Tomono, Ito, Furutani, Yoshida, & Tada, 2007). Tanto a polpa como a semente do fruto da oliveira contém óleo e este é idêntico em ambos os casos (Krüger, 2010). Os principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva são: ácido oleico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1) e ácido esteárico (C18:0) (Krüger, 2010).

A Figura 16 mostra as estruturas químicas e a composição de ácidos graxos mais comuns presentes no azeite de oliva (Penz, 2010).

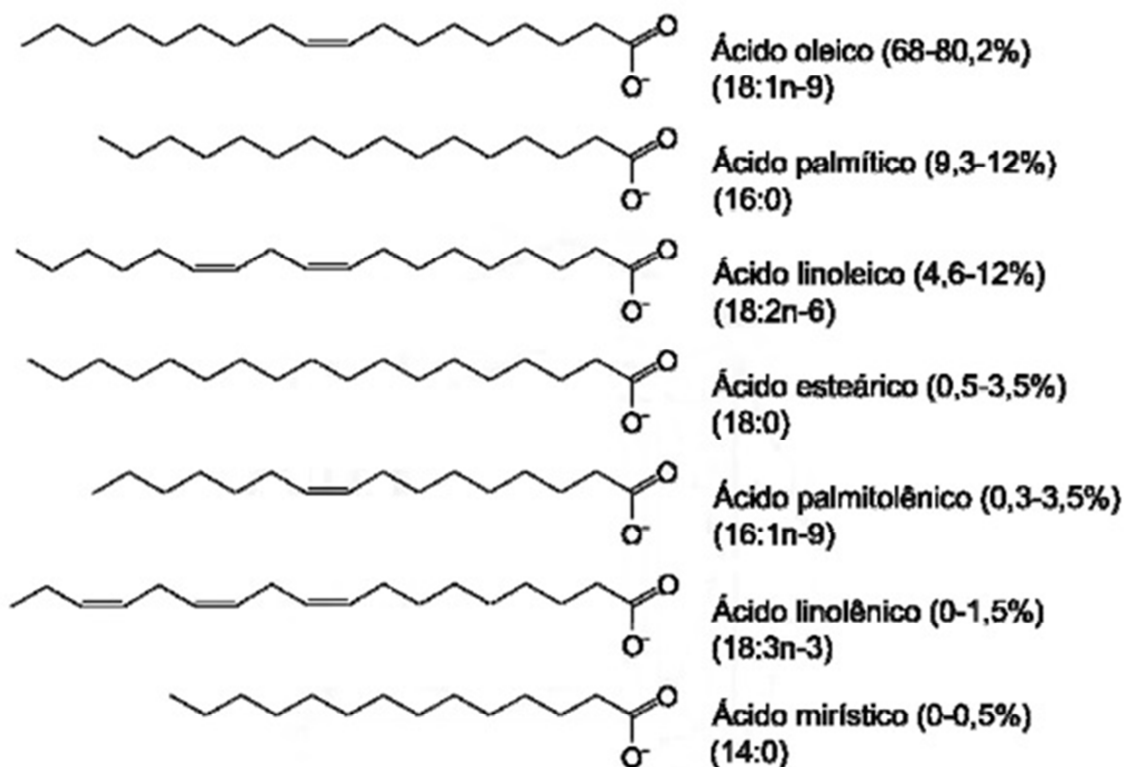


Figura 16 – Alguns ácidos graxos presentes no azeite de oliva com sua respectiva concentração.

2.6 Considerações Finais

A revisão da literatura mostra o destaque do óleo de oliva como matéria-prima para a produção de DAG e MAG, por sua homogeneidade e pela grande aceitação em dietas alimentares, devido a suas propriedades sensoriais agradáveis e também aos seus benefícios à saúde pelo seu consumo. A hidrólise enzimática mostra vantagens quando comparada com as rotas químicas, isto se deve ao fato da hidrólise acontecer em temperaturas e pressões mais brandas. Com isso a produção de DAG por via enzimática se torna mais atrativa, pois minimiza o consumo energético bem como a formação de produtos indesejáveis. A produção de um produto rico em DAG depende ainda de uma etapa de purificação tendo em vista que as rotas químicas e enzimáticas fornecem um produto com baixa concentração de DAG.

Foi constatado ainda, que a literatura é vasta em termos da produção de DAG via enzimática ou das reações para a produção de DAG, porém ainda é muito escassa no que se trata sobre os processos de purificação ou especificamente falando em processo de extração líquido-líquido.

Dentro deste contexto, este trabalho aborda a obtenção de dados do equilíbrio líquido-líquido de AGL + TAG a partir de uma mistura obtida pela hidrólise enzimática do óleo de oliva adicionada a uma solução de etanol e água. O processo de hidrólise tem fácil operação quando comparada com a reação de esterificação, e ainda apresenta problemas causados com o excesso de glicerol no meio.

O processo de extração líquido-líquido é de fácil condução por envolver temperaturas e pressões brandas, além dos solventes (etanol e água) utilizados serem de fácil obtenção e separação podendo ainda ser reaproveitados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para a etapa de obtenção do ácido graxo livre, através da reação de hidrólise, foi utilizado azeite de oliva extra virgem, água destilada e lipase comercial Lipozyme RM IM, utilizada como catalisador. Para a etapa de obtenção de dados de equilíbrio líquido-líquido, foram utilizados água destilada, etanol absoluto 99,5% (Neon®), azeite de oliva extra virgem, bem como o ácido graxo livre (97%) obtido na reação de hidrólise.

Com relação aos equipamentos utilizados, na etapa de reação de hidrólise, foi utilizado um béquer de 500 mL, um agitador mecânico e um banho Maria. Para a etapa de equilíbrio líquido-líquido, foi utilizado um banho termostático, células de equilíbrio encamisadas de 40 mL e um agitador magnético.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Quantificação de acidez

A quantidade de ácidos graxos presentes durante a reação de hidrólise foi quantificada realizando-se uma titulação com hidróxido de sódio (NaOH). Cerca de 1 g de amostra era retirada do meio reacional. Adicionou-se n-hexano à amostra para remover a fase polar da mistura. A amostra foi filtrada em papel de filtro para remover a enzima. A fase apolar da mistura foi separada e colocada em estufa à 120°C para garantir a remoção do solvente. Para a titulação, foi pesado em torno de 0,5 g da fase apolar e diluído em 50 mL de etanol. Com uma solução de NaOH (0,1mol/L), na presença do indicador fenolftaleína, titulou-se a amostra com agitação vigorosa até a mudança de coloração, de transparente para a cor rósea. Assim, anotou-se o volume gasto na titulação. A acidez do óleo foi calculada através da seguinte relação:

$$Acidez(m\%) = 100 \cdot \frac{Vol \cdot M_{NaOH} \cdot PM_{AGL}}{pa} \quad (19)$$

Onde:

Vol: Volume (L) da solução de NaOH gasto na titulação

M_{NaOH} : Molaridade da solução de NaOH (mol/L)

PM_{AGL}: Massa molar média dos ácidos graxos presentes no óleo oliva

pa: peso da amostra de óleo (g)

Considerando que o óleo de oliva apresenta diferentes tipos de ácidos graxos em sua composição (Figura 16), as moléculas de TAG e AGL foram tratadas como pseudo-componentes. A massa molar média do AGL foi calculada através de uma média ponderada (baseada na fração mássica) das massas molares dos ácidos graxos presentes no óleo de oliva informados pelo fabricante, conforme mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados encontrados na amostra do óleo de oliva

AGL	PM (g/mol)	x (Fração mássica)
Ácido Palmítico	256,429	0,158
Ácido Oleico	282,467	0,775
Ácido Linoleico	280,451	0,067

Assim, a massa molar utilizada foi 277,875 g/mol (media ponderada em relação à fração molar).

