

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LARISSA DE FREITAS

**Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos
empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**

Lorena – SP

2006

LARISSA DE FREITAS

**Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos
empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Universitária

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Freitas, Larissa

Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel / Larissa Freitas; orientadora Heizir Ferreira de Castro. -- 2006

110 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2006

1. Enzimas 2. Monoglicerídeo 3. Lipase 4. Óleo de babaçu 5. Esterificação 6. Glicerólise. I. Título.

577.15 - CDU

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Dr^a. Heizir Ferreira de Castro

Lorena – SP
2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

LARISSA DE FREITAS

Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Dr^a. Heizir Ferreira de Castro

Aprovada em 18 de agosto de 2006

Banca Examinadora

Dr^a. Heizir Ferreira de Castro – Presidente da Banca/ Escola de Engenharia de Lorena

Dr^a. Telma Teixeira Franco/Unicamp

Dr. Pedro Carlos de Oliveira/ Escola de Engenharia de Lorena

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro pela oportunidade, amizade, orientação e dedicação ao longo de todo o trabalho. Agradeço também a toda paciência dispensada nas revisões de trabalhos, relatórios e dissertação.

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

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

Aos doutores Júlio César dos Santos e Victor Haber Perez, pelo auxílio dado nesse trabalho, principalmente nas análises cromatográficas.

Aos colegas: Adriano, Ariela, Bia, Caio, Dani, Flávia, Grazi, Matheus, Mário, Michele, Patrícia, Tânia pela ajuda, amizade e ótima convivência no laboratório.

As minhas amigas Renata, Marli, Cecília, Cilene, Monique, Cris, Kika e Reny pela grande amizade conquistada.

A Deus, que no decorrer desta caminhada esteve ao meu lado em todos os momentos, fossem eles alegres ou tristes, fáceis ou difíceis, fortalecendo-me sempre que precisei e permitindo a conquista de mais uma etapa em minha vida. Sem Ele nada seria possível.

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

RESUMO

FREITAS, Larissa de. **Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel**. Lorena, 2006.110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena/ Universidade de São Paulo. Lorena. 2006.

O presente projeto teve como objetivo selecionar a melhor rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel, visando total aproveitamento do glicerol gerado como sub-produto na obtenção de biodiesel. Para alcançar o objetivo proposto foram analisadas duas metodologias: (1) esterificação do glicerol com ácidos graxos e (2) glicerólise do óleo de babaçu, testando lipases de diferentes fontes como *Candida antarctica B*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Penicillium camembertii* e pâncreas de porco, imobilizadas em polissiloxano álcool polivinílico (POS-PVA). As preparações de lipase imobilizada disponíveis comercialmente como Lipozyme IM²⁰, Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM foram também utilizadas. As atividades experimentais foram, inicialmente, direcionadas para o estabelecimento das condições adequadas da esterificação, investigando a influência de diversos parâmetros, tais como: proporção molar dos reagentes, tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação dos ácidos graxos e fonte de lipase. Verificou-se que meios reacionais contendo excesso de glicerol favoreceram a síntese de ésteres glicéricos, entretanto, tanto a velocidade reacional como a conversão molar foram dependentes do tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação dos ácidos graxos testados. Os experimentos realizados permitiram também selecionar a lipase *Candida antarctica B* como fonte de lipase mais adequada, sendo alcançada uma elevada concentração de monolaurina em 12 h de reação (24,15%). Para obtenção de monoglicerídeo pela rota de glicerólise do óleo de babaçu, o melhor desempenho foi alcançado pela lipase *Burkholderia cepacia*, revelando uma formação de 10% (m/m) de monoglicerídeos em apenas 3h de reação. A análise comparativa do desempenho das duas rotas indicou que a esterificação foi mais eficiente que a glicerólise, sendo então selecionada para estudos de otimização. Um planejamento experimental completo 2² foi proposto para verificar a influência simultânea das variáveis x_1 (temperatura entre 45-65°C) e x_2 (razão molar glicerol/ ácido láurico na faixa 3:1 a 5:1) na formação de monolaurina, empregando a lipase *Candida antarctica B* imobilizada em POS-PVA. De acordo com a análise estatística, a formação de monolaurina foi fortemente influenciada pela variável (x_2) razão molar entre glicerol e ácido láurico, enquanto que a influência da temperatura (x_1) foi pouco significativa. O modelo matemático proposto: $y = 24,16 + 2,51 x_1 + 4,43x_2 - 2,74 x_1x_2$, permitiu prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos de formação de monolaurina, sendo a reação maximizada (31,35%) para meios reacionais constituídos de glicerol e ácido láurico numa razão molar de 5:1 e temperatura de incubação de 45°C. Essas condições foram também adequadas para síntese de monolaurina empregando outras fontes de lipase, como a lipase de *Penicillium camembertii* cujo desempenho foi altamente eficiente para obtenção de monoglicerídeos, alcançando valores mais competitivos de formação de monolaurina (51%), podendo, portanto, ser uma alternativa interessante para ser considerada no desenvolvimento de futuros trabalhos.

Palavras-chave: lipase, monoglicerídeo, óleo de babaçu, esterificação, glicerólise.

ABSTRACT

FREITAS, Larissa de. **Enzymatic route selection for monoglyceride production using immobilized lipase on matrix obtained by sol-gel technique**. Lorena, 2006.110f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena/ Universidade de São Paulo. Lorena. 2006.

The objective of this project was to select the best enzymatic route to produce monoglycerides using lipase immobilized on matrix obtained by sol-gel technique, aiming to contribute for a better utilization of the glycerol generated as by-product in the biodiesel synthesis. For this purpose two methodologies were analyzed: (1) direct esterification of the glycerol with fatty acids and (2) glycerolysis of the babassu oil, testing lipases from different sources as *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Penicillium camemberti* and porcine pancreas immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol particles (POS-PVA). The commercial immobilized lipase preparations as Lipozyme IM20, Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM were also used. The experimental activities were, initially, addressed to establish appropriate conditions for the monoglycerides synthesis by direct esterification such as: reactants molar ratio, carbon chain size and insaturation degree of the fatty acids and lipase source. Reaction performance was found to be dependent on the glycerol/lauric acid molar ratio, requesting higher amount of glycerol to reach high reaction conversion. It was also verified that the molar conversion were strongly dependent on both carbon chain size and insaturation degree of the tested fatty acids. Experiments also allowed to select *Candida antarctica* B as catalyst to carry esterification reactions and the highest monolaurin formation occurred at 12 h reaction (24.15%). For the synthesis of monoglycerides by the glycerolysis route using babassu oil as a starting material, the best performance was attained by the lipase *Burkholderia cepacia*, revealing a formation of 10% (m/m) of monoglyceride in 3h reaction. The comparative performance of the two routes for the monoglycerides synthesis demonstrated that the direct esterification was more efficient than the glycerolysis, being selected for additional optimization studies. A full factorial design 2^2 was proposed to verify the simultaneous influence of the variables: x_1 (temperature in the range from 45 to 65°C) and x_2 (glycerol/ lauric acid molar ratio in the range from 3:1 to 5:1) in the monolaurin formation, using as catalyst lipase *Candida antarctica* B immobilized on POS-PVA. In agreement with the statistical analysis, the monolaurin formation was strongly influenced by the variable (x_2) glycerol/ lauric acid molar ratio. The proposed mathematical model: $y = 24.16 + 2.51 x_1 + 4.43x_2 - 2.74 x_1x_2$ allowed to predict conditions that favored to attain high monolaurin yield. The reaction was maximized (31.35%) for substrate containing glycerol/lauric acid molar ratio of 5:1 and at incubation temperature of 45°C. Those conditions were also appropriated for the monolaurin synthesis using other lipase sources, as the lipase of *Penicillium camembertii* that performance was found to be highly efficient for monoglycerides reaching more competitive values for monolaurin formation (51%) and can be turn out, therefore, an interesting alternative to be considered in futures works.

Key-words: lipase, monoglycerides, babassu oil, esterification, glycerolysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Surfatantes.....	3
2.1.1. Classificação e natureza química dos biossurfatantes	4
2.1.2. Propriedades e aplicações industriais dos biossurfatantes	5
2.2. Monoglicerídeos.....	7
2.3. Biotransformação.....	8
2.3.1. Lipases	9
2.3.2. Características cinéticas e físico-químicas das lipases	10
2.3.3. Especificidade	11
2.3.4. Lipases comerciais	11
2.4. Utilização de lipases em biocatálise.....	14
2.5. Imobilização de lipases	16
2.5.1. Suportes híbridos.....	17
2.5.2. Modificações químicas da superfície do suporte	20
2.6. Meios reacionais	21
2.7. Métodos de obtenção de monoglicerídeos (MAG).....	22
2.7.1. Método 1: Hidrólise ou Alcoólise	22
2.7.2. Método 2: Glicerólise de triglicerídeos	23
2.7.3. Método 3: Esterificação de glicerol com ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos	27
2.8. Matérias-primas.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Materiais	35
3.1.1. Enzimas	35
3.1.2. Materiais de partida	35
3.1.3. Suporte de imobilização	35
3.1.4. Outros reagentes	35
3.1.5. Padrões cromatográficos	36
3.2. Metodologia Experimental.....	36
3.2.1. Preparação do suporte híbrido (POS-PVA)	36
3.2.2. Ativação do suporte.....	37
3.2.2.1. Ativação com glutaraldeído	37
3.2.2.2. Ativação com metaperiodato de sódio	37
3.2.2.3. Ativação do suporte com carbonildiimidazol.....	37
3.2.3. Imobilização da lipase	37
3.2.4. Procedimento geral de esterificação.....	38
3.2.5. Reações de glicerólise do óleo de babaçu.....	38
3.2.6. Separação dos produtos formados na reação de esterificação e glicerólise	39
3.2.7. Planejamento Estatístico	40

3.3. Métodos de Análises	41
3.3.1. Construção do método cromatográfico para dosagem dos glicerídeos.....	41
3.3.2. Análise da concentração de ácido graxo total.....	41
3.3.3. Atividade hidrolítica das lipases imobilizadas.....	42
3.3.4. Teor de umidade	42
3.3.5. Cálculo da Atividade enzimática específica, Produtividade e Rendimento por grama de catalisador	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Estabelecimento do método de análise cromatográfica para quantificação dos glicerídeos.....	44
4.2. Testes referentes a rota de obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol com ácidos graxos.....	49
4.2.1. Influência da razão molar dos reagentes na esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme IM20.....	50
4.2.2. Influência do tamanho de cadeia do ácido graxo na síntese de ésteres glicerídeos Lipozyme IM20	52
4.2.3. Esterificação do glicerol e misturas de ácidos graxos em proporções simulando a composição do óleo de babaçu utilizando Lipozyme IM20	54
4.2.4. Influência das diferentes fontes de lipase na esterificação do glicerol com ácido láurico	57
4.2.5. Seleção das condições reacionais de esterificação	61
4.2.6. Influência do agente de ativação no procedimento de imobilização.....	61
4.3. Testes de obtenção de monoglicerídeos pela rota de glicerólise do óleo de babaçu	64
4.4. Seleção da rota enzimática para maior produção de MAG.....	67
4.5. Planejamento de experimentos.....	68
5. CONCLUSÕES	75
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
7. REFERÊNCIAS.....	78
8. APÊNDICES	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico	19
Figura 2.2. Reação envolvida na formação da base de Schiff	20
Figura 2.3. Obtenção de monoglicerídeos por hidrólise ou alcoólise por via enzimática.....	24
Figura 2.4. Obtenção de monoglicerídeos por glicerólise enzimática.....	24
Figura 2.5. Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos.....	27
Figura 2.6. Obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol protegido e ácido graxo.....	31
Figura 2.7. Estrutura de uma molécula de triglicerídeos.....	32
Figura 4.1. Curva de calibração dos lauratos	45
Figura 4.2. Curva de calibração dos ácidos graxos	45
Figura 4.3. Curva de calibração dos monoglicerídeos	46
Figura 4.4. Curva de calibração dos diglicerídeos	46
Figura 4.5. Curva de calibração dos triglicerídeos.....	47
Figura 4.6. Perfil de consumo do ácido láurico na síntese de laurato de glicerila empregando Lipozyme (60 °C) para meios reacionais contendo glicerol e ácido láurico em diferentes razões molares.	50
Figura 4.7. Conversão molar máxima alcançada nas reações de síntese de laurato de glicerila empregando Lipozyme (60°C) em diferentes razões molares de glicerol e ácido láurico no tempo de 4 h.....	51
Figura 4.8. Perfil de formação de mono, di e trilaurina na reação de esterificação do glicerol e ácido láurico catalisada pela preparação de Lipozyme IM.	52
Figura 4.9. Perfil da conversão molar de diferentes ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela Lipozyme: (a) Ácido Mirístico; (b) Ácido Palmítico; (c) Ácido Esteárico; (d) Ácido Oléico (60-65°C, agitação magnética, reator fechado).....	54
Figura 4.10. Perfil da conversão molar de diferentes ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela Lipozyme: (a) Ácido láurico; (b) Ácido láurico + mirístico; (c) Ácido láurico + mirístico + palmítico; (d) Ácido láurico + mirístico + palmítico + oleico (60-65°C, agitação magnética, reator fechado).....	56
Figura 4.11. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pelas preparações de lipase imobilizadas em POS-PVA: (a) Calb L; (b) Lipolase; (c) <i>Candida rugosa</i> ; (d) Pancreática, (e) Lipase AK “Amano” 20; (f) Lipase PS “Amano” e (g) Lipozyme TL 100L (40-60°C, agitação magnética, reator fechado).....	59

- Figura 4.12. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pelas preparações de lipases imobilizadas comercialmente: (a) Novozym 435, (b) Lipozyme RM IM e (c) Lipozyme TL IM (55-60°C, agitação magnética, reator fechado). 60
- Figura 4.13. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, utilizando diferentes agentes de ativação: (a) Glutaraldeído (b) Metaperiodato de sódio e (c) Carbonildiimidazol (60°C, agitação magnética, reator fechado). 62
- Figura 4.14. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono – di e triglicerídeos, nas reações de esterificação catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA (a) Sistema reacional A e (b) Sistema reacional B. 64
- Figura 4.15. Formação dos mono, di e triglicerídeos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pelas preparações de lipase PS Amano (a), AK Amano (b), CALB L (c) e (d) G Amano, imobilizadas em POS-PVA. Condições adotadas: temperatura ótima de cada preparação enzimática, agitação magnética, reator fechado..... 65
- Figura 4.16. Perfil de formação dos monos, dis e triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pelas preparações de lipase imobilizada: Lipozyme IM²⁰ (a) e Novozym 435 (b) a 60°C, agitação magnética, reator fechado. 66
- Figura 4.17. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada por diferentes lipases. 67
- Figura 4.18. Comparação das rotas (esterificação e glicerólise) para a produção de monoglicerídeos 68
- Figura 4.19. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono, di e triglicerídeos, nas reações de esterificação catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais..... 69
- Figura 4.20. Distribuição dos produtos formados nas reações de esterificação do ácido láurico com glicerol catalisada pela lipase Calb L imobilizada em POS-PVA nas diferentes condições ensaiadas no planejamento de experimentos..... 70
- Figura 4.21. Superfície de resposta para a produção de MAG na esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, descrita pela equação 4.1 (valores codificados). 72
- Figura 4.22. Perfil de formação de monolaurina, dilaurina e trilaurina na reação de esterificação do glicerol com ácido láurico (5:1) catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA biocatalisador a 45°C..... 73
- Figura 4.23. Perfil de formação de monolaurina, dilaurina e trilaurina na reação de esterificação do glicerol com ácido láurico (5:1) catalisada pela preparação de lipase G imobilizada em POS-PVA a 45°C. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais grupos de surfatantes de origem natural e sintética.	4
Tabela 2.2. Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes.	6
Tabela 2.3. Exemplos de aplicação de lipases em biocatálise	15
Tabela 2.4. Cotação de preparações comerciais de lipases imobilizadas	16
Tabela 2.5. Síntese de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando diferentes métodos.	26
Tabela 2.6. Métodos para formação seletiva de MAG em reações de esterificação. ..	28
Tabela 2.7. Composição em percentual de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais ...	32
Tabela 3.1. Nomenclatura e códigos dos padrões glicéricos utilizados para estabelecimento do método cromatográfico.	36
Tabela 4.1. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos lauratos por CG	47
Tabela 4.2. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos ácidos graxos por CG	48
Tabela 4.3. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos monoglicerídeos por CG	48
Tabela 4.4. Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos diglicerídeos	49
Tabela 4.5. Condições de operação estabelecidas no método de dosagem dos triglicerídeos	49
Tabela 4.6. Composição dos sistemas reacionais simulando a composição do óleo de babaçu em porcentagem de ácidos graxos	55
Tabela 4.7. Resumo das esterificações realizadas utilizando diferentes composições em ácidos graxos.....	57
Tabela 4.8. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas	61
Tabela 4.9. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes agentes de ativação do suporte	63
Tabela 4.10. Composição dos sistemas reacionais	64
Tabela 4.11. Matriz do planejamento fatorial 2^2 e resultados obtidos.....	70
Tabela 4.12. Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student para a produção de monolaurina de acordo com o planejamento fatorial 2^2	71
Tabela 4.13. Análise de Variância para a formação de monolaurina de acordo com planejamento fatorial 2^2	71
Tabela 4.14. Análise de Variância para o ajuste do modelo proposto que representa a produção de monolaurina a partir da esterificação do glicerol com ácido láurico.	72

NOMENCLATURA

POS-PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
MAG	Monoglicerídeos
DAG	Diglicerídeos
TAG	Triglicerídeos
FFA	Ácidos graxos Livres
LPP	Lipase Pancreática
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LRM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LPS	Lipase de <i>Pseudomonas sp</i>
Cal B	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
LPC	Lipase de <i>Penicillium camemberti</i>
LBC	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
Glic	Glicerol
AcLau	Ácido Láurico
AOT	Bis (2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio
PBA	Ácido fenilboro
TEOS	Tetraetil ortossilicato
PEG	Polietilenoglicol
p-NPP	p-nitrofenilpalmitato
GA	Glutaraldeído
GRAS	Generally Recognized as Safe
FDA	Food and Drugs Administration-USA
CNNP	Conselho Nacional de Normas e Padrão de Alimentos
PI	Ponto isoelétrico
NaIO₄	Metaperiodato de sódio
CDI	Carbonildiimidazol

1. INTRODUÇÃO

Monoglicerídeos são emulsificantes não iônicos, e constituem a principal categoria de agentes emulsificantes de uso alimentício, principalmente nas indústrias de panificação, de sorvetes, de margarina, de cosméticos e fármacos. Adicionalmente, monoglicerídeos são intermediários para a síntese de lipídeos, cristais líquidos e encapsulantes de medicamentos (BERGER e SCHNEIDER, 1993).

Estes emulsificantes são compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais e podem ser sintetizados por processos químicos ou enzimáticos. Atualmente monoglicerídeos (MAG) são manufaturados em escala industrial por glicerólise química contínua de óleos e gorduras a elevadas temperaturas, empregando catalisadores inorgânicos alcalinos (SONNTAG, 1982). O produto desta rota tem várias desvantagens, como por exemplo: baixo rendimento, coloração escura e cheiro de queimado (BERGER e SCHNEIDER, 1992).

As exigências para que as indústrias operem seus processos em condições de desenvolvimento sustentável, de química verde, ou em sistemas de tecnologia limpa, são cada vez mais importantes em várias partes do mundo, e tornam-se um obstáculo a superar sem a disponibilidade de biocatalisadores adaptados a estas condições.

As enzimas são biocatalisadores que apresentam diversas características que as tornam interessantes para a indústria; são altamente específicas, atuam em condições suaves (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e não causam problemas ao meio ambiente, sendo por isso consideradas “catalisadores ecologicamente corretos”. Por isso são utilizadas em setores industriais como agro-alimentares, químicos, farmacêuticos, detergentes e diagnóstico (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004). Com base nessas características, a síntese de monoglicerídeos via catálise enzimática vem sendo estudada como uma alternativa ao método clássico.

Lipases são biocatalisadores que encontram uma vasta e diversificada gama de aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais está crescendo significativamente.

