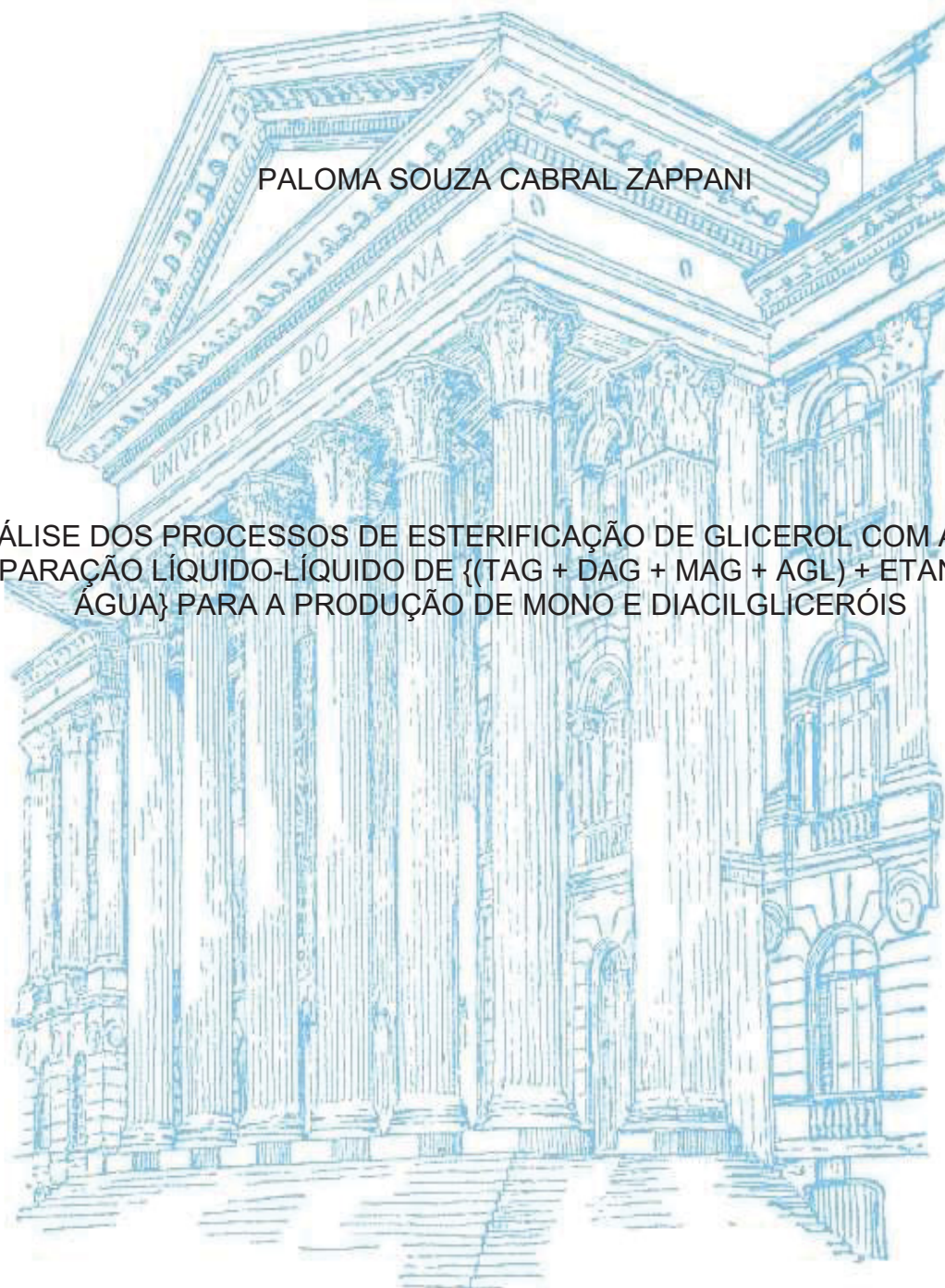


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA SOUZA CABRAL ZAPPANI

ANÁLISE DOS PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE GLICEROL COM AGL E
SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE {(TAG + DAG + MAG + AGL) + ETANOL +
ÁGUA} PARA A PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS



CURITIBA

2018

PALOMA SOUZA CABRAL ZAPPANI

ANÁLISE DOS PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE GLICEROL COM AGL E
SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE {(TAG + DAG + MAG + AGL) + ETANOL +
ÁGUA} PARA A PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos, no curso de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profº. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Coorientador: Profº. Dr. Fernando Augusto

Pedersen Voll

Curitiba

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Z35a Zappani, Paloma Souza Cabral
Análise dos processos de esterificação de glicerol com AGL e separação líquido-líquido de {(TAG + DAG + MAG + AGL) + etanol + água} para a produção de mono e diacilgliceróis / Paloma Souza Cabral Zappani. – Curitiba, 2018 .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos , 2018 .

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza.
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll.

1. Esterificação. 2. Diacilglicerol. 3. Acilgliceróis. 4. Separação líquido-líquido.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Voll, Fernando Augusto Pedersen. IV. Título.

CDD: 664.3

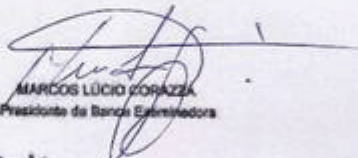
Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

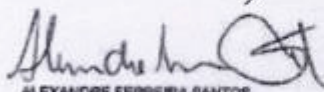
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de PALOMA SOUZA CABRAL ZAPPANI intitulada: ANÁLISE DOS PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE GLICEROL COM AGL E SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ((TAG+DAG+HAG+AGL) + ETANOL + ÁGUA) PARA A PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS, após terem inquirido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

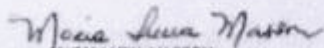
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, no atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

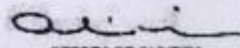
Curitiba, 13 de Julho de 2016.


 MARCOS LÚCIO CORAZZA
 Presidente da Banca Examinadora


 ALEXANDRE FERRERA SANTOS
 Avaliador Externo


 ARION ZANDORA FILHO
 Avaliador Externo


 MARIA LUCIA MASSON
 Avaliador Interno


 DEBORA DE OLIVEIRA
 Avaliador Externo

*Dedico este trabalho à minha mãe, meu filho
e meu marido.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar grandemente todos os dias.

À minha avó Nilda (*em memória*) por ser minha grande parceira durante a vida e por continuar sendo luz para mim.

Ao meu orientador Marcos Corazza, por tanto ensinamento. Por ser exemplo de orientador. Por me apoiar durante todo o período de mestrado e doutorado. E ainda pela bondade que sempre teve ao ensinar.

Ao meu coorientador Fernando Voll, pela orientação e ensinamento. Por toda paciência, boa vontade e confiança.

À minha mãe, Maria Umbelina, por me apoiar e incentivar sempre. Por tanto amor e dedicação e por nunca medir esforços para fazer o melhor por mim.

Ao meu filho, Joaquim, por ser meu incentivo para tudo desde que chegou. Por ser meu maior presente de Deus e minha razão de viver.

Ao meu marido, Cleber, pelo apoio durante todo o trabalho. Por ter me incentivado a iniciar o mestrado e conseqüentemente o doutorado e por compartilhar mais este momento importante comigo.

À Chris por ter me proporcionado tranquilidade quando precisei retomar as atividades deste trabalho. Por cuidar do meu filho, o amor da minha vida, como se fosse seu.

Ao meu pai, Carlos, e meu irmão, Valmir, por torcerem por mim.

Às minhas amigas Laís e Fabi, pela amizade e por me acompanharem durante a realização deste trabalho tornando os dias na Universidade mais agradáveis e alegres.

À minha amiga querida, Darlene (*em memória*), pelos ensinamentos que me serão válidos para sempre. Pelo carinho e amizade. Por mesmo tendo partido tão cedo e tão próximo do fim deste trabalho, me iluminou e deu ânimo.

À Thaíssa, tia Kátia, Alzira e Narinha por serem tão presentes sempre.

À bolsista de iniciação científica, Lilia, por toda colaboração neste trabalho e pela amizade.

Ao Lacta pela estrutura e equipamentos cedidos.

Ao PPGEAL, pela oportunidade deste Doutorado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde há mais de 300 milhões de pessoas obesas no mundo. Pesquisas com óleos e gorduras alimentícios indicam que os produtos ricos em diacilgliceróis, ao invés de triacilgliceróis apresentam ação benéfica sobre a saúde humana, pois o diacilglicerol tem a capacidade de reduzir o nível de lipídios pós prandial, auxiliar na redução de peso e evitar o acúmulo de gordura abdominal e, ao longo do tempo, combater a obesidade. Neste contexto surge o interesse na transformação dos óleos usados na alimentação humana, tornando-os ricos em diacilgliceróis, os quais são semelhantes a triacilgliceróis quanto a digestibilidade e valor energético. Entre os processos de modificação de óleos de maior interesse industrial estão as reações de esterificação de ácido graxo com glicerol. Este processo pode ser catalisado por enzimas ou catalisadores químicos, garantindo a formação dos produtos nas concentrações desejadas. Neste contexto o objetivo geral deste trabalho visa a produção de diacilglicerol via transformação de óleo vegetal e enriquecimento da fase oleosa em DAG. Nas reações de esterificação a partir de ácido oleico comercial + glicerol obteve-se maior conversão (85,10%) e teor de DAG (22,57%) a 160°C, com 5% de catalisador, ao final de 6 horas de reação, demonstrando que o catalisador utilizado apresenta efeito positivo na conversão de reação e na produção de diacilglicerol. Para as reações de esterificação de produto de hidrólise + glicerol, a maior conversão (73%) foi encontrada a 55°C, com 1,36% de enzima e razão molar 1:2 (ácido graxo: glicerol), ao final de 4 horas de reação. Foi obtido produto rico em diacilgliceróis com uma proporção satisfatória de mais de 40% de DAG, comprovando assim que a eficiência da utilização da enzima como catalisador em processo para obtenção de diacilglicerol. Com os experimentos de equilíbrio líquido-líquido, conclui-se que o diacilglicerol apresenta afinidade intermediária entre os componentes obtidos a partir do azeite o que faz com que a separação de fase líquido-líquido se torne um procedimento potencial para o enriquecimento do azeite em diacilglicerol. O modelo UNIQUAC correlacionou bem os resultados experimentais de ELL. Foi também constatado perda de antioxidantes durante o procedimento de separação LL. Tocoferóis e polifenóis têm afinidade com as fases alcoólicas, e tal informação pode ser usada para enriquecer uma amostra de óleo com antioxidantes aumentando sua estabilidade oxidativa. Por fim destaca-se que é possível tecnicamente enriquecer em DAG a fase oleosa nos processos de separação líquido-líquido.

Palavras-chave: Esterificação, Diacilglicerol, Acilgliceróis, Separação líquido-líquido.

ABSTRACT

According to the World Health Organization there are over 300 million obese people in the world. Research with food oils and fats indicates that products rich in diacylglycerols, instead of triacylglycerols, have a beneficial effect on human health, since diacylglycerol has the capacity to reduce the level of postprandial lipids, to help reduce weight and prevent accumulation of abdominal fat and, over time, combat obesity. In this context, interest arises in the transformation of the waste oils into human food, making them rich in diacylglycerols, which are similar to triacylglycerols as digestibility and energy value. Among the processes of modification of oils of greater industrial interest are the fatty acid esterification reactions with glycerol. This process can be catalyzed by enzymes or chemical catalysts, ensuring the formation of the products at the desired concentrations. In this context the general objective of this work is the production of diacylglycerol via transformation of vegetable oil and enrichment of the oil phase in DAG. In the esterification reactions from commercial oleic acid + glycerol higher conversion (85,10%) and DAG (22,57) content at 160 ° C with 5% of catalyst were obtained at the end of 6 hours of reaction, demonstrating that the catalyst used has a positive effect on the conversion and in the production of diacylglycerol. For the esterification reactions of the hydrolysis product + glycerol, the highest conversion (73%) was found at 55 ° C, with 1.36% of enzyme and 1: 2 molar ratio (fatty acid: glycerol) at the end of 4 hours of reaction. A product rich in diacylglycerols with a satisfactory ratio of more than 40% of DAG was obtained, thus proving the efficiency of the use of the enzyme as a catalyst in the process to obtain diacylglycerol. With the liquid-liquid equilibrium experiments, it is concluded that diacylglycerol has an intermediate hydrophobicity between the components obtained from the oil, which makes the liquid-liquid phase separation a potential procedure for the enrichment of the oil in diacylglycerol. The UNIQUAC model correlated well the experimental results of ELL. It was also found loss of antioxidants during the LL separation procedure. Tocopherols and polyphenols have affinity for the alcoholic phases, and such information can be used to enrich an oil sample with antioxidants increasing its oxidative stability. Finally, it is possible to technically enrich the oil phase in the liquid-liquid separation processes in DAG.

Key words: Esterification, Diacylglycerol, Glycerols, Separation-liquid-liquid

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURAS GERAIS DE UM DIACILGLICEROL. (A) 1,2 OU 2,3 – DAG; (B) 1,3 – DAG.....	20
FIGURA 2. REAÇÃO GERAL DE ESTERIFICAÇÃO.....	24
FIGURA 3. ETAPA DA REAÇÃO ENTRE ÁCIDO GRAXO E GLICEROL NA QUAL É FORMADO TAG.....	24
FIGURA 4. REAÇÃO GENÉRICA DE HIDRÓLISE.....	26
FIGURA 5. ESQUEMA DE REAÇÕES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TAG.....	27
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UM ARGILOMINERAL.....	30
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DAS LAMELAS DE UM ARGILOMINERAL.....	30
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE ATIVAÇÃO ÁCIDA.....	31
FIGURA 9. REATOR <i>PARR</i> E BANHO TERMOSTÁTICO UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO (ÁCIDO OLEICO + GLICEROL).....	38
FIGURA 10. AGITADOR MECÂNICO, BANHO TERMOSTÁTICO E BÉQUER UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE.....	39
FIGURA 11. FIGURA 11 – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO + GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C.....	46
FIGURA 12. CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO+ GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 160°C.	46
FIGURA 13. CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO + GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C E 160°C, SEM CATALISADOR.....	47
FIGURA 14. CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO OLEICO+ GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C E 160°C 5% DO CATALISADOR.....	47
FIGURA 15. CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO OLEICO+ GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 160°C E 140°C E 10% DO CATALISADOR.....	48
FIGURA 16. TEOR DE DAG NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 160°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.....	49
FIGURA 17. TEOR DE DAG NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 140°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.....	50
FIGURA 18. CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DE PRODUTO DE HIDRÓLISE + GLICEROL, CATALISADA PELA ENZIMA LIPOZIME® RM IM. A 155°C, 1,36% DE ENZIMA E RAZÃO MOLAR 4:1, 2:1 E 1:2.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NOMENCLATURA, NOME E FÓRMULA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	19
TABELA 2. PORCENTAGEM MÁSSICA DE TAG E DAG EM DIFERENTES ÓLEOS COMESTÍVEIS.....	20
TABELA 3. ACIDEZ FINAL OBTIDA PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM GLICEROL, CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	44
TABELA 4. CONVERSÕES OBTIDAS PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	45
TABELA 5. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 160°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.....	49
TABELA 6. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 140°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.	49
TABELA 7. ACIDEZ FINAL E CONVERSÕES OBTIDAS PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DE PRODUTO DE HIDRÓLISE + GLICEROL, CATALISADA PELA ENZIMA LIPOZIME® RM IM.....	51
TABELA 8. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS PARA DIFERENTES RAZÕES MOLARES DE ÁCIDO GRAXO:GLICEROL.....	53
TABELA 9. COMPOSIÇÃO DO ÓLEO EXTRA VIRGEM E ÓLEO EXTRA VIRGEM HIDROLISADO.....	64
TABELA 10. PARÂMETROS R_i E Q_i PARA TAG, DAG, MAG, AGL, ETANOL E ÁGUA.....	65
TABELA 11. PARÂMETRO DE INTERAÇÃO BINÁRIA A_{ij} E A_{ji} DO MODELO UNIQUAC PARA O SISTEMA TAG (1) + DAG (2) + MAG (3) + AGL (4) + ETANOL (5) + ÁGUA (6).....	65
TABELA 12. DADOS EXPERIMENTAIS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA O SISTEMA TAG (1) + DAG (2) + MAG (3) + AGL (4) + ETANOL (5) + ÁGUA (6) (LINHAS DE AMARRAÇÃO DE 1-3: 45 °C. LINHAS DE AMARRAÇÃO 4-10 SÃO DE LIMA <i>ET AL.</i> (2016): 55°C	67
TABELA 13. COMPOSIÇÕES EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DE CADA FASE (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL E EM PORCENTAGEM MÁSSICA (%M/M) PARA LINHAS DE AMARRAÇÃO 2 E 3 (TABELA 12).....	69
TABELA 14. COMPOSIÇÕES EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DE CADA FASE (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL E EM PORCENTAGEM MÁSSICA (%M/M) (LINHA DE AMARRAÇÃO 11).....	69

TABELA 15. RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM ANTES E DEPOIS DO PROCEDIMENTO ELL.....	71
TABELA 16. COMPOSIÇÃO DE TOCOFERÓIS E POLIFENÓIS NO ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM ANTES E DEPOIS DO PROCEDIMENTO ELL.....	71
TABELA 17. RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO HIDROLIZADO.....	72
TABELA 18. RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRE DE ETANOL E ÁGUA) OBTIDOS DAS FASES ALCOOLICA E ÓLEO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO 1,2,3 E 11.....	73
TABELA 19. PARÂMETROS A' E E'_a PARA AMOSTRAS DE ÓLEO OBTIDAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS ELL.....	74
TABELA 20. TEMPO DE INDUÇÃO DE OXIDAÇÃO E TEMPERATURAS DE OXIDAÇÃO CALCULADAS PARA ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM, ÓLEO DE OLIVA HIDROLIZADO E AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRES DE ETANOL E ÁGUA) OBTIDAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS DE ELL.....	74
TABELA 21. ANTIOXIDANTES DO ÓLEO DE OLIVE EXTRA VIRGEM, ÓLEO DE OLIVA HIDROLIZADO E AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL) OBTIDAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS DE ELL.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 ÓLEOS E GORDURAS.....	16
3.1.1 Óleo de oliva.....	17
3.1.2 Ácidos graxos livres.....	18
3.1.3 Diacilglicerol.....	18
3.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	23
3.3 REAÇÃO DE HIDRÓLISE.....	25
3.3.1 Hidrólise Enzimática.....	26
3.4 CATALISADORES ARGILOMINERAIS.....	28
3.5 ENZIMAS COMO CATALISADORES.....	32
3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	33
3.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	35
4 PRODUÇÃO DE DAG VIA ESTERIFICAÇÃO DE AGL	36
4.1 MATERIAL.....	36
4.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	37
4.2.1 Reações de esterificação (ácido oleico + glicerol).....	37
4.2.2 Reação de esterificação (produto da hidrólise completa + glicerol).....	38
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
4.3.1 Determinação de Acidez.....	41
4.3.2 Análise de Acilgliceróis por cromatografia gasosa.....	42
4.3.3 Dosagem de atividade lipolítica (hidrólise) por pHSTAT.....	42
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.4.1 Conversões das reações de esterificação (ácido oleico + glicerol) catalisadas por argilomineral.....	43
4.4.2 Análise de acilgliceróis das reações de esterificação de ácido oleico + glicerol.....	48
4.4.3 Obtenção de produto rico em ácido graxo livre através da reação de Hidrólise.....	50

4.4.4	Conversões das reações de esterificação do produto da hidrólise + glicerol, catalisadas por LIPOZIME® RM IM.....	51
4.4.5	Análise de acilgliceróis das reações de esterificação de produto da hidrólise + glicerol.....	52
4.5	CONSIDERAÇÕES.....	54
5	SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA ENRIQUECIMENTO DO ÓLEO EM DAG.....	55
5.1	MATERIAL.....	55
5.2	MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	56
5.2.1	Hidrólise parcial do óleo de oliva para produção de mistura de ácidos graxos (TAG, DAG, MAG e AGL).....	56
5.2.2	Medidas de equilíbrio líquido-líquido.....	56
5.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	57
5.3.1	Determinação de Acidez.....	57
5.3.2	Determinação do teor de água por Karl Fischer	58
5.3.4	Análise de acilgliceróis por RMN.....	58
5.3.5	Análise de tocoferóis e polifenóis.....	59
5.3.6	Estabilidade de oxidação.....	60
5.4	Modelagem do equilíbrio líquido-líquido.....	61
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.5.1	Composição dos óleos (exta virgem e hidrolisado) utilizados nos experimentos de equilíbrio líquido-líquido.....	64
5.5.2	Dados experimentais e calculados de ELL.....	64
5.5.3	Resultados de estabilidade oxidativa.....	70
5.6	CONSIDERAÇÕES.....	76
6	CONCLUSÕES	77
7	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O interesse dos consumidores por alimentos que apresentam potencial de prevenir doenças e promover a saúde têm aumentado nos últimos anos. A busca pela redução dos índices de obesidade e doenças cardiovasculares tem levado a procura pelo consumo de dietas que favoreçam esta redução.

Óleos e gorduras têm grande participação no aparecimento de doenças relacionadas ao acúmulo de gorduras, devido ao seu consumo em excesso. Desta forma, dietas ricas em óleos e gorduras são fatores de risco para obesidade e doenças do coração (CHEONG *et al.*, 2007). No entanto, dificilmente se conseguirá uma dieta completamente livre de gorduras, uma vez que estas conferem agradáveis características sensoriais e têm papel fundamental na alimentação por serem importantes veículos de vitaminas lipossolúveis, participar da síntese de substâncias endógenas e são fontes de ácidos graxos essenciais, que são sintetizados apenas por vegetais (BABICZ *et al.*, 2009).

Diante dos problemas relacionados ao consumo de óleos e gorduras e ao mesmo tempo a importância deste consumo, surge o interesse pela transformação dos óleos usados na alimentação humana, tornando-os ricos em diacilglicerol (DAG). Apesar de ser uma molécula similar ao triacilglicerol (TAG), o diacilglicerol é digerido e absorvido no intestino delgado, sendo consumido como energia, sem voltar a ser sintetizado como gordura, como acontece com os óleos convencionais que são constituídos principalmente por triacilgliceróis (CASTRO *et al.*, 2004).