3.2.2 Quantificação de água

A concentração mássica de água em uma amostra foi determinada por titulação Karl Fisher.

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Reação de hidrólise

A reação de hidrólise enzimática do óleo de oliva foi conduzida em um reator de vidro (500 mL) em banho sob agitação mecânica de 300 rpm. Quantidades precisas de óleo (184,3702 g), água destilada (80% em relação à massa de óleo) foram inicialmente pesadas em uma balança de precisão diretamente no reator.

Os substratos foram mantidos sob agitação a 50 °C durante uma hora para estabilizar a temperatura. Em seguida adicionou-se a quantidade específica de enzima (1% em relação à massa de substratos) para que a reação tivesse início.

Ao final da reação, a composição do óleo hidrolisado (óleo de oliva após a reação) apresentava em seu conteúdo valor próximo a 97% em massa de AGL. O produto final do reator foi então filtrado com adição de n-hexano, utilizado com um diluente para diminuir a viscosidade da amostra, acelerando a etapa do processo de filtração. A amostra de óleo

hidrolisado foi destilada em rotaevaporador, no Laboratório de Pós-graduação em Engenharia Química, para a remoção do n-hexano.

3.3.2 Equilíbrio de fases líquido-líquido

Os experimentos de equilíbrio líquido-líquido foram conduzidos em uma célula de equilíbrio encamisada (40 mL), a qual foi mantida em temperatura constante (55°C ou 25 °C) por um banho termostático. Adicionava-se à célula de equilíbrio determinada quantidade de óleo de oliva, etanol absoluto, água destilada e ácidos graxos livres (geralmente três componentes, com exceção de um experimento). Em seguida o sistema era submetido a uma agitação magnética para promover contato íntimo entre as fases. Após cerca de 4 horas interrompia-se o processo de agitação para que houvesse completa separação das fases do sistema. A coleta de amostras de cada fase era realizada 24 horas após a suspensão da agitação.

A quantificação do óleo foi realizada evaporando-se o etanol e a água da mistura, a água quantificada por meio de titulação Karl Fisher, os ácidos graxos livres foram quantificados por titulação. Uma vez conhecidas às frações mássicas de material oleoso (TAG ou AGL) e da água, a fração mássica de etanol foi calculada por diferença.

O esquema básico dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido é ilustrado na Figura 17.

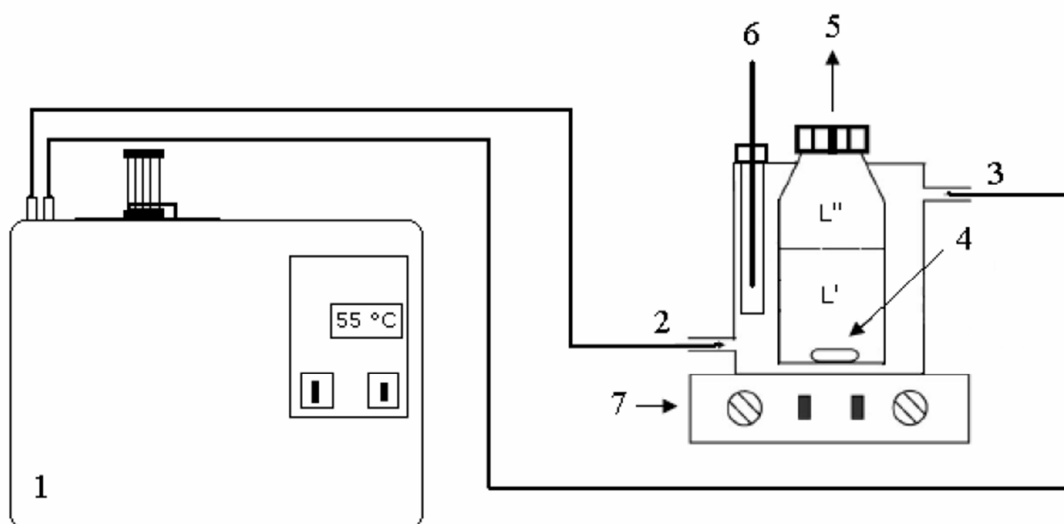


Figura 17- Esquema do experimento de equilíbrio líquido-líquido: 1- banho termostático; 2 e 3- circulação da água do banho; 4- barra magnética; 5- ponto amostragem; 6- termômetro; 7- agitador magnético.

3.4 Modelagem do Equilíbrio Líquido-Líquido do sistema TAG, AGL, Etanol e Água

3.4.1 Estimativa de parâmetros de Interação UNIQUAC

Os parâmetros de interação do modelo UNIQUAC (A_{ij} e A_{ji}) são estimados pela minimização da seguinte equação:

$$fob = \sum_f^{NF} \sum_n^{NL} \sum_i^{NC} \left(w_{in}^{f,exp} - w_{in}^{f,calc} \right)^2 \quad (20)$$

Sendo que para tanto a função deve obedecer às restrições do balanço de massa e de equilíbrio de fases com as seguintes equações:

$$\sum_i^{NC} x_{in}^{f,calc} = 1 \quad n = 1, \dots, NL \quad f = 1, \dots, NF \quad (21)$$

$$x_{in}^{f,calc} > 0 \quad i = 1, \dots, NC \quad n = 1, \dots, NL \quad f = 1, \dots, NF \quad (22)$$

$$x_{in}^{\alpha,calc} \cdot \gamma_{in}^{\alpha,calc} = x_{in}^{\beta,calc} \cdot \gamma_{in}^{\beta,calc} \quad i = 1, \dots, NC \quad n = 1, \dots, NL \quad (23)$$

$$w_{in}^{f,calc} = \frac{x_{in}^{f,calc} \cdot MM}{\sum_i^{NC} x_{in}^{f,calc} \cdot MM} \quad i = 1, \dots, NC \quad n = 1, \dots, NL \quad f = 1, \dots, P \quad (24)$$

E os valores de r_i e q_i para água e etanol são obtidos por:

$$r_i = \sum_k^{NG} v_{ki} \cdot R_k \quad (25)$$

$$q_i = \sum_k^{NG} v_{ki} \cdot Q_k \quad (26)$$

E os valores de r_i e q_i para o pseudo-componente ácido graxo livre do óleo de oliva (AGL):

$$r_i = \sum_m^{Nm} x_{mi} \cdot \sum_k^G v_{km} R_k \quad (27)$$

$$q_i = \sum_m^{Nm} x_{mi} \cdot \sum_k^G v_{km} Q_k \quad (28)$$

Para tanto, os valores de r_i e q_i para o TAG são obtidos por:

$$r_{TAG} = 3 \cdot (r_{AGL} - R_{CH_2} - R_{COOH} + R_{CH_2COO}) + r_{glicerol} - 3 \cdot R_{OH} \quad (29)$$

$$q_{TAG} = 3 \cdot (q_{AGL} - Q_{CH_2} - Q_{COOH} + Q_{CH_2COO}) + q_{glicerol} - 3 \cdot Q_{OH} \quad (30)$$

Durante o processo de minimização, as frações molares calculadas e os parâmetros de interação UNIQUAC são considerados as variáveis de decisão. Os parâmetros de interação UNIQUAC foram estimados com a ferramenta “solver” incluída no software Excel 2010 para Windows.