No entanto, a utilização de lipases tem sido limitada por alguns fatores como instabilidade enzimática, dificuldade de recuperação e insolubilidade da enzima. Para contornar esses problemas, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e materiais para a imobilização de enzimas. Recentemente

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

Neste contexto, o presente trabalho trata da utilização de lipases como catalisadores na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado (monoglicerídeos). Para esta finalidade, foram investigadas duas metodologias para a síntese enzimática de MAG empregando lipase (1) glicerólise do óleo de babaçu e (2) esterificação do glicerol com ácidos graxos. Para execução do presente trabalho, optou-se pela imobilização da enzima lipase em uma matriz híbrida constituída de partículas de polissiloxano álcool polivinílico, matriz esta testada com sucesso para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO *et al.*, 2004), *Candida rugosa* (BRAGA, 2005) e Pancreática (PAULA *et al.*, 2005).

Assim, buscando novos métodos para produção e purificação de monoglicerídeos, os principais aspectos que foram abordados neste projeto de mestrado compreenderam: (i) Estabelecimento de metodologia para caracterização da matéria prima e produtos formados, (ii) Obtenção de dados experimentais referente a esterificação direta do glicerol com diferentes ácidos graxos, (iii) Obtenção de dados experimentais referente a glicerólise (óleo vegetal e glicerol), (iv) Comparação dos métodos propostos e seleção da metodologia mais eficiente e (v) Otimização das condições de operação do método selecionado empregando planejamento fatorial.

Este trabalho se insere na linha principal de atuação do Grupo de Biocatálise/Escola de Engenharia de Lorena que vem desenvolvendo pesquisas referentes à aplicação da enzima lipase em processos de valorização de óleos vegetais para a produção, por exemplo, de ésteres aromatizantes, biocombustíveis, ácidos graxos poliinsaturados e emulsificantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Surfatantes

Os surfatantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, sendo normalmente sintetizados a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental, aliado às novas legislações de controle do meio ambiente tem impulsionado à busca de surfatantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

Os surfatantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI e BANAT, 1997). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfatantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz as tensões interfaciais e superficiais, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfatantes. Estas propriedades fazem os surfatantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais incluindo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfatantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo, na indústria de cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfatantes excede 3 milhões de toneladas por ano (BANAT, 2000), sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico.

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfatantes naturais (BOGNOLO, 1999). Atualmente, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfatantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de produtos mais brandos, substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos.

2.1.1. Classificação e natureza química dos biossurfatantes

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfatantes, isso é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfatantes (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998) e consistem em sub-produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

Os biossurfatantes constituem uma das principais classes de surfatantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (Tabela 2.1) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Tabela 2.1. Principais grupos de surfatantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfatantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etileno/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: NITSCHKE e PASTORE, 2002.

Algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfatantes, como por exemplo, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, algumas espécies de *Cyanobacteria* e alguns patógenos como *Serratia sp* (KAPPELI e FINNERTY, 1979).

Os biossurfatantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (BOGNOLO, 1999; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). A maioria dos biossurfatantes é neutra, ou aniônica variando desde pequenos ácidos graxos até polímeros de alto peso molecular.

2.1.2. Propriedades e aplicações industriais dos biossurfatantes

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfatantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfatantes convencionais (BOGNOLO, 1999):

- *atividade superficial e interfacial*: os biossurfatantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfatantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfatante (COOPER e PADDOCK, 1984);
- *tolerância à temperatura, pH e força iônica*: alguns biossurfatantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas;
- *biodegradabilidade*: diferentes dos surfatantes químicos, os biossurfatantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos;
- *baixa toxicidade*: os biossurfatantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998); além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998).

Os biossurfatantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (DESAI e BANAT, 1997). Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfatantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos não derivados de petróleo, fator importante à medida que o preço do petróleo aumenta. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfatantes por manipulações genéticas,

biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O maior mercado para os biossurfatantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados no fracionamento do petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (VAN DYKE *et al.*, 1991). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, como por exemplo, na agricultura, na mineração, em produtos de higiene, cosméticos, indústria de alimentos entre outras. A Tabela 2.2 resume as principais funções e aplicações industriais dos biossurfatantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Tabela 2.2. Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

2.2. Monoglicerídeos

Monoglicerídeos são surfatantes não iônicos, que possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drugs Administration-USA), sendo amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos (DA SILVA *et al.*, 2002), por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (MACHADO *et al.*, 2000).

Na indústria farmacêutica, os monoglicerídeos (MAG) são utilizados como emolientes para emplastos, liberando lentamente a medicação. Na indústria alimentícia são mais comumente utilizados como emulsificantes em produtos de padaria, como margarinas, derivados do leite, doces e molhos. Na indústria cosmética, eles são usados como agentes texturizantes e para melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG *et al.*, 2005).

A produção mundial de monoglicerídeos é estimada em cerca de 180 mil toneladas por ano (BELLOT *et al.*, 2001). Eles são consumidos na faixa de 85 mil toneladas por ano nos EUA, correspondendo a, aproximadamente, 70% do total de emulsificantes usados em produtos alimentícios (ARCOS e OTERO, 1996).

Normalmente os MAG são sintetizados quimicamente via glicerólise de triglicerídeos empregando catalisadores inorgânicos (Ca (OH)_2 , NaOH) a 220-250°C (SONNTAG, 1982). A utilização de temperatura elevada, além de acarretar um alto consumo energético, é responsável pela parcial degradação dos produtos, com formação de co-produtos escuros e sabor de queimado (BERGER e SCHENEIDER, 1992). O produto preparado por essa rota, é uma mistura que contém cerca de 35-60% de monoglicerídeos, 35-50% de diglicerídeos, 1-20% de triglicerídeos, 1-10% de ácidos graxos livres, e o sal de metal alcalino. Altas concentrações de MAG são obtidas por meio da destilação molecular (da SILVA *et al.*, 2002).

Tanto fatores técnicos como regulatórios da FDA, da União Européia, entre outras têm incentivado o desenvolvimento de melhores processos para a síntese de emulsificantes, especialmente daqueles usados em aplicações farmacêuticas ou relacionadas à área de alimentos (OTERO *et al.*, 2001).

Recentemente a síntese de MAG catalisada por lipases tem sido estudada intensamente como alternativa ao método clássico. As principais razões são a utilização de condições reacionais brandas, resultando em produtos de melhor qualidade e menores

custos de energia, e a seletividade das lipases. A exploração da especificidade dessas enzimas possibilita a síntese de produtos que não poderiam ser obtidos por rota química convencional. Cabe ressaltar que do ponto de vista ambiental, o processo é tecnicamente limpo e seguro (BÖRJESSON e HÄRRÖD, 1999).

A monolaurina (principal monoglicerídeo produzido por óleos láuricos) é muito usada nas indústrias de sabões, cosméticos e fármacos. Possuem propriedades antivirais, bacteriana, protozoal e microbiana. Em medicamentos é usada para destruir a gordura revestida de víruses como, por exemplo: HIV, herpes, várias bactérias patogênicas (ex. *Listeria monocytogenes*) e protozoa (ex. *Giardia lamblia*) (SINGFIELD, 2006). A monolaurina também é usada como um dos principais agentes penetrantes para aplicações em membranas mucosas, em que: reduz o tempo necessário para o início da ação da droga, aumenta a quantidade da droga penetrante e causa menor ou nenhum efeito deletério à membrana mucosa (MATSON *et al.*, 2006).

2.3. Biotransformação

O termo biotransformação é aplicado a uma modificação específica ou a uma interconversão de estruturas químicas provocadas por enzimas contidas nas células ou por enzimas livres diferindo assim da fermentação, na qual o substrato é convertido ao produto final por meio de uma complexa via metabólica (CASTRO e ANDERSON, 1995).

Embora atualmente a biotransformação não possa competir com a rota química já otimizada para a produção de compostos industrialmente importantes, poderia gradativamente, substituí-la devido a grande demanda de compostos naturais biodegradáveis que não causam danos ao meio ambiente. Por exemplo, a produção de compostos geralmente requer condições drásticas de temperatura e pressão, produzindo impurezas como produtos de degradação, que inviabilizam seu uso em alimentos sem redestilação prévia, tornando o processo energética e economicamente dispendioso. Portanto, a diminuição do gasto de energia e redução da degradação térmica, torna a biotransformação um processo mais atrativo que os processos químicos tradicionais.

As biotransformações podem ser realizadas por microorganismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos como RNA, anticorpos ou enzimas isoladas (FABER, 1997). A frequência do uso de um particular tipo de enzima em biotransformação não é uniformemente distribuída entre suas diferentes classes. Esta distribuição segue um perfil definido por suas vantagens técnicas e versatilidade de aplicação. Segundo FABER (1997),

a participação das hidrolases (lipases, esterases e proteases) nas reações de biotransformação, perfaz um total de 75%. Este fato é uma consequência direta da disponibilidade comercial dessas enzimas, o que permite a seleção da enzima mais adequada para a biotransformação desejada. Entre os processos químicos de maior interesse industrial são destacadas as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos catalisadas por lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

2.3.1. Lipases

A definição clássica de lipases descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3, que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER *et al.*, 1994), constituindo uma classe especial de esterases.

As esterases (E.C. 3.1.1.1) são enzimas largamente distribuídas na natureza e sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água.

A diferenciação entre lipases e esterases, entretanto, ainda não está completamente definida. Em 1958, SARDA e DESNUELLE propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al.*, 1991) e da lipase pancreática humana (WINKLER *et al.*, 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas era recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* B que apresentam a “lid” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER e

REETZ, 1998). Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “lid” e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica.

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como esterases (JAEGER *et al.*, 1999).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (BROCKMAN, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER *et al.*, 1999).

As lipases diferem grandemente com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Elas catalisam *in vitro* a hidrólise ou síntese de um grande número de ésteres carboxílicos diferentes (FONTANA *et al.*, 1993). Entretanto, todas elas mostram maior atividade específica para substratos glicerídeos (EGLOF *et al.*, 1995). As lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes, não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, como as reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. A diversidade de propriedades das lipases propicia a utilização destas enzimas em diferentes campos de aplicação (PANDEY *et al.*, 1999).

Um número significativo de livros textos e artigos referentes à produção de lipases e suas aplicações estão disponíveis (GANDHI, 1997; FABER, 1997; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998; PANDEY, 1999; SHARMA *et al.*, 2001; REETZ *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004).

2.3.2. Características cinéticas e físico-químicas das lipases

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade máxima entre 30 e 40°C. Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou

mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil.

As lipases geralmente são glicoproteínas ácidas (HIOL *et al.*, 1999) de massa molecular geralmente variando entre 20 e 60 kDa. Seu ponto isoeletrico varia em uma faixa de 3,6 a 7,6, sendo majoritariamente acídicas, com pI entre 4 e 5 (FERRER *et al.*, 2000).

2.3.3. Especificidade

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN *et al.*, 1983). Há vários tipos de especificidade encontrados: quanto ao substrato (diferentes taxas de hidrólise entre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte); posicional (hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições); quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato (preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações); estereoespecificidade (discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos). Pode-se observar também a combinação de todos os tipos citados.

2.3.4. Lipases comerciais

Lipases são encontradas em plantas, animais e microorganismos, nos quais o papel biológico das lipases é provavelmente digestivo. A maioria das biotransformações usa lipases comerciais, e cerca de 70 já estão disponíveis (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). As características de algumas lipases mais utilizadas como lipase de pâncreas de porco (LPP), lipase de *Candida rugosa* (LCR), de *Rhizomucor miehei* (LRM), de *Candida antarctica* (CAL B), de *Pseudomonas* sp. (LPS), de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) de *Burkholderia cepacia* (LBC) e lipase de *Penicillium camembertii* (LPC) são descritas a seguir.

Lipase de Pâncreas de Porco (LPP)

Lipases pancreáticas têm massa molecular de 50 kDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais, por esse motivo, de todas as lipases usadas para síntese a LPP é a menos pura. A lipase pancreática da Sigma contém cerca de 8-20% de proteína (WEBER *et al.*, 1995).

Preparações brutas de lipases pancreáticas contêm um número significativo de outras hidrolases (impurezas), além da “verdadeira LPP”. LPP está disponibilizada a um alto custo numa forma semi-purificada e a preparação mais usada para biotransformações é denominada de “pancreatina” que contém menos do que 5% de proteína. As principais hidrolases contaminantes são: esterases, tripsina, proteases, colesterol, fosfolipases entre outras (FABER, 1997).

Lipase de Candida rugosa (LCR)

Amostras comerciais de lipases de *Candida rugosa* contêm cerca de 2-11% de proteína (WEBER *et al.*, 1995) e o restante compreende açúcares e cargas inertes. Eletroforese em gel mostra uma proteína isolada com peso molecular de 63 kDa quando analisada por Comassie Blue, no entanto, análises mais sensíveis revelam uma pequena quantidade de outras proteínas. A biologia molecular tem produzido cinco diferentes isômeros de LCR a partir do levedo de *Candida rugosa*, tendo todas elas massas moleculares semelhantes (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

A LCR é capaz de acomodar ésteres de cadeia longa em seu sítio ativo, e é a lipase que possibilita a hidrólise seletiva de ésteres de álcoois secundários. Essa lipase é classificada como inespecífica e tem habilidade de liberar todos os tipos de ácidos graxos (de cadeias médias e longas) independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 1997).

Lipase de Rhizomucor miehei (LRM)

Lipases de *Rhizomucor miehei* tem massa molecular de 33 kDa e a preparação comercial contém cerca de 25-57% de proteína. LRM é uma proteína recombinante produzida pelo fungo *Aspergillus* (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

Com relação à necessidade estérica do substrato, elas se parecem com as lipases de *Pseudomonas* sp., e são similares a *Candida* e a *Pseudomonas*, quanto a sua especificidade hidrolítica. Estudos com lipases de *Rhizomucor miehei* mostraram que ela é muito seletiva na produção de monoéster opticamente puros (FABER, 1997).

Lipase de Candida antarctica (Cal B)

Cal B tem massa molecular de 33 kDa e cerca de 16-51% de proteína, é produzida por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*). Cal B apresenta pouca ou nenhuma ativação interfacial e catalisa muito lentamente a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Por esta razão, é classificada por alguns autores como uma esterase. Demonstra elevada atividade e alta enantiosseletividade para uma extensa variedade de álcoois. Esta enantiosseletividade é baixa para ácidos carboxílicos (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

Lipase de Pseudomonas sp. (LPS)

Lipases isoladas de bactérias de *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. glumae* e *P. cepacia* são catalisadores altamente específicos. *P. cepacia* é composta por 320 aminoácidos com massa molecular de 33 kDa. Lipase Amano P ou PS contém cerca de 1-25% de proteína e aditivos como diatomáceas, dextrinas e CaCl_2 . Alguns grupos têm produzido diferentes qualidades de LPS, mas a sequência de aminoácidos de todas é muito similar. Provavelmente a preparação comercial de LPS não é uma proteína recombinante. Na presença de uma interface a lipase *P. cepacia* mostra ativação interfacial, responsável por um aumento em aproximadamente 25 vezes de sua atividade catalítica (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

Como a maioria das lipases microbianas, todas as preparações comerciais disponíveis de lipases de *Pseudomonas sp.* possuem preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de álcoois secundários, mas a seletividade entre as diferentes preparações pode diferir entre si (FABER, 1997).

Lipase de Thermomyces lanuginosus (LTL)

Lipolase é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* também produzida por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*), comercializada pela Novozymes. Devido à sua elevada estabilidade em pH alcalino é mais utilizada na formulação de detergentes (AASLYNG *et al.*, 1991), entretanto, alguns trabalhos têm relatado sua aplicabilidade na síntese de ésteres (COSTA NETO, 2002; SHINTRE *et al.*, 2002).

Lipase de Pseudomonas fluorescens (LPF)

Lipase AK “Amano” 20 é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescens*. A lipase AK tem uma elevada atividade lipolítica e estabilidade térmica (AMANO ENZYME, 2006).

Lipase de Burkholderia cepacia (LBC)

Lipase PS é uma nova preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc. Esta enzima é manufaturada por uma cultura submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*. A enzima é purificada com etanol e possui uma elevada atividade lipolítica (AMANO ENZYME, 2006).

Lipase de Penicillium camembertii (LPC)

Lipase G é uma preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc, e é manufaturada por uma cultura submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Penicillium camembertii*. O fato desta lipase hidrolisar mono e diacilglicerol, produzindo glicerol e ácidos graxos, mas não triglicerídeos, melhora a qualidade de alguns óleos, que por apresentarem elevados níveis de mono e diglicerídeos apresentam sua qualidade reduzida. Esta enzima possui alta atividade de esterificação (AMANO ENZYME, 2006).

2.4. Utilização de lipases em biocatálise

A utilização de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio de solvente orgânico não é recente; as primeiras publicações a respeito deste assunto são do início do Século XX. Entretanto, o interesse por estes sistemas ressurgiu após a publicação dos trabalhos de ZAKS e KLIBANOV (1984; 1985; 1988 a, b), na década de 80. Embora os primeiros estudos estivessem relacionados à síntese de ésteres simples, com o avanço das pesquisas a atenção voltou-se para reações enantio e regiosseletivas. De fato, a possibilidade de obtenção de produtos enantiomericamente puros aumentou grandemente a possibilidade e o interesse de aplicação de lipases em diversas áreas industriais, especialmente na área farmacêutica, na qual compostos enantiomericamente puros têm grande importância devido à sua ação biológica distinta (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Exemplos de aplicação de lipases em biocatálise

Aplicações	Referência
Síntese quimio-enzimática de análogos de gangliosídeos	ZHANG <i>et al.</i> , 1999
Esterificação de ácido ascórbico com carotenóide (bixina)	HUMEAU <i>et al.</i> , 2000
Síntese de surfatantes por ligação amida	MAUGARD <i>et al.</i> , 1998
Síntese de ésteres de cadeia curta	SANTOS e CASTRO, 2006
Síntese de ésteres de açúcares	PAULA <i>et al.</i> , 2005
Proteção seletiva de grupos hidroxilas de açúcares	CARREA e RIVA, 2000
Síntese de biodiesel	URIOSTE e CASTRO, 2004

No caso de fármacos, a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta, ou seja, normalmente um dos isômeros (R ou S) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é muito menos ativo ou até mesmo tóxico. Um exemplo trágico é o caso da talidomida, composto empregado como sedativo para prevenir a náusea durante a gravidez. A eficácia da droga deve-se exclusivamente ao enantiômero R, e lamentavelmente, o enantiômero S é teratogênico. Como a síntese por via química deste composto é inespecífica, o produto causou anormalidades em muitas crianças. A biossíntese assimétrica química, ou seja, a obtenção de isômeros únicos de compostos quirais por métodos enzimáticos não possui esta desvantagem e é um mercado que se encontra atualmente em grande expansão, sendo que atualmente reconhece-se que cerca de 1/3 dos medicamentos comercializados são compostos opticamente puros. O mercado mundial de compostos quirais de química fina foi de 6,63 bilhões de dólares em 2000 e crescerá 13,2 % ao ano, atingindo um total de 16,2 bilhões em 2007, de acordo com um estudo feito na Inglaterra (STINSON, 2001).

Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de sistemas reacionais em solventes orgânicos apresenta muitas vantagens, como elevada solubilidade dos substratos e produtos, reversão da reação hidrolítica e modificação da especificidade da enzima (KLIBANOV, 2001, ZACKS e KLIBANOV, 1985), o que justifica a pesquisa sobre a utilização de enzimas em ambientes aquo-restritos.

A princípio, a capacidade de catalisar reações em meio de solvente orgânico foi descrita como característica principalmente de lipases. Entretanto, atualmente, diversas enzimas são utilizadas em escala industrial em reações sintéticas e de isomerização como a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose, pela ação da xilose isomerase, que

catalisa a isomerização de D-glucose a L-frutose, e a preparação de penicilina semi-sintética catalisada pela penicilina amidase (ZANIN e MORAES, 2004). Apesar das vantagens do emprego de sistemas não-aquosos para biocatálise, as enzimas geralmente mostram baixa atividade catalítica nestes meios, em comparação com soluções aquosas nativas. Portanto, ainda existem muitos problemas relacionados com a aplicação de enzimas em meio de solvente orgânico, entre os quais destacam-se a instabilidade da enzima em solventes orgânicos e termoinstabilidade.

Para contornar estas dificuldades, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e materiais para a imobilização de enzimas, a implementação de sistemas de micelas reversas, que preservam o número de moléculas de água necessárias à manutenção de sua estrutura, ou ainda a modificação das características enzimáticas por mutagênese sítio dirigida ou por evolução dirigida.