Diacilgliceróis podem ser produzidos através de processos de esterificação de glicerol com ácido graxo livre, glicerólise de triacilgliceróis ou hidrólise parcial de triacilgliceróis (KRISTENSEN *et al.*, 2005). Entre estes processos a esterificação é bastante utilizada por apresentar resultados satisfatórios quanto a rendimento e custo. Esta reação pode ser catalisada por enzimas ou catalisadores químicos (MATOS *et al.*, 2011).

O óleo de oliva é reconhecido por apresentar benefícios à saúde relacionados ao seu consumo, por sua homogeneidade e propriedades sensoriais agradáveis (ALVES, 2010). Por este motivo foi o óleo escolhido neste trabalho para as reações de hidrólise.

A utilização de enzimas como catalisadores para esterificação de ácidos graxos apresenta diversas vantagens, dentre as quais destaca-se a utilização de condições brandas de reação, facilidade na separação do meio e maior especificidade. (AWADALLAK, 2012; CASTRO *et al.*, 2004). As lipases são a principal classe de enzimas utilizadas neste tipo de aplicação.

Nos processos industriais é comum o uso de catalisadores químicos nas reações de esterificação e em outras vias de síntese de DAG. O uso de catalisadores homogêneos na síntese química de DAG envolve altas temperaturas de operação e reações lentas (SCHUCHARDT *et al.*, 1998), acarretando alto consumo energético e degradação parcial dos produtos, dando origem a subprodutos escuros com odor indesejado (FERREIRA-DIAS *et al.*, 2001).

O uso de catalisadores heterogêneos na síntese de DAG favorece o processo por facilitar a separação dos produtos do catalisador, diminuir a formação de resíduo, propicia a reutilização do catalisador (BARRAULT *et al.*, 2002) e ainda pode melhorar o rendimento, a pureza e a seletividade do produto de interesse (RODRÍGUEZ, 2014).

Os argilominerais têm sido largamente estudados devido sua potencial aplicação em diversas áreas, por exemplo tem sido usados como adsorventes no processo de branqueamento de óleos destinados à alimentação, na purificação de água residual, na produção de medicamentos e na remoção de metais em meios aquosos (KORICHI; ELIAS; MEFTI, 2009). Estes catalisadores são de grande interesse para indústria alimentícia por serem não tóxicos e inertes, não apresentando riscos a saúde humana quando presentes em alimentos ou utilizados na produção destes.

A separação líquido-líquido, surge como boa alternativa para o enriquecimento do produto em DAG, sendo possível o enriquecimento deste produto na fase oleosa utilizando ELL. Podendo ser realizado em condições brandas de temperatura e pressão, evitando custos energéticos e reações indesejáveis durante o processo (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Diante o exposto, o estudo do processo de separação LL para enriquecimento da fase oleosa em DAG se torna a contribuição inovadora deste trabalho para o meio acadêmico/científico.

Os objetivos, geral e específicos, foram delineados para o desenvolvimento do trabalho conforme apresentados na sequência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo a produção de diacilglicerol via transformação de óleo vegetal e enriquecimento da fase oleosa em DAG.

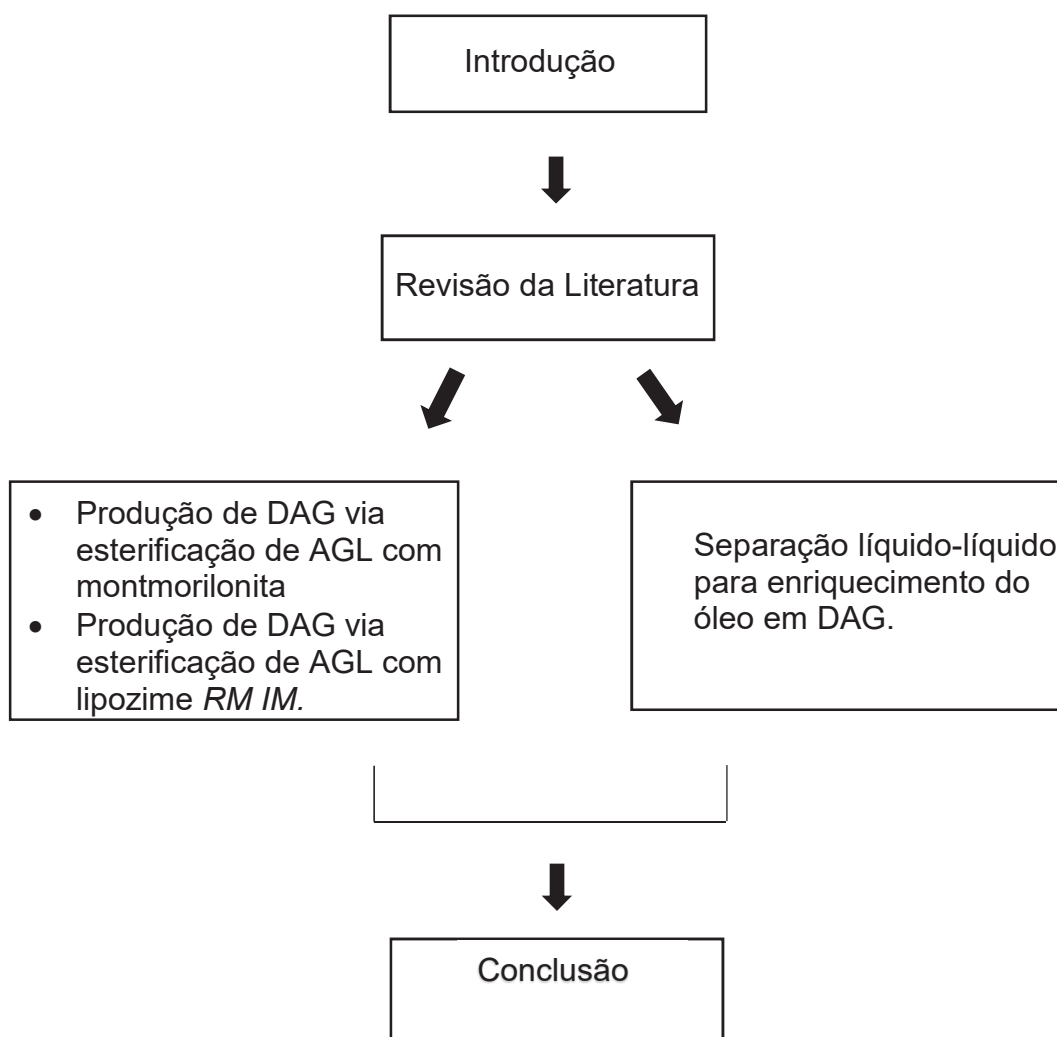
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as melhores condições para esterificação do ácido oleico com glicerol, catalisada por catalisador argilomineral montmorilonita ativado com ácido fosfórico.
- Definir a melhor razão entre os reagentes para esterificação do produto da hidrólise com glicerol, catalisada pela enzima LIPOZIME® RM IM.
- Experimentos de separação líquido-líquido de sistemas envolvendo acilgliceróis e ácidos graxos livres do óleo de oliva, etanol e água.

ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho será apresentado da seguinte forma:

1. Introdução.
2. Objetivos.
3. Revisão bibliográfica abordando os seguintes assuntos:
4. Material e métodos e resultados de reações de esterificação do ácido oleico com glicerol, utilizando catalisador argilomineral montmorilonita e reações de esterificação do produto da hidrólise enzimática com glicerol, catalisadas por lipozime *RM IM*.
5. Material e métodos e resultados da separação líquido-líquido para enriquecimento do óleo em DAG.
6. Conclusão.



3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão da literatura contemplando conceitos relevantes referentes aos óleos e gorduras, diacilgliceróis, reações de esterificação e hidrólise e os catalisadores utilizados nestas reações. São ainda apresentados conceitos a cerca da separação líquido-líquido para obtenção de DAG.

3.1 ÓLEOS E GORDURAS

Óleos e gorduras são substâncias viscosas e hidrofóbicas pertencentes ao grupo dos lipídios, formados por misturas de triacilgliceróis. (CAREY, 2011).

O consumo excessivo de óleos e gorduras tem sido associado a alguns problemas de saúde tais como doenças cardiovasculares, obesidade e resistência à insulina (BABICZ, 2009). Um recente relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostra que mais de 300 milhões de pessoas estão obesas e estima-se que este número possa aumentar drasticamente se uma ação imediata não for tomada (PHUAH *et al.*, 2012). A partir destes dados verifica-se a necessidade de maior atenção ao consumo de óleos e gorduras e, em função desta necessidade de dietas mais adequadas, têm aumentado o número de pesquisas com este enfoque.

Em relação à produção e consumo, é estimada uma produção mundial anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (FARIA, 2010). Os óleos vegetais são obtidos por meio do processo de extração de sementes ou frutos (AWADALLAK, 2012) e são constituídos principalmente por glicerídeos de ácidos graxos. Estes óleos podem conter fosfolipídeos, ácidos graxos livres e constituintes insaponificáveis. Suas características físicas variam com a estrutura e distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis (BABICZ, 2009).

De acordo com a resolução da ANVISA RDC 270 de 2005 a diferença entre óleos e gorduras depende do seu ponto de fusão na temperatura de 25°C. Os lipídeos recebem denominação de óleo, quando líquidos a 25°C, ou gordura quando sólidos a mesma temperatura (RAMALHO e SUAREZ, 2013), e azeite quando provenientes da polpa de frutos (GIOIELLI, 1995).

Triacilglicerol, predominantemente encontrado em óleo vegetal, é cientificamente comprovado como um dos principais causadores de várias doenças

relacionadas com a obesidade, tais como diabetes, hipertensão e câncer, quando consumido em excesso (PHUAH *et al.*, 2012).

Apesar dos malefícios oferecidos pelo consumo de óleos e gorduras, não é possível eliminá-los da dieta humana pois agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, tais como vitamina A, D, E e K1 e são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (CASTRO *et al.*, 2004). Como estes ácidos graxos essenciais são sintetizados apenas por vegetais, é necessário e fundamental que humanos os obtenham através da dieta alimentar (BABICZ, 2009).

Diante os problemas relacionados ao consumo de óleos e gorduras e ao mesmo tempo a importância deste consumo, tem surgido um crescente interesse pela tecnologia de modificação dos óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2004).

3.1.1 Óleo de oliva

Diferentemente de outros óleos vegetais, que são extraídos com o uso de solventes, o azeite de oliva é extraído do fruto colhido da oliveira, normalmente por processos mecânicos (ALVES, 2010).

O óleo extra virgem (acidez até 0,8%) é obtido a partir da primeira prensagem a frio das azeitonas, o que produz uma composição especial de compostos voláteis que fornecem suas características muito apreciadas de sabor e aroma (OLIVEIRA, 2010).

O óleo de oliva está entre os óleos vegetais comestíveis mais importantes comercializados mundialmente. Em populações que utilizam este óleo como principal fonte lipídica em sua dieta são registradas menores incidências de doenças coronarianas do que em povos de outras regiões, que consomem mais gorduras saturadas (KRUGER, 2010).

A qualidade do óleo de oliva pode ser influenciada por vários fatores, além dos relacionados ao meio ambiente e variedade, destacam-se o estado de maturação do fruto no momento da colheita, acidez, tempo de processamento das azeitonas após a colheita, condições de extração e processamento (MELLO, 2012).

Em altas temperaturas (acima de 150°C) o óleo de oliva extra virgem tem sua composição volátil e aspectos sensoriais alterados, formando principalmente compostos oxidados, sobretudo aldeídos de cadeia longa (NUNES, 2011).

O óleo de oliva é uma mistura de éster de glicerol com ácidos graxos. Contém também, pequenas quantidades de fosfatados (lecitina), ácidos graxos livres, proteínas, glicerol, pigmentos, carboidratos e compostos responsáveis pelo aroma (TORTOSA *et al.*, 2006).

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 (KRUGER, 2010). Quanto ao teor de acilgliceróis, o óleo de oliva tem 93,3% de TAG e 5,5% de DAG (YANAI, 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 linoleico (C18:2), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) e ácido esteárico (C18:0) (KRÜGER, 2010).

A grande aceitação do óleo de oliva em dietas humanas está relacionada às suas propriedades sensoriais agradáveis e aos benefícios que o consumo deste óleo pode trazer a saúde, por conter compostos fenólicos, que são antioxidantes naturais (ALVES, 2010).

O óleo de oliva foi escolhido como matéria prima das reações de hidrólise deste trabalho por sua homogeneidade, que se dá pela alta concentração de ácido oleico em sua composição, e pelos conhecidos benefícios relacionados ao seu consumo, como com alto teor de antioxidantes naturais e ácidos graxos monoinsaturados. Para possibilitar comparação entre os resultados, nas reações de esterificação o ácido utilizado foi o oleico.

3.1.2 Ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres correspondem a cadeias entre 4 e 22 átomos de carbono, finalizadas com uma função hidroxila. A forma de ocorrência mais frequente são os triacilgliceróis (TAGs), nos quais cada três radicais acila, mediante a perda de água dos respectivos ácidos graxos, iguais ou diferentes, estão esterificados ao glicerol (FONTANA, 2011).

São ácidos carboxílicos de cadeia alifática, produzidos quando as moléculas de gorduras ou óleos, são quebrados (BRUICE, 2006; SCRIMGEOUR, 2005). A maioria destes ácidos graxos possui um número par de átomos de carbono e uma cadeia carbônica não ramificada, que pode ser saturada ou insaturada, (CAREY, 2011;). Muitos ácidos graxos naturais contêm duas ou três ligações duplas, as gorduras ou óleos que provém deste tipo de ácido são chamados de poli-insaturados. Com relação aos ácidos graxos saturados, os mesmos possuem facilidade em se organizar como cristais, além disso, como as atrações de van der Waals são fortes, eles possuem pontos de fusão relativamente elevados (SOLOMONS, 2012).

Na tabela 1 são apresentadas a nomenclatura, o nome e a fórmula de diferentes ácidos graxos comumente encontrados em óleos e gorduras.

TABELA 1 – NOMENCLATURA, NOME E FÓRMULA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Nomenclatura	Nome	Fórmula
4:0	Butírico	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
6:0	Capróico	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
8:0	Caprílico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
10:0	Cáprico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
12:0	Láurico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
14:0	Mirístico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
16:0	Palmítico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
18:0	Esteárico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
18:1 9c	Oléico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
18:2 9c12c	Linoleico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH
18:3 9c12c15c	α-Linolênico	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH
22:1 13c	Erúcico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH

FONTE: SCRIMGEOUR, 2005.

O ponto de fusão dos ácidos graxos aumenta de acordo com o aumento da cadeia e decresce com o aumento de insaturações (quando esta apresentar isomeria *cis*) na molécula. Dentre os ácidos graxos saturados, os de cadeias ímpares apresentam menores ponto de fusão comparados aos de cadeias pares adjacentes (BLASI *et al.*, 2007).

3.1.3 Diacilglicerol

O diacilglicerol (DAG) está naturalmente presente, em baixa quantidade, na composição de gorduras e óleos comestíveis, sendo o componente predominante desses alimentos o triacilglicerol (TAG) (HU D. J. *et al.*, 2013; VOLL e BRITO, 2010). Os óleos comestíveis convencionais apresentam até 10% de diacilglicerol em sua composição, este valor varia de acordo com cada óleo vegetal. Os óleos de algodão e oliva possuem maiores quantidades de DAG em sua composição em comparação com outros óleos comestíveis (VOLL e BRITO, 2010).

Sendo ésteres provenientes do glicerol, os diacilgliceróis resultam da esterificação de dois grupos hidroxila do glicerol com ácidos graxos. As Figuras 1(a) e (b) apresentam duas formas isoméricas: *Sn*- 1,2- DAG e *sn*- 1,3- DAG (CABRAL, P. S., 2014; RAIZER, E., 2015; SAMBANTHAMURTHI *et al.*, 2000).

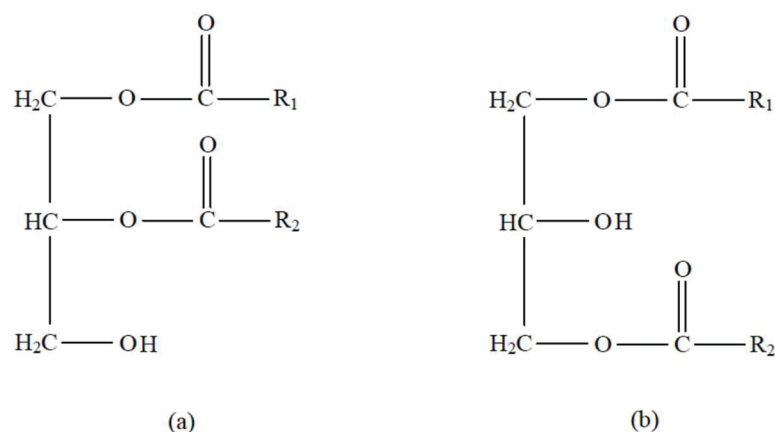


FIGURA 1 – ESTRUTURAS GERAIS DE UM DIACILGLICEROL. (A) 1,2 OU 2,3 – DAG; (B) 1,3 – DAG.

A forma isomérica 1,2-DAG é formada após a ingestão de triacilglicerol e é considerada como um intermediário metabólico. A 1,3-DAG é metabolizada por uma via diferente do TAG e do 1,2-DAG e por isso é responsável pela ação benéfica do consumo de diacilglicerol (BABICZ, 2009; WANG, Z. *et al.*, 2016).

A biotransformação de óleos e gorduras pode resultar na produção de diacilglicerol (SATYARTHI *et al.*, 2011; FIAMETTI *et al.*, 2008; FREGOLENTE *et al.*, 2009). Estes glicerídeos possuem o *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration-USA*) (FLICKINGER e MATSUO, 2003) definindo que podem ser ingeridos por humanos sem apresentar efeitos colaterais, por isso são os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como estabilizantes de emulsões) (DAMSTRUP *et al.*, 2006; MOQUIN *et al.*, 2006) e

farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) (KRÜGER, 2010; BOYLE e GERMAN, 1996; FLACK e KROG, 1970; BORNSCEUER, 1995).

Sanjukta Kar et al. (2016), comprovaram que sementes de soja enriquecidas com DAG oferecem excelentes benefícios para a saúde. O experimento ainda concluiu que economicamente, a produção de óleo rico em DAG não envolve nenhum custo adicional significativo em comparação com o óleo rico em TAG.

Dan-Jing Hu e colaboradores (2013) pesquisaram sobre o rendimento de diacilgliceróis de cadeia média utilizando reações de esterificação do glicerol e glicerólise do TAG com diferentes solventes, os resultados obtidos para as reações de esterificação do glicerol foram de 77,26% e 45,45% de DAG, já a glicerólise apresentou um rendimento de 53,17% de DAG.

Li *et al.* (2015) estudaram a reação de hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* e obtiveram como resultado a produção de 32,09% de DAG quando houve a conversão entre 68% e 73% de TAG.

No estudo feito por Eduardo Raizer (2015), foi analisada a hidrólise enzimática do óleo de girassol utilizando a enzima fosfolipase A1 e ultrassom, onde a condição mais favorável à produção de DAG foi uma fração de enzima/substrato de 1,7% (m/m) a 40°C, além disto, também foi avaliada a razão entre água e óleo na qual ocorreu a conversão máxima de DAG, a qual foi igual a 2% com o tempo de reação de 27 minutos.

No estudo de Zhang Z. et al (2017) foram obtidos DAG's numa porcentagem de 59,6% e pureza de 69,6% após uma destilação molecular de um estágio. Tal resultado foi obtido através da esterificação do ácido oleico com glicerol catalisada por SO₄²⁻/TiO₂, com duração de 6 horas, numa temperatura de 210°C e massa de catalisador sendo 0,1% da massa de ácido oleico.

Na indústria de alimentos a aplicação dos diacilgliceróis é ampla e variada, já que estes podem desempenhar a função de emulsificantes, estabilizantes e umectantes em produtos de panificação, confeitaria, margarinas, produtos lácteos, molhos, maioneses, sorvetes e chocolates (BOYLE, 1997; LO *et al.*, 2008). Novos alimentos nutracêuticos também têm sido desenvolvidos incorporando DAG à sua formulação, ocasionando melhorias nutricionais e tecnológicas ao produto (GOTO *et al.*, 2000).

Além disso, os DAGs têm grande aplicação como aditivo funcional em alimentos, trazendo benefícios para saúde (CHEONG *et al.*, 2007; KRUGUER *et al.*, 2011; YANAI *et al.*, 2007).

Estudos indicam que os produtos ricos em diacilgliceróis podem apresentar ação benéfica sobre a saúde humana, pois são moléculas menores consumidas como fonte de energia (NAGAO *et al.*, 2000), mais facilmente, sendo metabolizados totalmente, o que não ocorre com as moléculas de triacilgliceróis (SANTOS, 2011; KONDO *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2008), podem ainda diminuir o acúmulo de gordura corpórea, além de reduzir os níveis de triacilgliceróis no sangue após as refeições (BABICZ, 2009; VALÉRIO *et al.*, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Estes componentes podem também, a longo prazo, serem utilizados no combate a obesidade. Além disso, como sua estrutura é semelhante à estrutura da molécula de TAG, os óleos ricos em diacilgliceróis apresentam propriedades sensoriais similares aos óleos que contêm predominantemente triacilgliceróis (SANTOS, 2011).

Pesquisas realizadas por Maki e colaboradores (2002) demonstraram que o consumo de óleos constituídos predominantemente por DAG, associado a uma dieta com deficiência de energia pode acelerar a perda de peso. O resultado destas pesquisas apontou uma redução de massa gorda em 8,3% em 24 semanas para dietas com DAG e 5,6% para dietas com TAG. A tabela 2 apresenta a quantidade de TAG E DAG para diferentes óleos vegetais.

TABELA 2 – PORCENTAGEM MÁSSICA DE TAG E DAG EM DIFERENTES ÓLEOS COMESTÍVEIS.

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

FONTE: YANAI (2007)

Estudos realizados nos Estados Unidos e Japão mostram que a massa gorda de um indivíduo pode ser reduzida substituindo de 10 a 20 gramas dos óleos convencionais da dieta pela mesma massa de óleo rico em diacilglicerol (YASUKAWA *et al.*, 2004). Devido aos benefícios atribuídos ao consumo de diacilglicerol o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem Estar do Japão classificou os alimentos que contenham, no mínimo, 80 % deste acilglicerol, como alimentos para uso específico na saúde “*Food for Specified Health Use - FOSHU*” (YAMAMOTO *et al.*, 2001; HAMERSKI, 2013).