3.4.2 Predição do Equilíbrio Líquido-Líquido (Energia Livre de Gibbs de excesso)

Para a correlação dos coeficientes de atividade de sistemas binários há teorias baseadas no conceito de composição local. Assim é feita a suposição de que no interior de uma solução líquida são encontradas composições locais diferentes da composição global da mistura. Estas composições locais são responsáveis pelas orientações moleculares de curto alcance e não aleatórias que resultam nas diferenças no tamanho molecular e nas forças intermoleculares. Muitas equações para a correlação dos dados de ELL foram baseadas nesta teoria. Pode-se citar: Wilson, NRTL, UNIQUAC e UNIFAC.

O modelo UNIQUAC (Universal Quase-Chemical) foi desenvolvido com o auxílio de ferramentas da mecânica estatística e utiliza a fração de área local como variável primária de concentração. Assim obteve-se uma expressão que pode ser estendida a misturas de moléculas que diferem apreciavelmente em tamanho e forma.

A fração de área local é determinada representando a molécula por uma série de segmentos. Cada molécula é caracterizada por dois parâmetros estruturais: volume molecular relativo e área superficial relativa da molécula (Smith, Van Ness, & Abbott, 2007).

A soma dos potenciais químicos de cada componente de um sistema pode ser definida como sendo a Energia Livre de Gibbs Global (ELG). Com a minimização da ELG de um sistema de composição conhecida obtém-se o cálculo do equilíbrio líquido-líquido através da seguinte equação:

$$Gib = \sum_{i=1}^{NC} \sum_{f=1}^{NF} n_{if} \mu_{if} \quad (31)$$

Reescrevendo a equação anterior em termos de fugacidade dos componentes puros e considerando que todos os componentes estão na fase líquida, tem-se:

$$Gib = \sum_{i=1}^{NC} \sum_{f=1}^{NF} n_{if} \left(\mu_i^{0L} + R.T. \ln \left(\frac{f_{if}^L}{f_{if}^{0L}} \right) \right) \quad (32)$$

Por definição, tem-se:

$$f_{if}^L = x_{if} \cdot \gamma_{if} \cdot f_{if}^{0L} \quad (33)$$

E chega-se finalmente a:

$$Gib = \sum_{i=1}^{NC} \sum_{f=1}^{NF} n_{if} \left(\mu_i^{0L} + R.T. \ln(x_{if} \cdot \gamma_{if}) \right) \quad (34)$$

Tendo em vista que os valores dos potenciais químicos de referência não são relevantes para o cálculo do equilíbrio líquido-líquido (são constantes independente da distribuição das fases) e que não há reação química no processo, pode-se minimizar apenas a parte variável da equação, ou seja:

$$Z = \sum_{i=1}^{NC} \sum_{f=1}^{NF} n_{if} \cdot R.T. \ln(x_{if} \cdot \gamma_{if}) \quad (35)$$

Pode-se ainda rearranjar a equação de maneira a se ter a energia livre de Gibbs escrita em função do coeficiente de atividade e as frações molares dos componentes escritas em função no número de mols de i na fase j e do número de mols totais da fase j . Assim, obtém-se:

$$x_{if} = \frac{n_{if}}{n_t} \quad ; \quad n_t \cdot g_f^E = R.T. \sum_{i=1}^{NC} n_{if} \ln \gamma_{if} \quad (36)$$

$$Z = R.T. \sum_{i=1}^{NC} \sum_{f=1}^{NF} n_{if} \cdot (\ln n_{if} - \ln nt_f) + \sum_{f=1}^{NF} nt_f \cdot g_f^E \quad (37)$$

Sendo que a função Z a ser minimizada deve obedecer as restrições de balanço de massa e não negatividade do número de moles de acordo com as seguintes equações:

$$nt_i = \sum_f^{NF} n_{if} \quad i = 1, \dots, NC \quad (38)$$

$$n_{if} > 0 \quad i = 1, \dots, NC \quad f = 1, \dots, NF \quad (39)$$

O algoritmo de minimização da energia livre de Gibbs foi calculado pelo suplemento Solver do software Excel 2010. O suplemento XSEOS (Castier, 2010) foi utilizado para o cálculo dos coeficientes de atividade de cada componente em cada fase para o modelo UNIQUAC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Equilíbrio Líquido-Líquido

Os dados experimentais de ELL do óleo de oliva + ácidos graxos livres + etanol + água estão apresentados na Tabela 7. Estes dados experimentais foram utilizados para o ajuste dos parâmetros de interação do modelo UNIQUAC.

Tabela 7 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C

Composição global (Fração mássica)				Fase oleosa (Fração mássica)				Fase alcoólica (Fração mássica)			
$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
0	34,30	18,88	46,83	0	90,96	7,12	1,92	0	0,17	23,66	76,17
0	35,36	32,57	32,07	0	63,29	28,30	8,41	0	0,30	46,59	53,11
0	30,35	40,69	28,96	0	51,42	34,38	14,20	0	1,39	50,88	47,73
0	41,09	10,71	48,20	0	94,46	4,21	1,33	0	0,41	21,55	78,04
43,43	0	45,86	10,71	93,06	0	6,45	0,49	0,39	0	80,36	19,25
39,34	0	40,66	20,00	94,12	0	5,33	0,55	0,23	0	67,84	31,93
29,32	0	40,69	29,99	95,65	0	3,76	0,59	0,45	0	56,44	43,11
31,55	4,92	63,53	0	42,27	4,29	53,44	0	22,40	5,33	72,27	0
46,77	0	47,11	0	74,59	0	25,41	0	11,99	0	88,01	0

4.1.1 Determinação dos parâmetros UNIQUAC

Os valores de r_i e q_i para os componentes e pseudo-componentes que compõem o sistema estudado encontram-se na Tabela 8 e os parâmetros de A_{ij} e A_{ji} encontram-se na Tabela 9. Para o ajuste de parâmetros de interação foram utilizadas nove linhas de amarração experimentais (Tabela 7), englobando 52 informações experimentais para TAG, AGL, etanol e água. O erro dos dados experimentais e os valores calculados por minimização da energia livre de Gibbs (parâmetros estimados) foi obtida pela Equação 40.

$$EQM_i = \sqrt{\frac{\sum_0^{NOBS} (w_{io}^{exp} - w_{io}^{calc})^2}{NOBS}}$$

(40)

Tabela 8 - Parâmetros r_i e q_i para TAG (1), AGL (2), etanol (3) e água (4)

Composto	r_i	q_i
TAG	38,5601	31,2853
AGL	12,5541	10,3364
Etanol	2,5755	2,588
Água	0,92	1,4

Tabela 9 - Parâmetros A_{ij} e A_{ji} para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4)

Par ij	A_{ij} (K)	A_{ji} (K)
12	365,48	-243,27
13	211,87	- 43,969
14	875,56	- 152,08
23	153,23	- 136,72
24	116,75	1240,6
34	1434,4	- 425,96

4.1.2 Dados experimentais e preditos de equilíbrio líquido-líquido

A Figura 18 mostra os dados experimentais e os valores preditos pela minimização da energia livre de Gibbs do sistema AGL + etanol + água. Nota-se que a água é o componente com maior impacto na separação das fases, ou seja, para uma razão de etanol/óleo fixa na composição global, a adição da água acusa uma mudança significativa na composição das fases separadas. A concentração do óleo parece ser menos influente na separação das fases, e isto, pode ser observado pela inclinação das linhas de amarração. Para uma razão de água/etanol fixa, a adição de óleo acusa uma alteração de menor intensidade na composição das fases. Nos diagramas ternários apresentados nas Figuras 18 a 22, as linhas contínuas representam os valores calculados enquanto que os pontos representam os dados experimentais.