2.5. Imobilização de lipases

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por propiciar a reutilização destas enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Diversas preparações de lipase imobilizada estão disponíveis comercialmente e podem ser adquiridas de diversos fornecedores, como: Sigma-Aldrich, Fluka, Novozyme, Amano, entre outros. A Tabela 2.4 apresenta os preços divulgados nos catálogos desses fornecedores.

Tabela 2.4. Cotação de preparações comerciais de lipases imobilizadas

Fonte de Lipase	Descrição	Preço (\$/g)
<i>Candida antarctica</i>	Sol-gel-AK ou vidro sinterizado	32,12
	Resina acrílica (Novozym 435)	5,00
<i>Candida cylindracea</i>	Sol-gel-AK	56,80
<i>Candida rugosa</i> (tipo VII)	Resina acrílica	30,00
<i>Mucor miehei</i>	Sol-gel-AK	50,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sol-gel-AK ou vidro sinterizado	31,76
<i>Rhizomucor miehei</i>	Resina de troca iônica macroporosa (Lipozyme)	2,00

Devido ao elevado custo dessas preparações imobilizadas e considerando a compatibilidade com a enzima, inúmeros materiais têm sido testados como matrizes de

insolubilização de lipases, como por exemplo, Eupergit C, Celite, quitosana e quitina, agarose, Chromosorb e Sepharose. Alguns desses suportes apresentam como limitação a baixa resistência mecânica e, portanto, outros suportes têm sido considerados: polímeros polares como poli metil metacrilato (BASRI *et al.*, 1996), polímeros sintéticos anfifílicos como polietilenoglicol (HÉRNAIZ *et al.*, 1999) ou hidrofóbicos como o Accurel (ALDURI e YONG, 1997) e suportes inorgânicos, como sílica de porosidade controlada, óxido de nióbio entre outros (SOARES *et al.*, 1999; MIRANDA *et al.*, 2006).

Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, os que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores.

2.5.1. Suportes híbridos

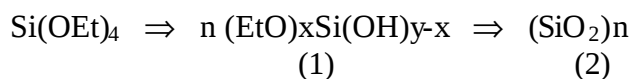
As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais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

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

Uma das principais rotas de obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos é o processo sol-gel. O sol é constituído de uma suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 1000 nm) em um líquido e o gel é formado pela estrutura rígida de partículas

coloidais (gel coloidal) ou por cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios (HIRATSUKA *et al*, 1995).

A reação química envolvida num processo sol-gel convencional, baseado em derivados alcóxidos, é mostrada abaixo. A etapa (1) corresponde a hidrólise, enquanto a (2) corresponde á policondensação do silano.



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

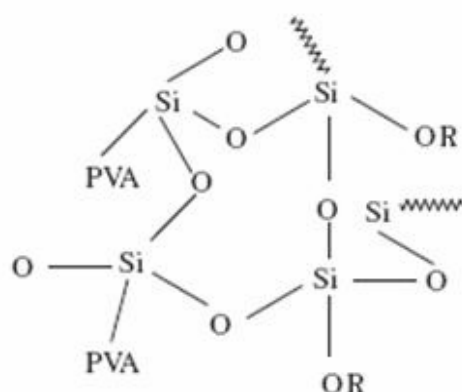
A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia fortemente a cinética de reação, assim como, a estrutura final do gel (FONSECA e AIROLDI, 2003; HENCH e WEST, 1990; SANCHEZ *et al.*, 1988). Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar através de uma substituição nucleofílica,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

Materiais híbridos podem ser facilmente preparados e modificados com a grande variedade de combinações de componentes disponíveis, conferindo diferentes contribuições nas propriedades do material resultante, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle da porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (ZOPPI *et al.*, 1997). Essa grande versatilidade associada ás suas propriedades ópticas, estabilidade química e termomecânica fazem com que esses materiais se apresentem com

um grande potencial em diferentes aplicações, como no desenvolvimento de sensores químicos, aplicações ópticas, biomateriais, em catálise, revestimento, aplicações cromatográficas, preparação de membrana e materiais compósitos (JOSÉ e PRADO, 2005).

O desenvolvimento de novos materiais para catálise heterogênea vem sendo usado na preparação de suportes híbridos orgânico-inorgânicos, onde o catalisador é aplicado na superfície de diferentes suportes, como sílica, alumina, cloreto de magnésio e materiais zeólitos (COLLINSON, 1998). A imobilização de catalisadores em membranas poliméricas tem sido uma das estratégias recentes utilizadas na busca de catalisadores heterogêneos, com maior seletividade, rendimento e velocidade para algumas reações (JOSÉ e PRADO, 2005).

Recentemente no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena foi testada com sucesso uma matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO *et al.*, 2004), *Candida rugosa* (BRAGA, 2005) e Pancreática (PAULA *et al.*, 2005). Essa matriz combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofilicidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (GILL e BALLESTEROS, 1998), bem como elevada atividade e estabilidade. A estrutura dessa matriz é representada na Figura 2.1.



R– Grupo alquil

Figura 2.1. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)

Considerando esses resultados promissores, selecionou-se essa matriz para imobilização das diversas fontes de lipases testadas no presente trabalho.

2.5.2. Modificações químicas da superfície do suporte

Como a maioria dos suportes utilizados para ligação covalente não apresenta grupos reativos que se ligam diretamente à proteína, torna-se necessário o uso de métodos de ativação. A ativação corresponde à incorporação de um grupo químico que é capaz de reagir com os grupos laterais da proteína.

O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico.

O agente de ativação mais comumente usado é o glutaraldeído que facilmente polimeriza resultando em polímeros contendo funções aldeído ω (ômega) insaturados que podem reagir com amino grupos da enzima. A reação envolve a formação de uma base de Schiff (Figura 2.2).

O mecanismo da reação é bastante complexo e ainda não completamente entendido (ARAKAKI e AIROLDI, 1999). Entretanto, a ligação de acoplamento entre a enzima e o suporte ocorre entre um grupo aldeído do suporte e usualmente uma amina disponível na proteína. A reação de ativação do suporte, normalmente, é realizada em pH 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) para evitar a polimerização do aldeído próximo à superfície do suporte com carga positiva. Após a ativação, a lavagem do suporte com água destilada tem a função de remover o excesso de glutaraldeído e impedir a polimerização do glutaraldeído em excesso com a enzima.

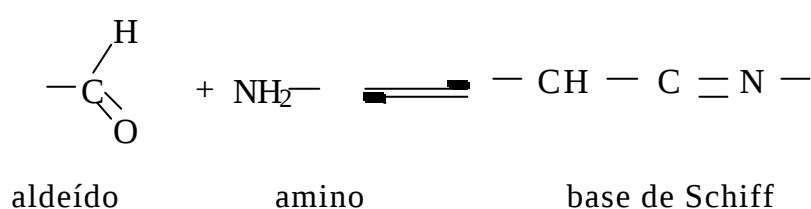


Figura 2.2. Reação envolvida na formação da base de Schiff

A utilização do carbonildiimidazol (CDI) na ativação de suportes contendo grupos hidroxilas para a imobilização de enzimas tem apresentado resultados satisfatórios (AKGOL *et al.*, 2001). O CDI atua como um agente carbonilante, inserindo uma carbonila no suporte.

A ativação é feita por dissolução do CDI em solvente polar aprótico e o suporte é então suspenso nesta solução à temperatura ambiente, com agitação constante seguida de intensa lavagem com água destilada (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2002). Após o tratamento, o suporte é colocado em contato com uma solução enzimática, o nitrogênio nucleofílico do grupo amino livre da enzima ataca a carbonila presente no suporte ativado, ocorrendo à ligação covalente entre a enzima e o suporte (AKGOL *et al.*, 2001).

O procedimento de ativação do suporte com metaperiodato de sódio é baseado na oxidação dos grupos hidroxilas do suporte envolvendo o íon periodato. O metaperiodato de sódio oxida especificamente os dióis vicinais (1,2 – dióis) com a clivagem da ligação carbono-carbono, mas não oxida o produto formado, gerando grupos aldeídos no suporte. A ativação do suporte geralmente é realizada por imersão do suporte em uma solução de NaIO_4 , a temperatura ambiente, em total ausência de luz e com agitação constante, seguida de intensa lavagem com água destilada (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 1999).

Após o tratamento, o suporte ativado é colocado em contato com uma solução enzimática, ocorrendo a ligação covalente.

2.6. Meios reacionais

A síntese de ésteres catalisada por lipases tem sido tópico para muitos estudos (TORRES e OTERO, 1999; GUBICZA *et al.*, 2000; SANTOS e CASTRO, 2006). Em princípio, os processos podem ser realizados em um sistema reacional contendo quantidades apropriadas de álcool e ácidos graxos em presença ou ausência de solventes orgânicos apolares (LANGRAND *et al.*, 1990; GUBICZA *et al.*, 2000). No entanto, a eliminação de solventes é tecnicamente possível e oferece inúmeras vantagens, tais como: permite obtenção de produções volumétricas mais elevadas, evita custo adicional dos solventes, os produtos formados são facilmente separados e os substratos não convertidos são prontamente reciclados. Além disso, a ausência de solventes geralmente promove processos produtivos ambientalmente limpos, já que a maioria dos solventes são tóxicos e agentes poluentes. Nestes sistemas a ausência de um solvente que solubilize reagentes e produtos, e que diminua a viscosidade do sistema, dificulta o controle e determina a influência dos vários parâmetros que afetam o processo (FORESTI e FERREIRA, 2005).

2.7. Métodos de obtenção de monoglicerídeos (MAG)

Três metodologias são descritas para a obtenção de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando a enzima lipase: (1) hidrólise ou alcoólise de triglicerídeos, (2) glicerólise de triglicerídeos, (3) esterificação ou transesterificação de glicerol com ácidos graxos de ésteres.

O primeiro método fornece 2-MAG, enquanto o segundo e terceiro métodos usualmente fornecem uma mistura de monoglicerídeos, na qual o 1(3) MAG é o composto predominante, geralmente obtido com um rendimento elevado. Alguns exemplos desses métodos são descritos na Tabela 2.5.

2.7.1. Método 1: Hidrólise ou Alcoólise

A hidrólise contínua de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos e glicerol é o processo padrão utilizado em escala industrial. As gorduras são hidrolisadas em tratamento contracorrente com vapor em elevadas temperaturas e pressões (LI e WARD, 1993). Hidrólises enzimáticas usando lipases não-específicas oferecem um processo alternativo para a produção de ácidos graxos em condições moderadas. Vários métodos estão descritos na literatura, incluindo reações na presença (VIRTO *et al.*, 1991) ou na ausência (BAILLARGEON e SONNET, 1991) de solventes orgânicos. Para obtenção de MAG por hidrólise enzimática, é necessário o controle da reação para evitar uma hidrólise completa. A maneira mais fácil de alcançar esse propósito é a aplicação de lipases 1,3-específicas resultando em 2-MAG (Figura 2.3).

O principal problema na reação de hidrólise é o baixo rendimento em MAG, pois são produzidos dois mols de ácido graxo livre por mol de MAG, e a migração do grupo acila (da posição 2 para a posição 1(3) do glicerol) deve ser suprimida (HOLMBERG e ÖSTERBERG, 1988). Por outro lado, a reação de alcoólise pode ser realizada na presença de solventes apolares, reduzindo a velocidade de migração do grupo acila. Por esta razão, a alcoólise de triacilgliceróis fornece rendimentos mais elevados (75-97%) que a hidrólise. Adicionalmente as reações de alcoólise são mais rápidas por não ocorrer mudança do pH durante a reação e também porque a lipase não sofre inibição dos ácidos graxos livres. A adição do álcool em excesso desloca o equilíbrio para a formação de monoglicerídeos.

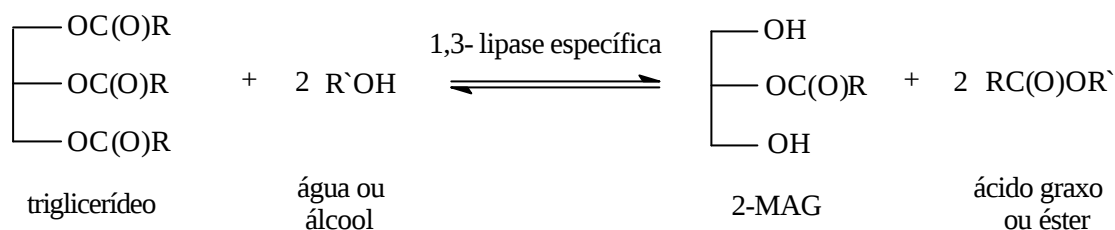


Figura 2.3. Obtenção de monoglicerídeos por hidrólise ou alcoólise por via enzimática

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

Um procedimento mais específico de obtenção de 2-MAG em um sistema bifásico foi relatado por MAZUR *et al.*, (1991). O sistema consistia em hexano, álcool alifático, como o 2-butanol, e uma solução aquosa tamponada contendo lipase 1,3-específica (Lipozyme). Numa segunda etapa uma maior seletividade de reação pôde ser induzida pela esterificação dos ácidos graxos livres liberados com o álcool alifático (geralmente álcoois primários). O rendimento foi de 70% e o método é aplicável para triglicerídeos de C_{8:0} até C_{14:0} (MAZUR *et al.*, 1991). Uma outra possibilidade para a indução da seletividade pode ser alcançada pela hidrólise do óleo na presença de surfatantes aniônicos. Em condições otimizadas HOLMENBERG e ÖSTERBERG (1988) obtiveram um rendimento de 80% em 2- MAG.

2.7.2 Método 2: Glicerólise de triglicerídeos

A desvantagem da reação de alcoólise é o desperdício de dois ácidos graxos do triglicerídeo, sendo, portanto, mais eficiente o método no qual o glicerol é usado como álcool, permitindo a conversão total dos três ácidos graxos (Figura 2.4), empregando lipases tanto específicas como não específicas (YAMANE *et al.*, 1986). Na prática, usualmente as reações promovem a migração do grupo acila de tal forma que se estabelece um equilíbrio da concentração dos produtos formados na razão de 9:1 (1(3) MAG e 2- MAG) (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

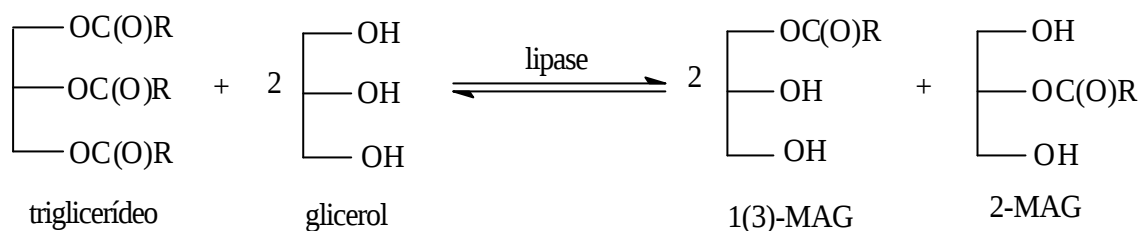


Figura 2.4. Obtenção de monoglicerídeos por glicerólise enzimática

Como a glicerólise de triglicerídeos apresenta baixo rendimento 30–50% em monoglicerídeos, devido ao equilíbrio desfavorável da reação, diversas estratégias são adotadas para deslocar o equilíbrio no sentido desejável da reação. O trabalho pioneiro foi desenvolvido por YAMANE *et al.* (1986) e desde então a reação de glicerólise catalisada por lipases vem sendo intensamente pesquisada, sendo inúmeros os trabalhos realizados visando a obtenção de MAG a partir de uma variedade de óleos e gorduras naturais. Reações de glicerólise já foram realizadas em micelas reversas (CHANG *et al.*, 1991; HOLMBERG *et al.*, 1989), na presença ou ausência de solventes orgânicos ou em sistemas em estado sólido livre de solvente (MCNEILL *et al.*, 1990). Problemas envolvendo a hidrofiliabilidade do substrato glicerol em solventes orgânicos e problemas analíticos para a determinação quantitativa dos glicerídeos parciais foram descritos por FERREIRA DIAS e FONSECA (1993).

YAMANE *et al.*, (1986) estudaram a reação de glicerólise do óleo de milho pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* em sistema batelada sem adição de surfatantes ou emulsificantes, e conseguiram produzir 20,4% de MAG a 40°C. Foi também relatado que a lipase pode sofrer inibição e desativação pela gordura oxidada durante a glicerólise (batelada ou contínua) do óleo de girassol (OHTA *et al.*, 1989).

MCNEILL *et al.*, (1990) desenvolveram um método, no qual a glicerólise foi realizada numa emulsão líquido-líquido de glicerol e triglicerídeos, seguida da cristalização dos monoglicerídeos formados. Usando este método, foram obtidas altas formações de MAG (70–99%) utilizando diferentes meios reacionais (BORNSCHEUER e YAMANE, 1994; FERREIRA DIAS e FONSECA, 1993; MYRNES *et al.*, 1995). A temperatura de reação também é crítica e precisa ser mantida abaixo da temperatura do ponto de fusão do monoglicerídeo, por exemplo, para sebo de boi a temperatura ótima foi de 42 °C fornecendo 72% 1(3) MAG usando lipase pancreática ou microbiana (MCNEILL *et al.*, 1990). Um melhor desempenho do processo pode ser ainda obtido por meio do

controle do teor de água do meio reacional, a razão entre triglicerídeos e glicerol e a quantidade e o tipo de lipase (MCNEILL e YAMANE, 1991).

A atividade e estabilidade das lipases de diferentes fontes foram também estudadas usando trioleína como modelo de triacilglicerol, sendo observado que lipases bacterianas foram muito estáveis, enquanto que as lipases fúngicas foram rapidamente inativadas (BORNSCHEUER e YAMANE, 1994). Uma melhoria na estabilidade operacional foi descrita por meio da imobilização da lipase em Celite. Com lipase de *Chromobacterium viscosum*, 99% de MAG foi obtido em 120 h de reação a 8°C (primeiras 8 h a 25°C).

A correlação entre a composição da gordura e o rendimento em MAG em função do tamanho da cadeia e perfil de saturação dos ácidos graxos, foi relatada na glicerólise do óleo de palma. A análise detalhada da composição dos produtos de reação indicou uma cristalização preferencial de MAG (MCNEILL e BERGER, 1993; MCNEILL *et al.*, 1992) especialmente pelo acúmulo de ácidos graxos saturados, tais como, C_{16:0} na fração de MAG.

Em processos contínuos, podem ser usados reatores à membrana para remover os monoglicerídeos ao invés da estratégia da cristalização (STEVENSON *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 1991).

Em biorreatores à membrana de microporos hidrofílicos, o óleo comestível foi glicerolizado por lipase de *P. fluorescens*, resultando na formação de 5-25% de MAG. O tempo de meia-vida da enzima foi de 3 semanas a 40°C. CHANG *et al.*, (1991) empregaram biorreatores contínuos com membrana de polissulfona para a glicerólise do óleo de oliva em AOT/isooctano usando lipase de *C. viscosum* imobilizada em lipossomos (pequenas vesículas lamelares). A fase estacionária foi detectada após 24 h de operação, resultando numa conversão de 80% do óleo de oliva durante 6 dias de operação do reator. Uma produtividade mais elevada da monoleína (90 µmol (h.mL)⁻¹) foi obtida numa concentração de 2% do substrato inicial. O fluxo otimizado do óleo de oliva foi de 2,5 mL/h, e o teor de água foi menor que 8%.

Tabela 2.5. Síntese de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando diferentes métodos.