No Japão, desde 1999, é comercializado um óleo rico em diacilgliceróis sendo considerado como óleo de cozinha funcional ou óleo de diacilgliceróis, registrado pela marca “Econa™” (SANTOS, 2011). Em 2000, o consumo de um óleo rico em DAG foi aprovado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*, ou *Geralmente Reconhecido Como Seguro*) nos Estados Unidos (VOLL e BRITO, 2010). Este óleo comercial é produzido a partir da esterificação de ácidos graxos provenientes de óleo de soja e canola por reação enzimática, e tem uma composição de no mínimo 80 % em massa de DAG (BABICZ, 2009). No entanto, o óleo rico DAG teve as vendas suspensas em 2009 por causa de seus “altos níveis” de glicidil ésteres (GEs), que são potencialmente cancerígenos. No processo comercial (request N AESA-Q-2004-089), DAG foram produzidos por esterificação de ácidos graxos com glicerol ou monoacilglicerol, na presença de uma lipase imobilizada, com um processo de refinação subsequente, que inclui destilação (200°C) e deodorização (230°C). Uma vez que a presença de GEs esteris de glicidil em óleos está relacionada com a exposição do DAG e do MAG a altas temperaturas (CHENG ET AL., 2016), o processo de refinação convencional é inviável para a purificação do DAG.

Atualmente, somente o DAG proveniente do óleo de canola e/ou de soja é aprovado pela ANVISA para comércio no Brasil (ANVISA, 2009). Em 22 de dezembro de 2014 a ANP autorizou a inclusão de ensaios com Diacilglicerol (ASTM D6584) em alguns laboratórios (Jusbrasil, 2014).

3.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A reação de condensação de ácidos carboxílicos e alcoóis para a formação de ésteres é chamada de esterificação, e pode ser catalisada por diversos tipos de

No trabalho realizado por Hamerski F. (2013), um estudo sobre a reação de esterificação entre o ácido oleico e glicerol foi realizado com o objetivo de obter acilgliceróis como produtos da reação. As reações foram estudadas com e sem catalisador, nas reações a 180°C cujo catalisador HDL do complexo Mg-Al-CO₃ foi adicionado ao meio reacional. Observou-se um aumento de 15% na soma de acilgliceróis em comparação com as reações executadas sem o catalisador.

Em se tratando da reação de esterificação catalisada por enzima, Wang Z. (2016) apresentou um estudo no qual a enzima Lipozyme TL IM foi utilizada como catalisador da reação entre ácido oleico e glicerol. A condição ideal encontrada foi a 40°C com 1,8g de Lipozyme TL IM e razão molar ácido oléico/glicerol de 3,5:1, com um rendimento total de cerca de 50% de 1,3 – dioleína.

Segundo Rosset e colaboradores (2015), a esterificação do ácido oleico catalisada pela lipase Candida Antarctica para produção de biodiesel apresentou uma conversão de 96,5%.

3.3 REAÇÃO DE HIDRÓLISE

Dentre as rotas distintas para síntese de DAG a hidrólise tem como vantagens sua fácil operação quando comparada com a reação de esterificação. Ainda, não apresenta os problemas característicos causados pelo excesso de glicerol no meio, que é um problema na reação de glicerólise, pois causa limitação de transferência de massa em catalisadores heterogêneos (VOLL, 2011).

A hidrólise dos óleos, de forma geral, apresenta como produtos finais o glicerol e ácidos graxos livres, e como produtos intermediários DAG e MAG, que consistem em TAG sem um ou dois ácidos graxos respectivamente (PINTO e LANÇAS, 2010; CAREY, 2011).

A reação hidrólise ocorre em etapas e é reversível. Os triacilglicerídeos (TAG) são hidrolisados a diacilgliceróis, posteriormente os DAG formados são hidrolisados a monoacilgliceróis (MAG) e por último estes são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol. Para cada etapa há liberação de um ácido graxo. O tempo de reação e disponibilidade de reagentes para a conversão definem se a reação será completa ou não (AWADALLAK, 2012; SOLOMONS, 2012).

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação que se dá pela solubilidade da água nos mono e diacilgliceróis formados (BUENO, 2005). A reação de hidrólise de óleos pode ser favorecida pelo excesso de água no meio, altas temperaturas, pressão e ação de enzimas ou catalisadores (GUNSTONE e NORRIS, 1983; TEIXEIRA, 2011).

A Figura 4 apresenta reação de hidrólise genérica.

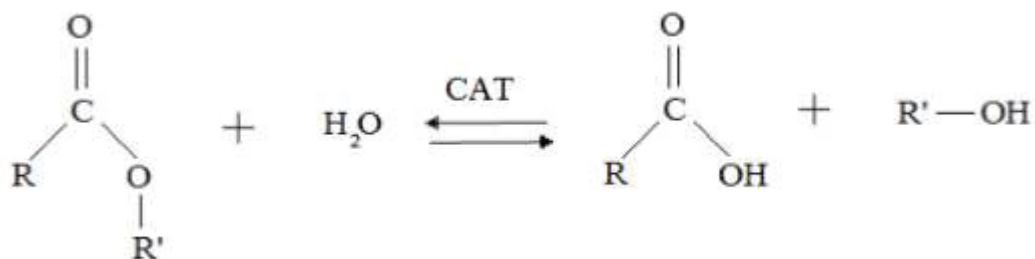


FIGURA 4. REAÇÃO GENÉRICA DE HIDRÓLISE

FONTE: LEÃO, L. S., 2009.

3.3.1 Hidrólise Enzimática

Durante a hidrólise enzimática existem 3 etapas, na primeira há inicialmente um período de indução, no qual as taxas de reação são muito baixas. Após este período as velocidades de reação aumentam e começam a ser formados o AGL e o DAG. Na segunda etapa o DAG é hidrolisado formando MAG e mais uma molécula de AGL. Na terceira etapa acontece a hidrólise do MAG para glicerol e AGL, levando hidrólise completa (AWADALLAK, 2012; BRUICCE, 2006). A última etapa é indesejada quando se objetiva a formação de DAG e MAG.

Na literatura são apresentados estudos em que foram realizadas reações de esterificação, glicerólise e hidrólise para produção de DAG utilizando lípases (PHUA *et al.*, 2012; VALÉRIO *et al.*, 2009; AWDALAK *et al.*, 2013; FARIA, 2010; KRUGUER *et al.*, 2011; BABICZ *et al.*, 2009; KRISTENSEN *et al.*, 2005). Apesar da grande aplicação dos diferentes métodos, a hidrólise é preferível em termos de custo e rendimento, conforme mencionado anteriormente (PHUAH *et al.*, 2012). Na figura 5 é ilustrado um esquema de reações de hidrólise enzimática de triacilglicerol.

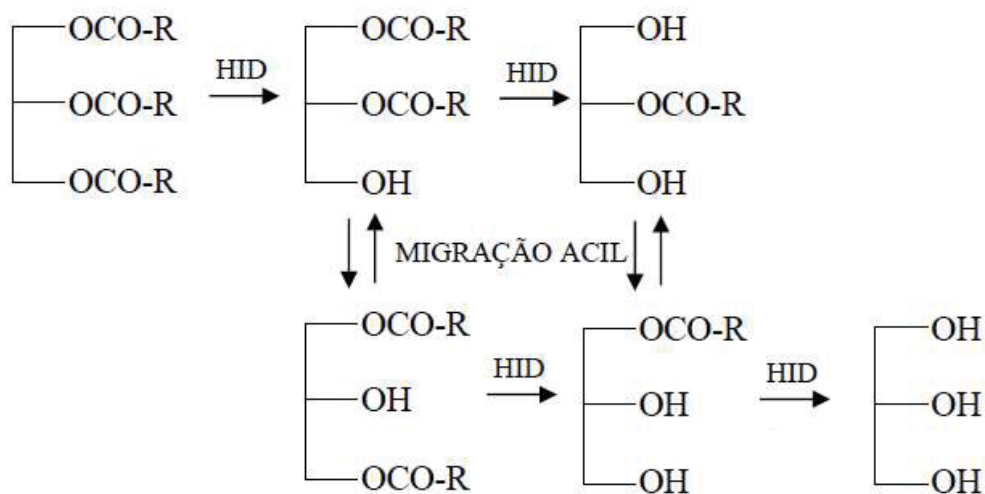


FIGURA 5 – ESQUEMA DE REAÇÕES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TAG.

O interesse por biotransformação de óleos ampliou consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofatores, possuem uma larga especificidade (CASTRO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 1999) e permitem a aplicação de temperaturas e pressões brandas no processo, com a manutenção de uma alta atividade (SANTOS, 2011). Entretanto o uso de catalisadores químicos ainda é considerado interessante em alguns casos, considerando o alto custo das enzimas (AWADALLAK, 2012).

A quantidade de enzima a ser utilizada é um parâmetro importante da reação de hidrólise. É preciso certa quantidade mínima de enzima para catalisar a reação mas ao mesmo tempo o excesso delas no meio é capaz de dificultar a reação (MURTY, 2002). Este comportamento foi percebido em estudo feito por Valério *et al.* (2009), onde a partir de um determinado valor, o aumento na quantidade de enzimas no meio reacional ocasionava diminuição na produção de MAG e DAG, e esse comportamento foi atribuído a limitações de transferência de massa, pelo fato de que a mistura da reação fica mais pobre para uma grande quantidade de enzimas presentes.

3.4 CATALISADORES ARGILOMINERAIS

Em processos industriais costuma-se utilizar catalisadores químicos nas reações de esterificação e em outras vias de síntese de DAG (FERREIRA-DIAS *et al.*, 2001). O uso de catalisadores homogêneos na síntese química de mono e diacilglicerol envolve altas temperaturas de operação e reações lentas, levando ao alto consumo energético e à degradação parcial dos produtos, o que dá origem a subprodutos escuros e com odor indesejado (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). Além disso, na catálise química homogênea ocorre a formação de grande quantidade de sais, dificultando a purificação dos produtos de interesse (BANCQUART *et al.*, 2001; FERREIRA-DIAS *et al.*, 2001).

O uso de catalisadores heterogêneos na síntese de diacilglicerol favorece o processo por facilitar a separação dos produtos do catalisador, diminuir a formação de resíduo, propiciar a reutilização do catalisador (BARRAULT *et al.*, 2002; LEUNG; WU; LEUNG, 2010) e ainda, melhorar o rendimento, a pureza e a seletividade do produto de interesse, pela escolha de um catalisador sólido específico para o processo (CORMA *et al.*, 2005).

Os catalisadores heterogêneos são aqueles que reagem em uma fase diferente dos reagentes, fornecendo uma superfície onde a reação pode ocorrer. A maioria dos catalisadores heterogêneos são sólidos e podem catalisar reações de substratos numa mistura líquida e/ou gasosa. A área total da superfície do catalisador tem um efeito significativo na velocidade de reação, quanto menor o tamanho de partícula do catalisador maior a área de superfície para uma dada massa de partículas (RODRÍGUEZ, 2014).

Todavia, utilizando catalisadores sólidos, a reação pode proceder a uma taxa menor porque o sistema se constitui em três fases e, devido aos efeitos de difusão, ocorre inibição da reação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Hamerski e Corazza (2014) avaliaram a potencialidade de um catalisador heterogêneo hidróxido duplo lamelar (HDL) para as reações de esterificação entre ácidos graxos e glicerol para produção de MAG e DAG e obtiveram resultados satisfatórios. Este tipo de catalisador apresenta características interessantes e pode apresentar potencialidade para reações de hidrólise de óleos vegetais para síntese mono e diacilglicerol.

Rodríguez (2014) estudou reações de hidrólise de óleo de soja, em presença de um catalisador heterogêneo ácido e obtiveram bons resultados em termos de rendimentos dos produtos de interesse.

Teixeira (2011) estudou reações de hidroesterificação química de óleo de andiroba via catálise heterogênea ácida e obteve uma taxa de conversão satisfatória para os produtos desejados.

Em se tratando de reações cujos produtos têm textura oleosa, os catalisadores heterogêneos simplificam o tratamento do produto após a reação, uma vez que podem ser removidos facilmente do sistema além de simplificarem o processo de purificação dos produtos sob condições brandas (TREMILIOSI, 2009). Outra característica deste tipo de catalisador é a pouca geração de resíduo, além disso, possui baixo custo devido a sua alta disponibilidade comercial (SOUZA, S. et al., 2012).

Num processo de esterificação, a presença de um catalisador heterogêneo ácido aprimora a reação, atuando como doador de próton para o ácido carboxílico. Os catalisadores argilominerais possuem como uma de suas principais características a presença de sítios ácidos de Lewis e/ou de Brønsted, necessários para promoverem a reação de esterificação (ZATTA, 2013).

Dourado M. S. (2015) estudou a reação de esterificação etílica de ácidos graxos residuais obtidos da purificação da glicerina gerada na produção de biodiesel foi realizada utilizando o catalisador heterogêneo de ácido níobico, os melhores resultados foram obtidos na condição de 200°C com 20% de catalisador, 6 horas de reação e razão molar álcool/ácidos graxos igual a 20, onde a conversão foi de 70% dos ácidos graxos convertidos em ésteres.

A utilização do catalisador argila KSF na reação de esterificação heterogênea dos ácidos graxos livres do óleo da polpa de macaúba foi estudada por Colonelli et al. (2014), e o maior rendimento obtido foi de aproximadamente 7% com condições de reação de 80°C, razão molar etanol/AGL de 4:1 e 2% de catalisador.

No processo de esterificação onde utilizou-se o catalisador heterogêneo Amberlyst 15 para produção de biodiesel, Hykkerud e colaboradores (2016) verificaram que quanto mais alta a temperatura e maior a quantidade de catalisador, maior a conversão, onde a reação foi ajustada para ocorrer em 6 horas. O maior rendimento obtido neste estudo foi de 53% com uma razão molar 1:1 de álcool/ácido graxo.

As argilas são compostas principalmente por argilominerais, que são silicatos hidratados de alumínio ou magnésio, contendo teores significativos de ferro, cromo, níquel e outros cátions. Quando as argilas são ativadas com ácidos, adquirem características adsorptivas e catalíticas, e são empregadas industrialmente como catalisadores, suportes catalíticos e adsorventes (HYKKERUD *et al.*, 2016)

De uma maneira geral, as argilas e seus derivados não são tóxicos e não apresentam problemas sistemáticos com saúde e meio ambiente (GBA). No Brasil, o emprego e a pesquisa de catalisadores baseados em argilominerais são motivados pelo seu baixo custo, substituição de catalisadores importados e alta disponibilidade comercial. Além disso, estes tipos de catalisadores possuem alta atividade catalítica, estabilidade térmica sob altas temperaturas e fácil manuseio (ZATTA, L., 2013).

Na Figura 6 é apresentado um esquema da estrutura de um argilomineral e na Figura 7 o esquema de uma lamela de um argilominal do tipo 2:1, grupo ao qual pertencem as montmorilonitas.

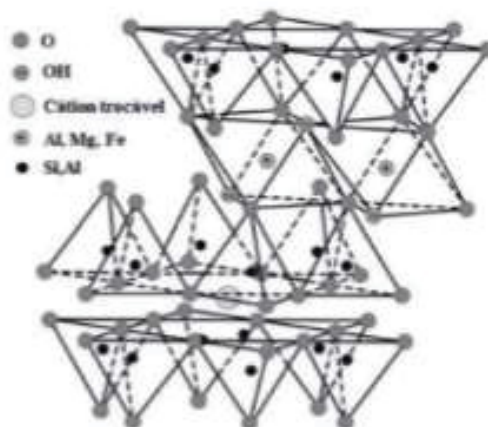


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UM ARGILOMINERAL 2:1
 FONTE: COELHO; SANTOS, 2007.

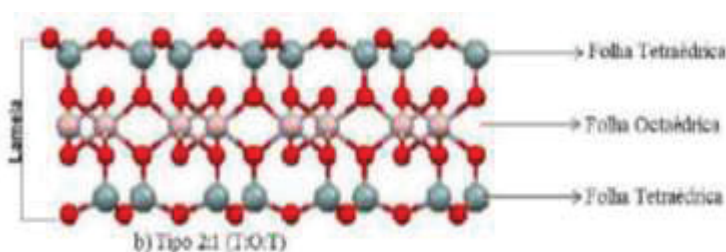


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DAS LAMELAS DE UM ARGILOMINERAL 2:1
 FONTE: ZATTA, 2013.

O desempenho deste tipo de catalisador pode ser aumentado utilizando ativação ácida, tal procedimento tem como objetivos eliminar impurezas cimentadas adsorvidas naturalmente nos cristais, substituir cátions trocáveis por H^+ , abrir as bordas dos cristais e lixiviar cátions octaédricos, tais como Mg^{2+} e Al^{3+} (MORALES-CARRERA et al., 2009; MORALES-CARRERA et al., 2009). Este método, através do ataque de ácidos inorgânicos, envolve a lixiviação de alguns cátions Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} ou Fe^{2+} nas folhas octaédricas das camadas 2:1 causando a desagregação das partículas do argilomineral; substituição do cálcio e outros cátions intercalados por prótons; eliminação de impurezas minerais e dissolução das bordas externas, assim, alterando sua composição química e sua estrutura (COELHO; SANTOS, 2007; PANDA et al., 2010).

A primeira etapa do ataque ácido é a adsorção deste na superfície, levando a substituição dos cátions trocáveis por prótons. A segunda é difusão dos prótons pelas lamelas, ocorrendo a lixiviação do alumínio, magnésio e ferro das folhas octaédricas e tetraédricas; este processo faz com que ocorra a abertura do retículo cristalino, aumentando a área superficial (STEUDEL et al., 2009; ZATTA; RAMOS; WYPYCH, 2013). Os cátions constituintes das folhas octaédricas se tornam solúveis e são desorvidos seletivamente para a fase líquida (PANDA et al., 2010; STEUDEL et al., 2009; ZATTA; RAMOS; WYPYCH, 2013). Na FIGURA 8 está representado o processo de ativação ácida.

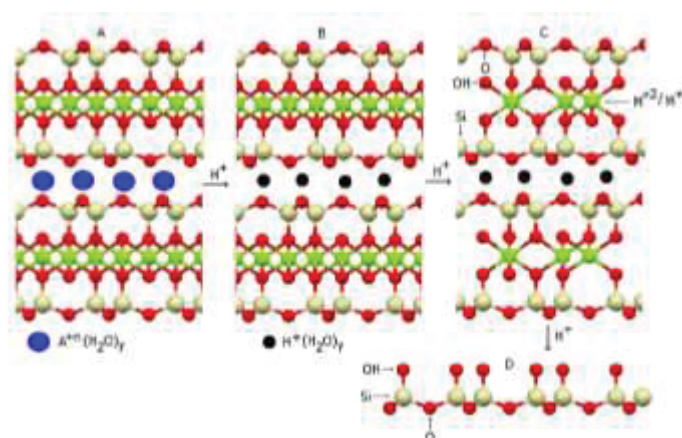


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE ATIVAÇÃO ÁCIDA.
 FONTE: ZATTA, 2013.

Onde: A – representação de duas lamelas de um argilomineral do tipo 2:1

- B – os cátions intercalados são substituídos por prótons hidratados
- C – metais octaédricos (Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+}) são lixiviados da estrutura, D – sílica hidratada obtida pelo colapso da estrutura do argilomineral.

As esmectitas montmorilonitas são constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica, com uma folha central octaédrica de alumínio, unidas entre si por oxigênios comuns às folhas (PATRICIO, 2013). São as mais empregadas no tratamento de ativação ácida, devido principalmente à sua estrutura lamelar e capacidade de inchamento (EMMANUEL et al., 2012).

No trabalho realizado por Santos et al. (2016), a cinética de esterificação de ácido láurico com etanol anidro foi estudada para a obtenção de Biodiesel, neste estudo foi concluído que a cinética catalisada por montmorilonita stx1-b apresentou maior conversão com relação à cinética realizada sem o catalisador.

Zatta (2013) verificou o potencial catalítico de argilominerais ativados com diferentes ácidos minerais e em diferentes condições de processo. Foram conduzidas reações de esterificação metílica e etílica do ácido láurico, esteárico e oleico. Nos sistemas estudados foram observados ganhos na conversão ao se utilizarem os argilominerais.

3.6 ENZIMAS COMO CATALISADORES

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária e quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade de reações, sem serem, elas próprias alteradas neste processo (Champe & Harvery, 1989).

Quase todas as reações orgânicas ocorridas em sistemas biológicos requerem um catalisador. A maioria dos catalisadores biológicos é de enzimas. As enzimas podem aumentar a velocidade de uma reação intermolecular em até 10^6 vezes (BRUICE, 2006). As reações enzimáticas ocorrem normalmente em condições brandas e produzem menos subprodutos devido à elevada especificidade do biocatalisador (RAMANI, 2010).

Do ponto de vista industrial, o biocatalisador deve exibir uma elevada atividade, juntamente com uma elevada estabilidade operacional, de modo a tornar economicamente viável a reação com catálise enzimática (NUNES, 2011).

No estudo realizado por Gattas et al. (2014), onde a enzima *Rhizopus oryzae* imobilizada foi utilizada na reação de hidrólise para produção de monoleína e dioleína, foi obtido após 15 minutos de reação mantida a 37°C, uma composição em massa de 78%, 10% e 12% de trioleína, dioleína e monoleína respectivamente. Além disso, o estudo demonstrou que a lipase imobilizada por adsorção em esferas de alginato foi muito mais ativa do que a imobilizada por adsorção em CaCO₃, o que pode ser explicado por uma melhor proteção da enzima dentro das esferas das alterações do microambiente.

Shweta Gupta (2016), estudou a realização da hidrólise do óleo de oliva, de palma e de mamona para produzir ácidos graxos livres usando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada. Neste estudo verificou-se que as condições ótimas para o maior grau de hidrólise (%) eram na temperatura de 37°C, pH 8,0, a uma concentração de 0,05 M em iso-octano e o tempo de reação inicial de 24 h. Em condições ótimas, o grau de hidrólise para o óleo de oliva, óleo de palma e óleo de mamona foi de 38,5%, 35,4% e 21,2%, respectivamente. A enzima lipozyme RM IM foi utilizada como catalisador na reação de esterificação de ácidos graxos, sendo o tempo ótimo de reação entre 24 e 48 horas onde foram observadas conversões entre 71 e 94% .

Na reação de hidrólise do óleo de soja para a produção de diacilglicerol, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*, DAOMING LI et al., 2015 obteve o melhor resultado, com 33,11% de DAG e TAG entre 68% e 73% sob condições de reação com: pH de 6,5, teor de água de 20%, enzima a uma concentração de 30 U/g e temperatura de 40 °C durante 6 horas.