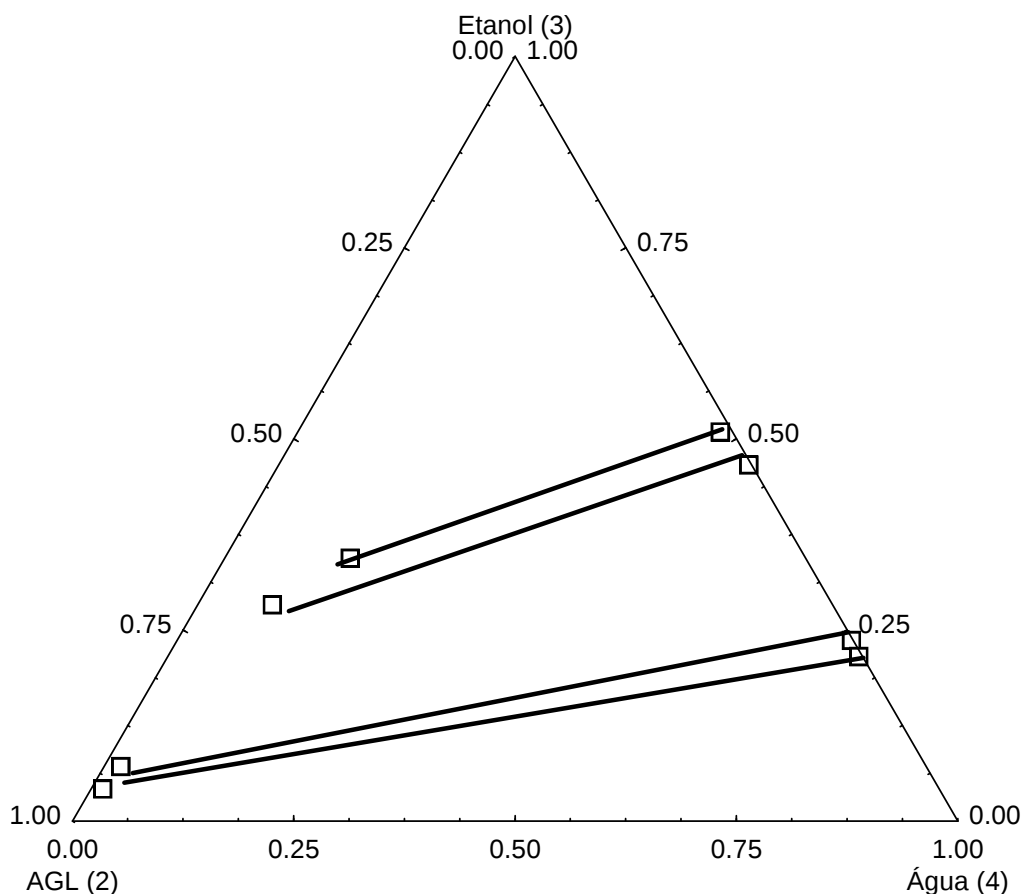


Figura 18 – Linhas de Amarração para o sistema ternário AGL (2) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C

Observa-se pela Figura 18 que existe uma miscibilidade completa do AGL com Etanol a 55°C. A água, entretanto, é completamente imiscível em AGL nas condições do experimento. Os cálculos indicam uma região de miscibilidade completa do sistema para concentrações de etanol acima de aproximadamente 65% em massa.

Na Figura 19 são apresentados os dados experimentais e os valores preditos pela minimização da energia livre de Gibbs do sistema TAG + etanol + água a 55°C.

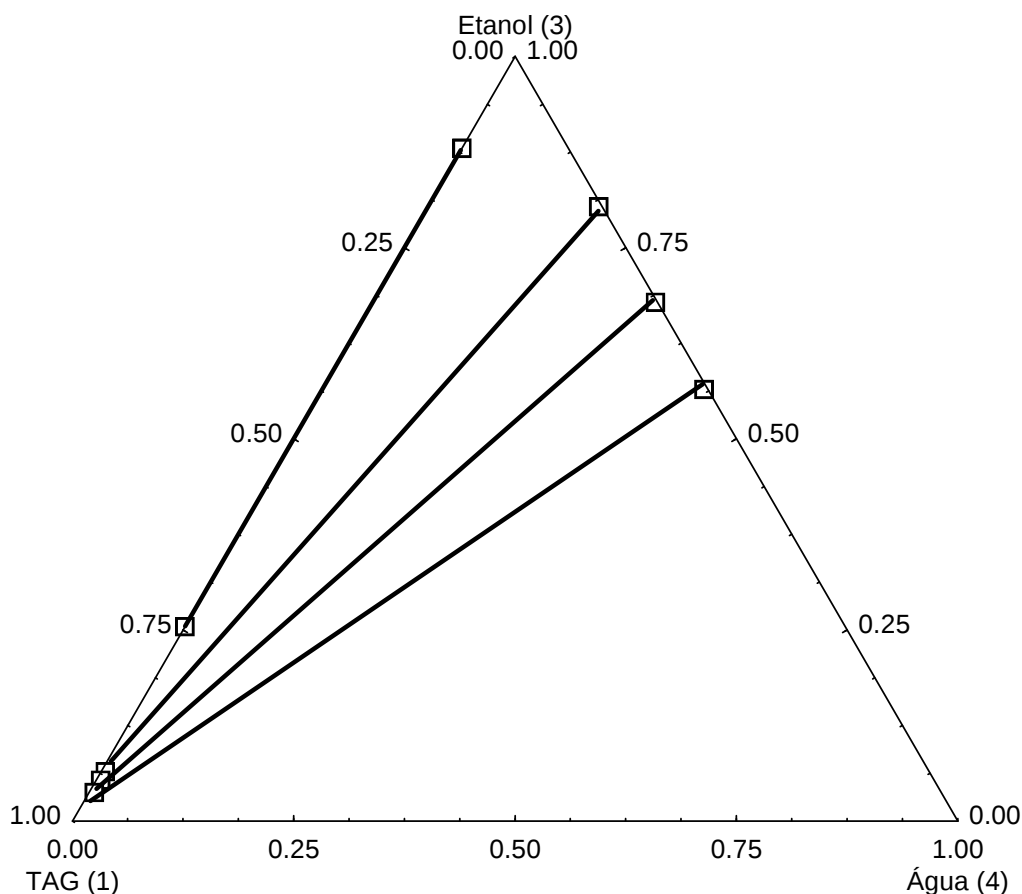


Figura 19 - Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C

Verificou-se experimentalmente que etanol não é completamente imiscível em TAG a uma temperatura de 55°C. Assim, temos uma pequena região de miscibilidade do sistema para baixas concentrações de água e altas concentrações de etanol. Pode-se observar na Tabela 7 que os experimentos foram realizados com pouca concentração global de água no sistema. Isso se deve ao fato de que, altas concentrações de água no sistema, a quantidade de TAG na fase alcoólica é muito baixa, tornando difícil em escala laboratorial quantificar os acilgliceróis.

Os dados experimentais e calculados para o sistema TAG +AGL + etanol estão ilustrados na Figura 20.