Método	Receptor do grupo acila	Doador do grupo acila	Sistema reacional	Rendimento (%)	Lipase	Referência
1	Água	Óleo de palma	Micelas reversas	78	LRO	HOLMBERG e ÖSTERBERG (1988)
1	Etanol	Trioleína	Etanol	84	LPF	ZAKS e GROSS (1990)
1	Butanol	Tricaprina	Butanol / Duas fases	87	LHL	MAZUR <i>et al.</i> (1991)
1	Etanol	Tripalmitina	MTBE	97	LRO	MILLQVIST-FUREBY <i>et al.</i> (1994)
1	Etanol	Trilaurina	Etanol	75	LPC	MILLQVIST-FUREBY <i>et al.</i> (1997)
1	Água	Trioleína	Tampão fosfato	67	LPP	PLOU <i>et al.</i> (1996)
2	Glicerol	Óleo de palma	Micelas reversas	30	LRO	HOLMBERG <i>et al.</i> (1989)
2	Glicerol	Sebo bovino	Precipitado/ sem solvente	72	LPF	McNEILL <i>et al.</i> (1990)
2	Glicerol	Trioleína	Micelas reversas	50	LCV	CHANG <i>et al.</i> (1991)
2	Glicerol	Trioleína	Precipitado/ sem solvente	96	LCV	BORNSCHEUER e YAMANE (1994)
3	Glicerol	Ácido palmítico	Precipitado/ sem solvente	95	LPcam	WEISS (1990)
3	Glicerol	Ácido oléico	Peneira molecular/ sem solvente	74	LPcam	YAMAGUCHI e MASE (1991)
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	55	LCR	HAYES e GULARI (1991)
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	62	LRO	HAYES e GULARI (1994)
3	Glicerol	Ácido oléico	Peneira molecular/ Hexano	72	Lpcam	AKOH <i>et al.</i> (1992)
3	Glicerol	Laurato de vinila	MTBE	90	LRM	BERGER e SCHNEIDER (1992)
3	Glicerol	Ácido oléico	Micelas reversas	42	LRM	SINGH <i>et al.</i> (1994)
3	Glicerol	Ácido láurico	Micelas reversas	11	LPC	BORNSCHEUER <i>et al.</i> (1994)
3	Glicerol	Oleato de etila	Acetona	68	LCA-B	PASTOR <i>et al.</i> (1995)
3	Glicerol	Ácido palmítico	Hexano	61	LRO	KWON <i>et al.</i> (1995)

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

A estabilidade operacional da lipase imobilizada em lipossoma foi calculada em 45 dias, por outro lado, o tempo de meia-vida da enzima livre em mistelas reversas foi somente cerca de 4 dias. Nesse último exemplo, a atividade da enzima imobilizada foi ligeiramente inferior ao biocatalisador na forma livre (CHANG *et al.*, 1991).

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

2.7.3. Método 3: Esterificação de glicerol com ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos

A esterificação também produz monoglicerídeos sem desperdiçar o ácido graxo, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG e TAG, conforme especificidade da lipase (Figura 2.5). Na esterificação do glicerol com ácidos graxos utilizando lipases 1,3-específicas, o glicerol pode ser esterificado na posição 1 ou 3, podendo formar 1(3) MAG e 1,3 DAG (diglicerídeo). Quando lipases não específicas são empregadas, o glicerol pode ser esterificado em qualquer posição, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG e TAG (triglicerídeo). Deve-se levar em consideração que ainda pode ocorrer a migração do grupo acila, ocasionando mudanças de posições desse grupo na molécula do glicerol.

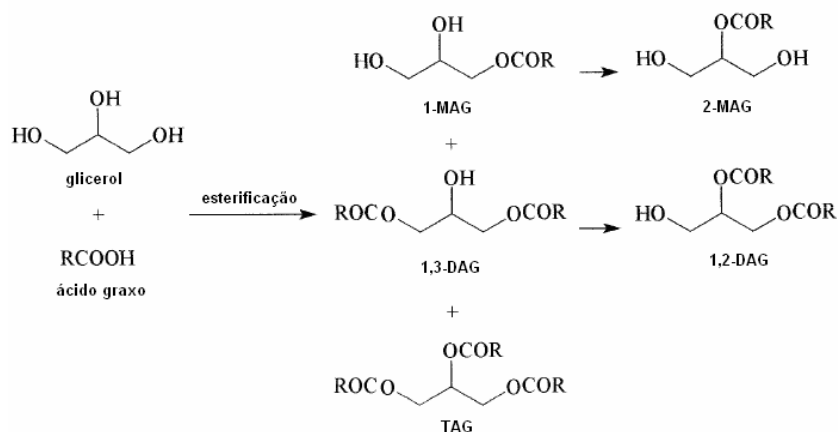


Figura 2.5. Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos.

Para deslocar a reação para a formação de monoglicerídeos, diversas estratégias são usadas para remover água ou álcool, como por exemplo, redução de pressão ou uso de agentes dessecantes (YAMAGUCHI e MASE, 1991; MILLQVIST - FUREBY *et al.*, 1996). A Tabela 2.6 lista outras estratégias descritas na literatura para atingir um elevado rendimento de formação de MAG e evitar a inversão da reação no sentido da hidrólise.

Tabela 2.6. Métodos para formação seletiva de MAG em reações de esterificação.

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

A influência do tamanho da cadeia dos ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol tem sido estudada por diversos grupos (TSUJISAKA *et al.*, 1977; JANSSEN *et al.*, 1993).

TSUJISAKA *et al.*, (1977) demonstraram a versatilidade das lipases para a reação de esterificação do glicerol com diversos ácidos graxos. Com lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*, a esterificação do ácido oleico ocorreu exclusivamente nas posições 1 e 3 do glicerol. Por outro lado, lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* esterificaram somente ácidos graxos de cadeia longa e a esterificação ocorreu randomicamente (TSUJISAKA *et al.*, 1977).

JANSSEN *et al.*, (1993) observaram que a maior formação de monoéster foi possível para cadeias curtas de ácidos graxos em solventes polares, ao passo que a maior síntese de di e triéster foi encontrada nas cadeias maiores de ácidos graxos em solventes orgânicos apolares.

Uma conversão mais elevada (80-90%) foi reportada por FLETCHER *et al.*, (1987), mas a lipase empregada não foi a 1,3-específica e ambos 1 (3) e 2-MAG foram formados. Isto também foi relatado por BORNSCHEUER *et al.*, (1994) para a reação entre glicerol e ácido láurico usando lipase purificada de *Pseudomonas cepacia* em microemulsões. Ao passo que a lipase de *Chromobacterium viscosum* foi encontrada muito

estável em AOT em micelas reversas (FLETCHER *et al.*, 1987), a lipase de *R. deleamar* mostrou-se menos estável no mesmo sistema.

A baixa solubilidade do glicerol em solventes apolares orgânicos reduz a velocidade de reação e favorece a reação paralela, ou seja, acilação dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis mais solúveis. Para minimizar este problema, algumas técnicas têm sido propostas como o uso de diferentes tipos de solventes (KWON *et al.*, 1995); micelas reversas (BORNSCHEUER *et al.*, 1994), meios reacionais isentos de solvente (YAMAGUCHI e MASE, 1991; ou condução do processo em reatores à membranas (VAN DER PADT *et al.*, 1992; HOQ *et al.*, 1985).

O alto rendimento de síntese de 1(3) MAG regioisomericamente puro em solventes orgânicos em escala laboratorial foi relatado por BERGER e SCHNEIDER (1992). O problema da baixa solubilidade do hidrofílico glicerol em solventes orgânicos apolar foi superado facilmente pela adsorção do glicerol em um suporte sólido em pó (ex; sílica gel). Estas preparações de glicerol foram colocadas em um solvente orgânico e um doador do grupo acila foi adicionado juntamente com a lipase 1,3-seletiva, simulando assim, uma interface líquido-líquido artificial. Depois da reação completada, enzima e suporte foram removidos simultaneamente por filtração simples, enquanto os produtos da esterificação permaneceram em solução. Em condições otimizadas, foi obtida concentração máxima de 70% de MAG, rendimentos mais elevados não foram alcançados devido à alta concentração de 1(3) MAG que serviu como melhor substrato que o próprio glicerol (BERGER e SCHNEIDER, 1992). Desta forma, para obter rendimentos mais elevados, os autores desenvolveram um sistema de separação contínua constituída de 2 etapas: síntese e isolamento. Substratos não reagidos e subprodutos indesejados (ex; 2-MAG, DAG e TAG) foram completamente reciclados e 1(3) MAG foi congelado a baixas temperaturas. Lipases não específicas também foram utilizadas com sucesso neste procedimento (BERGER e SCHNEIDER, 1992).

A aplicabilidade do método desenvolvido por BERGER e SCHNEIDER (1992) foi demonstrada para diferentes sistemas de esterificação usando vários doadores do grupo acila, tais como, ácidos graxos livres (C₅ a C₁₈ saturados ou insaturados), metil éster de ácidos graxos, ésteres vinílicos, triacilgliceróis sintéticos e óleos e gorduras naturais. Vários monoacilgliceróis foram produzidos com alto rendimento e pureza isomérica sem a necessidade de etapas posteriores de purificação.

Um processo alternativo foi baseado em um reator à membrana equipado com coluna de adsorção em série (VAN DER PADT *et al.*, 1992). Neste reator, um circuito interno (contendo ácidos graxos e glicerídeos produzidos) e um circuito externo glicerol-água, foram separados usando uma membrana de fibra oca. A lipase foi adsorvida na superfície interna da fibra e uma coluna em série foi colocada na fase oleosa do circuito do reator. VAN DER PADT *et al.*, (1992) encontraram que monogliceróis (ex: monocaprina) foram adsorvidos preferencialmente na coluna em série, portanto o MAG foi removido da mistura reacional, deslocando o equilíbrio, levando a esterificação para a formação de DAG e TAG.

Os autores concluíram que o reator de membrana pode ser usado em processos contínuos usando uma seqüência de colunas. Eles estimaram uma produção de 60 mols (15 Kg) de monoéster/g de enzima. O tempo de meia-vida da lipase de *Candida rugosa* foi de 50 dias.

A produção contínua de glicerídeos em reator à membrana a partir de ácidos graxos e glicerol por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em microporos hidrofóbico, foi relatada por YAMANE *et al.*, (1984) e HOQ *et al.*, (1985). Com 80% de conversão, 32% de MAG (principalmente 1-MAG) foram produzidos e o tempo de meia-vida da enzima foi de 54 dias (HOQ *et al.*, 1985). A aplicação de biorreatores à membrana para esterificação de ácidos graxos com glicerol e a hidrólise de óleos, foi revisada por KLOOSTERMAM *et al.* (1987).

Uma outra estratégia para superar o problema da acilação subsequente, que pode ocorrer nas reações de esterificações com glicerol puro, tem sido testada por vários grupos de pesquisa empregando glicerol protegido (Figura 2.6). Isso também oferece uma vantagem para a síntese de MAG na posição específica ou enantiomericamente puro (WANG *et al.*, 1988; BORNSCHEUER e YAMANE, 1995).

O ácido fenilboro (PBA) foi descrito como um solubilizante e agente protetor da esterificação do glicerol com diferentes ácidos graxos na presença de solventes orgânicos (STEFFEN *et al.* 1992). O rendimento mais elevado de MAG (84%) foi obtido usando o ácido hidroxisteárico como substrato e Lipozyme como biocatalisador em meio a *n*-hexano.

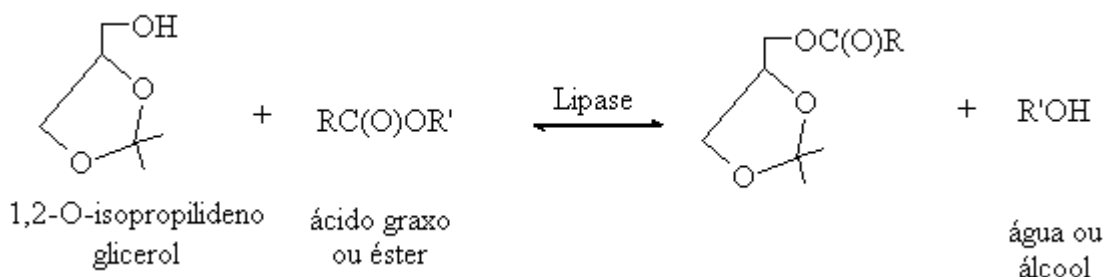


Figura 2.6. Obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol protegido e ácido graxo.

2.8. Matérias-primas

As matérias-primas para produção de monoglicerídeos são: glicerol e ácidos graxos puros ou presentes em óleos vegetais. Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres resultantes da condensação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos graxos (triacilgliceróis ou triglicerídeos) (Figura 2.7). Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos óleos apresentam cadeias de 16 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas (sem duplas ligações) ou insaturadas (com duplas ligações). Estas podem ser mono, di ou tri-insaturadas, dependendo da quantidade de duplas ligações carbono/carbono. A diferença entre óleos e gordura resume-se basicamente na aparência física (COSTA NETO *et al.*, 2000). A resolução 20/77 do CNNPA define a temperatura de 20°C como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo todos os lipídeos de ponto de fusão inferior a essa temperatura.

Óleos vegetais são constituídos de cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, cujo grau de saturação, ou insaturação, é função do tipo da semente que originou o óleo. Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (ricos em ácido láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura de 20-25° C; aqueles cujo teor de insaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoléico/ oléico) apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente e abaixo desta (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2005).

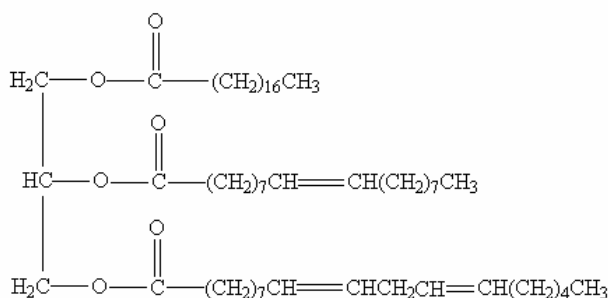


Figura 2.7. Estrutura de uma molécula de triglicerídeos.

Conforme a espécie de oleaginosa, variações na composição química do óleo vegetal são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura. Portanto, a análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro procedimento para a avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e isto pode ser obtido por meio de vários métodos analíticos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e de fase gasosa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A Tabela 2.7 apresenta a composição de alguns óleos vegetais, com potencial de utilização na produção de emulsificantes.

Entretanto, não existem limitações técnicas para o uso de qualquer outro tipo de óleo. Vários aspectos, incluindo tipo de catalisador (químico ou bioquímico), razão molar, temperatura, pureza dos reagentes (incluindo teor de água) e composição dos ácidos graxos livres interferem na eficiência da reação.

Tabela 2.7. Composição em percentual de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais

Ácido Graxo	Óleo Vegetal					
	Oliva	Soja	Babaçu	Mamona	Palma	Arroz
Octanóico (C ₈)	0	0	3,5	0	0	0
Decanóico (C ₁₀)	0	0	4,5	0	0	0
Láurico (C ₁₂)	0	0	44,7	0	0,1	0
Mirístico (C ₁₄)	0	0,1	17,5	0	1,2	0
Palmítico (C ₁₆)	16,9	10,5	9,7	1,2	46,8	17,5
Esteárico (C ₁₈)	2,7	3,2	3,1	1,0	3,8	1,3
Oléico (C _{18:1})	61,9	22,3	15,2	3,3	37,6	39,9
Linoléico (C _{18:2})	14,8	54,5	1,8	3,6	10,0	39,1
Linolênico (C _{18:3})	0,6	8,3	0	0,2	0	0,3
Ricínoleico (C _{18:1})	0	0	0	89,2	0	0

O óleo de babaçu foi selecionado para desenvolvimento deste trabalho, por apresentar uma composição rica em ácidos graxos saturados (aproximadamente 80%), possuir uma grande disponibilidade comercial e custo acessível.

O babaçu é uma palmácea encontrada em grande quantidade nos estados do Mato Grosso, Tocantins, Maranhão e Piauí. O Maranhão possui a maior concentração de babaçuais do país, distribuídos de forma descontínua em 10 milhões de hectares no estado (COPENAT, 1981). O babaçu pode atingir até 20 m de altura e suas folhas chegam a ter em média 9 m de comprimento.

O auge da economia babaçueira foi entre as décadas de 60 a 80. Neste período, 52 empresas de médio e de grande porte funcionavam no Maranhão, produzindo óleo para o abastecimento das indústrias alimentícias e de higiene e limpeza no país e no exterior. A produção anual de óleo de babaçu girava em torno de 130 mil toneladas, sendo o principal item da pauta de exportação do estado (ROCHA NETO, 1993).

Na década de 80 o avanço da produção de soja do Brasil iniciou um processo de migração da demanda por óleos comestíveis em favor desta. Na década seguinte, o processo de abertura da economia brasileira resultou na redução das alíquotas de importação dos óleos láuricos. Produtos oriundos do sudeste asiático, com preços extremamente competitivos, iniciaram uma forte concorrência no mercado brasileiro, restringindo ainda mais a demanda por óleo de babaçu. O resultado deste processo foi à falência de várias esmagadoras, com a redução significativa do parque industrial de óleos maranhense (ROCHA NETO, 1993).

Enquanto a estrutura industrial se alterou significativamente, a estrutura de produção do babaçu continuou sendo feita de maneira artesanal num sistema caseiro tradicional e de subsistência, no entanto, já se dispõe de equipamentos para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes (TASSARO, 1996). O esmagamento do coco produz dois tipos de óleos: um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico). A utilização do óleo de babaçu para fins comestíveis tem sofrido declínio constante, em virtude de duas razões: a substituição por óleos mais acessíveis, e a tendência dos consumidores a optarem por óleos e gorduras não saturadas. O mercado brasileiro formal para o óleo de babaçu comestível é estimado em 5,5 mil toneladas/ano, predominantemente para o mercado nordestino.

O mercado brasileiro de óleos láuricos constitui-se atualmente no principal mercado para o óleo de babaçu. As indústrias do segmento de higiene, limpeza e cosméticos absorvem cerca de 35 mil toneladas anuais de óleo de babaçu bruto.

Por apresentar altas concentrações dos ácidos láuricos, mirístico e palmítico, utilizados em todo o mundo para a produção de tensoativos, o óleo de babaçu também é muito utilizado para esta finalidade pelas indústrias químicas (MORAES, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Os experimentos foram realizados com preparações comerciais de lipases de células microbianas como: *Candida antarctica* B (Calb L, Novozymes), *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase e Lipozyme TL 100L, Novozymes), *Candida rugosa* (Tipo VII, Sigma), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK “Amano” 20, Amano), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS “Amano”, Amano), *Penicillium camembertii* (Lipase G, Amano) e células animais (pâncreas de porco, Tipo II, Sigma). As preparações comerciais de lipase imobilizada Lipozyme IM²⁰, Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM (Novozymes - Dinamarca) foram também utilizadas.

3.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: glicerol (Merck), ácidos graxos, como: ácido láurico (C₁₂), mirístico (C₁₄), palmítico (C₁₆), esteárico (C₁₈) e oléico (C_{18:1}) (Riedel-de Haën) e óleo de babaçu gentilmente cedido pela COGNIS (Jacareí-São Paulo).

3.1.3. Suporte de imobilização

Como suporte foi utilizado uma matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (POS-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (EUA).

3.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona - Synth, etanol - Nuclear, hexano - Quimex, dimetilsufóxido - F. Maia Indústria e Comércio Ltda, clorofórmio (Dinâmica), ácido acético glacial (Synth), peneira molecular 0,32 cm diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals; base (hidróxido de potássio - Merck), indicador ácido-base (fenolftaleína - Olleman), álcool polivinílico (Acrós), HCl (Isofar), glutaraldeído (Nuclear), metaperiodato de sódio (Nuclear), carbonildiimidazol (Sigma), polietilenoglicol (Synth - MM 1500) e Tetraetilortossilicato (Sigma - Aldrich).

3.1.5. Padrões cromatográficos

Para o estabelecimento do método cromatográfico os padrões utilizados (mono-di e triglicerídeos) foram adquiridos da empresa AccuStandard, com exceção da trioleína, adquirida da CHEM SERVICE. Os padrões utilizados, bem como seus códigos, estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Nomenclatura e códigos dos padrões glicéricos utilizados para estabelecimento do método cromatográfico.

Monoglicerídeos	Cód.	Diglicerídeos	Cód.	Triglicerídeos	Cód.
Monocaprina (C10)	GS – 006N	Dicaprina (C10)	GS – 005N	Tricaprina (C10)	GS – 004N
Monolaurina (C12)	GS – 009N	Dilaurina (C12)	GS – 008N	Trilaurina (C12)	GS – 007N
Monomiristina (C14)	GS – 012N	Dimiristina (C14)	GS – 011N	Trimiristina (C14)	GS – 010N
Monopalmitina (C16)	GS – 015N	Dipalmitina (C16)	GS – 014N	Tripalmitina (C16)	GS – 013N
Monooleína (C18:1)	UG – 012N	Dioleína (C18:1)	UG – 011N	Trioleína (C18:1)	Pz – 880

3.2. Metodologia Experimental

3.2.1. Preparação do suporte híbrido (POS-PVA)

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi inicialmente sintetizado conforme metodologia descrita por LIMA-BARROS *et al.* (2002), pela mistura de 5 mL de tetraetil ortossilicato (TEOS), 5 mL de etanol e 6 mL de solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (p/v). Essa mistura foi aquecida a 60° C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado, a agitação foi mantida nesta temperatura por mais 40 min. A mistura foi vertida em placas de Eliza e mantida à temperatura ambiente por 48h (aproximadamente) para completa solidificação (formação da rede interpenetrada de polissiloxano-álcool polivinílico – POS-PVA). O composto foi então triturado até a obtenção de partículas que passam por uma peneira (série Tyler de peneiras padrões) de 80 MESH, correspondendo a partículas com diâmetro menor que 0,175 mm.