3.6 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido é um processo de separação que leva em conta as solubilidades relativas de solutos em solventes imiscíveis entre si. Uma separação parcial ocorre quando os componentes da mistura original têm solubilidades relativas diferentes na fase do solvente determinado.

O estudo da extração líquido-líquido de MAG, DAG e TAG com etanol aquoso, realizado por Monick e Treybal (1956), avaliou, inicialmente, dois sistemas: o primeiro constituído por TAG, DAG, etanol e água, e o segundo constituído por DAG, MAG, etanol e água, ambos a 60°C. No equilíbrio, os sistemas formavam duas fases, sendo uma delas rica em etanol aquoso e a outra rica em acilgliceróis. Concluiu-se que moléculas com maior número de grupos polares, no caso, o grupo hidroxila, têm maior afinidade com a fase rica em etanol aquoso quando comparadas com moléculas com um número menor de grupos polares.

Os mesmos autores citados anteriormente estudaram o equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo MAG comercial, e verificaram que os sistemas puros (constituídos de um único tipo de ácido graxo) e comerciais tiveram tendências de distribuição similares. Uma vez que os produtos comerciais continham compostos insaturados e o comprimento da cadeia dos ácidos graxos variava entre 8 a 18 carbonos, concluiu-se que as diferenças estruturais entre mono-, di- e triacilgliceróis são os fatores determinantes no equilíbrio líquido-líquido de acilgliceróis com solventes polares.

Gonçalves e Meirelles (2004) estudaram o equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo óleo de palma + ácido palmítico/oleico + etanol + água a 318.2 K e verificaram que a adição de água no solvente causa um considerável aumento na seletividade do solvente, e um pequeno decréscimo no coeficiente de distribuição dos ácidos graxos livres. Os autores utilizaram os dados experimentais obtidos no ajuste de parâmetros dos modelos NRTL e UNIQUAC. Embora o óleo de palma seja constituído por diferentes moléculas de triacilgliceróis, este foi tratado como um único pseudo-componente com a massa molar calculada por meio de média ponderada em relação à fração molar de triacilgliceróis presentes no óleo. Verificou-se que o sistema foi bem ajustado para ambos os modelos NRTL e UNIQUAC, o que permite a modelagem e simulação de extratores líquido-líquido que utilizam os solventes propostos.

O enriquecimento de DAG por extração líquida-líquida pode ser considerado uma boa alternativa ao processo de destilação, uma vez que pode ser realizado em condições leves de temperatura e pressão, evitando custos energéticos e reações indesejáveis durante o processo (GONÇALVES et al., 2002; RODRIGUES et al, 2003).

Voll et al. (2013) estudou o equilíbrio líquido-líquido do óleo de palma hidrolizado com soluções hidroalcoólicas e mostrou que, devido à diferença na polaridade do DAG e outros acilgliceróis presentes no óleo, uma fase rica em DAG pode ser obtida a partir da mistura de TAG, DAG, MAG e ácidos graxos livres (AGL). Os autores observaram que os coeficientes de partição seguem a marca de tendência TAG > DAG > AGL > MAG, e as diferenças entre os coeficientes destes compostos aumentam com o aumento de água no sistema.

Shiozawa et al. (2015) obteve dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas que contenham óleos refinados, etanol e pequenas quantidades de DAG, MAG e FFA. Esses autores observaram que MAG e FFA apresentaram maior afinidade para a fase de solvente, enquanto DAG apresentou para a fase de óleo, independentemente da fonte de óleo (soja, algodão ou farelo de arroz) e do tipo de AGL (oleico ou linoleico). Esta conclusão indica que as diferenças estruturais entre os ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis (e não o perfil de ácidos graxos) são o fator primário na separação de fase líquido-líquido de acilgliceróis com solventes polares.

Uma melhor compreensão de como o processo de separação líquido-líquido afeta o teor de antioxidantes do produto e, portanto, sua estabilidade se torna útil no estabelecimento de condições adequadas para o enriquecimento efetivo de DAG sem comprometer a sua qualidade e sua estabilidade.

3.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A revisão da literatura revela a importância da modificação de óleos e gorduras para que se obtenha produtos ricos em DAG, que oferece ação benéfica sobre a saúde humana. Os catalisadores argilomineirais aparecem como ótima alternativa catalítica em reações de transformação de óleos pois além de seu baixo custo e alta disponibilidade comercial, não são tóxicos. Esta revisão mostrou ainda que o enriquecimento de DAG através do processo de separação líquido-líquido pode ser considerado uma boa alternativa já que pode ser realizado em condições brandas de temperatura e pressão, evitando custos energéticos e reações indesejáveis durante o processo.

4 PRODUÇÃO DE DAG VIA ESTERIFICAÇÃO DE AGL

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados neste trabalho para obtenção de cinéticas das reações de esterificação, conversões e análise de MAG, DAG e TAG. Estão também apresentados os resultados de conversão e teor de acilglicerois, dos experimentos de reações de esterificação de ácido oleico + glicerol e esterificação de produto de hidrólise + glicerol. Abaixo estão descritas as etapas que serão apresentadas a seguir.

Material e métodos	<ul style="list-style-type: none">•Material e métodos das reações de esterificação do ácido oleico com glicerol, utilizando catalisador argilomineral montmorilonita.•Material e métodos das reações de esterificação do produto da hidrólise com glicerol, catalisadas por lipozime <i>RM IM</i>.
Resultados e discussão	<ul style="list-style-type: none">•Resultados e discussões das reações de esterificação do ácido oleico com glicerol, utilizando catalisador argilomineral montmorilonita.•Resultados e discussões das reações de esterificação do produto da hidrólise com glicerol, catalisadas por lipozime <i>RM IM</i>.
Considerações	<ul style="list-style-type: none">•Conclusões parciais obtidas a partir das reações de esterificação de AGL para produção de DAG.

4.1 MATERIAL

O óleo utilizado neste trabalho foi o azeite extra-virgem da marca andorinha (acidez medida: 1%; ácidos graxos saturados: 15,8%, insaturados: 77,5%, poliinsaturados: 6,7%, conforme declarado pelo fornecedor), comprado em mercado local de Curitiba - Brasil. A enzima utilizada foi LIPOZIME® RM IM da empresa Novozymes, comprada da Sigma-Aldrich. O glicerol utilizado foi da marca Carlo Erba reagentes, com pureza de 99,5%. Foi utilizado solvente n-hexano (Panreac, pureza: 99%) para a filtração do meio reacional na remoção das enzimas. Uma solução de NaOH (Vetec) 0,1 molar foi utilizada nas análises de determinação de acidez. Biftalato

de potássio foi empregado na padronização da solução de NaOH. Fenolftaleína (Vetec) foi utilizada como indicador. Etanol absoluto (Neon, pureza: 99,8%) foi utilizado na diluição das amostras para titulação. O catalisador químico utilizado nas reações de esterificação foi o argilomieral montmorilonita ativada com ácido fosfórico caracterizado por SANTOS, 2014.

4.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Reações de esterificação (ácido oleico + glicerol)

As reações de esterificação do ácido oleico foram conduzidas em um reator Parr® modelo 4597, o qual possui um vaso de aço inox de 50 mL de capacidade. O reator foi preenchido com os reagentes (razão mássica glicerol/ácido oléico de 1:3, sendo 7g de glicerol e, portanto 21g de ácido oleico) e com o catalisador (adicionado em quantidades previamente determinadas: 0%, 5% e 10% da massa de ácido oleico) em até 70% de sua capacidade. Após o preenchimento e vedação do reator iniciou-se o aquecimento e, somente a partir do momento em que o sistema atingiu a temperatura desejada, entre 8 e 20 minutos, iniciou-se a contagem do tempo de reação. As misturas foram submetidas ao aquecimento em diferentes temperaturas (140°C e 160°C) e rotação de 500 rpm.

Para a obtenção dos dados cinéticos, as reações foram conduzidas nos tempos de 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos e cada ponto corresponde a um experimento independente (experimento destrutivo), uma vez que o procedimento de retirada de várias alíquotas reduziria significativamente o volume do meio reacional.

A quantidade de massa dos reagentes permaneceu constante em todas as reações, alterando-se somente a temperatura e quantidade de catalisador no meio reacional. Na Figura 9 é mostrado o reator *Parr* com o banho termostático, ambos utilizados na reação de esterificação.



FIGURA 9. REATOR PARR E BANHO TERMOSTÁTICO UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO (ÁCIDO OLEICO + GLICEROL).

Ao final da reação, o produto foi armazenado em eppendorfs para as posteriores análises necessárias. Uma vez que o produto e o catalisador permanecem em fases bastante distintas, o processo de separação do catalisador foi facilitado.

4.2.2 Reação de esterificação (produto da hidrólise completa + glicerol).

Reação de hidrólise completa

Para a realização da reação de hidrólise foram utilizadas as condições propostas no estudo de CABRAL, 2014. Adicionou-se cerca de 500g de óleo de oliva extra virgem à um béquer com capacidade de 1 litro. Após, adicionou-se água destilada em quantidade correspondente a 20% da massa de óleo utilizada e 1,36% da massa do substrato (óleo+água). Em um banho termostático já ajustado em 45°C, posicionou-se o béquer como num banho-maria, de modo que todo o meio reacional permanecesse coberto pela água. Em seguida ajustou-se o agitador mecânico em 300rpm para garantir a homogeneidade do meio reacional. A Figura 10 demonstra o esquema descrito.



FIGURA 10. AGITADOR MECÂNICO, BANHO TERMOSTÁTICO E BÉQUER UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE.

O tempo total de reação foi de 96 horas. Duas vezes a cada dia, amostras foram retiradas e tituladas para o acompanhamento do aumento da acidez. Para estas retiradas o agitador foi desligado para que as enzimas decantassem e o glicerol pudesse permanecer numa fase distinta do produto com ácido graxo, aumentando a confiabilidade dos resultados da análise. Com a verificação contínua da acidez foi possível perceber necessidade de adicionar mais água ao meio reacional. Quando constatava-se não significativo o aumento da acidez, (considerava-se significativo o aumento de mais que 5% da acidez ao dia), mais água destilada era adicionada ao meio reacional. A cada cerca de dois dias, foi adicionada água numa quantidade correspondente à 5% da massa inicial de óleo. Ao final da reação, todo o meio foi filtrado para a retirada das enzimas com o auxílio do solvente hexano. O volume

filtrado foi rotaevaporado para a retirada do solvente e para facilitar a separação do glicerol formado durante a reação. O produto final rico em ácidos graxos conferiu uma acidez de 97,3%, sendo então armazenado em frasco âmbar e mantido refrigerado (entre 6 e 10°C).

Esterificação (produto da hidrólise + glicerol)

A reação de esterificação entre ácidos graxos livres e glicerol, catalisada pela enzima LIPOZIME® RM IM, foi realizada em reator de vidro com capacidade de 50 mL a temperatura constante de 55°C. Diferentes razões molares entre os reagentes (ácido graxo:glicerol) foram testadas, sendo elas: 4:1, 2:1 e 1:2. A porcentagem em massa da enzima foi mantida constante em 1,36% (em relação a massa total dos reagentes) para todas as reações. O tempo total de reação foi 4 horas.

Para a obtenção dos dados cinéticos, as reações foram conduzidas nos tempos de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e cada um dos pontos corresponde a um experimento independente, sendo experimentos destrutivos, para evitar a redução significativamente do volume do meio reacional.

O hexano foi utilizado na filtração do produto final, facilitando a separação das enzimas do meio. Destaca-se também que o solvente pôde ser reaproveitado após a rotaevaporação.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação de Acidez

Os ácidos graxos livres foram quantificados de acordo com o método AOCS Ca 5a40 (AOCS, 1997). Como o azeite contém diferentes ácidos graxos livres em sua composição, tais moléculas foram tratadas como pseudo-componentes. A massa molar de ácidos graxos livres foi considerada igual a 277,875 g mol⁻¹ (Lima et al., 2016). Este valor foi estimado como uma média ponderada de massa molar de diferentes ácidos graxos livres presentes no azeite utilizado neste trabalho (15,8% de saturado, 77,5% de insaturado e 6,7% de ácidos graxos livres poliinsaturados, conforme declarado pelo fornecedor). O ácido palmítico (256,429 g mol⁻¹) foi utilizado para representar os ácidos saturados, enquanto o ácido oleico (282,467 g.mol⁻¹) e o ácido linoleico (280,451 g.mol⁻¹) foram utilizados para representar os ácidos insaturados e poliinsaturados, respectivamente.

Para determinar a acidez das amostras foi pesado cerca de 1g, diluída em 50 ml de etanol absoluto em um Becker. Posteriormente adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína na solução e esta titulada, sob agitação, com solução de NaOH 0,1M até o aparecimento de coloração rósea persistente. A acidez será calculada em porcentagem mássica.

Cálculo da acidez:

$$AGL\% = \frac{V \cdot M \cdot PM_{agl}}{P_{oleo} \cdot 10}$$

Onde:

AGL% = acidez da amostra

V = ml da solução de NaOH gastos

M = molaridade real da solução de NaOH

PM_{agl} = Massa molar do ácido graxo livre analisado

P_{oleo} = g da amostra de óleo analisada

4.3.2 Análise de Acilgliceróis por cromatografia gasosa

O procedimento analítico para determinar o teor de ácido graxo livre (AGL), monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) e triacilglicerol (TAG) foi baseado na norma EN 14105 do Comitê Europeu de Padrões. As amostras foram analisadas usando um cromatógrafo Shimadzu (GC 2010 Plus), coluna capilar (Select Biodiesel, Agilent 15 mx 0,32 mm x 0,10 μm), detector de ionização de chama (FID), injetor automático (1 μL) e modo de injeção particionada (1:10). As temperaturas do injetor e do detector foram de 380 ° C e 400 ° C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada para aumentar, em primeiro lugar, de 50 ° C para 180 ° C a uma taxa de 15 ° C.min⁻¹. Depois disso, aumentar para 230 ° C a uma taxa de 7 ° C.min⁻¹, e finalmente, a uma taxa de 10 ° C.min⁻¹, atingir 380 ° C mantido por 6 min. O gás de arraste foi o hélio a 29,2 cm³.s⁻¹. As curvas de calibração foram obtidas utilizando padrões externos (monooleína, dioleína, trioleína e ácido oleico) e padrões internos (ácido láurico e tricaprina). Os padrões foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, com grau de pureza superior a 99%. Prepararam-se amostras e curvas de calibração utilizando N-metil-N-trimetiltrifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich, pureza 98,5%) como derivatizante. O conteúdo dos produtos de reação foi expresso em termos da quantidade total de FFA, MAG, DAG e TAG (por percentagem de peso) na amostra.

4.3.3 Dosagem de atividade lipolítica (hidrólise) por pHSTAT

A dosagem de atividade lipolítica de hidrólise pelo método titulométrico, consiste na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre os triacilglicerídeos. Uma unidade (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto. Este método baseia-se na metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações. Para o preparo da emulsão contendo o substrato, inicialmente preparou-se uma solução tampão Tris-HCl (0,25 m.mol.L⁻¹, pH 7,0), e em seguida, adicionou-se a esta solução CaCl₂ (2 m.mol.L⁻¹), NaCl (150 mmol.L⁻¹) e goma arábica (3%, m/v) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). Após total dissolução da goma arábica, adicionou-se o substrato (óleo de oliva) (67 mmol.L⁻¹). A solução foi mantida sob forte agitação até formar uma emulsão. Posteriormente, a emulsão foi agitada

novamente em um liquidificador por 5 min. Para cada ensaio, adicionou-se 20 mL da emulsão de óleo de oliva em um vaso termostatizado na temperatura de 45°C. Ajustou-se as condições do ensaio e o tempo da reação de hidrólise em 300 segundos. Adicionou-se então, 10 mg da enzima imobilizada em um suporte comercial.

Para a análise de dados, os volumes de NaOH (0,05M) consumidos foram anotados a cada 30s até 300s e um gráfico de volume de NaOH (mL) x tempo (s) foi feito. A partir do gráfico (o qual teve o ajuste mais próximo de uma reta), calculou-se a velocidade da reação (dV/dt), que é o consumo de NaOH pelo tempo. Calcula-se então a atividade através da equação 6.

$$A = \frac{\left(\frac{\partial V}{\partial t}\right) \cdot [NaOH] \cdot F_{NaOH} \cdot F_{pH}}{X} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

$\partial V/\partial t$ = velocidade do consumo de NaOH (mL.min⁻¹); [NaOH] (μmol.mL⁻¹)

F_{NaOH} = fator de correção da solução de NaOH (adimensional)

F_{pH} = fator de correção relacionado ao pKa do substrato no pH do ensaio (adimensional)

X = quantidade de enzima imobilizada adicionada em um suporte sólido (g)

A = atividade lipolítica nas condições de pH e temperatura analisadas. Unidade de atividade lipolítica (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de ácidos graxos por min.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Conversões das reações de esterificação (ácido oleico + glicerol) catalisadas por argilomineral

Para verificar as maiores conversões foram observadas a acidez do produto final, uma vez que a mistura começa com a maior acidez possível na reação, devido ao ácido oleico. Essa acidez vai diminuindo conforme o tempo de reação aumenta. Ao

longo da reação as moléculas de ácido graxo reagem com o glicerol, levando a formação dos produtos (MAG, TAG, DAG e AGL) e diminuição da acidez, ou seja, quanto menor a acidez do produto final (levando em consideração a acidez inicial no tempo de 0 horas), maior a formação dos produtos e, portanto, maior a conversão da reação.

A reação de esterificação do ácido oleico com glicerol, utilizando como catalisador o argilomineral montmorilonita ativada com ácido fosfórico (STx1-PO, 5M2h) teve duração total de 6 horas. No presente trabalho, a reação foi realizada em duas temperaturas diferentes (140°C e 160°C), sendo analisados tempos variados de reação (0 horas, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 6 horas). Em cada temperatura, quantidades definidas de catalisador foram testadas (0%, 5% e 10%), sendo o branco das reações correspondente a 0% de catalisador adicionado. A tabela a seguir apresenta os resultados de acidez obtidos para cada ponto experimental realizado.

TABELA 3. ACIDEZ FINAL OBTIDA PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM GLICEROL, CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

Tempo(min)	140°C			160°C		
	Branco	5% cat	10% cat	Branco	5% cat	10% cat
0	89,10	89,49	90,33	85,98	91,50	83,55
30	73,00	85,42	86,24	76,60	84,03	74,48
60	65,34	83,21	81,55	66,02	74,99	67,34
120	51,97	72,17	80,16	62,78	52,77	53,88
180	49,58	67,77	71,76	47,07	24,47	44,35
240	48,21	65,34	68,13	44,05	11,61	40,05
360	48,05	64,99	67,45	32,14	10,34	38,69

Analisando a Tabela 3, verifica-se que a menor acidez final observada ocorreu a 160°C com 5% de catalisador, portanto, é possível prever que nessa mesma condição ocorreu a maior conversão, o que de fato ocorreu. Da mesma maneira percebe-se maior acidez final na reação de esterificação com 10% de catalisador à 140°C. A Tabela 4 mostra as conversões obtidas para cada ponto experimental realizado.

TABELA 4. CONVERSÕES OBTIDAS PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO COM GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

Tempo(min)	140°C			160°C		
	Branco	5% cat	10% cat	Branco	5% cat	10% cat
0	0,84	0,79	1,33	0,72	3,30	0,54
30	3,66	2,19	6,20	1,76	6,55	11,10
60	12,30	2,82	11,49	17,24	18,84	20,23
120	30,35	8,81	12,23	25,04	34,08	35,01
180	33,96	14,88	22,03	44,28	70,00	47,42
240	35,46	39,12	25,80	57,95	84,00	52,28
360	36,58±0,11*	41,01±0,17	25,83±0,11	59,02±0,25	85,10±0,17	46,40±0,15

*Valores médios e desvio padrão de triplicata.

A maior conversão (85,10%) foi percebida no tempo 6hs da reação à 160°C e 5% de catalisador, a segunda e terceira maiores conversões ocorreram no mesmo tempo e temperatura, com 0% e 10% de catalisador respectivamente.

Nas reações de esterificação que aconteceram à 140°C houve pouca diferença nos valores de conversão entre as reações com e sem catalisador, o que pode acontecer pela adsorção física do catalisador pelo glicerol inibindo a reação. Conversão ainda menor foi observada quando utilizados 10% de catalisador, o que se deve a limitação de transferência de massa que o excesso de catalisador no meio ocasiona.

Comparando os resultados entre os brancos da reação observou-se que ao variar a temperatura de 140 °C para 160 °C o ganho de conversão foi significativo, de 36,58% para 59,02%. Este resultado confirma o caráter endotérmico da reação de esterificação do ácido oleico, destacando-se que mesmo sem o uso de catalisador esta reação alcança conversões expressivas.

Tanto à 160°C como à 140 °C, a reação sem catalisador apresentou conversão menor que quando utilizado 10% deste. Ainda em ambas as temperaturas o melhor resultado de conversão atribui-se à utilização de 5% de catalisador. Assim é possível dizer que o catalisador se apresenta eficiente nas reações, nas duas temperaturas testadas. E ainda pode-se afirmar que o excesso de catalisador prejudica a reação em termos de conversão.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, observou-se efeito positivo no aumento da temperatura.

As Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 apresentam graficamente os resultados de conversão das cinéticas de esterificação nas diferentes temperaturas e concentrações de catalisador.

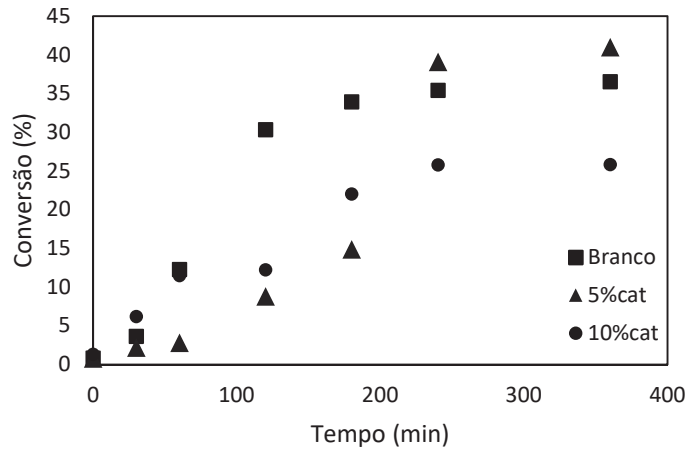


FIGURA 11 – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO + GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C.