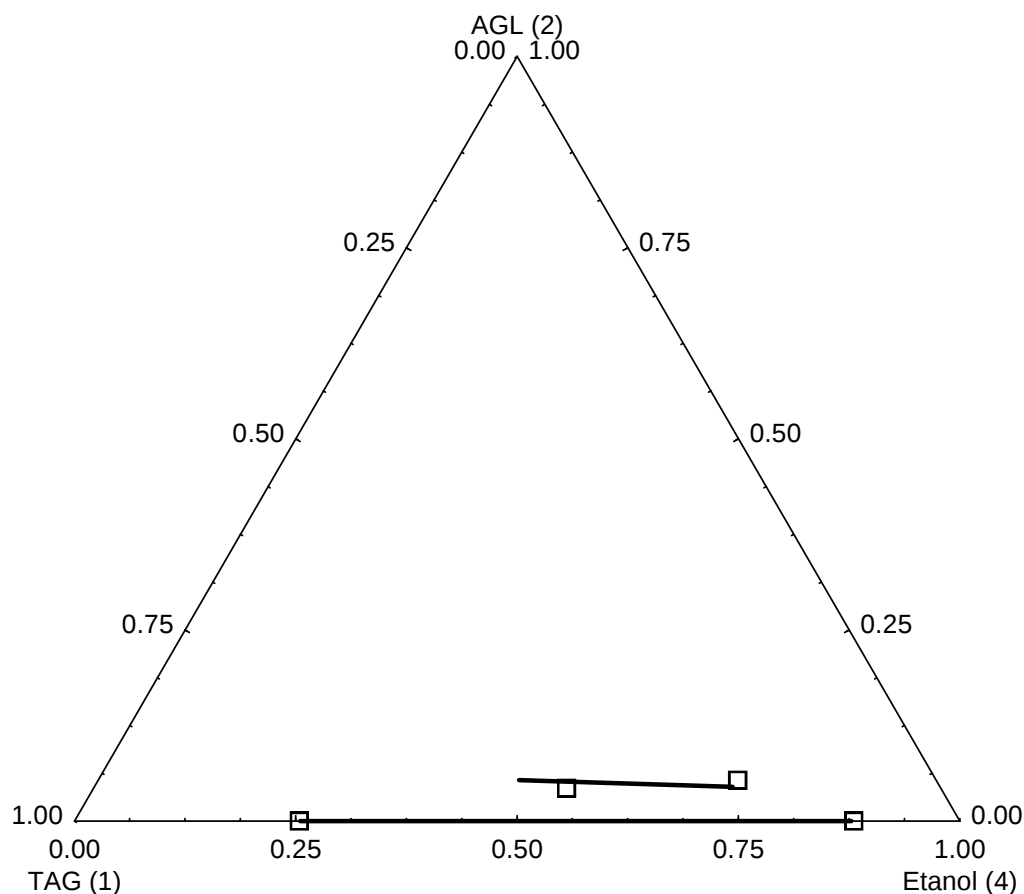


Figura 20 - Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + AGL (2) + Etanol (3) na temperatura de 55°C

A Figura 20 mostra que o AGL é completamente miscível em TAG e Etanol, e o sistema apresentado mostra uma grande região de miscibilidade. Os dados calculados ilustrados nas Figuras 18, 19 e 20, assim como os desvios entre estes resultados e os valores experimentais, estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Dados calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C

Fase oleosa				Fase alcoólica			
$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
0	90,02	6,29	3,68	0	1,52E-04	24,71	75,29
0	61,83	27,48	10,69	0	0,42	47,86	51,72
0	53,26	33,55	13,19	0	0,98	51,22	47,79
0	91,63	5,01	3,36	0	9,83E-08	21,32	78,68
91,75	0	7,79	0,45	0,69	0	79,82	19,50
95,17	0	4,23	0,60	0,39	0	68,12	31,49
96,65	0	2,62	0,73	0,24	0	57,13	42,63
47,08	5,35	47,57	0	23,40	4,48	72,12	0
74,50	0	25,50	0	12,25	0	87,75	0

Tabela 11 - Erro entre composição experimental e calculada do equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG (1) + AGL (2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C, em porcentagem mássica

Linhas de Amarração	Fase oleosa				Fase alcoólica			
	$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_2(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
1	0	0,94	0,83	1,76	0	0,17	1,05	0,88
2	0	1,46	0,82	2,28	0	0,12	1,27	1,39
3	0	1,84	0,83	1,01	0	0,41	0,34	0,06
4	0	2,83	0,80	2,03	0	0,41	0,23	0,64
5	1,31	0	1,34	0,035	0,30	0	0,54	0,25
6	1,05	0	1,10	0,050	0,16	0	0,28	0,44
7	1,00	0	1,14	0,14	0,21	0	0,69	0,48
8	4,93	1,72	6,65	0	1,67	1,46	3,13	0
9	0,09	0	0,09	0	0,26	0	0,26	0

Conforme indicado pela Tabela 11, os baixos valores do erro entre os dados experimentais e os calculados por minimização de energia livre de Gibbs indicam que o modelo UNIQUAC com os parâmetros ajustados utilizados é adequado na predição do equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG, AGL, etanol e água. O EQM obtido entre os dados experimentais utilizados no ajuste dos parâmetros do modelo UNIQUAC e os calculados por minimização da energia de Gibbs foi de 1,44 %.

Para a validação do modelo, foram realizados experimentos em condições diferentes daquelas usadas na estimação dos parâmetros, estes resultados foram então comparados com cálculos obtidos pelo modelo matemático. As Tabelas 12-17 apresentam os valores experimentais, calculados, e os desvios entre os dados.

Tabela 12 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C.

Composição global			Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
41,63	47,43	10,93	96,44	3,38	0,18	0,31	77,68	22,01
33,59	33,38	33,03	97,01	2,36	0,63	0,71	49,63	49,66
23,19	31,77	45,05	98,04	1,75	0,21	0,12	44,50	55,38

Tabela 13 - Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C (Razão de TAG(1):AGL(2) na composição global igual a 0,534:0,466)

Composição global			Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
44,05	45,31	10,64	95,92	3,28	0,80	0,06	29,10	70,84
38,44	39,35	22,21	91,14	8,86	1,52	0,07	35,97	63,96
33,13	33,62	33,25	85,68	11,85	2,47	0,52	47,65	51,83

Tabela 14 - Dados calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema Óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C (Razão de TAG(1):AGL(2) na composição global igual a 0,534:0,466)

Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
92,45	4,66	2,89	3,1E-03	28,63	71,36
89,37	7,23	3,40	1,83E-02	37,65	62,33
83,47	12,11	4,42	0,29	51,26	48,46

Tabela 15 - Dados Calculados de equilíbrio líquido-líquido para o sistema TAG (1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C

Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
94,48	5,17	0,34	0,49	77,25	22,26
97,88	1,49	0,63	0,22	50,31	49,47
98,12	1,20	0,68	0,17	44,99	54,84

Tabela 16 - Erro entre composição experimental e preditos pelo modelo no equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo ácido (1+2) + etanol (3) + água (4) a 55 °C, em porcentagem mássica

Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_{1+2}(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
3,47	1.38	2.09	0,057	0,47	0,52
1,77	1.63	1.88	0,052	1,68	1,63
2,21	0.26	1.95	0,23	3,61	3,37

Tabela 17 - Erro entre composição experimental e preditos pelo modelo no equilíbrio líquido-líquido do sistema TAG(1) + etanol (3) + água (4) a 25 °C, em porcentagem mássica

Fase oleosa			Fase alcoólica		
$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$	$w_1(\%)$	$w_3(\%)$	$w_4(\%)$
1,96	1,79	0,16	0,18	0,43	0,25
0,87	0,87	0,00	0,49	0,68	0,19
0,08	0,55	0,47	0,05	0,49	0,54

Observando-se os baixos valores de erro nas Tabelas 15 e 16 percebe-se que o modelo utilizado no trabalho tem boa capacidade de prever resultados de equilíbrio de fases do tipo líquido-líquido para um sistema TAG + AGL + etanol + água. O EQM obtido entre os dados experimentais que não foram utilizados no ajuste dos parâmetros do modelo UNIQUAC e os calculados por minimização da energia de Gibbs foi de 1,47 %.