3.2.2. Ativação do suporte

3.2.2.1. Ativação com glutaraldeído

O suporte foi embebido em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) e em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH na faixa entre 7 e 8, na proporção sólido líquido de 1:10 sendo mantido sobre a placa de agitação por 1 h. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão fosfato, sendo levado à estufa (60 °C) por 24 h.

3.2.2.2. Ativação com metaperiodato de sódio

Mediante metodologia descrita por CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (1999), o suporte foi suspenso em uma solução de 0,5 M de metaperiodato de sódio, sob agitação constante durante 90 min em ambiente isento de claridade. Em seguida, o suporte ativado foi transferido para um funil de Buchner e lavado com água destilada até a neutralidade do filtrado. Após a lavagem, a água foi succionada por 30 min.

3.2.2.3. Ativação do suporte com carbonildiimidazol

O procedimento foi realizado conforme metodologia descrita por CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (2002). O suporte foi suspenso em uma solução de 5 mg.mL⁻¹ de carbonildiimidazol (CDI), diluído em dimetilsufóxido, sob agitação constante por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, o suporte foi transferido para um funil de Buchner e lavado com uma solução aquosa de dimetilsufóxido (1:1) e intensamente lavado com água destilada. Após a lavagem, a água foi succionada por 30 min.

3.2.3. Imobilização da lipase

O suporte ativado foi embebido em hexano (1:10), e mantido sob agitação durante 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na forma livre e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietileglicol (PEG-1500). O sistema foi mantido sob agitação até a completa evaporação do hexano. Na Figura 3.1 é mostrado o esquema do procedimento de imobilização. A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do paranitrofenilpalmitato ou azeite de oliva, como descrito no item 3.3.3.

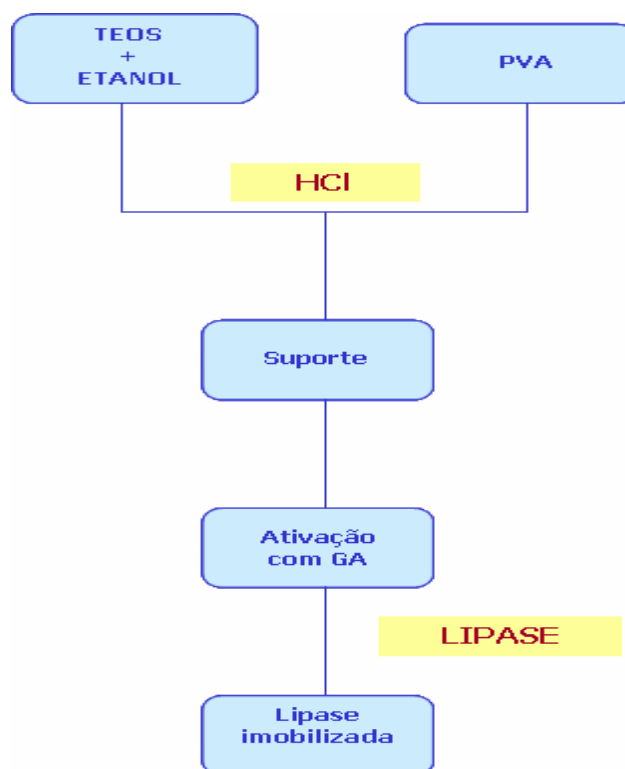


Figura 31. Esquema do procedimento experimental de preparo do suporte e imobilização da lipase.

3.2.4. Procedimento geral de esterificação

As sínteses foram realizadas em balões de fundo redondo (50 mL) contendo misturas adequadas de glicerol, ácido graxo e preparações de lipase imobilizada, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 45 a 65°C, dependendo da estabilidade térmica de cada preparação de lipase imobilizada. Esses experimentos foram realizados variando-se a razão molar dos reagentes (glicerol e ácido graxo), sistema imobilizado (lipases de diferentes fontes imobilizadas em suporte híbrido), tamanho de cadeia carbônica dos ácidos graxos (C_{12} a C_{18}) e composição em ácidos graxos. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, quantificando o consumo de ácido graxo e a formação dos mono, di e triglicerídeos.

3.2.5. Reações de glicerólise do óleo de babaçu

As sínteses foram realizadas em reatores de vidro esféricos (50 mL) contendo óleo de babaçu e glicerol numa razão molar de álcool: óleo igual a 2. As misturas foram

incubadas com diferentes fontes de lipases imobilizadas em POS-PVA na proporção 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 24 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 45 a 60°C, dependendo da estabilidade térmica de cada preparação de lipase. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação de mono, di e triglicerídeos por cromatografia de fase gasosa.

3.2.6. Separação dos produtos formados na reação de esterificação e glicerólise

Nas amostras (5g) retiradas do meio reacional (reações de esterificação ou glicerólise) foram adicionadas uma mistura de 45 mL de clorofórmio e 12,5 mL de ácido acético glacial, com homogenização por 10 min sob agitação constante. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma proveta de 500 mL e o volume foi completado com água destilada, sendo transferido para um funil de separação para a separação das fases (AOCS, 1990). A fase aquosa (contendo também glicerol) foi descartada e a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador Fisaton 801. O procedimento utilizado na separação dos produtos é mostrado na Figura 3.2.

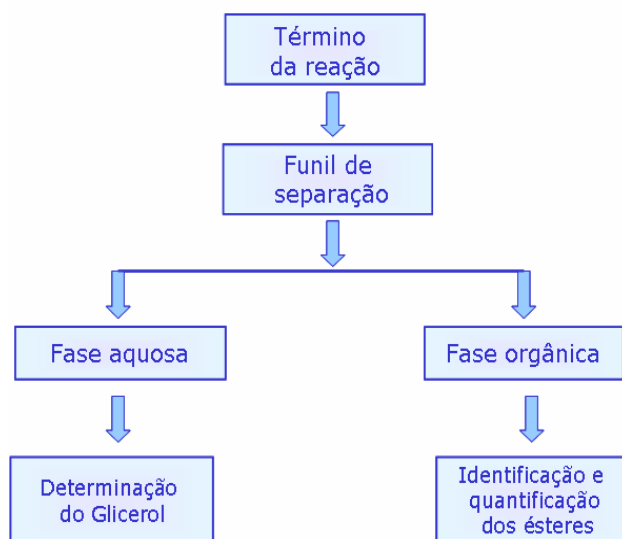


Figura 3.2. Processo operacional do fracionamento dos produtos da hidrólise

3.2.7. Planejamento Estatístico

Com base nos resultados obtidos, foi realizado um estudo do efeito das variáveis: temperatura e razão molar dos materiais de partida, com objetivo de determinar a melhor combinação dessas variáveis para a obtenção máxima de monoglicerídeos (MAG). Um planejamento fatorial completo 2^2 com 2 pontos centrais foi utilizado para melhor entendimento da influência dessas variáveis e de suas interações na formação de monoglicerídeos. Na Tabela 3.2 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica.

Tabela 3.2. Níveis das variáveis utilizados nos ensaios esterificação do glicerol com ácido láurico

Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)
Razão molar (ácido láurico: glicerol)	1:1	1:3	1:5
Temperatura (°C)	45	55	65

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA (versão 5.0), considerando como variável resposta a formação de monoglicerídeos. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão (teste t de Student's), e ainda em tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrática dos fatores (SQF), soma média quadrática (SMQF), teste F e nível de significância (p).

Os modelos foram determinados por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados aplicada aos resultados experimentais obtidos nos planejamentos fatoriais completos. Estes modelos são representados pela equação 3.1.

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_{ii} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

em que: Y_i representa a variável resposta, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} representam os coeficientes da regressão X_i , X_j representam as variáveis estudadas.

Os valores das variáveis foram codificados nos planejamentos fatoriais de acordo com a equação 3.2.

$$Z = \frac{N - m}{(\Delta N) / 2} \quad (3.2)$$

em que: Z = valor codificado da variável; N = valor real da variável; μ = média dos valores reais das variáveis; ΔN = valor real máximo da variável.

3.3. Métodos de Análises

3.3.1. Construção do método cromatográfico para dosagem dos glicerídeos

No estabelecimento do método de análise cromatográfica, foi utilizada uma coluna capilar (CP Sil 5CB: 10 m X 0,25 mm X 0,12 μ m) fabricada pela Varian, descrita na literatura como adequada para a quantificação de monoglicerídeos (LANGONE, 1998).

Para determinação dos tempos de retenção de cada produto e rampas de temperaturas, os padrões cromatográficos (Tabela 3.1) foram diluídos em hexano/acetato de etila (1:1) e em seguida 1 μ L de cada amostra foi injetada no cromatógrafo. Os métodos foram construídos e ativados segundo procedimentos descritos no “Manual de Operação da Workstation Varian Versão 4.5”, para configuração do equipamento e elaboração de métodos de análises.

3.3.2. Análise da concentração de ácido graxo total

A concentração de ácido carboxílico foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol 98° GL neutralizado, empregando-se uma solução alcoólica de KOH 0,02 M (Merck) e fenolftaleína como indicador, utilizando bureta digital de 50mL (Hirshmann Techcolor). Os cálculos foram efetuados pela equação 3.3.

$$\text{Ácido carboxílico (g/L)} = \frac{V \times M \times MM}{v} \quad (3.3)$$

em que: MM = massa molecular do ácido carboxílico titulado ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); M = molaridade da solução de KOH ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); V = volume gasto de KOH (mL); v = volume da alíquota titulada (mL).

A conversão do substrato foi expressa em conversão molar do ácido graxo consumido, empregando a equação 3.4.

$$\% \text{ Molar} = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (3.4)$$

em que: C_0 = concentração inicial do reagente e C = concentração do reagente em um determinado tempo.

3.3.3. Atividade hidrolítica das lipases imobilizadas

De acordo com a fonte de lipase utilizada, a determinação da atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas foram determinadas pela reação de hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP, massa molecular = 377,5 g/ Mol) (PENCREAC'H e BARATTI 1996) ou do azeite de oliva (SOARES *et al.*, 1999). Em ambas reações as condições de incubação foram: pH 7,0 (tampão fosfato) e temperatura 37°C. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de produto por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (μmoles/mg.min) (U), sendo que miligrama refere-se à massa de suporte seco para lipase imobilizada.

3.3.4. Teor de umidade

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

3.3.5. Cálculo da Atividade enzimática específica, Produtividade e Rendimento por grama de biocatalisador

Os valores de Atividade Enzimática Específica (A.E.E), Produtividade (P) e o Rendimento por grama de catalisador oferecido (R) obtidos nos diversos sistemas reacionais testados foram determinadas empregando-se as equações 3.5, 3.6 e 3.7, respectivamente, de acordo FORESTI e FERREIRA (2005).

$$\text{A.E.E (mmol ácidos graxos consumidos/h.g)} = \frac{(\text{NF}_A)^0 \times (\text{X}_{\text{ac}})_t}{t \times w} \quad (3.5)$$

$$P \text{ (mmol ácidos graxos consumidos/h)} = \frac{(NF_A)^0 \times (X_{ac})_t}{t} \quad (3.6)$$

$$R \text{ (mmol ácidos graxos consumidos/g)} = \frac{(NF_A)^0 \times (X_{ac})_t}{w_o} \quad (3.7)$$

em que: $(NF_A)^0$ = é a quantidade inicial de ácidos graxos (mmol), $(X_{ac})_t$ = é a conversão de ácidos graxos em um determinado tempo, t = tempo (horas) e w_o = massa total de biocatalisador oferecida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste projeto foi aplicar os princípios de biocatálise na síntese de monoglicerídios, visando o aproveitamento do glicerol formado como subproduto na obtenção do biodiesel, utilizando lipase como catalisador. Inicialmente, foi necessário estabelecer um método cromatográfico que permitisse quantificar os produtos formados nas reações de esterificação ou glicerólise (mono, di e triglicerídeos) por cromatografia de fase gasosa. Na sequência foram analisadas duas metodologias enzimáticas para a obtenção de monoglicerídeos: (1) esterificação do glicerol com ácidos graxos e (2) glicerólise de triglicerídeos, visando selecionar o método mais eficiente de síntese.

4.1. Estabelecimento do método de análise cromatográfica para quantificação dos glicerídeos

Para quantificação dos mono, di e triglicerídeos formados tanto nas reações de esterificação do glicerol com ácidos graxos, quanto nas glicerólises do óleo de babaçu, foram estabelecidos métodos de análise cromatográfica, utilizando um cromatógrafo à gás (Varian- Modelo CG 3800).

Nas Figuras 4.1 a 4.5 são apresentados os cromatogramas das curvas de calibração dos Métodos de análise para quantificação das concentrações (g/L) dos lauratos, ácidos graxos, mono, di e triglicerídeos formados nas reações (esterificações e glicerólises). As condições estabelecidas para os métodos são resumidas nas Tabelas 4.1 a 4.5, respectivamente.

A elaboração desse método revelou ser uma ferramenta importante no acompanhamento tanto das reações de esterificação enzimática do glicerol com ácidos graxos, como das glicerólises, permitindo o monitoramento da reação e facilitando possíveis correções operacionais.