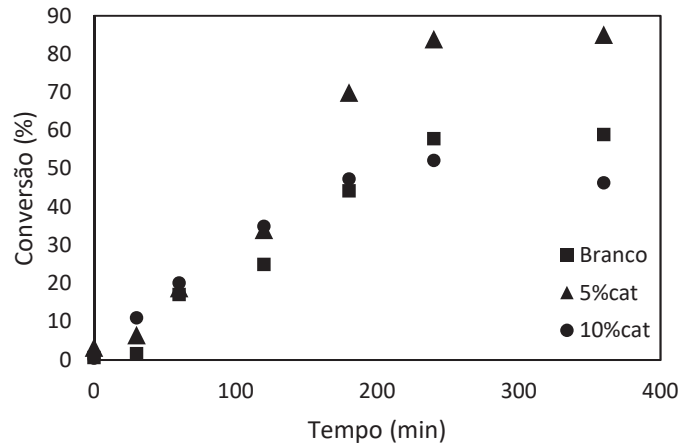


FIGURA 12 – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO+GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 160°C.

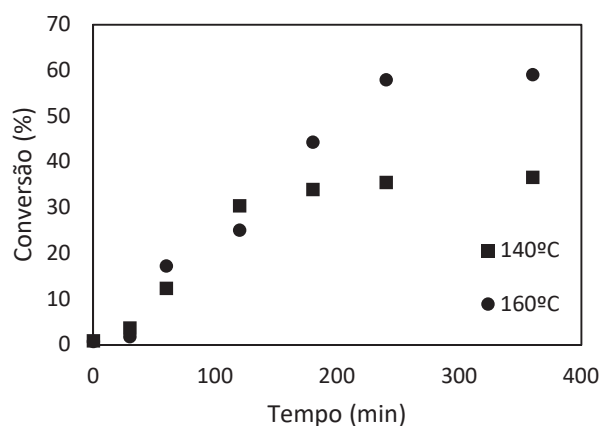


FIGURA 13. – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO + GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C E 160°C, SEM CATALISADOR.

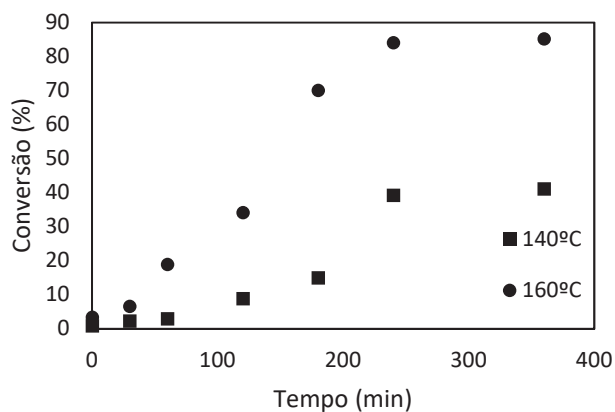


FIGURA 14. – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO OLEICO+GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 140°C E 160°C 5% DO CATALISADOR.

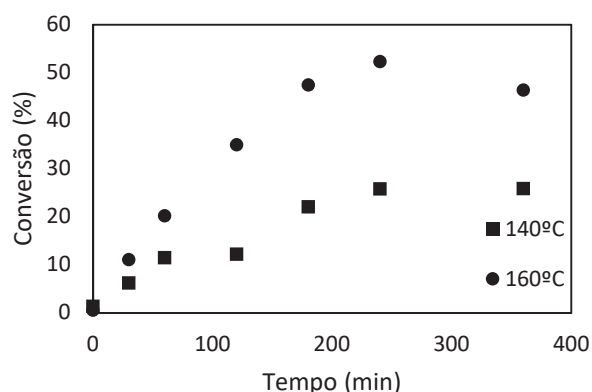


FIGURA 15. – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DO OLEICO+GLICEROL CATALISADA POR ARGILOMINERAL MONTMORILONITA ATIVADA COM ÁCIDO FOSFÓRICO A 160°C E 140°C E 10% DO CATALISADOR.

As cinéticas com 5% de catalisador apresentaram maiores conversões para ambas as temperaturas (140°C e 160°C). É notável que os brancos das cinéticas apresentaram maiores conversões com relação às reações feitas com 10% de catalisador, para ambas as temperaturas também.

Como concluído por Hamerski F. (2013), a adição de catalisador no meio reacional aumenta a conversão da reação, o que de fato ocorreu no presente trabalho para adição de 5% de catalisador no meio reacional. A cinética com maior conversão realizada neste trabalho apresentou um resultado satisfatório de 85,10%.

4.4.2 Análise de acilgliceróis das reações de esterificação de ácido oleico + glicerol

Os resultados do teor de acilgliceróis das amostras, obtidos por cromatografia gasosa, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 e Figuras 16 e 17.

TABELA 5. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 160°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.

Tempo (min)	Catalisador(%m/m)								
	5%			10%			0%		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	2,27	1,36	0,00	7,28	3,11	0,00	3,07	1,68	0,00
60	4,36	1,86	0,00	10,72	4,73	0,00	9,22	3,69	0,00
120	11,89	5,41	0,00	15,33	8,86	0,68	14,54	9,3	0,82
180	20,7	13,95	1,43	18,89	13,35	1,34	15,39	10,17	0,98
240	23,25	17,85	2,28	19,99	16,75	2,81	18,34	14,85	2,04
360	24,69	22,57	3,19	22,09	17,46	4,37	19,47	18,07	2,91

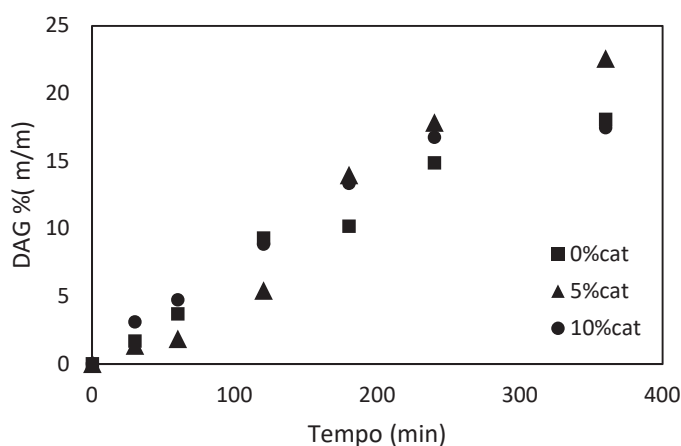


FIGURA 16. TEOR DE DAG NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 160°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.

TABELA 6. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 140°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.

Tempo (min)	Catalisador (%m/m)								
	5%			10%			0%		
	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG	MAG	DAG	TAG
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,14	0,05	0,00	2,80	1,97	0,00	0,81	0,35	0,00
60	3,74	2,20	0,00	4,34	2,39	0,00	4,30	2,57	0,00
120	6,57	3,65	0,00	7,03	3,64	0,00	6,91	3,64	0,00
180	7,57	4,34	0,00	8,85	5,07	0,00	8,76	5,11	0,00
240	11,33	6,68	0,02	12,16	8,33	0,85	12,37	8,93	0,89
360	12,12	7,59	0,75	13,02	9,13	0,91	14,82	11,76	1,16

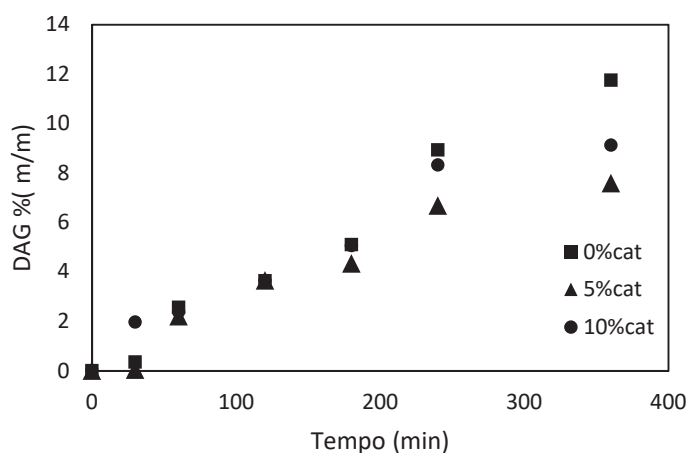


FIGURA 17. TEOR DE DAG NAS AMOSTRAS DAS REAÇÕES À 140°C, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR.

A maior concentração de DAG foi obtida nas mesmas condições em que se obteve a maior conversão de reação (160°C; 5% de catalisador). Com base nas Tabelas 5 e 6 ainda é possível perceber a influência do aumento da temperatura na obtenção de DAG, sendo que os melhores resultados foram à 160°C.

Assim como nas conversões, percebeu-se maior concentração de DAG nas amostras das reações com 5% de catalisador para ambas temperaturas.

Ainda, para as duas temperaturas estudadas, foram obtidos teor de DAG semelhantes para amostras de reações com 10% de catalisador e sem catalisador. Este resultado pode ser explicado pelas limitações de transferência de massa que o excesso de catalisador ocasiona, limitando a formação dos produtos de interesse.

4.4.3 Obtenção de produto rico em ácido graxo livre através da reação de hidrólise.

A enzima LIPOZIME® RM IM se mostrou eficiente como biocatalisador na reação de hidrólise, com atividade de 2307 U/g (calculada através da metodologia apresentada na seção 4.2.2.9) e também como biocatalisador nas reações de esterificação. A verificação contínua da acidez foi essencial para manter a eficiência da reação de hidrólise, possibilitando manter o equilíbrio sempre deslocado no sentido dos produtos, com a adição gradativa de água destilada ao longo da reação. No estudo realizado por Shweta Gupta (2016), que realizou a reação de hidrólise do óleo de oliva utilizando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada como catalisador, foi obtido

conversão de 38,5% em 24 horas de reação a 37°C. A reação de hidrólise enzimática realizada no presente trabalho, chegou ao fim após 96 horas de duração e um produto rico em ácidos graxos livres foi obtido com acidez satisfatória de 97,3%.

4.4.4 Conversões das reações de esterificação do produto da hidrólise + glicerol, catalisadas por LIPOZIME® RM IM

A reação de esterificação do produto rico em ácidos graxos livres com o glicerol catalisada pela enzima LIPOZIME® RM IM pôde ser realizada em condições brandas, o que gera menor custo. Para verificar as maiores conversões obtidas neste trabalho, foi considerada a acidez do produto final, uma vez que a reação começa com a maior acidez possível, devido ao produto de hidrólise, rico em ácidos graxos livres. Essa acidez vai diminuindo conforme o tempo de reação de aumenta.

A boa performance desta enzima numa reação de esterificação já foi demonstrada por Schneider (2005), o qual obteve conversões entre 71% e 94%.

Três razões molares diferentes foram testadas mantendo-se constante a temperatura de 55°C e porcentagem de enzima de 1,36%. A tabela 7 apresenta os resultados de acidez e conversão obtidos para cada ponto experimental realizado.

TABELA 7. ACIDEZ FINAL E CONVERSÕES OBTIDAS PARA CADA CINÉTICA EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DE PRODUTO DE HIDRÓLISE + GLICEROL, CATALISADA PELA ENZIMA LIPOZIME® RM IM.

Tempo (min)	Razão molar [ácido:glicerol]					
	4:1		2:1		1:2	
	Acidez(%)	Conversão(%)	Acidez(%)	Conversão(%)	Acidez(%)	Conversão(%)
0	91,03	0	91,10	0	62,23	0
30	89,12	2,46	80,08	12,23	60,50	7,55
60	68,07	25,69	71,45	21,16	55,11	11,43
120	62,53	29,25	47,14	48,68	16,35	74,09
180	59,37	35,37	47,28	48,77	20,21	68,32
240	56,15	38,42±0,25*	44,43	51,06±0,11	17,10	73,46±0,19

Analisando a Tabela 7, verifica-se que a menor acidez final observada (17%) ocorreu com a razão molar de 1:2. A maior conversão (73%) foi observada nas mesmas condições. Este resultado foi obtido através da cinética de 4 horas a 55°C, 1,36% de enzima e razão molar 1:2, a segunda e terceira maiores conversões

ocorreram com as razões molares de 2:1 e 4:1 respectivamente. A seguir são apresentadas as Figuras 18, 19 e 20, que demonstram graficamente a conversão versus tempo das cinética estudadas.

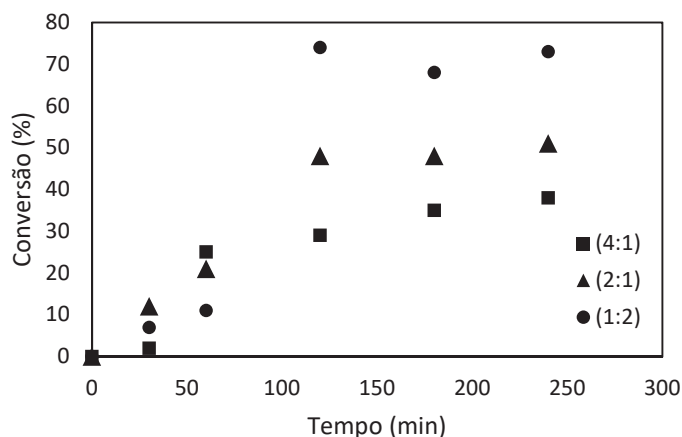


FIGURA 18. – CONVERSÃO EXPERIMENTAL DA ESTERIFICAÇÃO DE PRODUTO DE HIDRÓLISE + GLICEROL, CATALISADA PELA ENZIMA LIPOZIME® RM IM. A 155°C, 1,36% DE ENZIMA E RAZÃO MOLAR 4:1, 2:1 E 1:2.

A maior conversão obtida (73%) ocorreu com a cinética de razão molar 1:2, a qual possui maior quantidade de glicerol entre as três razões molares testadas. Observa-se também que, a menor conversão (38%) ocorreu com a razão molar 4:1, com isso, é possível concluir que, de acordo os experimentos realizados e os resultados obtidos, uma maior quantidade de glicerol com relação ao ácido graxo acarreta num aumento da conversão da reação.

Assim como descrito na literatura, a esterificação de ácidos graxos com glicerol catalisada por catalisador apresenta bons resultados em condições brandas. No presente trabalho, a reação foi conduzida de forma satisfatória a 55°C.

4.4.5 Análise de acilglicerois das reações de esterificação de produto da hidrólise + glicerol

A partir da análise por cromatografia gasosa, é possível determinar as proporções de MAG, DAG e TAG contidas nas amostras de cada cinética estudada. Os resultados obtidos por este método estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA PARA ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL), GLICEROL (GL), MAG, DAG E TAG CONTIDOS NAS AMOSTRAS PARA DIFERENTES RAZÕES MOLARES DE ÁCIDO GRAXO:GLICEROL.

Razão molar	Tempo (min)	AGL (%m/m)	GL (%m/m)	MAG (%m/m)	DAG (%m/m)	TAG (%m/m)	DAG/GL	DAG/MAG
4:1	0	92,99	7,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	89,81	6,30	1,65	2,24	0,00	0,35	1,35
	60	77,57	4,07	4,81	11,52	2,03	2,83	2,39
	180	66,63	2,08	7,11	21,50	2,69	10,33	3,02
	240	66,08	1,78	9,01	20,12	3,02	11,30	2,23
2:1	0	87,71	12,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	79,55	10,74	3,03	6,68	0,00	0,62	2,20
	60	73,12	9,72	4,46	10,50	2,21	1,08	2,35
	180	57,87	6,67	11,22	22,32	1,91	3,35	1,98
	240	57,78	7,14	7,19	25,26	2,62	3,54	3,51
1:2	0	71,70	28,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	61,39	26,79	3,26	8,55	0,00	0,32	2,62
	60	47,20	24,74	8,12	18,04	1,90	0,72	2,22
	180	29,52	22,10	14,27	31,81	2,29	1,43	2,22
	240	16,39	20,10	19,44	41,25	2,81	2,05	2,12

A cinética com maior quantidade de DAG presente ao final da reação foi a de razão molar 1:2, a mesma na qual foi obtida maior conversão. Uma quantidade de 40,32% de DAG, contra apenas 3,54% de TAG é altamente apreciável para o fim de obter produto rico em diacilgliceróis. Novamente a maior quantidade de glicerol com relação ao ácido graxo no início da reação proporcionou o resultado mais satisfatório, ressaltando ainda que, ao final das reações uma quantidade considerável dos reagentes ainda estava presente, o que significa que um maior tempo de reação pode acarretar em resultados ainda melhores.

5.6 CONSIDERAÇÕES

De acordo com os resultados obtidos, comparando as cinéticas de esterificação de ácido oleico + glicerol, é possível afirmar que a maior conversão (85,10%) foi obtida a 160°C, com 5% de catalisador, ao final de 6 horas de reação. Concluindo que o catalisador utilizado apresenta efeito positivo na conversão de reação e na produção de diacilglicerol.

Ainda em relação as reações de esterificação de ácido oleico + glicerol, pode-se afirmar que o excesso de catalisador não apresenta resultado satisfatório quanto à conversão, uma vez que as cinéticas com 10% de catalisador apresentaram conversões menores em relação às cinéticas feitas sem catalisador, para ambas as temperaturas de 140°C e 160°C.

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que, para as reações de esterificação de produto de hidrólise + glicerol, a maior conversão (73%) foi encontrada a 55°C, com 1,36% de enzima e razão molar 1:2 (ácido graxo: glicerol), ao final de 4 horas de reação. Uma maior quantidade de glicerol representou uma maior conversão para a reação e ainda uma maior quantidade de DAG presente no produto final. Foi obtido produto rico em diacilgliceróis com uma proporção satisfatória de mais de 40% de DAG e somente cerca de 3% de TAG. Comprovando assim que a utilização da enzima como catalisador pode ser uma boa alternativa quando objetiva-se o emprego de temperaturas mais brandas em processo de obtenção de diacilglicerol.

6 SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA ENRIQUECIMENTO DO ÓLEO EM DAG

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados neste trabalho para obtenção de dados de equilíbrio líquido-líquido, análise de acilgliceróis, tocoferóis e polifenóis das amostras dos experimentos de ELL, análise de estabilidade oxidativa do óleo oriundo da separação LL e obtenção de parâmetros para modelagem do equilíbrio líquido-líquido. Estão também apresentados os resultados obtidos a partir dos experimentos LL. Abaixo está apresentado as etapas que serão descritas a seguir.

Material e métodos	<ul style="list-style-type: none">•Material e métodos da separação líquido-líquido para enriquecimento do óleo em DAG.
Resultados e discussão	<ul style="list-style-type: none">•Resultados e discussões dos experimentos e análises da separação líquido-líquido.
Considerações	<ul style="list-style-type: none">•Conclusões parciais obtidas a partir da separação líquido-líquido para enriquecimento do óleo em DAG.

5.1 MATERIAL

O óleo utilizado neste trabalho foi o azeite extra-virgem da marca andorinha (acidez medida: 1%; ácidos graxos saturados: 15,8%, insaturados: 77,5%, poliinsaturados: 6,7%, conforme declarado pelo fornecedor), comprado em mercado local de Curitiba - Brasil. Uma solução de NaOH (Vetec) 0,1 molar foi utilizada nas análises de determinação de acidez. Biftalato de potássio foi empregado na padronização da solução de NaOH. Fenolftaleína (Vetec) foi utilizada como indicador.

Etanol absoluto (Neon, pureza: 99,8%) foi utilizado na diluição das amostras para titulação. Nas análises do teor de água foram utilizados o reagente Karl Fischer (mistura de iodo e dióxido de enxofre) e metanol (solvente), ambos adquiridos da Panreac.

5.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Hidrólise parcial do óleo de oliva para produção de mistura de ácidos graxos (TAG, DAG, MAG e AGL)

Para a reação de hidrólise foram adicionados 400 g de azeite de oliva e 8,4 g de água a um reator de vidro magneticamente agitado (300 rpm) e aquecido por um banho termostático para manter a temperatura de 45 °C. Após o sistema atingir a temperatura desejada, foi adicionado 6,5 g de enzima Lipozyme RM IM para iniciar a reação de 72 h. Este procedimento foi realizado como sugerido por Voll et al. (2012), a fim de maximizar a produção do DAG durante a hidrólise.

No final da reação, o conteúdo do reator foi filtrado com a adição de n-hexano para diminuir a viscosidade da amostra. O n-hexano foi removido do óleo hidrolizado por rotaevaporação em rota evaporador à 85°C até que nenhum condensado fosse observado.

5.2.2 Medidas de equilíbrio líquido-líquido

As medições do equilíbrio líquido-líquido envolveram sistemas compostos por solvente e óleo. Nestes experimentos o óleo foi óleo de oliva, óleo de oliva hidrolizado, ou uma amostra de óleo obtida em um procedimento de separação de fase líquido-líquido anterior. O solvente utilizado foi etanol ou etanol e água. Assim, as misturas de óleo e solvente eram inicialmente submetidas a agitação mecânica em um Becker de vidro por uma hora para promover o contato íntimo entre as fases.

Os experimentos de equilíbrio líquido-líquido foram então realizados em um funil de decantação de 500 ml que foi deixado dentro de uma estufa de temperatura controlada para manter a temperatura a 45°C. Após 24 h, as fases líquidas foram coletadas do funil de decantação e colocadas em frascos de fundo redondo.

Foi coletada uma amostra de cada fase (cerca de 1 ml) para quantificação da água por titulação de Karl Fisher. O etanol e a água foram removidos de cada fase por rotaevaporação a 85°C até que nenhum condensado fosse observado (geralmente em torno de 15 min). A quantidade de voláteis (água e etanol) presente em cada fase foi determinada pelo balanço de massa. Duas amostras de óleo livre de água e etanol de cada fase foram, portanto, coletadas para a quantificação do ácido graxo livre por titulação e quantificação de acilgliceróis pela metodologia de RMN. Finalmente, 10 g de óleo, livre de água e etanol, de cada fase foram coletados para testes de estabilidade de oxidação e quantificação de antioxidantes.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1 Determinação de Acidez

Os ácidos graxos livres foram quantificados de acordo com o método AOCS Ca 5a40 (AOCS, 1997). Como o azeite contém diferentes ácidos graxos livres em sua composição, tais moléculas foram tratadas como pseudo-componentes. A massa molar de ácidos graxos livres foi considerada igual a 277,875 g mol⁻¹ (Lima et al., 2016). Este valor foi estimado como uma média ponderada de massa molar de diferentes ácidos graxos livres presentes no azeite utilizado neste trabalho (15,8% de saturado, 77,5% de insaturado e 6,7% de ácidos graxos livres poliinsaturados, conforme declarado pelo fornecedor). O ácido palmítico (256,429 g mol⁻¹) foi utilizado para representar os ácidos saturados, enquanto o ácido oleico (282,467 g.mol⁻¹) e o ácido linoleico (280,451 g.mol⁻¹) foram utilizados para representar os ácidos insaturados e poliinsaturados, respectivamente.