Na Figura 21 e na Figura 22 estão representados os diagramas ternários dos sistemas utilizados para validação do modelo matemático.

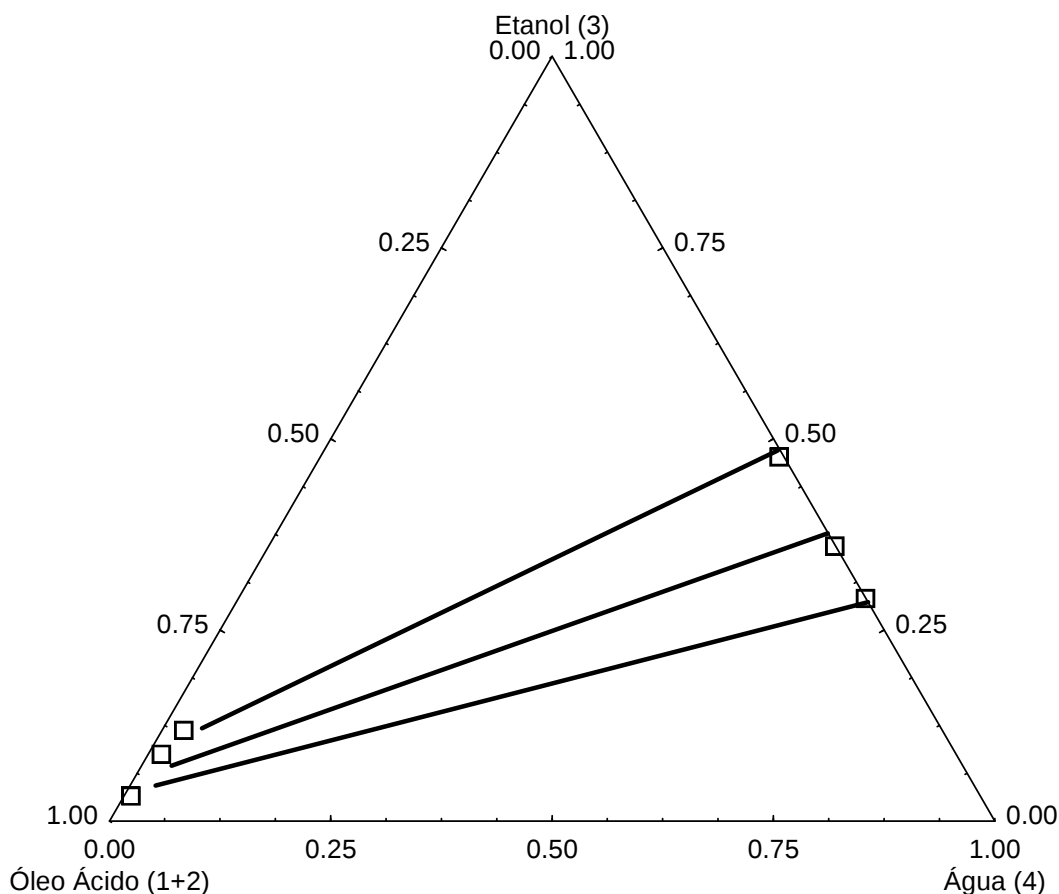


Figura 21 - Linhas de Amarração para o sistema ternário Óleo ácido (1+2) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 55°C

A Figura 21 é uma representação ternária de um sistema quaternário, ou seja, um sistema pseudo-ternário, onde o pseudo-componente “óleo ácido” (1+2) é composto por TAG+AGL (53,4%/46,6% m/m). Tendo em vista que o AGL é mais miscível em etanol quando comparado com o óleo, é natural que o perfil encontrado na Figura 21 seja um intermediário aos resultados das Figuras 18 e 19, o que mostra certa coerência entre os resultados obtidos.

A Figura 21 indica que o modelo prediz bem a separação de fases do “óleo ácido” (TAG+AGL), etanol e água. Deve-se lembrar de que a Figura 21 representa uma mistura pseudo-ternária de um sistema de quatro componentes. Uma vez que existe a diferença de hidrofobicidade entre as moléculas de TAG e AGL, suas composições relativas se diferem em cada fase e em cada linha de amarração.

Com relação às linhas de amarração obtidas verifica-se que as composições calculadas estão muito próximas ou são coincidentes com os valores obtidos experimentalmente. A inclinação obtida sugere que as linhas de amarração estão coerentes, uma vez que está variando suavemente e muito próximos aos pontos experimentais para este sistema.

Os pontos preditos na Figura 21 foram obtidos pelo modelo UNIQUAC ajustado. Aqui se avaliou a robustez do modelo com pontos experimentais que não fizeram parte da função objetivo de ajuste de parâmetros do modelo.

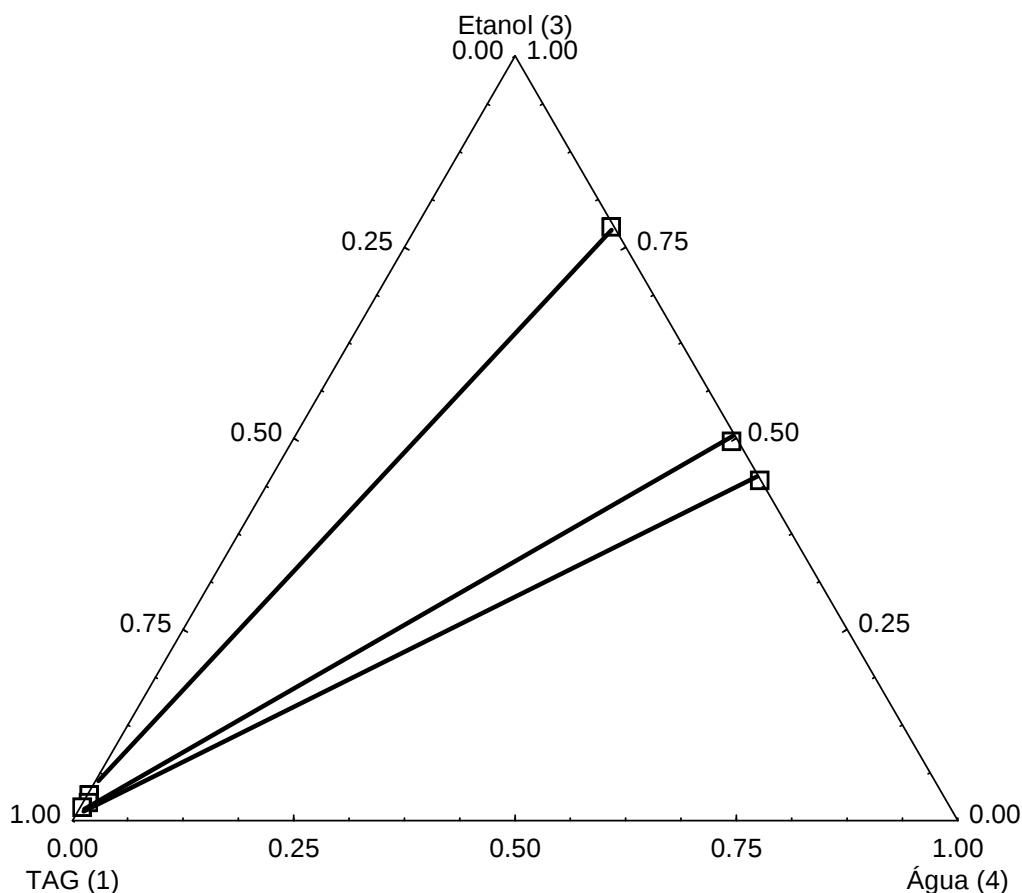


Figura 22- Linhas de Amarração para o sistema ternário TAG (1) + Etanol (3) + Água (4) na temperatura de 25°C

Assim como para a Figura 21, os valores preditos pelo modelo e representados na Figura 22, partiram de valores experimentais a uma temperatura de 25°C e que também não fizeram parte do ajuste de parâmetros para o modelo.