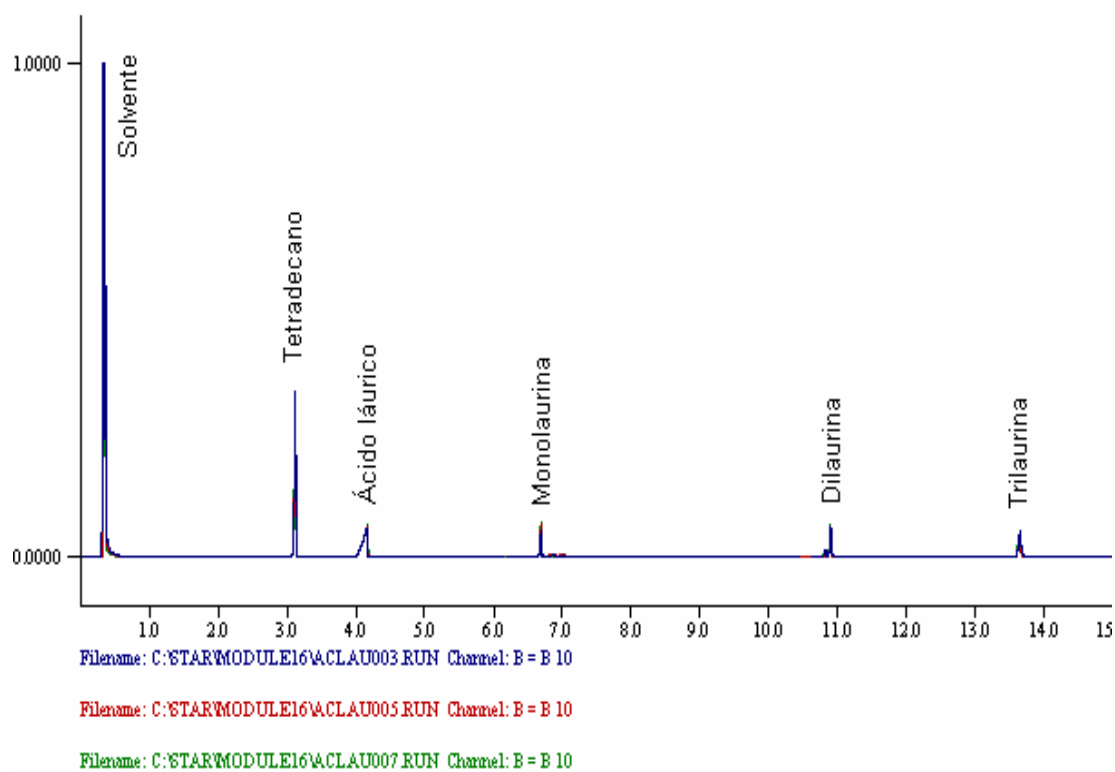


Figura 4.1. Curva de calibração dos lauratos

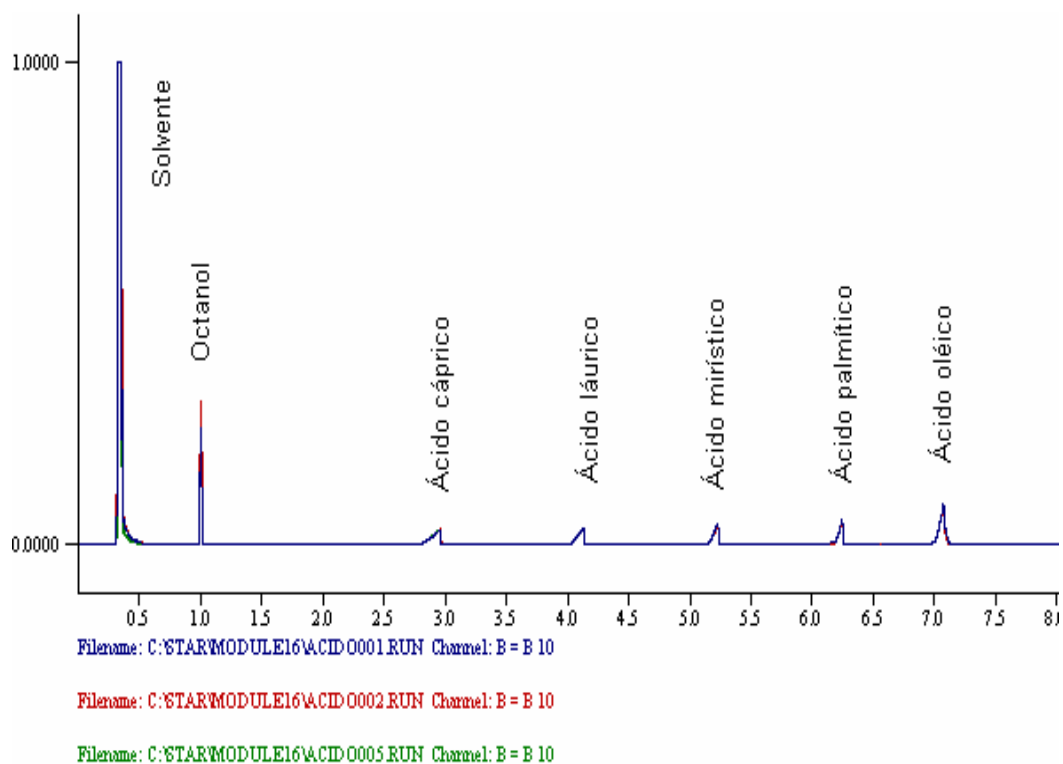


Figura 4.2. Curva de calibração dos ácidos graxos

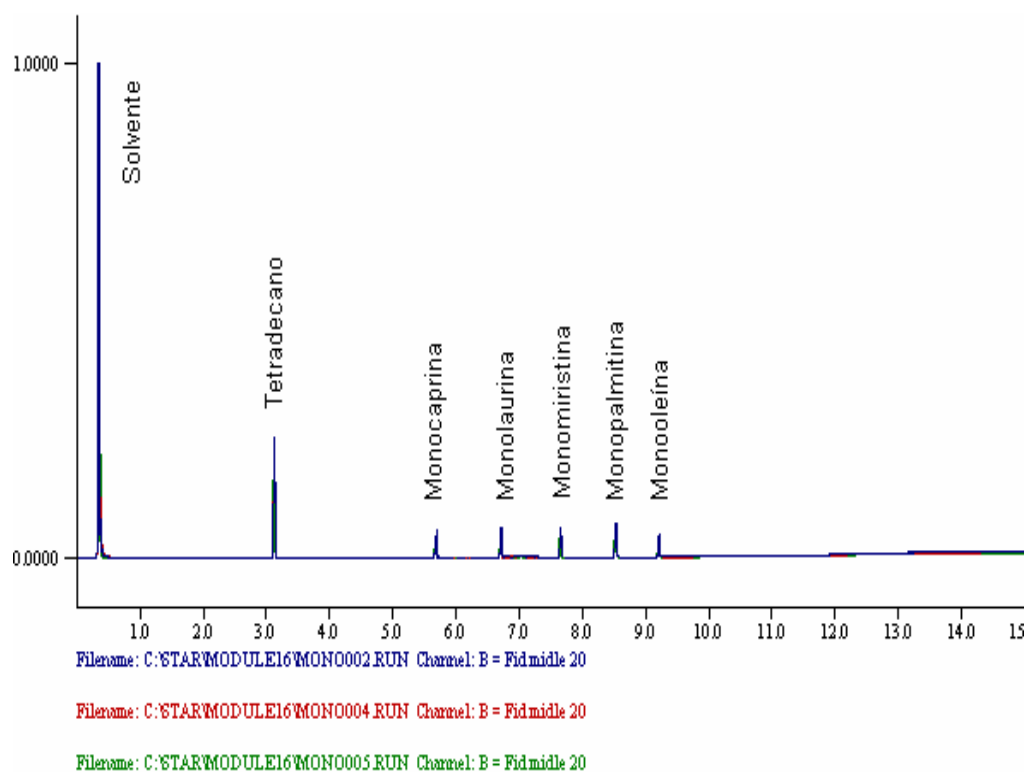


Figura 4.3. Curva de calibração dos monoglicerídeos

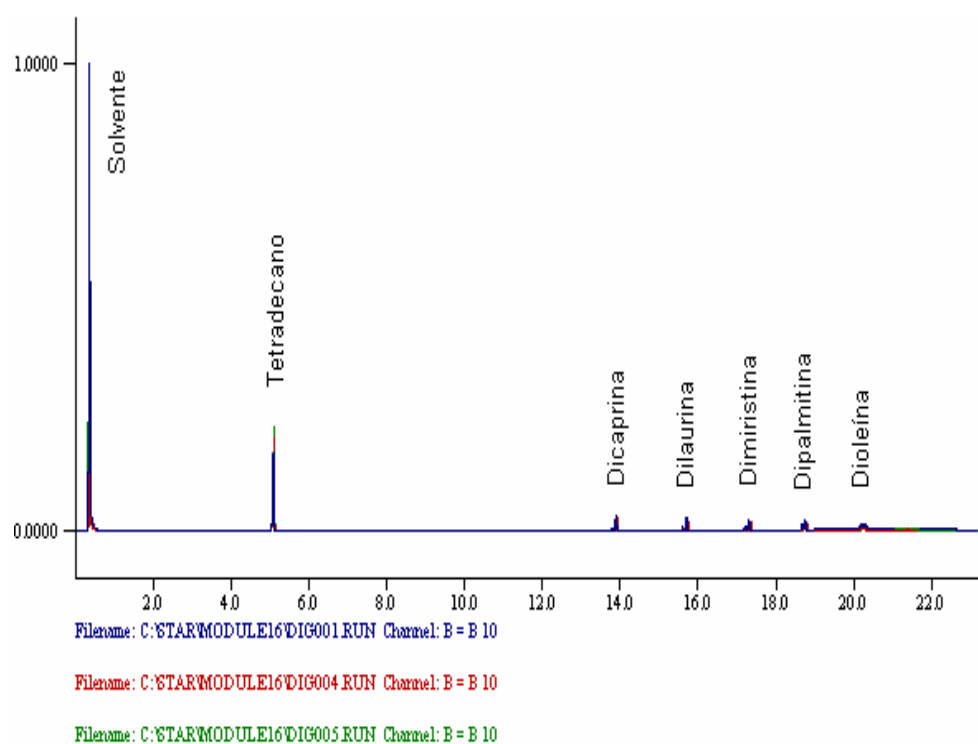


Figura 4.4. Curva de calibração dos diglicerídeos

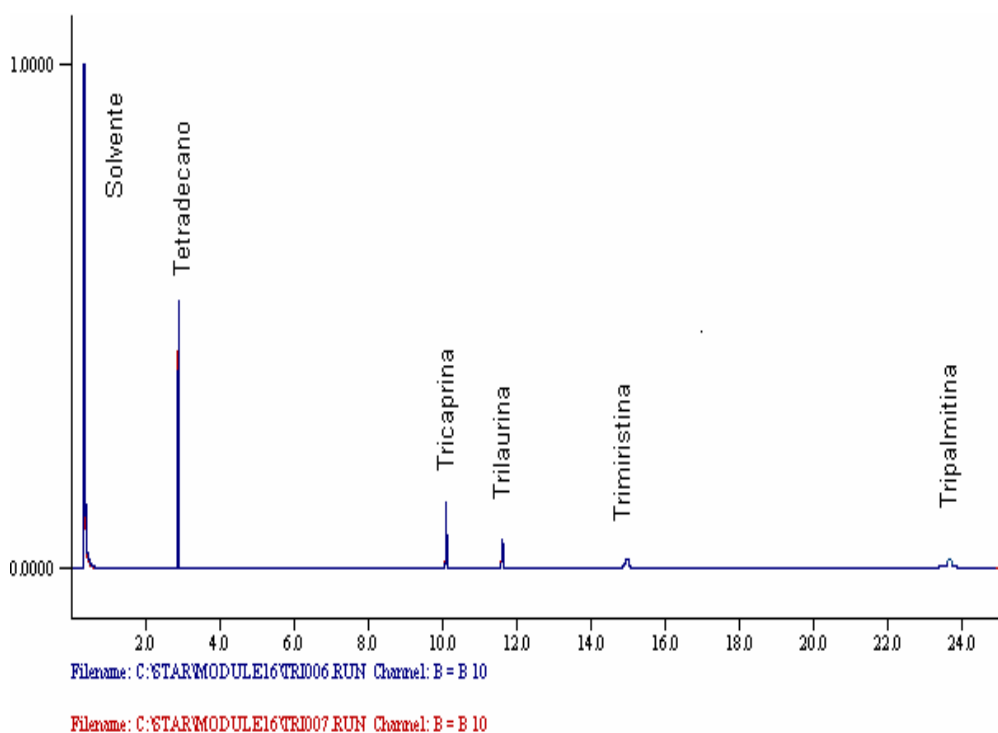


Figura 4.5. Curva de calibração dos triglicerídeos

Tabela 4.1. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos lauratos por CG

Padrão Interno (PI): Tetradecano		
Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 320°C numa taxa de 20°C/ min, mantendo-se constante por 2 min, totalizando 15 min de análise.	Ionizador 350°C	Vaporizador 350° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1		
Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
tetradecano	3,128	20,77
ácido láurico	4,175	36,46
monolaurina	6,725	21,39
dilaurina	10,944	29,66
trilaurina	13,714	24,32

Tabela 4.2. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos ácidos graxos por CG

Padrão Interno (PI): Octanol			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 240°C numa taxa de 20°C/min, mantendo-se constante por 1 min, totalizando 10 min de análise.	Ionizador 350°C	Vaporizador 350° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	octanol	1,00	24,85
2	ácido cáprico	2,818	34,31
3	ácido láurico	4,101	30,29
4	ácido mirístico	5,177	31,01
5	ácido palmítico	6,198	30,29
6	ácido oléico	7,012	97,53

Tabela 4.3. Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem dos monoglicerídeos por CG

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 320°C numa taxa de 20°C/min, mantendo-se constante por 2 min, totalizando 15 min de análise.	Ionizador 350°C	Vaporizador 350° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	tetradecano	3,134	20,77
2	monocaprina	5,734	12,45
3	monolaurina	6,754	12,03
4	monomiristina	7,659	12,70
5	monopalmitina	8,546	12,42
6	monoleína	9,223	6,13

Tabela 4.4. Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos diglicerídeos

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 3 min até 320°C numa taxa de 15°C/min, mantendo-se constante por 6 min, totalizando 25 min de análise.	Ionizador 350°C	Vaporizador 350° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	tetradecano	5,102	20,77
2	dicaprina	13,909	11,78
3	dilaurina	15,717	13,42
4	dimiristina	17,328	11,78
5	dipalmitina	18,766	13,09
6	dioléina	20,198	8,51

Tabela 4.5. Condições de operação estabelecidas no método de dosagem dos triglicerídeos

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 320°C numa taxa de 25°C/min, mantendo-se constante por 19,40 min, totalizando 30 min de análise.	Ionizador 350°C	Vaporizador 350° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	tetradecano	2,874	22,33
2	tricaprina	10,090	16,67
3	trilaurina	11,587	15,20
4	trimiristina	14,972	13,46
5	tripalmitina	23,669	14,62

4.2. Testes referentes a rota de obtenção de monoglicerídeos por esterificação do glicerol com ácidos graxos

Optou-se por efetuar os ensaios iniciais com a preparação comercial de lipase imobilizada – Lipozyme IM²⁰, por ser uma preparação bem documentada e ter um comportamento definido em diversos sistemas reacionais (PASTORE e PARK, 1993;

SELMÍ *et al.*, 1998; ARCOS *et al.*, 1998; LANGONE, 1998; DA SILVA *et al.*, 2002), permitindo uma comparação com os resultados obtidos no presente projeto. Utilizando este biocatalisador, foram estudados alguns fatores que podem interferir no rendimento de esterificação, como: razão molar dos reagentes, tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação do ácido graxo. Testes subsequentes foram efetuados para estabelecer as condições que maximizem a produção de MAG.

4.2.1. Influência da razão molar dos reagentes na esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme IM²⁰

Nesta série de experimentos, foi verificada a influência da razão molar entre o glicerol (Glic) e ácido láurico (AcLau) nas seguintes proporções: equimolar (1:1), excesso de glicerol (3:1) e excesso de ácido láurico (1:3) na síntese do laurato de glicerila catalisada pela Lipozyme, em termos de consumo do ácido láurico. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 4.6 e 4.7, tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.1.

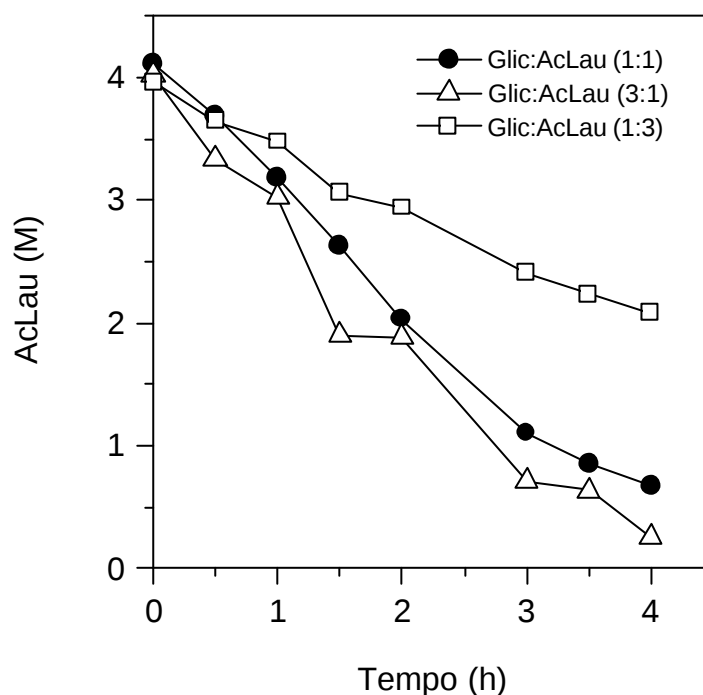


Figura 4.6 Perfil de consumo do ácido láurico na síntese de laurato de glicerila empregando Lipozyme (60°C) para meios reacionais contendo glicerol e ácido láurico em diferentes razões molares.

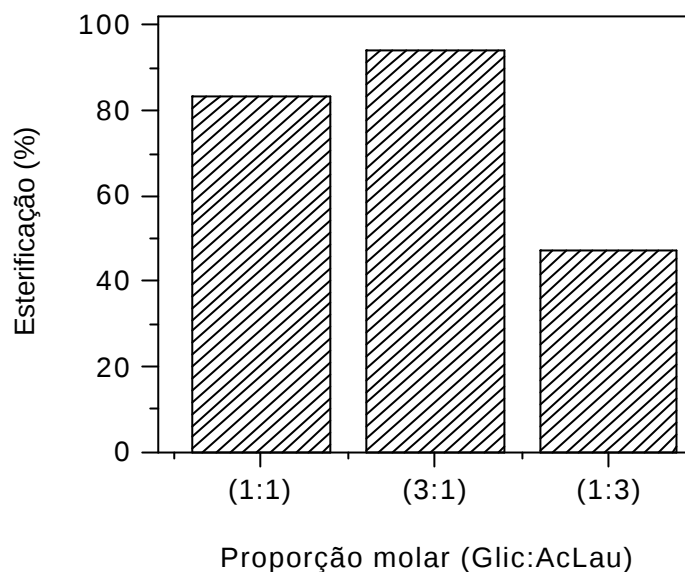


Figura 4.7. Conversão molar máxima alcançada nas reações de síntese de laurato de glicerila empregando Lipozyme (60°C) em diferentes razões molares de glicerol e ácido láurico no tempo de 4 h.

Verifica-se que o perfil de consumo de ácido láurico na formação do laurato de glicerila foi dependente da razão molar dos materiais de partida, com favorecimento da reação para meios contendo excesso de glicerol. Em substratos contendo proporção equimolar de reagentes (1Glic: 1AcLau) o consumo de ácido láurico foi de 3,43 M em 4 h de reação. Esse consumo elevou-se para 3,76 M quando o substrato era constituído com excesso de glicerol (3Glic: 1AcLau). Este fato pode ser melhor observado na Figura 4.8, em que todo o ácido láurico (94,36%) foi praticamente consumido em apenas 4 h de reação, comprovando o comportamento altamente satisfatório desse sistema imobilizado (LANGONE, 1998). Por outro lado, utilizando substratos com excesso de ácido láurico (1Glic: 3AcLau) o consumo de ácido graxo foi reduzido para valores próximos a 1,88 M. Esse comportamento é similar ao descrito na literatura para diferentes sistemas reacionais e diversas fontes de lipase (PASTORE e PARK, 1993; MONTEIRO *et al.*, 2003).

No trabalho publicado por PASTORE e PARK (1993) referente à esterificação do glicerol com ácido oleico empregando lipase de *Penicillium sp*, foi verificado que quanto menor a concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol maior foi o grau de esterificação.

Utilizando a condição reacional que favoreceu a formação do laurato de glicerila (ácido láurico/glicerol = 3) e empregando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador, foi realizado um teste para quantificação dos produtos formados na esterificação, empregando

a metodologia desenvolvida para análise cromatográfica. A Figura 4.8 mostra o perfil de formação de mono, di e trilaurina no teste realizado, cujo detalhamento encontra-se no Apêndice 8.2. Analisando-se esta figura, podemos observar que houve formação de 28% de monolaurina em apenas 4h de reação, comprovando o comportamento altamente satisfatório deste biocatalisador.

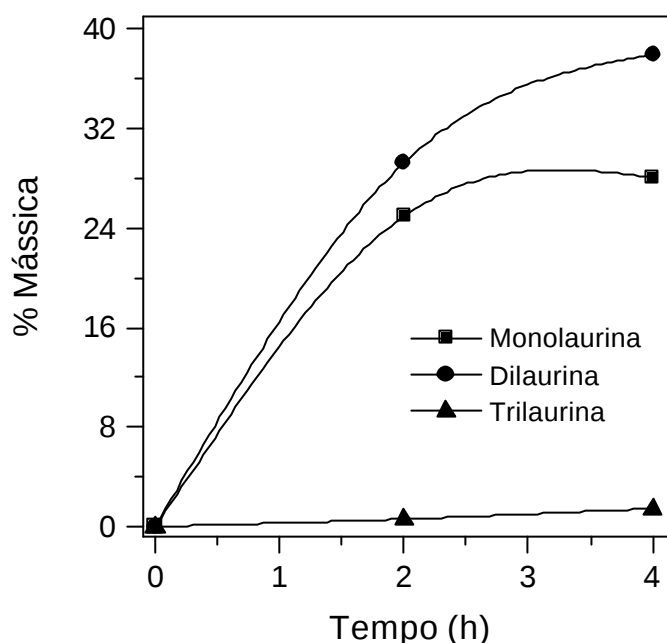


Figura 4.8. Perfil de formação de mono, di e trilaurina na reação de esterificação do glicerol e ácido láurico catalisada pela preparação de Lipozyme IM.

4.2.2. Influência do tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação do ácido graxo na síntese de ésteres glicerídeos Lipozyme IM²⁰

Visando estudar a influência da composição dos ácidos graxos em termos de tamanho da cadeia e grau de insaturação no desempenho da reação de esterificação, foram realizados testes empregando diferentes ácidos graxos tomando por base a composição do óleo de babaçu, tais como os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e oléico.

Estes experimentos foram realizados em meio reacional contendo excesso de glicerol, tendo em vista que esta foi a melhor condição determinada anteriormente para o sistema reacional (glicerol: ácido láurico e Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador) utilizado neste trabalho como padrão de comparação para as demais preparações testadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.9 (a-d), tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.3.

Na reação de esterificação do glicerol com o ácido mirístico (Figura 4.9a) o grau de esterificação máximo alcançado em termos de consumo do ácido foi de 70,68% em 5 h de reação. Em relação a esterificação do glicerol com ácido láurico (94,36% em 4h de reação) verificou-se uma redução da conversão molar do ácido graxo, provavelmente devido ao aumento da cadeia carbônica (C_{12} para C_{14}). Um comportamento similar foi observado na síntese do palmitato de glicerila (Figura 4.9b), sendo alcançada uma conversão molar do ácido palmítico de 70,95%, para o mesmo tempo de reação (5 h).

Na reação de esterificação do glicerol e o ácido esteárico (Figura 4.9c), a conversão molar obtida em 5 h de reação decresceu para 63,86%, sendo esta redução justificada novamente, pelo aumento do número de carbonos na composição desse ácido (C_{18}).

Uma explicação provável para essa influência marcante do tamanho da cadeia do ácido graxo pode estar relacionada com o fato do sítio ativo da lipase ter encontrado dificuldade em interagir com o grupo funcional dos reagentes (dificultado pelo aumento do tamanho das cadeias carbônicas), diminuindo assim o poder catalítico da enzima.

A influência do grau de insaturação do ácido graxo na síntese de ésteres glicéricos pode ser melhor observada nas Figuras 4.9c e 4.9d. Na esterificação do glicerol com ácido esteárico (ácido graxo saturado) a conversão molar máxima foi de 63,86% em 5 h de reação (Figura 4.9c), enquanto, que a conversão molar obtida na reação do glicerol com ácido oléico (ácido graxo monoinsaturado) foi de apenas 23,13% num mesmo tempo de reação (Figura 4.9d). Podendo-se então concluir que, a presença de insaturação na cadeia carbônica do ácido graxo, também restringe a catálise pela lipase.

Um comportamento similar foi relatado por SELMI *et al.*, 1998, na síntese de triglicerídeos empregando Lipozyme como catalisador em meio isento de solvente. Analisando estes resultados verifica-se que tanto o tamanho da cadeia carbônica como o grau de insaturação do ácido graxo, interferiram significativamente na conversão molar e velocidade de reação.