Para determinar a acidez das amostras foi pesado cerca de 1g, diluída em 50 ml de etanol absoluto em um Becker. Posteriormente adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína na solução e esta titulada, sob agitação, com solução de NaOH 0,1M até o aparecimento de coloração rósea persistente. A acidez será calculada em porcentagem mássica.

Cálculo da acidez:

$$AGL\% = \frac{V \cdot M \cdot PM_{agl}}{P_{oleo} \cdot 10}$$

Onde:

AGL% = acidez da amostra

V = ml da solução de NaOH gastos

M = molaridade real da solução de NaOH

PM_{agl} = Massa molar do ácido graxo livre analisado

P_{oleo} = g da amostra de óleo analisada

5.3.2 Determinação do teor de água por Karl Fischer

O teor de água nas fases líquidas em equilíbrio foi determinado pela titulação de Karl Fisher.

A determinação do teor de água foi realizada em um equipamento Metler Toledo V30 Volumetric KF Titrator, utilizando reagente Karl Fischer (mistura de iodo e dióxido de enxofre) e o metanol seco (solvente). Primeiramente foi realizada a titulação do solvente, em seguida das amostras as quais foram adicionadas ao solvente, sendo então realizada a análise coulométrica do teor de água.

5.3.4 Análise de acilgliceróis por RMN

O conteúdo de acilgliceróis das amostras dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido foi determinado por RMN. Primeiro, a massa molar dos acilgliceróis foram determinadas supondo que as moléculas de triacilglicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol são resultado da esterificação de três, duas e uma moléculas de ácidos graxos livres com uma molécula de glicerol, respectivamente. Uma vez que a massa molar dos ácidos graxos livres de azeite foi determinada para ser igual a $277,875 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, as massas molares dos acilgliceróis foram calculados como: $M_{TAG} = 871.675 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{DAG} = 611.815 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{MAG} = 351.955 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

O conteúdo de acilgliceróis foi determinado pela análise de ressonância magnética nuclear ^{13}C (RMN) (Bruker 400 MHz avance HD) do centro de RMN da UFPR, utilizando um pulso modificado Bruker para quantificação ^{13}C sem efeito de NOE durante o período de relaxamento (zgig25) e as seguintes condições: delay de relaxamento 3,0000 s; Pulso = 25° ; tempo Acq. = 1,517 s; repetições = 2048; linha de ampliação = 0,3 Hz; e temperatura ambiente. Amostras de 0,7 ml (1:3 v/v de óleo/clorofórmio deuterado) foram preparadas em tubos de ressonância magnética de 5 mm e armazenadas sob refrigeração até análise. Acilgliceróis foram identificados a partir de um sinal correspondente ao carbono G-2 do esqueleto gliceride de cada acilglicerol. Os picos relacionados ao carbono G-2 de 1-mag, 1, 2-DAG, 1, 3-DAG e TAG são encontrados no espectro em 70,25 ppm, 72,1 ppm, 68,3 ppm e 68,9 ppm, respectivamente.

A análise de RMN de ^{13}C foi realizada após pulso de 90°C , potência de desacoplamento do amplificador e amplificação do sinal. Estes parâmetros foram determinados para pulsos padrão. Eles foram obtidos durante a instalação do equipamento e calibrado usando ASTM, etilbenzeno e colesterol como padrões de amostra. Antes das análises foram testados e aprovados sensibilidade, resposta e forma de linha. A quantificação foi realizada usando os parâmetros de padrões de LoD e LoQ com base na razão S/N. Neste estudo, foi utilizado um $\text{S/N} > 20$, que foram observados para MAG, DAG e TAG na zona gliceride de RMN do ^{13}C . Os espectros têm um $\text{S/N} = 52$ para grupos carboxílicos e razão $\text{S/N} = 265$ para os carbonos alquil. Assim, um limiar de $\text{S/N} < 10$ foi utilizado para quantificação e também para LoD.

5.3.5 Análise de tocoferóis e polifenóis

Os tocoferóis e polifenóis das amostras dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido foram analisados por cromatográfica líquida de alto desempenho (HPLC).

Os tocoferóis foram quantificados por HPLC de acordo com o método descrito por Andrikopoulos et al. (1991). Alfa e Delta tocoferóis foram quantificados individualmente, enquanto beta e gama foram quantificados juntos.

Os polifenóis foram quantificados por HPLC de acordo com o método COI/T. 20/doc. n. ° 29.

As incertezas padrão foram estimadas com base no conhecimento geral das experiências e metodologias empregadas (NIST TN 1297:4. Tipo B: avaliação da incerteza padrão).

5.3.6 Estabilidade de oxidação

A estabilidade de oxidação das amostras de óleo foi determinada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Shimadzu 60 Plus), utilizando abordagens isotérmicas e não isotérmicas (Pardauil et al., 2011; Tan et al., 2002; Thurgood et al., 2007). A amostra de óleo foi colocada no forno e submetida a uma atmosfera de nitrogênio puro a 105°C por 10 min, a fim de garantir que a amostra esteja completamente seca quando submetida à atmosfera de oxigênio. Isso é importante para garantir que qualquer alteração no perfil DSC seja devido à oxidação da amostra, e não à perda de massa. Após 10 min em 105°C, o aquecimento foi desligado, assim a temperatura foi diminuída para 40°C.

Para o estudo das isotermas, após o procedimento de secagem, a temperatura foi aumentada de 40°C para a temperatura de análise a uma taxa de 40°C. min⁻¹, o fluxo de nitrogênio foi interrompido, e um fluxo contínuo de oxigênio foi passado através do forno por um tempo suficientemente grande para uma mudança no perfil do fluxo de calor. Essa alteração é atribuída à oxidação da amostra e o tempo decorrido é chamado de tempo de indução de amostra para a temperatura de análise. Para cada amostra foram obtidos três tempos de indução nas temperaturas correspondentes. Com tal informação, os parâmetros aparentes da energia do pre-exponencial e da ativação de uma equação de Arrhenius (com seu formulário linear, como expresso no Eq. 1) podem ser determinados, e o tempo da indução da amostra pode ser previsto para toda a temperatura.

$$\ln \frac{1}{OIT} = \ln A' - \frac{E_a'}{RT} \quad (\text{Eq. 1})$$

Para o estudo de não-isotérmico, após o procedimento de secagem, o fluxo de nitrogênio foi interrompido, e um fluxo contínuo de oxigênio foi passado através do forno como a temperatura elevada de 40°C para 200 e 250°C a uma taxa constante (5, 10 e 15 C min⁻¹). Dependendo da taxa de aquecimento (b), ocorrerá uma alteração no perfil do fluxo de calor a uma determinada temperatura de oxidação (OT). A correlação entre b e OT pode ser usada para determinar os parâmetros aparentes de uma equação de Arrhenius (Eq. 2), que pode ser usada para calcular uma constante de velocidade aparente (K⁰) de uma amostra em função da temperatura. As amostras com valores de K⁰ mais elevados em uma temperatura especificada são menos estáveis à oxidação.

$$K' = A' e^{\left(\frac{E'_a}{R-T}\right)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Para determinar as constantes A' e E'_a da EQ. (2) o β e o OT devem ser correlacionados de acordo com a equação (3), conforme descrito por Thurgood et al. (2007):

$$\log(\beta) = -\frac{E'_a}{2,19 \cdot R \cdot OT} - 2,315 + \log\left(\frac{A' \cdot E'_a}{R}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

6.4 Modelagem do equilíbrio líquido-líquido

Os dados experimentais de ELL obtidos neste estudo foram utilizados para a estimativa de parâmetros de interação binária para o modelo UNIQUAC (Poling et al., 2001). Os valores do r_i e q_i do modelo UNIQUAC foram calculados de acordo com as equações apresentadas por Voll et al. (2013), usando a composição do azeite apresentada na seção 2.2.2 do presente trabalho.

Os parâmetros binários de interação do modelo UNIQUAC (AIJ e a) foram obtidos pela minimização da seguinte função objetivo:

$$OF = \sum_p^{NP} \sum_n^{NT} \sum_i^{NC} (w_{i,n}^{p,exp} - w_{i,n}^{p,calc})^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde $w_{i,n}^{p,exp}$ e $w_{i,n}^{p,calc}$ são os valores da fração mássica experimental e calculada do componente i /pseudo-componente na linha de corte n e na fase p , respectivamente. Os valores de $w_{i,n}^{p,exp}$ foram calculados pela minimização de energia livre de Gibbs de sistemas com composições globais conhecidas (obtidos a partir das linhas de corte experimental, de modo geral a composição está no meio da linha de empate experimental). Desde que nenhuma reação seja considerada, a equação (5) pode ser minimizada para cada cálculo teórico da linha do laço (Voll et al., 2013):

$$G^* = \sum_{i=1}^{NC} \sum_{p=1}^{NP} n_i^p \cdot (\ln(n_i^p) - \ln(nt^p)) + \sum_{i=1}^{NC} \sum_{p=1}^{NP} n_i^p \cdot \ln(\gamma_i^p) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde n_i^p é o número de moles de cada componente na fase p , e nt^p é o número total de moles da fase p . Durante a minimização de G^* , n_i^p são consideradas as variáveis de decisão. Algumas limitações no balanço de massa e a não-negatividade do número de mols foram respeitadas durante os cálculos. $w_{i,n}^{p,calc}$ foram obtidos a partir do número de mols de cada fase e as massas molares de cada componente.

A minimização das duas equações (4) e (5) foi realizada combinando Particle Swarm Optimization o (PSO) (FERRARI et al., 2009) e um método simplex modificado (Press et al., 1992). Quando $w_{i,n}^{p,calc}$ é obtido da minimização da equação (5), é muito importante garantir que o mínimo global de G^* seja obtido. Por essa razão, um método estocástico (PSO) é utilizado para a suposição inicial no procedimento de estimativa de parâmetros.

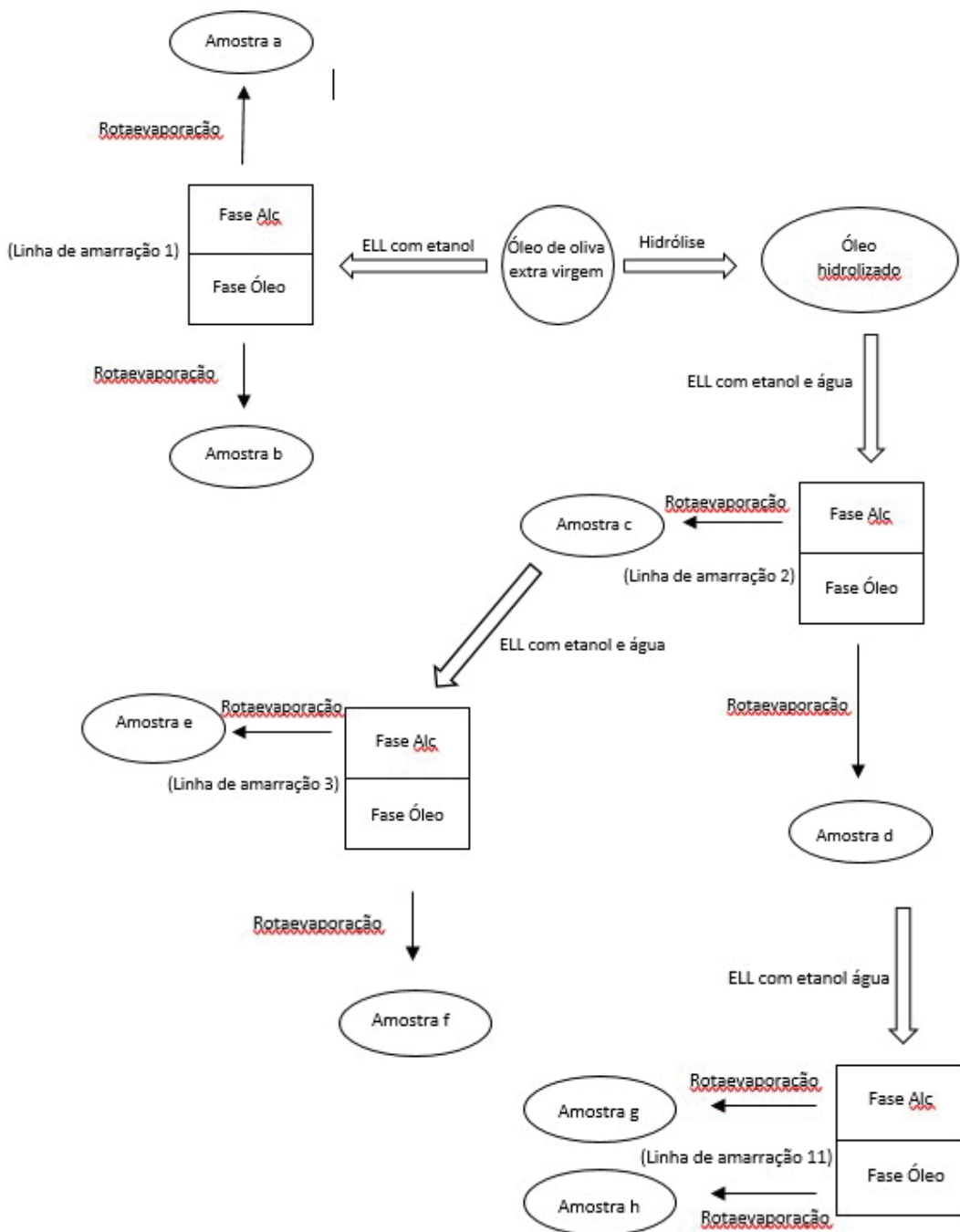
Lima et al. (2016) estudaram o equilíbrio líquido-líquido do azeite + ácidos graxos livres (do azeite) + etanol + água, portanto, os resultados poderiam ser usados em conjunto com os dados que contemplam sistemas mais complexos em que monoacilglicerols e diacilglicerols estão presentes. Uma vez que o óleo é maioritariamente composto de ácido oleico, é provável que o seu acilglicerol e ácidos graxos livres se comportem como pseudocomponentes para fins de modelagem.

Sete linhas de amarração experimental, que incluem 42 frações mássicas experimentais, informações relativas de TAG, AGL, etanol e água de Lima et al. (2016) foram utilizados no procedimento de estimativa de parâmetros, juntamente com as três linhas de corte (compreendendo 32 frações mássicas experimentais

informadas) obtidos no presente trabalho. Vale a pena mencionar que o estudo de Lima et al. (2016) considerou sistemas ternários em relação a quatro componentes (TAG, AGL, etanol e água), enquanto o presente trabalho investigou sistema com seis componentes (TAG + DAG + MAG + AGL + etanol + água).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de facilitar a visualização dos resultados, é apresentado no fluxograma a seguir a origem experimental de cada amostra.



5.5.1 Composição dos óleos (extra virgem e hidrolisado) utilizados nos experimentos de equilíbrio líquido-líquido.

As composições dos azeites extra virgem e hidrolisado utilizados neste trabalho são apresentadas na Tabela 9.

É observado a partir da Tabela 9 que o óleo extra virgem é composto quase que exclusivamente por TAG. O óleo hidrolisado, por outro lado, apresenta quantidades significativas de outros acilglicerois e também de ácidos graxos livres. É interessante notar que a composição do óleo hidrolisado obtida neste trabalho foi bastante semelhante à obtida por Voll et al. (2012) para o óleo de palma hidrolisado nas mesmas condições de reação. Isso corrobora a hipótese de que a cinética obtida por Voll et al. (2012) também pode ser usada para estudos envolvendo óleos diferentes como substratos, como o azeite de oliva.

TABELA 9. COMPOSIÇÃO DO ÓLEO EXTRA VIRGEM E ÓLEO EXTRA VIRGEM HIDROLISADO.

Componente	Concentração (m%)	
	Extra virgem	Hidrolisado
Triacilgliceróis	99,0*	34,78*
Diacilgliceróis	nd***	32,92*
Monoacilgliceróis	nd***	8,70*
Ácidos Graxos Livres	1,0**	23,60*

Incertezas padrão são: *u = 1 m%; **u = 0,5 m%.

**nd – Não detectado pela metodologia RMN.

5.5.2 Dados experimentais e calculados de ELL

Os valores do r_i e q_i para os componentes (etanol e água) e pseudo-componentes (TAG, DAG, MAG e FFA) foram calculados com a mesma metodologia apresentada por Voll et al. (2013) e são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. PARÂMETROS r_i E q_i PARA TAG, DAG, MAG, AGL, ETANOL E ÁGUA.

Componente	r_i	q_i
TAG	38,5601	31,2853
DAG	27,3053	22,4928
MAG	16,0505	13,7004
AGL	12,5541	10,3364
Etanol	2,5755	2,5880
Água	0,9200	1,4000

A Tabela 11 apresenta os valores dos parâmetros A_{ij} e A_{ji} , que foram estimados pela modelagem dos dados experimentais apresentados na Tabela 12, através do modelo UNIQUAC. Composições experimentais e calculadas de fases alcoólicas e oleosas são apresentadas na Tabela 12.

TABELA 11. – PARÂMETRO DE INTERAÇÃO BINÁRIA A_{ij} E A_{ji} DO MODELO UNIQUAC PARA O SISTEMA TAG (1) + DAG (2) + MAG (3) + AGL (4) + ETANOL (5) + ÁGUA (6).

Par ij	A_{ij} (K)	A_{ji} (K)
12	-134,719	- 255,492
13	171,378	- 325,483
14	15,8663	- 202,564
15	282,11	- 70,2896
16	214,319	71,6697
23	- 96,2897	- 490,912
24	- 31,4109	- 395,526
25	- 41,5889	- 167,677
26	7,56003	475,374
34	- 225,772	255,278
35	- 26,8197	- 330,671
36	252,353	- 65,1604
45	14,6745	- 143,74
46	299,56	300,408
56	- 280,171	167,677

DADOS EXPERIMENTAIS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA O SISTEMA TAG (1) + DAG (2) + MAG (3) + AGL (4) + ETANOL (5) + ÁGUA (6) (LINHAS DE AMARRAÇÃO DE 1-3: 45 °C. LINHAS DE AMARRAÇÃO 4-10 SÃO DE LIMA ET AL. (2016): 55°C

Linha de amarração	Fase Alcoólica						Fase Óleo					
	100w ₁	100w ₂	100w ₃	100w ₄	100w ₅	100w ₆	100w ₁	100w ₂	100w ₃	100w ₄	100w ₅	100w ₆
1	7,02	0	0	0,17	92,28	0,53	81,26	0	0	1,45	17,24	0,05
2	0,41	2,67	1,28	6,15	73,36	16,13	47,60	22,62	0,58	10,66	16,82	1,72
3	0,00	1,30	1,70	7,65	63,48	25,87	4,79	18,84	4,34	27,88	41,31	2,84
4*	0	0	0	0,17	23,66	76,17	0	0	0	90,96	7,12	1,92
5*	0	0	0	0,30	46,59	53,11	0	0	0	63,29	28,30	8,41
6*	0	0	0	1,39	50,88	47,73	0	0	0	51,42	34,38	14,20
7*	0	0	0	0,41	21,55	78,04	0	0	0	94,46	4,21	1,33
8*	0,39	0	0	0	80,36	19,25	93,06	0	0	0	6,45	0,49
9*	0,23	0	0	0	67,84	31,93	94,12	0	0	0	5,33	0,55
10*	0,45	0	0	0	56,44	43,11	95,65	0	0	0	3,76	0,59

Experimental

*Dados experimentais foram obtidos de Lima et al. (2016). Incertezas padrão experimentais são: $u = 0,5 \text{ m\%}$ para TAG, DAG MAG e AGL e $u = 1 \text{ m\%}$ para etanol e água na fase alcoólica. $u = 1 \text{ m\%}$ para TAG, DAG MAG e AGL e $u = 0,5 \text{ \%m}$ para etanol e água na fase óleo

A linha de amarração experimental 1 da Tabela 12, foi obtida pela mistura de 80 g de óleo extra virgem (Tabela 9) com 450 ml de etanol. A linha de amarração experimental 2 foi obtida pela mistura de 80 g de azeite hidrolizado, 355 ml de etanol e 56 g de água. Para obter a linha de amarração 3, foi necessário repetir o procedimento utilizado para a linha de corte 2 (três repetições). A fase alcoólica obtida nestes procedimentos foi então seca e 60 g de óleo obtido foi misturado com 249 g de etanol e 42 g de água para obter a linha de amarração 3. Pode ser observado a partir de linhas de corte 2 e 3 (Tabela 12) que MAG e AGL têm mais afinidade com a fase alcoólica, que é a fase mais rica em água, quando comparado com DAG. Além disso, DAG tem mais afinidade com a fase alcoólica quando comparado ao TAG. Isso pode ser atribuído ao fato de que as moléculas do DAG têm uma hidrofobicidade intermediária em comparação com os outros componentes do óleo.

A raiz média do desvio quadrado (RMSD) entre os dados experimentais e calculados, usando o modelo UNIQUAC, apresentados na Tabela 12, foi encontrada, sendo 1,76 m%, o que indica um bom ajuste do modelo para os dados experimentais. As composições de óleo (considerando apenas os componentes TAG, Dag, MAG e FFA) para cada fase para as linhas de amarração 2 e 3 são apresentadas na Tabela 13.

É possível observar que o óleo obtido a partir de uma "fase óleo" é mais rico em TAG quando comparado com o óleo obtido a partir de uma "fase alcoólica". Também pode ser observado que o óleo obtido a partir de uma "fase alcoólica" é mais rico em MAG e AGL quando comparado com o óleo obtido a partir de uma "fase óleo". A fim de avaliar a capacidade do modelo em prever a composição do óleo em fases diferentes para uma circunstância que não fosse usada no procedimento da estimativa dos parâmetros, uma experimento final de ELL foi realizado.

TABELA 13 – COMPOSIÇÕES EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DE CADA FASE (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL E EM PORCENTAGEM MÁSSICA (%M/M) PARA LINHAS DE AMARRAÇÃO 2 E 3 (TABELA 12).