Observa-se na Figura 22 que o etanol não é completamente imiscível em TAG a uma temperatura de 25°C, porém com era esperado, com intensidade menor quando comparado a uma temperatura de 55°C, conforme verificado na Figura 19. A Figura 22 mostra também uma pequena região de miscibilidade do sistema para baixas concentrações de água e altas concentrações de etanol.

A Figura 22 indica ainda que o modelo prediz bem o sistema contendo TAG, etanol e água. Com relação às linhas de amarração obtidas verifica-se que as composições calculadas

estão muito próximas ou são coincidentes com os valores obtidos experimentalmente. A inclinação obtida sugere que as linhas de amarração estão coerentes, uma vez que está variando suavemente e muito próximos aos pontos experimentais para este sistema.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizado um estudo experimental e teórico sobre o comportamento do equilíbrio de fases líquido-líquido. A partir dos resultados obtidos, é possível destacar algumas conclusões sobre o comportamento de equilíbrio de fases líquido-líquido.

A reação de hidrólise parcial do óleo de oliva (TAG) na presença da enzima comercial lipase Lipozyme RM IM gerou um produto composto por 97% em massa de ácidos graxos livres (AGL).

O modelo UNIQUAC ajustou-se bem aos dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido do óleo de oliva e ácidos graxos livres com água e etanol. As predições de equilíbrio líquido-líquido por meio do cálculo da minimização da energia livre de Gibbs (utilizando o modelo UNIQUAC no cálculo dos coeficientes de atividade) geraram resultados próximos aos experimentais, o que validou esta abordagem matemática.

Os dados experimentais e teóricos obtidos e apresentados neste trabalho representam uma contribuição no sentido do levantamento e disponibilização de informações termodinâmicas de sistemas de interesse em processos de purificação do DAG.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podem ser feitas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar estudos do comportamento do equilíbrio líquido-líquido com diferentes tipos de óleos vegetais.
- Realizar a modelagem termodinâmica do equilíbrio líquido-líquido para este utilizando outros modelos, como o NRTL.
- Realizar experimentalmente as etapas de extração líquido-líquido para obtenção de um óleo de oliva rico em DAG.
- Avaliar as características físicas do óleo de oliva rico em DAG a partir da extração líquido-líquido.
- Realizar estudos sobre a otimização do processo de extração líquido-líquido para purificação de DAG produzido a partir da glicerólise enzimática.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aparicio, R., & Harwood, J. (2003). Manual del Aceite de oliva. Madri: Ediciones y Mundi-prensa Madri.
- Aued-Pimentel, S., Takemoto, E., Minazzi-Rodrigues, R., & Badolato, E. (2002). Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69-75.
- Awadallak, J. (2012). *Uso de Ultrassom na Hidrólise Enzimática do óleo de Palma: Síntese de Dialciglicerol*. Toledo - PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- Babicz, I. (2009). *Produção de Diacilgliceróis via Hidrolise Enzimática de óleo de Palma*. Rio de Janeiro: UFRJ.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: A critical review. *Eur J. Lipid Sci Technol*, 102, 133-153.
- Blasi, F., Cossignani, L., Simonetti, M., & Damiani, P. (2007). Biocatalysed synthesis of sn-1,3 diacylglycerol oil from extra virgin olive oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 727-732.
- Boskou, D. (1996). Olive Oil. (AOCS, Ed.) *Chemistry and Technology*.
- Boyle, E., & German, J. (1996). Monoglycerides in Membrane System. *Critical reviews in food science and nutrition*, 785-805.
- Castier, M. (2010). Thermodynamic Properties using Excess Gibbs Free Energy Models and Equations of State. United Arab Emirates.
- Cheong, L., Tan, C., Long, K., Yussof, M., Arifin, N., Lo, S., et al. (2007). Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, 1614-1622.
- Costa, I. (2009). *Utilização de Lipozyme RM IM na produção de diacilgliceróis a partir do óleo de palma*. Rio de Janeiro.
- Coutinho, E., Ribeiro, F., & Cappellaro, T. (2009). Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). *Embrapa Clima Temperado*.
- Damstrup, M., Abildskov, J., Kill, S., Jensen, A., Sparso, F., & Xu, X. (2008). Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 7113-7119.
- Ferreira-Dias, S., Correia, A., & da Fonseca, M. (2003). Response Surface Modeling of Glycerolysis Catalyzed by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Different Polyurethane

- Foams for the Production of Partial Glycerides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, pp. 71-80.
- Ferreira-Dias, S., Correia, A., Baptista, F., & Fonseca, M. (2001). Contribution of repose surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 699-711.
- Fregolente, L. (2006). *Obtenção de monoglicerídeos de alta concentração através do processo de destilação molecular*. Campinas: UNICAMP.
- Fregolente, P., Pinto, G., Wolf-Maciel, M., Maciel Filho, R., & Batistella, C. (2009). Produção De Monoacilgliceróis E Diacilgliceróis Via Glicerólise Enzimática E Destilação Molecular. *Química Nova*, 1539-1543.
- Freitas, L., Bueno, T., Perez, V., & Castro, H. (2008). Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações . *Química Nova* , 1514-1521.
- Gomes, R. (1979). *A olivicultura no Brasil*. São Paulo: Nobel.
- Gonçalves, C., & Meirelles, A. (2004). Liquid-liquid equilibrium for the system palm oil + fatty acids + ethanol + water at 318.2K. *Fluid Phase Equilibria*, 139-150.
- Gonçalves, C., Batista, E., & Meirelles, A. (2002). Liquid-liquid equilibrium data for the system corn oil + oleic acid + ethanol + water at 298.15K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 416-420.
- Granero, M., Rodrigues, C., & Gonçalves, C. (2012). Liquid-Liquid Equilibrium Data for the System Lard + Oleic Acid + Ethanol + Water at 318.2 K: Cholesterol Distribution Coefficients . *J. Chem. Eng. Data*, 1728-1736.
- Hackbart, L. (2007). *Equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo fenol-água-solvente: obtenção e modelagem termodinâmica*. Curitiba.
- Henley, E. J., & Seader, J. D. (1981). *Equilibrium-Stage Separation Operations in Chemical Engineering*. New York: John Wiley & Sons.
- Henning. (2014). *Lípídeos e Ácidos Graxos*. Acesso em 07 de 2014, disponível em USP: http://www2.iq.usp.br/docente/henning/Disciplinas/Bioquimica%20QBQ230N/acidos_graxos.pdf
- IUPAC. (1997). *Pure Appl Chem*. 69, 1613-1632.
- Jaeger, K., Dijkstra, B., & Reetz, M. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, 3-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbial*, 53, 315-351.
- Kanda, L. (2013). *Estudo do equilíbrio líquido-líquido e de propriedades de excesso em sistemas envolvendo palmitato de etila, ácidos graxos livres, álcoois, água e glicerol*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