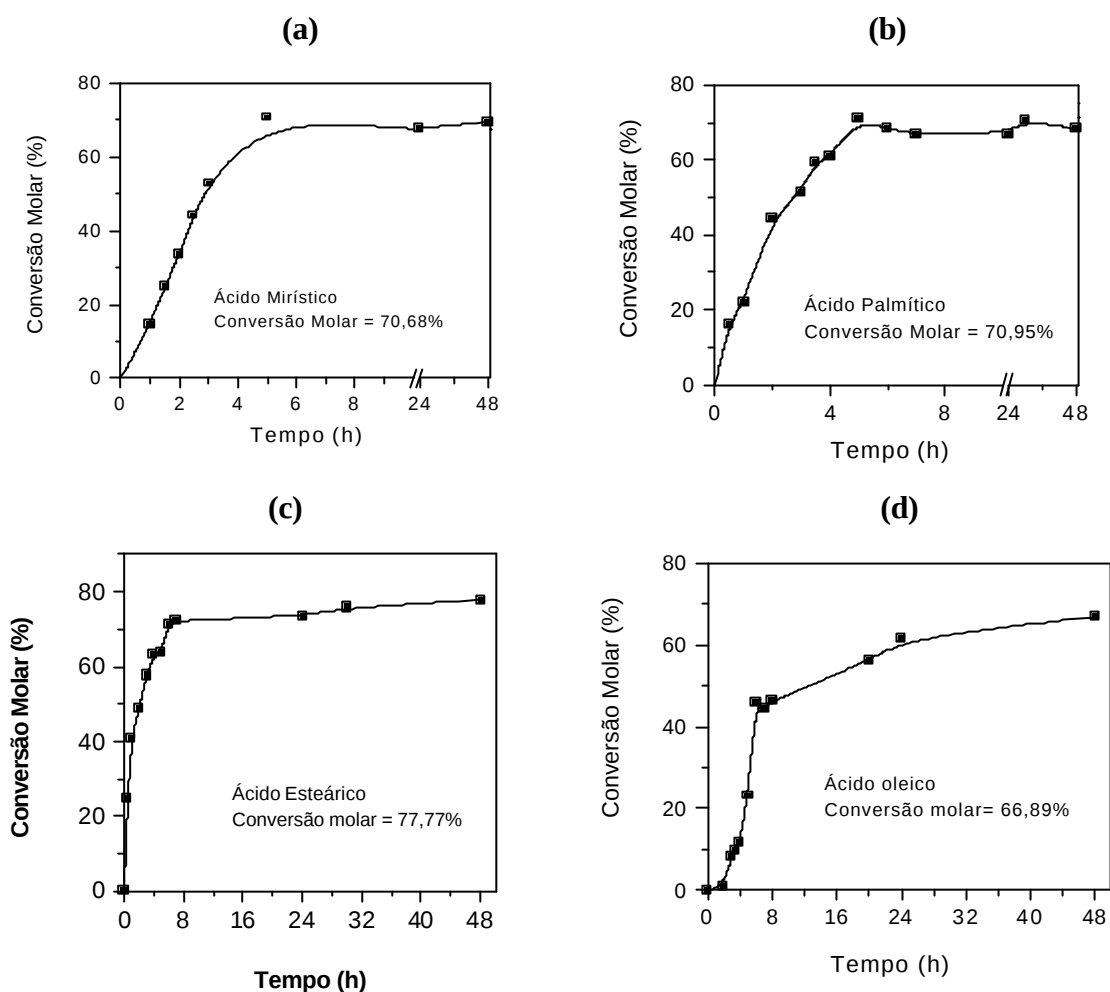


Figura 4.9. Perfil da conversão molar de diferentes ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela Lipozyme: (a) Ácido Mirístico; (b) Ácido Palmítico; (c) Ácido Esteárico; (d) Ácido Oléico (60-65°C, agitação magnética, reator fechado).

4.2.3. Esterificação do glicerol e misturas de ácidos graxos em proporções simulando a composição do óleo de babaçu utilizando Lipozyme IM²⁰

Estes experimentos foram realizados com o intuito de simular a composição em ácidos graxos do óleo de babaçu, para posterior comparação com a reação de glicerólise. Foram testados quatro sistemas reacionais, contendo uma concentração total em ácidos graxos da ordem de 0,025 mols, com diferentes proporções de ácido láurico (100- 52%), ácido mirístico (0-20%), ácido palmítico (0- 14%), e ácido oléico (0-17%), conforme descrito na Tabela 4.6. O detalhamento desses experimentos está apresentado no Apêndice 8.4.

Tabela 4.6. Composição dos sistemas reacionais simulando a composição do óleo de babaçu em porcentagem de ácidos graxos

Sistema reacional	Composição em ácidos graxos	Resultados
A	100 % ácido láurico	Figura 4.10 a
B	72% ácido láurico; 28% ácido mirístico	Figura 4.10 b
C	62 % ácido láurico; 24 % ácido mirístico 14 % ácido palmítico	Figura 4.10 c
D	52% ácido láurico, 20% ácido mirístico, 11% ácido palmítico e 17% ácido oléico.	Figura 4.10 d

O sistema reacional contendo glicerol e 100% de ácido láurico (A), possibilitou o alcance de uma conversão molar praticamente total da ordem de 95% em 4 h de reação (Figura 4.10a). Nos outros sistemas reacionais, constatou-se redução do grau de esterificação à medida que a porcentagem do ácido láurico era gradativamente reduzida de 100 para 52%.

No sistema B (Figura 4.10b) composto por 72% de ácido láurico e 28% de ácido mirístico, foi observado que a substituição parcial do ácido láurico por um ácido de cadeia carbônica maior (mirístico) reduziu a conversão molar máxima para valores de 85% e aumentou o tempo de reação para 7 h.

No sistema reacional C composto por glicerol e os ácidos láurico (62%), mirístico (24%) e palmítico (14%) (Figura 4.10c), foi obtido um perfil similar ao alcançado no sistema B. Entretanto, o consumo total dos ácidos graxos e a velocidade de reação foi ainda mais afetada negativamente pela adição do ácido palmítico no meio reacional (conversão máxima alcançada = 82,7% em 8h de reação). Esse comportamento também foi observado no sistema reacional D contendo 52% de láurico, 20% de mirístico, 11% de palmítico e 17% de ácido oléico (Figura 4.10d), sendo alcançado um grau de esterificação da ordem de 81%.

A Tabela 4.7 mostra os valores de conversão molar, atividade enzimática específica, produtividade e rendimento por grama de biocatalisador, das reações de esterificação realizadas utilizando diferentes composições em ácidos graxos.

Considerando que o ácido láurico é o ácido graxo presente em maior proporção no óleo de babaçu da ordem de 44%, estudos adicionais foram realizados adotando o sistema reacional composto de glicerol e ácido láurico visando selecionar a fonte de lipase mais adequada para sintetizar o monoglicerídeo correspondente.

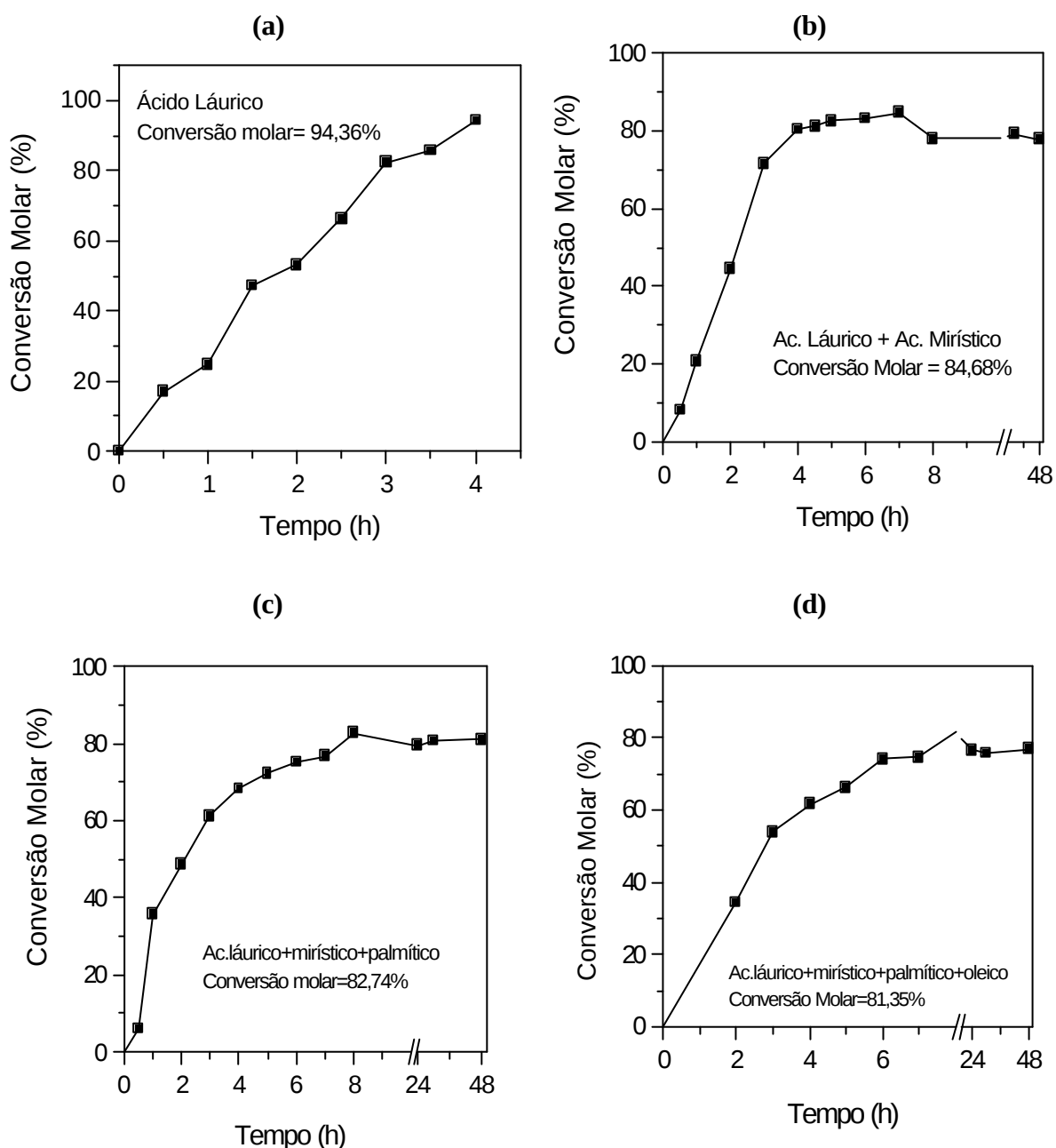


Figura 4.10. Perfil da conversão molar de diferentes ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol catalisada pela Lipozyme: (a) Ácido láurico; (b) Ácido láurico + mirístico; (c) Ácido láurico + mirístico + palmítico; (d) Ácido láurico + mirístico + palmítico + oleico (60-65°C, agitação magnética, reator fechado).

Tabela 4.7. Resumo das esterificações realizadas utilizando diferentes composições em ácidos graxos

Sistema imobilizado	Conversão Molar (%)	A.E.E ^a	P ^b	R ^c	Tempo ^d (h)
Ácido mirístico/Glicerol	69,11	13,82	6,91	69,11	5
Ácido palmítico/Glicerol (1:3)	71,07	11,85	5,92	71,07	6
Ácido esteárico/Glicerol (1:3)	77,77	1,62	0,81	77,77	48
Ácido oléico/Glicerol (1:3)	66,89	1,39	0,70	66,89	48
Sistema A	94,36	25,59	11,80	94,36	4
Sistema B	84,68	12,09	6,05	84,68	7
Sistema C	81,16	1,69	0,85	81,16	48
Sistema D	81,35	10,17	5,08	81,35	8

^a Atividade Enzimática Específica (mmol ácidos graxos consumidos/h.g), ^b Produtividade (mmol ácidos graxos consumidos/h), ^c Rendimento por massa de catalisador (mmol ácidos graxos consumidos/g), ^d Tempo no qual obteve-se a maior conversão molar

Sistema A = Composto por: 100% de ácido láurico; **Sistema B** = Composto por: 72% ácido láurico e 28% ácido mirístico; **Sistema C** = Composto por: 62% ácido láurico, 24% ácido mirístico e 14% ácido palmítico, **Sistema D** = Composto por: 52% ácido láurico, 20% ácido mirístico, 11% ácido palmítico e 17% ácido oléico.

4.2.4. Influência das diferentes fontes de lipase na esterificação do glicerol com ácido láurico

A condição experimental (excesso de glicerol) que forneceu o grau de esterificação mais elevado foi utilizada como referência para verificar o efeito da fonte de lipase na síntese do laurato de glicerila. Diferentes fontes de lipases (Calb L, Lipolase, *Candida rugosa*, Pancreática, Lipase AK “Amano” 20, Lipase PS “Amano” e Lipozyme TL 100L), foram utilizadas, todas imobilizadas em suporte híbrido POS-PVA, conforme descrito no item 3.2.3. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.11 (a-g), cujo detalhamento está apresentado no Apêndice 8.5.

Nesta série de experimentos, algumas lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, todas Novozymes) foram também empregadas nas reações de esterificação do glicerol com ácido láurico (Figura 4.12 a-c) para permitir uma comparação do desempenho dos sistemas imobilizados obtidos experimentalmente (Apêndice 8.6).

Tanto a preparação comercial da lipase imobilizada Novozym 435 (Figura 4.12a) como a preparação experimental Calb L imobilizada em POS-PVA (Fig 4.11a) forneceram uma conversão molar média de 66,5% em 4 h de reação. A continuidade da reação por um longo período (48 h) não foi um fator decisivo para aumentar a conversão molar do ácido

laúrico, sendo constatado um valor médio de 77%. Por outro lado, não foi observada reversibilidade de reação.

Ambas preparações de Lipolase e *Candida rugosa* imobilizadas em POS-PVA (Figuras 4.11b e 4.11c, respectivamente) apresentaram desempenhos insatisfatórios, sendo constatado um consumo máximo de apenas 51-52% do ácido láurico em 48 h de reação. O problema detectado pela preparação de Lipolase foi referente ao efeito da reversibilidade da reação de forma bem acentuada, ocorrendo um decaimento na conversão molar após 24 h de reação. Apesar da Lipolase ser mais utilizada na formulação de detergentes (AASLYNG *et al.*, 1991), alguns trabalhos descritos na literatura indicam sua aplicabilidade na síntese de monoésteres (biodiesel) (COSTA NETO, 2002).

A baixa conversão molar obtida pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em POS-PVA pode ser explicada pela restrição que essa lipase possui em catalisar substratos, em meio orgânico, contendo mais de 12 carbonos (URIESTE, 2004), como no sistema reacional utilizado neste trabalho, (substrato contendo 15 carbonos = 12C ácido láurico + 3C glicerol). Destaca-se, que em meio aquoso essa limitação não é observada, sendo inclusive uma das lipases recomendadas na hidrólise de triglicérides por não apresentar regioespecificidade (RONNEY e WEATHERLEY, 2001).

O derivado imobilizado de lipase pancreática em POS-PVA (Figura 4.11d), apesar de ter apresentado menor velocidade de reação em relação as preparações de Lipozyme e a Novozym 435, obteve um perfil similar, atingindo 60% de conversão molar no final das 48 h de reação. Dados encontrados na literatura referentes à essa lipase em reações de esterificação são escassos, no entanto esta preparação pode ser uma opção interessante por apresentar um custo bem inferior quando comparado às outras lipases.

A preparação de Lipase AK “Amano” 20 (Figura 4.11e) não apresentou desempenho satisfatório, fornecendo uma conversão molar de apenas 18,48% em 48 h de reação. A Figura 4.11 f mostra o bom desempenho alcançado pela preparação de lipase PS “Amano” que atingiu 53,26% de conversão molar em 30 h de reação. Embora a preparação de Lipozyme TL 100L (Figura 4.11g) tenha apresentado uma conversão molar intermediária (42,90% em 8 h de reação) e ter apresentado reversibilidade da reação, este derivado imobilizado foi o que apresentou a maior atividade enzimática específica (5,36) mmol de ácidos graxos consumidos/h.g) e a maior produtividade (2,68 mmol de ácidos graxos consumidos/ h) dos derivados obtidos experimentalmente.

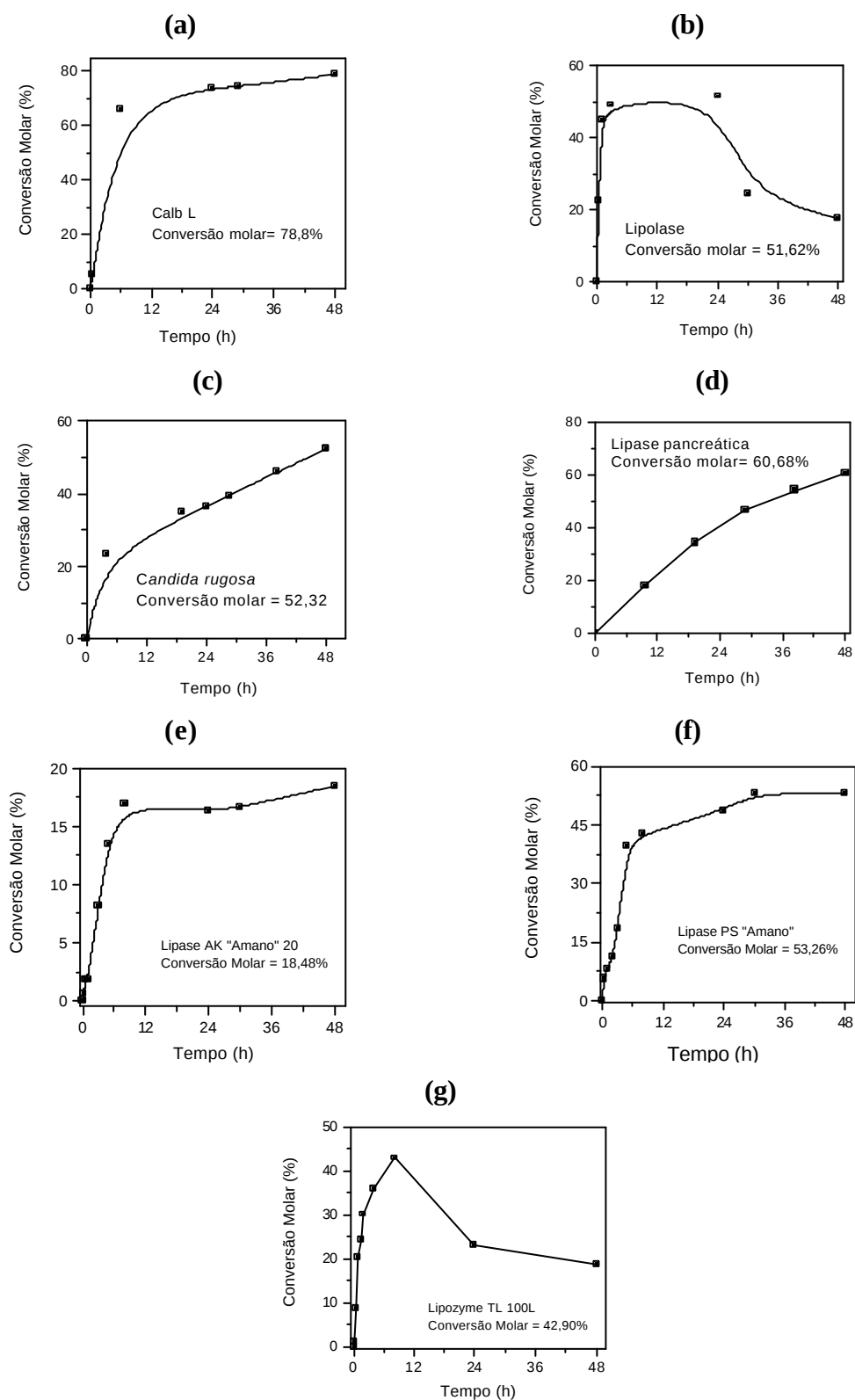


Figura 4.11. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pelas preparações de lipase imobilizadas em POS-PVA: (a) Calb L; (b) Lipolase; (c) *Candida rugosa*; (d) Pancreática, (e) Lipase AK "Amano" 20; (f) Lipase PS "Amano" e (g) Lipozyme TL 100L (40-60°C, agitação magnética, reator fechado).