Linha de amarração	Fase Alcoólica				Fase oleosa			
	TAG	DAG	MAG	AGL	TAG	DAG	MAG	AGL
Experimental								
2	3,90	25,40	12,18	58,52	58,43	27,76	0,71	13,10
3	0,00	12,22	15,98	71,80	8,58	33,73	7,77	49,92

Incertezas padrão experimentais são: $u = 1 \%m/m$

Foram efetuadas três repetições do procedimento utilizado para a obtenção da linha de amarração 2 e, por conseguinte, a fase de óleo obtida nestes procedimentos foi seca. 50g do óleo obtido foi misturado com 369g de etanol e 9 g de água foram utilizados para obter a linha de amarração número 11, em que as composições de óleo (isentos de etanol e água) de cada fase são apresentadas na tabela 14. É importante enfatizar que os dados experimentais da linha de amarração 11 não foram utilizados para a estimativa de parâmetros.

TABELA 14 – COMPOSIÇÕES EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DE CADA FASE (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL E EM PORCENTAGEM MÁSSICA (%M/M) (LINHA DE AMARRAÇÃO 11).

Fase Alcoólica				Fase oleosa			
TAG	DAG	MAG	AGL	TAG	DAG	MAG	AGL
Experimental							
33,97	39,34	2,85	23,84	86,30	9,14	0,00	4,56

Incertezas padrão experimentais são: $u = 1 \%m/m$

Pode-se notar que a composição do óleo obtido na fase alcoólica na linha de amarração 11 é mais rica em DAG do que o óleo hidrolizado (Tabela 9). Isso foi possível porque quando o óleo hidrolizado foi submetido ao primeiro passo de LLE (resultando na linha de amarração 2), o óleo obtido a partir da fase óleo era pobre em MAG e AGL, porque estes componentes têm mais afinidade com a fase alcoólica quando comparado com DAG e TAG. Uma vez que este óleo (pobre em MAG e AGL)

foi subsequentemente submetido a um procedimento de LLE (para obter a linha de amarração 11), a maioria de TAG (que é mais hidrofóbico que DAG) migrou para a fase óleo, permanecendo principalmente DAG na fase alcoólica.

Em relação à modelagem termodinâmica proposta neste trabalho, pode-se observar um ajuste razoável (com desvio absoluto de 5,54%) entre resultados experimentais e calculados apresentados na Tabela 14. Foram observados uma superestimação de DAG na fase óleo e uma subestimação de TAG na fase alcoólica, o que é explicado pelo fato de o DAG ter hidrofobicidade mais perto de moléculas de TAG do que MAG ou AGL.

Como a linha de amarração 11 foi obtida adicionando uma pequena quantidade de água quando comparada às condições experimentais utilizadas para a estimativa de parâmetros do modelo, o modelo termodinâmico não foi capaz de separar precisamente DAG e TAG nas duas fases líquidas. De qualquer forma, é importante mencionar que o modelo foi capaz de prever um óleo mais rico em DAG na fase alcoólica e óleo rico em TAG na fase óleo, de acordo com os resultados experimentais.

5.5.3 Resultados de estabilidade oxidativa

A fim de avaliar a influência do processo líquido-líquido sobre a estabilidade de oxidação de uma amostra de óleo, isotérmicas e nonisothermal análise do azeite virgem extra foram realizadas. O óleo extra virgem foi submetido a um processo de separação líquido-líquido com 80 g de óleo e 450 ml de etanol. No entanto, no final do experimento, o conteúdo de óleo obtido a partir das diferentes fases foi misturado novamente. Este procedimento foi realizado apenas para verificar a influência do procedimento de ELL na análise de estabilidade do óleo. Os resultados dos testes de estabilidade oxidativa para estas amostras são apresentados na tabela 15.

TABELA 15 – RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM ANTES E DEPOIS DO PROCEDIMENTO ELL.

Isotérmico	Antes ELL	Depois ELL	Não-isotérmico	Antes ELL	Depois ELL
T (°C)	OIT (min)		Taxa (°C.min ⁻¹)	OT (°C)	
160	21,7	25,0	5,00	178,7	176,8
170	11,0	1,5	10,00	185,2	183,6
180	5,0	5,4	15,00	190,2	188,0
A'(min ⁻¹)	1,08E+13	5,61E+13	A'(min ⁻¹)	1,42E+18	3,55e+18
E'a/R(K)	14337	15109	E'a/R(K)	19212	19537

Incertezas padrão experimentais são $u(\text{OIT}) = 0,5 \text{ min}$ e $u(\text{OT}) = 0,5^\circ\text{C}$.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 15, pode-se observar que a estabilidade do óleo não foi significativamente alterada pelo procedimento de ELL. Também é interessante observar que a análise isotérmica indica um pequeno ganho na estabilidade do óleo após o procedimento de LLE, enquanto a análise não-isotérmica indica o oposto. Métodos isotérmicos e métodos não-isotérmicos foram utilizados neste trabalho de forma complementar, de modo que seus resultados podem corroborar uns aos outros. Normalmente, é inesperado que possam ser obtidas diferentes conclusões a partir dos dois métodos relativos à amostra. No entanto, pode-se salientar que ambos os métodos indicam que não há mudança significativa na estabilidade do óleo após o procedimento de ELL com etanol. A fim de compreender melhor estes resultados, os antioxidantes (tocoferóis e polifenóis) de ambos os óleos (antes e depois do ELL) foram avaliados e os resultados são apresentados na tabela 16.

TABELA 16 – COMPOSIÇÃO DE TOCOFERÓIS E POLIFENÓIS NO ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM ANTES E DEPOIS DO PROCEDIMENTO ELL.

Tocoferol	Antes ELL	Depois ELL	Polifenol	Antes ELL	Depois ELL
	Total (ppm)			Total (ppm)	
A	338,71	256,68	Hidrositirasol	10,4	13,8
$\beta + \gamma$	78,01	71,04	Tirosol	7,6	10,9
δ	2,10	2,15	Outros	225	203,9
Total	418,83	329,88	Total	243	228,7

Incertezas padrão para total de tocoferóis e polifenóis $u = 10 \text{ ppm}$

Pode-se observar na Tabela 16 que o procedimento de ELL resultou em uma perda de tocoferóis totais e polifenóis totais na composição do óleo, o que está de acordo com a pequena perda de estabilidade observada pela análise não-isotérmicas.

No entanto, é importante notar que a quantidade de polifenóis que são importantes para a estabilidade do óleo, hidroxitirosol e tirosol, foram aumentadas durante o procedimento. Isso pode ser associado a um possível pequeno ganho na estabilidade oxidativa observada nas condições utilizadas para a análise isotérmica.

O óleo extra virgem foi submetido a um processo de hidrólise (com o principal objetivo de produzir diacilgliceróis e monoacilgliceróis, e ácidos graxos livres como subprodutos desta reação. Os resultados da estabilidade da oxidação e a composição dos antioxidantes do óleo hidrolisado são apresentados na Tabela 17.

TABELA 17 - RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO HIDOLIZADO.

Testes de Estabilidade			
Isotérmico		Não-isotérmico	
T (°C)	OIT (min)	Taxa (°C min ⁻¹)	OT (°C)
130	72,33	5,00	154,81
140	26,74	10,00	164,05
150	11,82	15,00	168,43
A' (min ⁻¹)	E _a '/R (K)	A' (min ⁻¹)	E _a '/R (K)
6,3801E+14	15460	1,3297E+14	14312
Composição de Antioxidantes			
Tocoferóis	total (ppm)	Polifenóis	total (ppm)
α	245,96	Hidroxitiropsol	23,0
β + γ	73,59	Tirosol	17,7
Δ	2,17	Outros	287,5
Total	321,72	Total	328,2

Pode ser percebido em uma comparação entre as Tabelas 15 e 17 que o óleo hidrolisado é significativamente menos estável à oxidação do que o óleo extra virgem original, apesar do óleo hidrolisado ter apresentado quantidades mais elevadas de antioxidantes importantes como hidroxitirosol e tirosol quando comparado a azeite extra-virgem (Tabela 15). Uma diminuição da quantidade de α-tocoferol é percebida como consequência do processo hidrólise, mas o mesmo foi observado para o processo de ELL, sem alterações na estabilidade oxidativa do óleo. Uma vez que os polifenóis totais de óleo hidrolisado são ainda mais elevados do que o azeite extra-virgem, a diminuição da estabilidade pode ser atribuída à composição do óleo hidrolisado (Tabela 9), que contém quantidades significativas de MAG e AGL.

As amostras de óleo (isentas de etanol e água) obtidas a partir de fases alcoólicas e oleosas das linhas de amarração 1, 2, 3 e 11 (ver Tabelas 12-14) foram

avaliadas de acordo com a sua estabilidade oxidativa. Tais resultados são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRE DE ETANOL E ÁGUA) OBTIDOS DAS FASES ALCOOLICA E ÓLEO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO 1,2,3 E 11.

Isotérmico		Não-isotérmico	
T (°C)	OIT (min)	Taxa (°C.min ⁻¹)	OT (°C)
Amostra a: fase alcoólica da linha de amarração 1 (97,64 m% de TAG e 2.36 m% de AGL)			
160	44,49	5,00	186,26
170	20,69	10,00	191,25
180	10,36	15,00	194,13
Amostra b: fase óleo da linha de amarração 1 (98,25 m% de TAG e 1,75 m% de AGL)			
140	24,94	5,00	163,50
150	10,14	10,00	169,68
160	4,40	15,00	173,72
Amostra c: fase alcoólica da linha de amarração 2 (composição: ver tabela 13)			
120	77,24	5,00	153,67
130	33,64	10,00	161,10
140	12,01	15,00	166,70
Amostra d: fase óleo da linha de amarração 2 (composição: ver tabela 13)			
120	52,22	5,00	149,34
130	15,87	10,00	156,51
140	6,96	15,00	162,03
Amostra e: fase alcoólica da linha de amarração 3 (composição: ver tabela 13)			
110	64,28	5,00	144,65
120	27,56	10,00	151,55
130	11,78	15,00	157,14
Amostra f: fase óleo da linha de amarração 3 (composição: ver tabela 13)			
110	72,69	5,00	147,08
120	32,70	10,00	153,97
130	13,43	15,00	159,49
Amostra g: fase alcoólica da linha de amarração 11 (composição: ver tabela 14)			
120	51,87	5,00	150,69
130	20,10	10,00	158,46
140	6,85	15,00	162,79
Amostra h: fase óleo da linha de amarração 11 (composição: ver tabela 14)			
120	78,72	5,00	155,06
130	33,49	10,00	163,87
140	14,33	15,00	168,72

Incertezas padrão são: $u(OIT) = 0.5 \text{ min}$ e $u(OT) = 0.5^\circ\text{C}$

Os parâmetros A' e E'_a das equações (1) e (3) foram ajustados a partir dos dados da tabela 18 e apresentados na Tabela 19.

TABELA 19 - PARÂMETROS A' E E'_a PARA AMOSTRAS DE ÓLEO OBTIDAS DAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS ELL.

Amostra (ver Tabela 18)	Isotérmico		Não Isotérmico	
	A' (min ⁻¹)	E'_a/R (K)	A' (min ⁻¹)	E'_a/R (K)
<i>a</i>	4,9850E+12	14305	7,1119E+26	28466
<i>b</i>	8,4004E+14	15525	4,3643E+19	20009
<i>c</i>	5,9449E+14	15099	1,0846E+14	15137
<i>d</i>	2,5588E+16	16388	1,9643E+15	15224
<i>e</i>	1,0963E+13	13102	2,3668E+15	15125
<i>f</i>	7,9912E+12	13034	3,6423E+15	15390
<i>g</i>	2,6414E+16	16430	8,7490E+15	15901
<i>h</i>	2,4091E+13	13833	1,6689E+14	14413

Os parâmetros apresentados na Tabela 19 fornecem informações sobre o quão estável é uma amostra e como sua estabilidade é afetada por uma mudança de temperatura. O tempo de indução da oxidação (OIT) e as temperaturas de oxidação (OT) de uma amostra podem ser estimados para diferentes temperaturas e taxas de aquecimento de acordo com estes parâmetros. A fim de tornar mais fácil a comparação da estabilidade oxidativa das diferentes amostras de óleo apresentadas neste trabalho, OIT em 150°C e OT para 10°C min⁻¹, foram calculados de acordo com as equações (1) e (3), respectivamente, e apresentados na Tabela 20.

TABELA 20 – TEMPO DE INDUÇÃO DE OXIDAÇÃO E TEMPERATURAS DE OXIDAÇÃO CALCULADAS PARA ÓLEO DE OLIVA EXTRA VIRGEM, ÓLEO DE OLIVA HIDROLIZADO E AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRES DE ETANOL E ÁGUA) OBTIDAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS DE ELL.

Amostra de óleo	OIT (min) à 150 °C	OT (°C) - 10 °C min ⁻¹
Óleo de oliva extra virgem	48,52	185,62
Óleo hidrolizado	11,55	163,57
<i>a</i> *	96,45	191,21
<i>b</i> *	10,22	169,82
<i>c</i> *	5,28	161,56
<i>d</i> *	2,58	157,00
<i>e</i> *	2,56	152,14
<i>f</i> *	2,98	154,48
<i>g</i> *	2,76	158,32
<i>h</i> *	6,54	163,68

* ver Tabela 18 para obter detalhes destas amostras.

Os teores de antioxidantes nas amostras apresentadas na tabela 20 são apresentados na Tabela 21.

TABELA 21 – ANTIOXIDANTES DO ÓLEO DE OLIVE EXTRA VIRGEM, ÓLEO DE OLIVE DIDROLIZADO E AMOSTRAS DE ÓLEO (LIVRE DE ÁGUA E ETANOL) OBTIDAS DAS FASES ALCOÓLICA E ÓLEO DOS EXPERIMENTOS DE ELL.

Amostra de óleo	Tocoferóis (ppm)				Polifenóis (ppm)		
	α	$\beta + \gamma$	δ	Total	Hidroxitirosol	Tirosol	Total
EV óleo de oliva	338,7	78,0	2,1	418,8	10,4	7,6	243,0
Óleo hidrolizado	246,0	73,6	2,2	321,7	23,0	17,7	328,2
<i>a</i> *	687,8	181,3	5,5	874,7	73,9	43,6	702,7
<i>b</i> *	124,5	29,2	0,7	154,4	0	0	2,9
<i>c</i> *	1,0	47,7	3,0	51,7	14,8	59,1	735,9
<i>d</i> *	49,7	45,1	1,3	96,2	0	1,5	24,6
<i>e</i> *	0,2	14,3	2,4	16,9	10,4	100	1112,0
<i>f</i> *	0,6	37,3	3,4	41,3	1,3	17,8	182,9
<i>g</i> *	96,0	67,0	2,2	165,2	3,5	4,6	51,6
<i>h</i> *	35,4	15,8	0,2	16,0	0	0	1,2

* ver tabela18 para detalhes das amostras. Incerteza padrão para total de tocoferóis e polifenóis $u = 10$ ppm.

É possível perceber na Tabela 20 que a amostra *a* é mais estável do que o azeite extra virgem, enquanto a amostra *b* é menos estável. As amostras *a* e *b* foram obtidas a partir de fases alcoólicas e oleosas da linha de amarração 1 (azeite extra virgem + etanol), respectivamente. Isso mostra que a separação de fases líquido-líquido pode fornecer amostras de óleo de fases leves e pesadas com maior e menor estabilidade de oxidação em comparação ao óleo original. Isso pode ser explicado pela maior concentração de antioxidantes na fase alcoólica (amostra *a*) quando comparada com a fase oleosa (amostra *b*), como pode ser visto na Tabela 21.

As amostras *c* e *d* foram obtidas a partir da linha de amarração 2 (azeite hidrolizado + etanol + água). É observado que ambas as amostras *c* e *d* apresentaram menor estabilidade oxidativa quando comparadas ao óleo hidrolizado. Na Tabela 21 pode-se observar que uma perda de tocoferóis ocorreu por causa da separação de fase líquido-líquido, em que ambas as amostras *c* e *d* apresentaram a concentração de tocoferóis mais baixa quando comparada ao óleo hidrolizado. É notável a concentração extremamente baixa de α -tocoferol na amostra *c* (0,99 ppm), sugerindo uma perda significativa deste antioxidante nas duas fases líquidas. Isto foi atribuído ao procedimento de secagem da amostra. A fase alcoólica da linha de amarração 2 apresentou 16,13% de água, enquanto a fase de óleo apresentou apenas 1,72%. É

possível que a presença de água durante o procedimento de secagem possa favorecer a degradação do α -tocoferol.

Comparando a estabilidade das amostras *e*, *f*, *g* e *h* (amostras que foram obtidas após dois procedimentos de ELL) é possível notar que a amostra mais estável (*h*) apresentou o menor teor de polifenóis totais e tocoferóis, indicando que a composição lipídica é mais determinante para a estabilidade do óleo do que a composição antioxidante.

5.6 CONSIDERAÇÕES

A partir dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido, constatou-se que o diacilglicerol apresenta uma hidrofobicidade intermediária entre os componentes obtidos a partir do óleo de oliva (menor do que o do TAG e superior ao de MAG e AGL). Esta diferença de hidrofobicidade faz com que a separação de fase líquido-líquido se torne um procedimento potencial para o enriquecimento em diacilglicerol do azeite extra-virgem. O modelo UNIQUAC correlacionou bem os resultados experimentais de ELL, indicando que os parâmetros do modelo podem ser usados para fins de layout de processo e otimização de processos.

A estabilidade das amostras obtidas da separação da fase líquido-líquido foi menor, em algumas amostras, do que na amostra original, o que foi atribuído a possível perda de antioxidantes durante o procedimento. Considerando um processo industrial, tornou-se claro que a extração líquido-líquido deve ser realizada em condições suficientemente brandas e bem controladas (baixas temperaturas e restrição de oxigênio no sistema) para evitar a degradação antioxidante, especialmente na secagem em procedimentos com amostras com alto teor de água. Foi também observado que tanto tocoferóis como polifenóis têm afinidade com as fases alcoólicas, e isso pode ser usado para enriquecer uma amostra de óleo com antioxidantes e aumentar a sua estabilidade oxidativa.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a partir das reações cinéticas de esterificação de ácido oleico + glicerol, é possível afirmar que a maior concentração de DAG foi obtida nas mesmas condições em que se obteve a maior conversão de reação (160°C; 5% de catalisador) comprovando a influência do aumento da temperatura na obtenção de DAG.

A partir dos resultados obtidos das reações de esterificação do produto da hidrólise + glicerol, é observado que quanto maior a quantidade de glicerol utilizada, maior é o teor de DAG presente no produto final. O teor de DAG (mais de 40%) presente no produto final indica que a utilização da enzima é uma boa alternativa de catalisador para as reações estudadas.

Com base nos resultados dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido, concluiu-se que a diferença de hidrofobicidade do DAG em relação aos outros acilgliceróis e AGL, torna a separação líquido-líquido um potencial procedimento para o enriquecimento em diacilglicerol do óleo de oliva extra-virgem. Foi observado também que através da separação líquido-líquido é possível aumentar a estabilidade oxidativa do óleo, enriquecendo o mesmo com antioxidantes.

Neste trabalho foi possível comprovar tecnicamente que é possível obter DAG pelos processos de esterificação do ácido oleico + glicerol, esterificação do produto da hidrólise + glicerol e separação líquido-líquido. O catalisador químico não apresentou toda eficiência esperada, mas ainda assim foram obtidos bons resultados em termos de conversão e obtenção de DAG e apresenta a vantagem de ser uma boa alternativa para produtos alimentícios por ser inerte e não tóxico, podendo permanecer no produto final.

O processo enzimático se mostrou bastante eficiente na formação de DAG e conversão da reação, no entanto apresenta o problema de excesso de ácido graxo livre ao final do processo, dificultando a separação e fazendo necessário o emprego de processos que utilizam altas temperaturas gerando outros subprodutos indesejáveis. Assim, se torna interessante o uso do processo de separação líquido-líquido, que neste trabalho apresentou bons resultados para obtenção de DAG através do enriquecimento da fase óleo, utilizando temperaturas brandas e evitando a

necessidade de procedimentos de separação com altas temperaturas ao final do processo, o que geralmente gera compostos não desejáveis.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as reações de esterificação estudadas.
- Realizar cinéticas de esterificação utilizando concentração de catalisador intermediária as estudadas neste trabalho (entre 5 e 10%).
- Utilizar produto final da esterificação enzimática, na melhor condição observada em termos de rendimento de DAG, no processo de separação líquido-líquido.

7 REFERÊNCIAS

ANDRIKOPOULOS, N.K., BRUESCHWEILER, H., FELBER, H., TAESCHLER, CH, 1991. **HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides**. J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 359-364, 1991.

ANVISA. GGALI, **Novos ingredientes aprovados**. 2009. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle >. Acesso em: 31 jan. 2018.

A. oil chemists' society (AOCS). **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**, fourth ed. Champaign. 1997

AKIL, E; CASTELO-BRANCO, V. N.; COSTA, A. M. M.; VENDRAMINI, A. L. A ; CALADO, V. ; TORRES, A. G. . **Oxidative Stability and Changes in Chemical Composition of Extra Virgin Olive Oils After Short-Term Deep-Frying of French Fries**. Journal of the American Oil Chemists' Society , p. 409-421, 2015.

ALVEZ, J. O. **Espectrometria de massas com ionização electrospray (esi-ms) e métodos quimiométricos: caracterização de azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem**. Dissertação de mestrado em engenharia química da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

AWADALLAK, J. ABD. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol**. Dissertação (mestrado em engenharia química), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

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

BABICZ, I. **Produção de diacilglicerol via hidrólise enzimática do óleo de palma.** Dissertação (mestrado em ciências e tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

BABICZ, I.; LEITE, S.G.F.; SOUZA, R.O.M.A.; ANTUNES, O.A.C. **Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation.** Ultrasonics Sonochemistry, v.17, p. 4-6, 2010.

BANCQUART, S., VANHOVE, C., POUILLOUX, Y., BARRAULT, J., **Glycerol Transesterification with Stearate over Solid Basic Catalysts I. Relationship Between Activity and Basicity.** Applied Catalysis A: General, v. 218, p. 1-11, 2001.

BARRAULT, J.; POUILLOUX, Y.; CLACENS, J.M.; VANHOVE, C; BANCQUART, S. **Catalysis and fine chemistry.** Catalysis Today, v. 75, p. 177–181, 2002.

BLASI, F.; COSSIGNANI, L.; SIMONETTI, M.S.; DAMIANI, P. **Biocatalysed synthesis of *sn*-1,3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil.** Enzyme and Microbial Technology, v. 41, p. 727–732, 2007.