- Kristensen, J., Xu, X., & Mu, H. (2005). Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipase. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 329-334.
- Krüger, R. (2010). *Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva*. Florianópolis.
- Lobo, L. Q., & Ferreira, A. G. (2006). *Termodinâmica e Propriedades Termofísicas*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Matias, A., & Lasta, F. (2001). Calidad y estabilidad del aceite de oliva. *Olivo: Estación Experimental Agropecuaria Catamarca*, 118-123.
- Meirelles, A., & Pina, C. (2000). Deacidification of Corn Oil by Solvent Extraction in a Perforated Rotating Disc Column. *JAOCs*, 77, 553-559.
- Meng, X., Zou, D., Shi, Z., Duan, Z., & Mao, Z. (2004). Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, 39, 37-41.
- Miller C., Austin, H., Posorke, L., & Gonzalez, J. (1988). Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 927-931.
- Ming, L., Yusoff, M., Koon, L., Ping, T., Yeok, L., Tahiruddin, S., et al. (2007). *Patente Nº EP1803819A2 - Process for the production of diacylglycerol*.
- Monick, J., & Treyball, R. (1956). Separation of monooglycerides and tryglycerides by liquid-liquid extraction. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 193-197.
- Oliveira, A. (2001b). *Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões in vitro de oliveira (olea europaea L.)*. Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C., Nigam, P., & Krieger, N. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Appl Biochem*, 119-131.
- Pawongrat, R., Xu, X., & H-Kittikun, A. (2007). Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chemistry*, 251-258.
- Peixoto, E., Santana, D., & Abrantes, S. (1998). Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva: Proposta para atualização da legislação brasileira. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 363-470.
- Penz, L. R. (2010). *Estudo das alterações físico-químicas do azeite de oliva após tratamento térmico*. Lajeado.
- Pina, C. G., & Meirelles, A. J. (May de 2000). Deacidification of Corn Oil by Solvent Extraction in a Perforated Rotating Disc Column. *Paper no. J9349 in JAOCs 77*, pp. 553–559.

- Pio, R., Bastos, D., Berti, A., Filho, J., Mourão Filho, F., Entelmann, F., et al. (maia/jun de 2005). Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. *Ciência e Agrotecnologia*, 562-567.
- Quintaes, K. (nov de 2005). Trans: A gordura do mal. *Vida e Saúde*, 10-15.
- R.M., & I.M. (2003). Lipozyme. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1201-1207.
- Ramirez-Torton, C., & Yaqoob, P. (2006). *Olive Oil and Health*. Londres.
- Ramirez-Tortosa, C., Granados, S., & Quiles, J. (2006). Chemical Composition, types and characterization of olive oil.
- Riegel, R. (2002). *Bioquímica*. São Leopoldo: Unisinos.
- Rodrigues, C., Antoniassi, R., & Meirelles, A. (2003). Equilibrium data for the system rice bran oil + fatty acids + ethanol + water at 298.2K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, pp. 367-373.
- Rousseau, D., & Marangoni, A. (1996). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Nova York: Akoh.
- Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Tan, Y. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. *Prog. Lip. Res.*, 507-558.
- Sandler, S. (2000). *Chemical and Engineering Thermodynamics*. Nova York: John Wiley & Sons.
- Schmid, R. (1987). Biotechnology: application to oleochemistry. *J. Am. Oil Soc.*, 563-570.
- Scrimgeour, C. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons.
- Seong-Koon, L., Chin-Ping, T., Kamariah, L., Mohd, S., & Oi-Ming, L. (2007). Diacylglycerol Oil-Properties, Processes and Products: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 223-233.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 19, 627-662.
- Shimizu, M., Moriwaki, J., Nishide, T., & Nakajima, Y. (2004). *Journal of Am. Oil Soc.*, 81, p. 571.
- Smith, J. M., Van Ness, H. C., & Abbott, M. M. (2007). *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química*. Rio de Janeiro: LTC.
- Sonntag, N. (1982). Glycerolysis of fats and methyl esters-status, reviews and critique. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 795-802.
- Sundram, K. (2014). *Palm Oil: Chemistry and Nutrition Updates*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Takase, H. (2007). Metabolism of diacylglycerol in humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 398-403.
- Tirapegui, J. (2006). *Nutrição - Fundamentos e Aspectos Atuais*. São Paulo: Atheneu.

- Tuter, M., & Aksoy, H. (2000). Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oil catalysed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of glycerolysis products. *Biotechnology Letters*, 31-34.
- Valério, A. (2009). *Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes de grau alimentício em sistemas livre de solvente*. Erechim, RS.
- Van Ness, H. (1980). *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois.
- Venkata Rao, P., & Lanxmanan, C. (1991). Lipase enzyme technology and its potential applications in the oils and fats industry. *Indian Chem Eng*, 33, 7-29.
- Villardi, H., Santos, M., & Pessoa, F. (s.d.). Estudo do Equilíbrio Líquido-Líquido de Sistemas envolvendo Biodiesel de Palma.
- Vognild, E., Elvevoll, E., Brox, J., Olsen, R., Bastard, H., Aursand, M., et al. (1998). Effects of Dietary Marine Oils and Olive Oil on Fatty Acid Composition, Platelet Membrane Fluidity, Platelet Responses, and Serum Lipids in Healthy Humans. *Lipids*, 33, 427-436.
- Voll, F. (2011). *Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do óleo de Palma*. Maringá.
- Voll, F., Kanda, L., Filho, L., & Corazza, M. (2013). (Liquid+liquid) equilibrium for the system (hydrolyzed palm oil+ethanol+water) for diacylglycerol enrichment. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 58, pp. 1-7.
- Voll, J., & Brito, M. (2010). Metabolismo de características nutricionais do óleo 1,3-diacilglicerol. *Revista Saúde e Pesquisa*, 121-126.
- Wang, L., Wang, Y., Cao, C., Yang, X., & Zhao, M. (2011). Preparation of Diacylglycerol - Enriched Oil from Free Fatty Acids Using Lecitase Ultra-Catalyzed Esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*
- Watanabe, T., Sugiura, M., Sato, M., Yamadab, N., & Nakanishi, K. (2005). Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, 637-643.
- Yamaguchi, S., & Mase, T. (1991). High yield of synthesis of monoglyceride by mono- and diacylglycerol lipase form *Penicillium camemberrtti* U-150. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 162-167.
- Yamamoto, K., Asakawa, H., Torunaga, H., Watanabe, H., Matsuo, N., Tokimitsu, I., et al. (2001). Long term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerol in type II diabetes patients with hyperglyceridemia. *Journal of Nutrition*, 3204-3207.
- Yamamoto, K., Takeshita, M., Tokimitsu, I., Watanabe, H., Mizuno, T., Asawaka, H., et al. (2006). Diacylglycerol oil ingestion in type-2 diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Nutritioin*, 22, pp. 22:23-29.

- Yanai, H., Tomono, Y., Ito, K., Furutani, N., Yoshida, H., & Tada, N. (2007). Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome. *Nutrition Journal*, 43.
- Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., & Xu, X. (2005a). Monoacylglycerols synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. *Journal of food lipids*, 12, 299-312.
- Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., & Xu, X. (2005b). Enzymatic Production of Monoacylglycerols Containing Polyunsaturated Fatty Acids through an Efficient Glycerolysis System. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1475-1481.
- Yasukawa, T., Katsuragi, Y., Matsuo, N., Flickinger, B., Tokimitsu, I., & Matlock, M. (2004). Diacylglycerol Oil. *AOCS Press: Champaign*, pp. 1-15.
- Ziller, S. (1996). Grasas y Aceites Alimentarios. 7ª, 71. Zaragoza: Acribia.