BOYLE, E. **Monoglycerides in Food Systems: Current and Future Uses.** Food Technology, v. 51, n. 8, p. 52-59, 1997.

BOYLE, E.; GERMAN, J. B. **Monoglycerides in Membrane Systems.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 36, p. 785 – 805, 1996.

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

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial União,** Brasília, DF, 23 de Setembro de 2005.

BRITISH STANDARD. EN 14105:2003. Fat and oil derivatives - fatty acid methyl esters (FAME) - determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents - **Reference method Norma DIN EN nº 14105 do Comitê Europeu para Padronizações**. European Committee for Standardization, 2003.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. Vol. 2. Pearson Prentice Hall. 4ª ed. São Paulo, 2006.

BUEHLER, M. e WANDREY, C. **Continous use of lipases in fat hidrolisis**. *Food Wissenschaft Technologie Fat Science Technology*, v. 89, n.14, p. 598-605, 1987.

BUENO, T. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

B. oil chemists' society (AOCS). **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**, fourth ed. Champaign. 1997

CABRAL, P. S. **Cinética enzimática da hidrólise do óleo de oliva em sistemas batelada e batelada alimentada**. Dissertação de mestrado em engenharia de alimentos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Vol. 2. McGraw-Hill. 7ª ed. Porto Alegre, 2011.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: **Bioquímica Ilustrada**, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 1989. 446p. p53-66.

CHENG, W., LIU, G., LIU, X. **Formation of glycidyl fatty acid esters both in real edible oils during laboratory-scale refining and in chemical model during high temperature exposure**. *J. Agric. Food Chem.* 64, 5919-5927, 2016.

COI/T.20/Doc n.º 29, 2009. **Determinacion de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC**.

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

CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. **Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase**. Biochemical Engineering Journal, v. 35, p. 71–80, 2007.

CHEONG, L.Z.; TAN, C.P.; LONG, K.; YUSSOF, M.S.A.; ARIFIN, N.; LO, .K. LAI, O.M. **Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology**. Food chemistry, v. 105, p. 1614-1622, 2007.

CORAZZA, F. de C.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; NEITZEL, I. **Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis**. Acta Scientiarum Technology, v. 25, p. 33-38, 2003.

CORDEIRO, C.S. **Compostos lamelares como catalisadores heterogêneos em reações de (trans)esterificação (m)etílica**. 187 p. Tese (Doutorado em Química), Pós-Graduação em Química, UFPR, Curitiba, 2008.

CORMA, A.; GARCIA, H.; IBORRA, S.; PRIMO, P. **Modified faujasite zeolites as catalysts in organic reactions: Esterification of carboxylic acids in the presence of HY zeolites**. Journal of Catalysis, v. 120, p. 78-87, 1989.

DAMSTRUP, M.L.; JENSEN, T.; SPARSØ, F.V.; KIIL, S.Z.; JENSEN, A.D.; XU, X. **SOLVENT Optimization for Efficient Enzymatic Monoacylglycerol Production Based on a Glycerolysis Reaction**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DAOMING LI; QIN, X.; WANG, J.; YANG, B.; WANG, W.; HUANG, W.; WANG, Y. **Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from Rhizopus oryzae**. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. China, 2015. Vol. 115. p. 43-50.

DI SERIO, M.; TESSER, R.; PENGMEI, L.; SANTACESARIA, E. **Heterogeneous catalysts for biodiesel production.** Energy Conversion and Management, v.47, n.15-16, p. 2271-2282, 2006.

FERRARI, J.C., NAGATANI, G., CORAZZA, F.C., OLIVEIRA, J.V., CORAZZA, M.L. **Application of stochastic algorithms for parameter estimation in the liquid-liquid phase equilibrium modeling.** Fluid Phase Equil. 280, 110-119, 2009

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido.** Dissertação (mestrado em ciências de alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

Ferreira-dias, S.; Correia, A.C.; Baptista, F.O.; Fonseca, M.M.R. **Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases.** J. Mol. Catal. B: Enzym . v. 11, p. 699-711, 2001.

FIAMETTI, K.G.; ROVANI, S.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M.L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of variable effects on solvent-free monoacylglycerol enzymatic production in AOT surfactant.** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 110, p. 510-515, 2008.

FLACK, E. A.; KROG, N. **The Functions and Applications of Some Emulsifying Agents Commonly Used in Europe.** Food Trade Review, v. 40, p. 27-33, 1970.

FLICKINGER, B. D.; MATSUO, N. **Nutritional Characteristics of DAG Oil.** Lipids, v. 38, n. 2, p. 129-132, 2003.

FONTANA, J. D. **Biodiesel: para leitores de 9 a 90 anos.** Curitiba, PR. Editora UFPR, 2011.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELA, C. B. **Produção de monoglicérides e diglicérides via glicerólise enzimática e destilação molecular.** Química Nova, v. 32, p. 1539 – 1543, 2009.

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

FUJII, T.; KHUWIJITJARU, P.; KIMURA, Y.; DACHI, S. **Decomposition kinetics of monoacyl glycerol and fatty acid in subcritical water under temperature-programmed heating conditions.** Food Chemistry, v.94, n. 3, p. 341, 2006.

GATTAS, N.; ABIDI, F.; GALAI, S.; MARZOUKI, M. N.; SALAH, A. B. Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **International Journal of Biological Macromolecules.** Tunisia, 2014. v. 68, p. 1-6.

GIOIELLI, L. A. **Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia.** Revista Brasileira de Farmacologia, p. 211 – 232, 1995.

GONÇALVES, C. A. ; OLIVEIRA, J. R. DA C. ; DUTRA, S. **Reclamation and management of pastures of Jaragua grass (*Hyparrhenia rufa*) in Rondonia.** Brasil. Pasturas Tropicales, v. 24, n. 2, p.47-56, 2002.

GUNSTONE, F.D.; NORRIS, F. A. **Lipids in foods: Chemistry, Biochemistry and Technology.** Oxford: Pergamon, p. 170, 1983.

GUPTA, R.; KUMAR, S.; GOMES, J.; KUHAD, R. C. **Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol.** Biotechnology for Biofuels, v. 5, p. 16 - 25, 2012.

HAMERSKI, F. **Esterificação de ácidos graxos com glicerol em reações catalisadas por hidróxido duplo lamelar.** Tese. (Doutorado em Engenharia Química), Universidade federal do Paraná, CURITIBA, 2013.

HAMERSKI, F; CORAZZA, L. M. **LDH-catalyzed esterification of lauric acid with glycerol in solvent-free system**. Applied Catalysis A: General, v. 475, p. 242–248, 2014.

HYKKERUD, A.; MARCHETTI, J. M. **Esterification of oleic acid with ethanol in the presence of Amberlyst 15**. Biomass and Bioenergy. Noruega, 2016. p. 1-4

HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. **Model-based fedbatch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 152, p. 88 – 107, 2009.

HOLLIDAY, R.L. e KING, J.W. **Hydrolysis of vegetable oil in sub-and supercritical water**. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 36, p. 932-935, 1997.

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

Jusbrasil. **Diário oficial**, p 108, seção 1 . Despachos do superintendente. 22 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/82746836/dou-secao-1-23-12-2014-pg-108> Acesso em: 20 jul. 2016.

KAO. **Long Tradition of Fat and Oil Research**. Japão, 2016. Disponível em:< http://www.kao.com/jp/en/corp_rd/development_01_01.html>. Acesso em: 03 ago. 2016.

KAR, S.; BHATTACHARYYA, D. K.; GHOSH, M. **Evaluation of Nutritional Characteristics of Health Beneficial DAG Rich oil based Spreads**. International Conference on Advances in Bioprocess Engineering and Technology (ICABET). Materials Today Proceedings. Índia, 2016. Vol. 3. p. 3375-3387.

KASAMATSU, T., OGURA, R., IKEDA, N., MOTITA, O., SAIGO, K., WATABE, H., SAITO, Y., SUZUKI, H. **Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil.** *Food Chem. Toxicol.* 43, 253-260, 2005.

KAWASHIMA, H., TAKASE, H., YASUNAGA, K., WAKAKI, Y., KATSUGARI, Y., MORI, K., YAMAGUCHI, T., HASE, T., MATSUO, N., YASUKAWA, T., TOKIMITSU, I., KOYAMA, W. **One-year ad libitum consumption of diacylglycerol oil as part of a regular diet results in modest weight loss in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil in overweight Japanese subjects.** *J. Am. Diet Assoc.* 108, 57- 66, 2008.

KHUWIJITJARU, P.; FUJII, T.; ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MATSUNO, R., 2004, **Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water.** *Chemical Engineering Journal*, v. 99, n.1, p. 1.

KONDO, H.; HASE, T.; MURASE, T.; TOKIMITSU, I. **Digestion and Assimilation Features of Dietary DAG in the Rat Small Intestine.** *Lipids*, v. 38, n. 1, p. 25-30, 2003.

KORICHI, S., ELIAS, A. L., MEFTI, A. **Characterization of smectite after acid activation with microwave irradiation.** *Appl. Clay Sci.*, v. 42, p. 432-438, 2009.

KRISTENSEN, J.B.; XU, X.; MU, H. **Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipase.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 82, p. 329–334, 2005.

KRUGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

KRUGUER, R. L.; SYCHOSKI, M.; BALEN, M.; NINOW, J. L.; CORAZZA, M. L. **Estudo da glicerólise enzimática na produção de mono e diacilgliceróis utilizando óleo de oliva.** *Ciências Exatas e Naturais*, v.13, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, v.1, p. 25, 3ª ed. São Paulo: IMESP, 1985.

LEÃO, L. S. **Estudo Empírico e Cinético Da Esterificação De Ácidos Graxos Saturados Sobre o Ácido Nióico**. Dissertação de mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, D.F.B., SANTOS, L.F., PEREIRA, D.B., LENZI, M.K., CORAZZA, M.L., VOLL, F.A.P. **Liquid-liquid equilibrium in systems containing olive oil, free fatty acids, ethanol and water**. Open Chem. Eng. J. 10, 10-17,2016

LISBOA, F. S. **Lauratos de metais como catalisadores para a esterificação (m)etílica do ácido láurico: perspectivas de aplicação na produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LO, S.; TAN, C.; LONG, K. **Diacylglycerol Oil-Properties, Processes and Products: A review**. Food Bioprocess Technology, v. 1, p. 223-233, 2008.

MAKI, K. C.; DAVIDSON, M. H.; TSUSHIMA, R.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; UMPOROWICZ, D. M.; DICKLIN, M.R.; FOSTER, G.S.; INGRAM, A.; ANDERSON, B.D.; FROST, S.D.; BELL, M. **Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil**. American Journal of Clinical Nutrition, v. 76, p. 1230–1236, 2002.

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

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. **Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil.** Alimentos e Nutrição Brazilian Journal of Food and Nutrition. Araraquara, 2012. v. 23, n. 4, p. 537-548.

MILLIREN, A. L.; WISSINGER J. C.; GOTTOMUKALA, V.; SCHALL, C. A. **Kinetics of soybean oil hydrolysis in subcritical water.** Fuel, v. 108, p. 277-281, 2013.

MING, L.O., YUSOFF, M.S.A., KOON, L.S., LONG, K., PING, T.C., YEOK, L.J., TAHIRUDDIN, S., **HASHIN, K. Process for the Production of Diacylglycerol. EP1803819A2.** 2007.

MOQUIN, P. H. L. e TEMELLI, F. **Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media.** Journal of Supercritical Fluids, v. 45, n. 1, p. 94, 2008.

MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F.; SOVOVÁ, H.; SALDAÑA, M. D. A. **Kinetic modeling of glycerolysis-hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data.** Journal of Supercritical Fluids, v. 37, p. 417-424, 2006.

MONICK, J.A., TREYBAL, R.E. **Separation of monoglycerides, diglycerides, and triglycerides by liquid-liquid extraction.** J. Am. Oil Chem. Soc. 33, 1956.

MORESCHI, S. R. M., PETENATE, A.J., MEIRELES, M.A.A. **Hydrolysis of Ginger Bagasse Starch in Subcritical Water and Carbon Dioxide.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, n. 6, p.1753-1758, 2004

MURTY, V, R.; BHAT,J.; MUNISWARAN, P. K. A. **Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review.** Biotechnology and Bioprocess Engineering. v. 7, 57-66, 2002.

NAGAO, T.; WATANABE, H.; GOTO, N.; ONIZAWA, K.; TAGUCHI, H.; MATSUO, N.; YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H.; ITAKURA, H. **Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to**

Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial. Journal of Nutrition, v. 130, p. 792-797, 2000.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRALA, P.; FERREIRA-DIAS, S. **Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases.** Food Chemistry. Portugal, 2011. v. 127, n. 3, p. 993-998.

NUNES, C. A.; SOUZA, V. R.; CORRÊA, S. C.; SILVA, M. C. C.; BASTOS, S. C.; PINHEIRO, A. C. M. **Heating on the volatile composition and sensory aspects of extra-virgin olive oil.** Ciência e agrotecnologia. Lavras, 2013. v. 37, n. 6

OLIVEIRA, M.C. et al. **Rooting of olive tree cuttings using organic fertilizations and IBA.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 2010. v.34, n.2, p. 337-344.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. **Hidrólise enzimática da gordura de babaçu.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 19, p. 270-276 , 1999.

PARDAUIL, J.J.R., SOUZA, L.K.C., MOLFETTA, F.A., ZAMIAN, J.R., ROCHA FILHO, G.N., DA COSTA, C.E.F. **Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area.** Bioresour. Technol. 102, 5873-5877, 2011.

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

PENZ, L. R. **Estudo das alterações físico-químicas do azeite de oliva após tratamento térmico.** Dissertação de Mestrado, UNIVATES – Lajeado, 2010.

POLING, B.E., PRAUSNITZ, J.M., O'CONNELL, P.J. **The Properties of Gases and Liquids**, fifth ed. McGraw-Hill, New York, 2001

PRESS, W.H., TEUKOLSKY, S.A., VETTERLING, W.T., FLANNERY, B.P. **Numerical Recipes in Fortran 77**, second ed. Cambridge university Press, USA, 1992.

PHUAH, E.T.; LAI, O.M.; CHOONG, T.S.Y.; TAN, C.P; LO, S.K. **Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic , v. 78, 91– 97, 2012.

PINTO, J. S. da S. e LANCAS, F.M.. **Hydrolysis of corn oil using subcritical water**. J Brazil Chem Soc, v.17, n. 1, p. 85, 2006,

PINTO, J. S. da S. e LANÇAS, F. M. **Hidrólise do óleo de *azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas**. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. **A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino**. Revista Virtual de Química, V. 5, n. 1, 2-15, 2013.

RAMOS, L. P. & SADDLER, J. N. **Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis***. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 46, p. 193 – 207, 1994.

RAIZER, E. **Uso de ultrassom na síntese de diacilglicerol via hidrólise enzimática de óleo de girassol**. Dissertação de mestrado em engenharia química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2015.

RAMANI, K.; BOOPATHY, R.; VIDYA, C.; KENNEDY, J. L.; VELAN, M.;SEKARAN, G. **Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil**. Pcess Biochemistry. Índia, 2010. v. 45, p. 986-992.

RAMIREZ-TORTOSA, C.; GRANADOS, S.; QUILES J.L. **Chemical composition, types and characterization of olive oil**. In: QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTON, C.; YAQOOB, P. (Ed.) Olive oil and health. London: CABI, 2006. cap. 2.

Request N EFSA-Q-2004-089, 2004. **Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to an application to market enova oil as a novel food in the EU**. EFSA J. 159, 1-19.

RENDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E. **Solvent engineering applied to lipase-catalized glycerolysis of triolein**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 78, p. 1061–1066, 2001

ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. Catálise enzimática: **Transesterificação do óleo e soja e esterificação do ácido oléico via lípases**. Revista Brasileira de Energias Renováveis. Brasil, 2015.

SAMBANTHAMURTHI, R; SUNDRAM, K.; TAN Y. **Chemistry and biochemistry of palm oil**. Progress in Lipid Research, Malaysia, v. 39, p. 507-558, 2000.

SANTOS, J. S. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. Dissertação de mestrado em engenharia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SATYARTHI, J.K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. **Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts**. Applied Catalysis A: General, v. 391, p. 427-435, 2011.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. **Transesterification of vegetable oils: a Review**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 9, p. 199-210, 1998.

SCRIMGEOUR, C. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6ª edição, John Wiley

& Sons, 2005.

SHIOZAWA, S., BESSA, L.C.B.A., FERREIRA, M.C., MEIRELLES, A.J.A., BATISTA, E.A.C. **LiquidLiquid equilibrium data for fatty systems containing monoacylglycerols and diacylglycerols**. J. Chem. Eng. Data 60, 2371-2379, 2015.

SANTOS, P. R. S.; WYPYCH, F.; VOLL, F. A. P.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. **Kinetics of ethylic esterification of lauric acid on acid activated montmorillonite (STx1-b) as catalyst**. Fuel. Brasil. 2016. p. 600-609.

SCHNEIDER, J. C.; WOLF, C. R.; CORRÊA, D. S.; AMORIM, H. L. N.; GORMANN, M. **Reação de esterificação de ácido graxos, empregando-se glicerol como agente de alcóolise: estudo comparativo entre diferentes catalisadores**. Revista de Iniciação Científica da ULBRA. Brasil, 2005. n. 4.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. LTC Editora, 10ed., v. 2, p. 100, 2012.

SOUZA, S. P. L. D., MARQUES, M. R. D. C., MATTOS, M. C. S. D., **Desenvolvimento sustentável e pensamento complexo: estudo de caso: o uso de argilas como catalisadores**. Química Nova. Brasil. v. 35, p.1891-1894, 2012.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, 1986. v. 168, p. 1070-1074.

TEIXEIRA, E. L. **Produção de biodiesel através da hidroesterificação do óleo de andiroba (*Carapa guianenses, Aubl.*) via catálise heterogênea ácida**. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

VALÉRIO, A.; KRUGER, R. L.; NINOW, J. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. **Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed**

glycerolysis olive oil in surfactant system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 8350–8356, 2009.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. et. al. **Customizing lipases or biocatalysis: a survey of chemical physical and molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 113–148; 2000.

VIEIRA, S. S. **Produção de biodiesel via esterificação de ácido graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos.** Dissertação de mestrado em agroquímica da Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

VOLL, F.A.P. **Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do Óleo de Palma.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

VOLL, F.A.P., KANDA, L.R.S., CARODOZO-FILHO, L., CORAZZA, M.L. **(Liquid-Liquid) equilibrium for the system (hydrolyzed palm oil þ ethanol þ water) for diacylglycerol enrichment.** J. Chem. Thermodyn. 58, 1-7, 2013.

VOLL, F. A. P.; ZANETTE, A. F.; CABRAL, V. F.; DARIVA, C.; SOUZA, R. O. M. A.; FILHO, L. C.; CORAZZA, M. L. **Kinetic Modeling of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis of Palm Oil.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 168, p. 1121-1142, 2012.

VOLL, J.C; BRITO, M.N. **Metabolismo e características nutricionais do óleo 1,3-diacilglicerol.** Revista Saúde e Pesquisa, v.3, p. 121-126, 2010.

TAKASE, H. **Metabolism of diacylglycerol in humans.** Asia Pac. J. Clin. Nutr. 16, 398-403, 2007.

TAN, C.P., CHE MAN, Y.B., SELAMAT, J., YUSOFF, M.S.A. **Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods.** Food Chem. 76, 385e389, 2002.

THURGOOD, J., WARD, R., MARTINI, S. **Oxidation kinetics of soybean oil/anhydrous milk fat blends: a differential scanning calorimetry study.** Food Res. Int. 40, 1030-1037, 2007.

ZHANG, Z., HUANG, H., MA, X., LI, G., WANG, Y., SUN, G., TENG, Y., YAN, R., ZHANG, N., LI, A. **Production of diacylglycerols by esterification of oleic acid with glycerol catalyzed by diatomite loaded SO₄²⁻/TiO₂.** J. Ind. Eng. Chem. 53, 307-316, 2017.

WANG, Z.; DU, W.; LIU, D. Study on Lipozyme TL IM-catalyzed esterification of oleic acid and glycerol for 1,3-diolein preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, China. 2016. P. 11 – 17.

ZHANG, Z.; HUANG, H.; XIANG MA; GUANGHUI LI; WANG, Y.; SUN, G.; TENG, Y.; YAN, R.; ZHANG, N.; AIJUN LI. Production of diacylglycerols by esterification of oleic acid with glycerol catalyzed by diatomite loaded SO₄²⁻/TiO₂. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. China, 2017. v. 53. p. 307-316.

WIBOONSIRIKUL, J.; HATA, S.; TSUNO, T.; KIMURA, Y.; ADACHI, S. **Production of functional substances from black rice bran by its treatment in subcritical water.** LWT - Food Science and Technology, v. 40, p.1732–1740, 2007.

XIE, W.; PENG, H.; CHEN, L. **Transesterification of soybean oil catalyzed by potassium loaded on alumina as a solid-base catalyst.** Applied Catalysis: A, v. 300, n.1, p.67-74, 2006.

XU, Z. P.; ZHANG, J.; ADEBAJO, M. O.; ZHANG, H.; ZHOU, C. **Catalytic applications of layered double hydroxides and derivatives.** Applied Clay Science, v. 53, n.2, p. 139-150, 2011.

YAMAMOTO, K., ASAKAWA, H., TOKUNAGA, K., WATANABE, H., MATSUO, N., TOKIMITSU, I.; YAGI, N. **Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers**

serum triacylglycerol in type II diabetic patients with hypertriglyceridemia. Journal of Nutrition, v. 131, p. 3204-3207, 2001.

YANAI, H.; TOMONO, Y.; ITO K.; FURUTANI N.; YOSHIDA, H.; TADA, N.; **Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome.** Nutrition Journal, v. 6, p. 43, 2007.

YASUKAWA, T.; KATSURAGI, Y.; MATSUO, N.; FLICKINGER, B. D.; TOKIMITSU, I., MATLOCK, M. G. **Diacylglycerol oil.** AOCS Press: Champaign, p. 1-15, 2004.

ZATTA, L. **Argilominerais modificados como catalisadores para reações de esterificação de ácidos graxos.** Tese de doutorado em química da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

ZHANG, F.; XIANG, X.; LI, F.; DUAN, X. **Layered Double Hydroxides as Catalytic Materials: Recent Development.** Catalysis Survey from Asia, v. 12, p. 253-265, 2008.