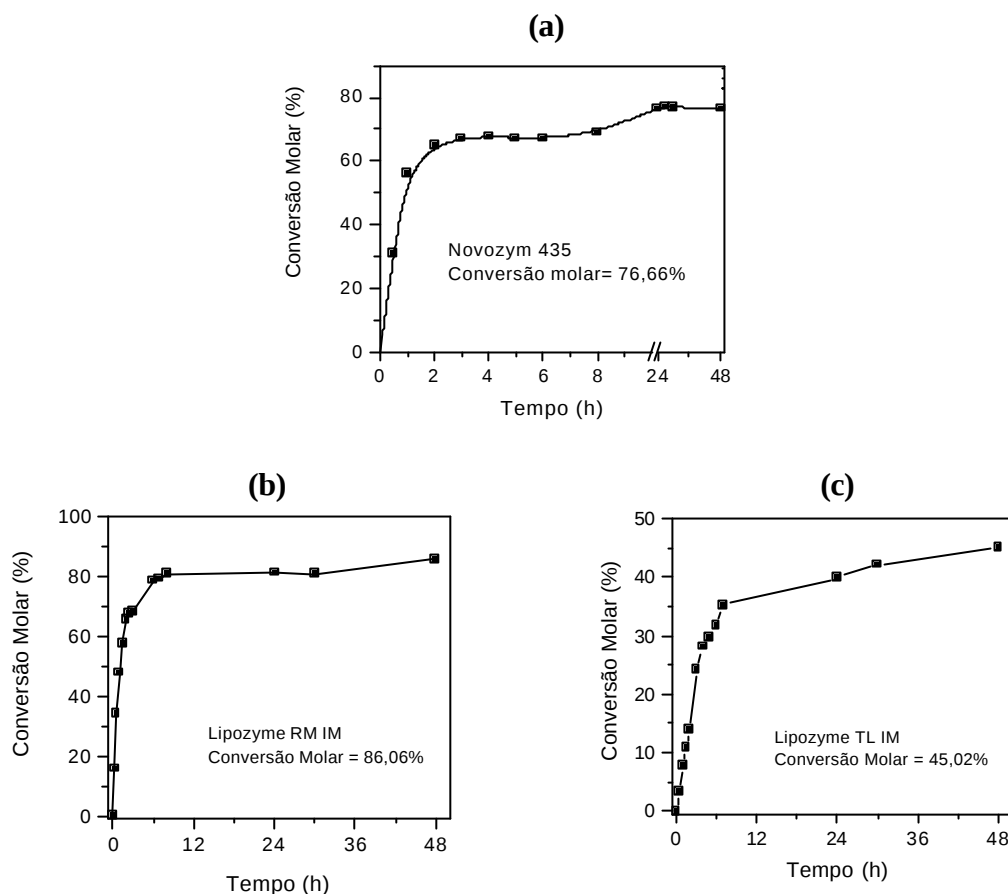


Figura 4.12. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pelas preparações de lipases imobilizadas comercialmente: (a) Novozym 435, (b) Lipozyme RM IM e (c) Lipozyme TL IM (55-60°C, agitação magnética, reator fechado).

Com relação às preparações imobilizadas disponíveis comercialmente, a Lipozyme RM IM (Figura 4.12b) atingiu uma alta conversão molar (86,06% em 48 h de reação) tendo apresentado também o maior rendimento por grama de catalisador fornecido (86,06 mmol de ácidos graxos consumidos/g), enquanto que a Lipozyme TL IM (Figura 4.12c), consumiu apenas 45,02% de ácido láurico no mesmo tempo de reação. A Tabela 4.8 mostra os valores de conversão molar, atividade enzimática específica, produtividade e rendimento por grama de biocatalisador (de acordo com FORESTI e FERREIRA, 2005), das esterificações realizadas utilizando diferentes fontes de lipases imobilizadas.

Tabela 4.8. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas

Sistema Imobilizado	Conversão Molar (%)	A.E.E ^a	P ^b	R ^c	Tempo ^d (h)
Lipozyme IM 20 *	94,36	25,59	11,80	94,36	4
Novozym 435 *	76,89	2,56	1,28	76,89	30
Lipozyme RM IM *	86,06	1,79	0,90	86,06	48
Lipozyme TL IM *	45,02	0,94	0,47	45,02	48
Calb L **	78,80	1,64	0,82	78,80	48
Lipolase **	51,62	2,15	1,07	51,62	24
<i>Candida rugosa</i> **	36,56	1,52	0,76	36,54	24
Lipase Pancreática **	60,68	1,26	0,63	60,68	48
AK “Amano” 20 **	18,48	0,39	0,19	18,48	48
PS “Amano” **	53,26	1,77	0,89	53,26	30
Lipozyme TL 100L **	42,90	5,36	2,68	42,90	8

*Sistemas imobilizados disponíveis comercialmente, **Sistemas imobilizados obtidos experimentalmente

^a Atividade Enzimática Específica (mmol ácidos graxos consumidos/h.g), ^b Produtividade (mmol ácidos graxos consumidos/h)

^c Rendimento por massa de catalisador (mmol ácidos graxos consumidos/g), ^d Tempo no qual obteve-se a maior conversão molar

4.2.5. Seleção das condições reacionais de esterificação

Com base nos resultados obtidos nas reações de esterificação, foram selecionadas as condições adequadas para a síntese de ésteres glicéricos, das quais se destacam:

- ✓ substrato: ácido láurico e glicerol;
- ✓ razão molar: glicerol/ácido láurico = 3;
- ✓ biocatalisador: Calb L (*Candida antarctica*) imobilizada em POS-PVA;
- ✓ temperatura: 60°C.

Adotando essas condições foram ainda realizados testes visando verificar se o tipo de agente de ativação do suporte poderia modificar a sua ligação com a enzima, alterando as propriedades do biocatalisador selecionado, gerando, conseqüentemente rendimentos de esterificação mais elevados.

4.2.6. Influência do agente de ativação no procedimento de imobilização

Visando estudar a influência de diferentes agentes na ativação do suporte, no procedimento de imobilização Calb L (*Candida antarctica*) em polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), foram testados metaperiodato de sódio, carbonildiimidazol, e glutaraldeído (já utilizado nos demais derivados imobilizados testados). Os resultados

encontrados são mostrados na Figura 4.13 (a-c), cujo detalhamento encontra-se no Apêndice 8.7.

A Figura 4.13a mostra o perfil apresentado pelo derivado imobilizado ativado com glutaraldeído, que forneceu 78,80% de conversão molar em 48 h de reação, 1,64 mmol ácidos graxos consumidos/g.h de atividade enzimática específica, 0,82 mmol ácidos graxos consumidos/h de produtividade e 78,80 mmol ácidos graxos consumidos/g.

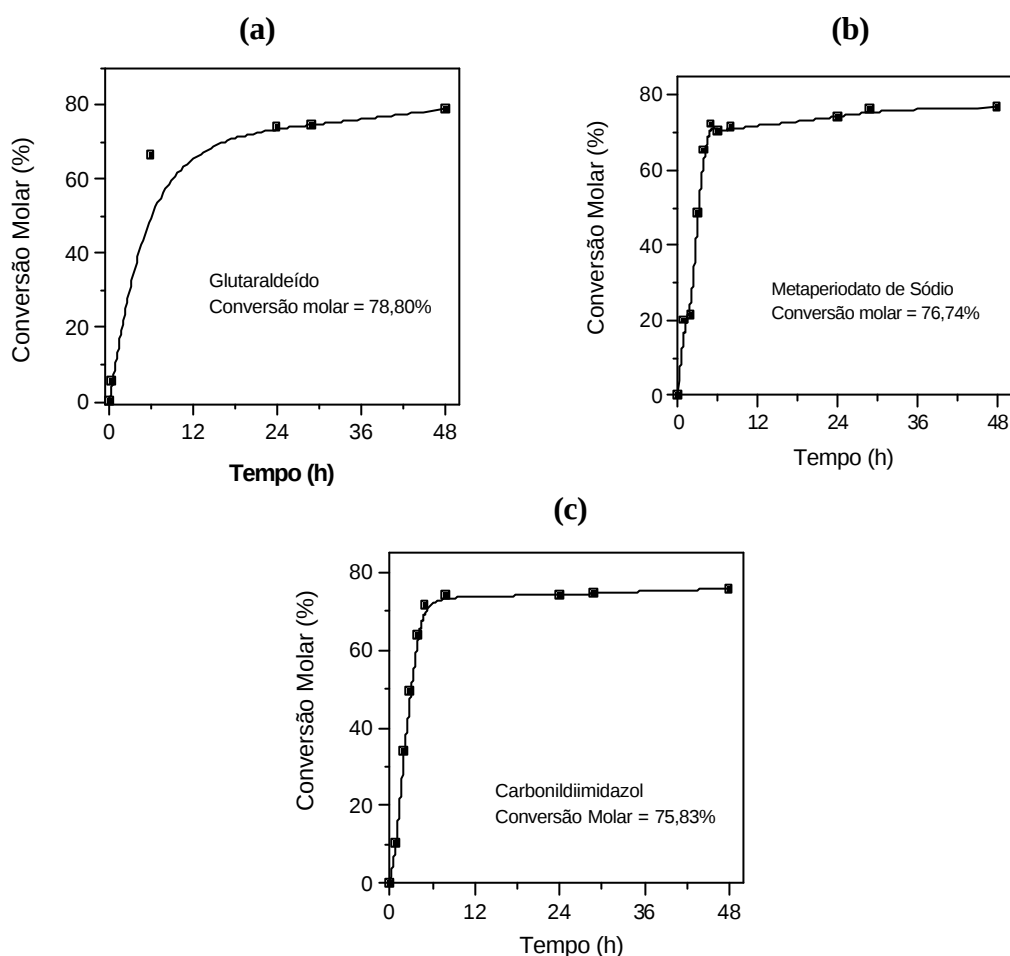


Figura 4.13. Perfil da conversão molar do ácido láurico na reação de esterificação com glicerol catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, utilizando diferentes agentes de ativação: (a) Glutaraldeído (b) Metaperiodato de sódio e (c) Carbonildiimidazol (60°C, agitação magnética, reator fechado).

O desempenho alcançado pelo derivado imobilizado ativado com metaperiodato de sódio (Figura 4.13b) foi da ordem de 76,74% de conversão molar em 48 h de reação, 1,60 mmol ácidos graxos consumidos/g.h de atividade enzimática específica, 0,80 mmol ácidos graxos consumidos/h de produtividade e 76,74 mmol ácidos graxos consumidos/g. Enquanto o sistema imobilizado ativado com carbonildiimidazol (Figura 4.13c) forneceu

75,83% de conversão molar em 48 h de reação, 1,58 mmol ácidos graxos consumidos/g.h de atividade enzimática específica, 0,79 mmol ácidos graxos consumidos/h de produtividade e 75,83 mmol ácidos graxos consumidos/g. A Tabela 4.9 mostra os valores de conversão molar, atividade enzimática específica, produtividade e rendimento por grama de biocatalisador (de acordo com FORESTI e FERREIRA, 2005), das esterificações realizadas utilizando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA ativado com diferentes agentes de ativação.

Tabela 4.9. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes agentes de ativação do suporte

Sistema Imobilizado	Conversão Molar (%)	A.E.E ^a	P ^b	R ^c	Tempo ^d (h)
Calb L ** Agente de ativação: GA	78,80	1,64	0,82	78,80	48
Calb L ** Agente de ativação: NaIO ₄	76,74	1,60	0,80	76,74	48
Calb L ** Agente de ativação: CDI	75,83	1,58	0,79	75,83	48

*Sistemas imobilizados disponíveis comercialmente, **Sistemas imobilizados obtidos experimentalmente

^a Atividade Enzimática Específica (mmol ácidos graxos consumidos/h.g), ^b Produtividade (mmol ácidos graxos consumidos/h), ^c Rendimento por massa de catalisador (mmol ácidos graxos consumidos/g), ^d Tempo no qual obteve-se a maior conversão molar.

Os resultados obtidos indicam que para o sistema reacional testado (glicerol e ácido láurico), o agente de ativação do suporte não apresentou influência significativa em termos de conversão molar, atividade enzimática específica, produtividade e rendimento por grama de catalisador fornecido.

4.2.7 Síntese de monoglicerídeos pela rota de esterificação utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA

Para quantificação dos monoglicerídeos formados pela rota de esterificação direta, foram testados dois sistemas reacionais, conforme descrito na Tabela 4.10. A Figura 4.14 (a e b) mostra o perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono, di e triglicerídeos nos testes realizados, cujo detalhamento encontra-se no Apêndice 8.8.

No sistema reacional A (Figura 4.14a) verifica-se que houve formação de 24% de monolaurina em 12h de reação, demonstrando que esse biocatalisador foi adequado para a produção desse monoglicerídeo pela esterificação direta do glicerol com ácido láurico.

Para o sistema reacional B (Figura 4.14b) apenas 20% de MAG foi obtido em 48h de reação. Esse desempenho já era esperado, tendo em vista que o aumento do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos presentes no meio reacional, diminui a velocidade da reação.

Tabela 4.10. Composição dos sistemas reacionais

Sistema reacional	Composição
A	Glicerol + ácido láurico
B	Glicerol + 52% ácido láurico, 20% ácido mirístico, 11% ácido palmítico, 17% ácido oléico (simulação do óleo de babaçu)

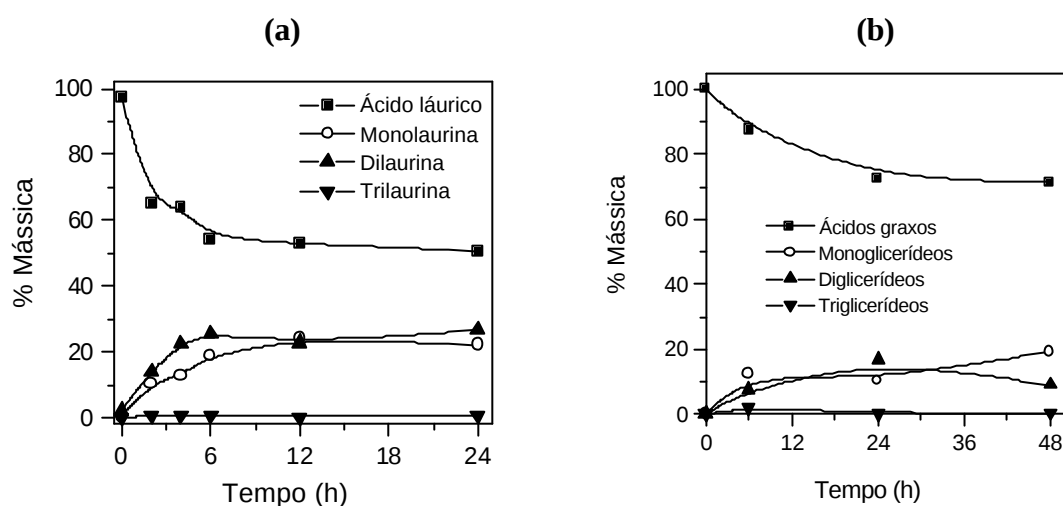


Figura 4.14. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono – di e triglicerídeos, nas reações de esterificação catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA (a) Sistem reacional A e (b) Sistema reacional B.

4.3. Testes de obtenção de monoglicerídeos pela rota de glicerólise do óleo de babaçu

Uma outra rota testada para a produção de monoglicerídeos, foi a glicerólise do óleo de babaçu, utilizando meios reacionais contendo excesso de glicerol, conforme indicado em diversos trabalhos (KAEWTONG *et al.* e 2005; TUTER *et al.*, 1999). Utilizando essa condição reacional, foi efetuada uma triagem da fonte de lipase mais adequada para a produção dos monoglicerídeos por glicerólise, a partir das seguintes preparações de lipase (Calb L - Novozymes, PS, AK e G - Amano) imobilizadas no suporte

híbrido POS-PVA. Nesta série de experimentos, as lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme IM²⁰ e Novozym 435) também foram empregadas.

O perfil de formação dos mono, di e triglicerídeos obtido pela atuação das diferentes fontes de lipases em função do tempo de reação é mostrado nas Figuras 4.15 e 4.16, tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.9. Para melhor entendimento, a distribuição em porcentagem desses compostos no meio reacional é apresentada na Figura 4.17.

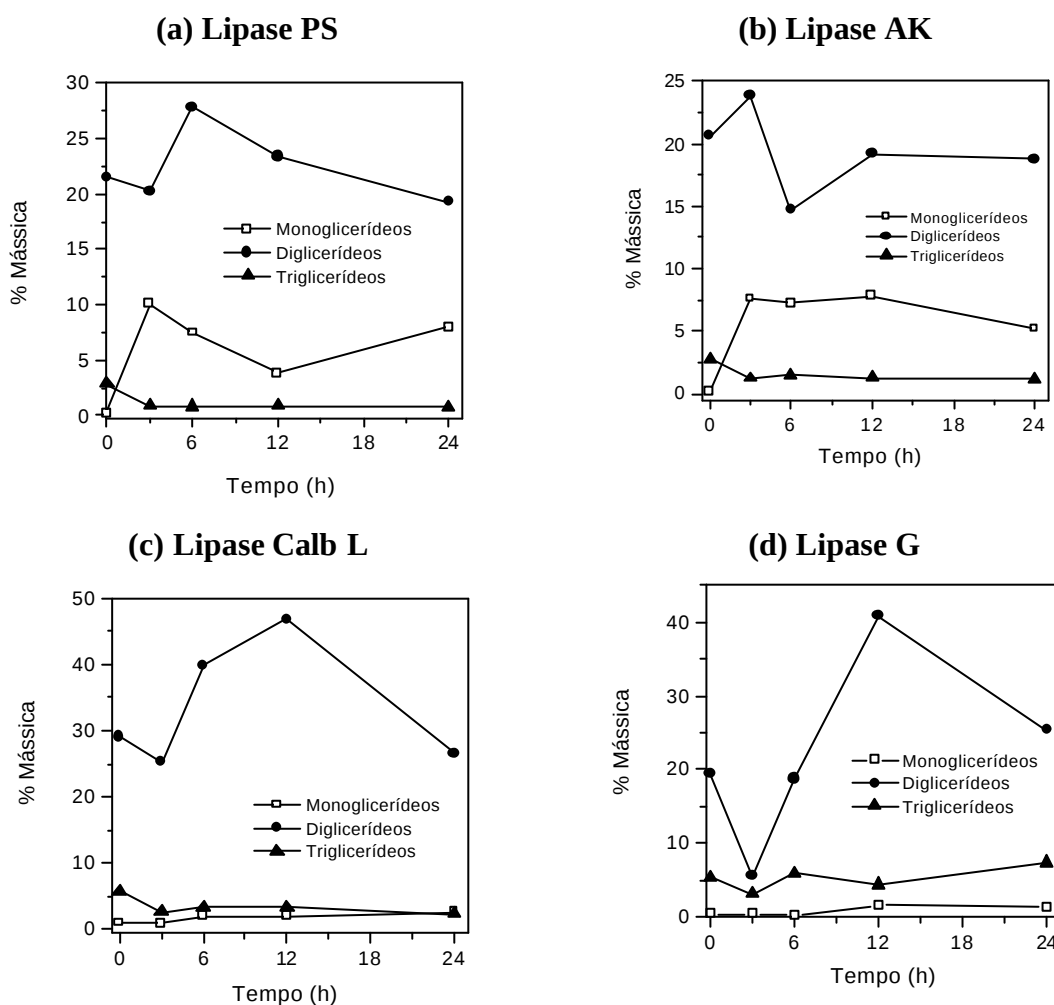


Figura 4.15. Formação dos mono, di e triglicerídeos na glicerólise do óleo de babaçu catalisada pelas preparações de lipase PS Amano (a), AK Amano (b), CALB L (c) e (d) G Amano, imobilizadas em POS-PVA. Condições adotadas: temperatura ótima de cada preparação enzimática, agitação magnética, reator fechado.

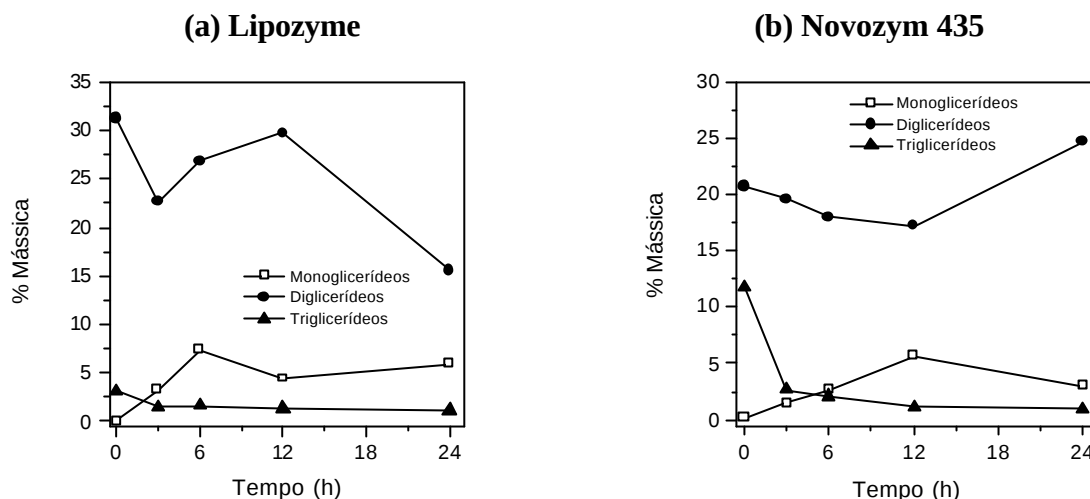


Figura 4.16. Perfil de formação dos monos, dis e triglicerídeos na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada pelas preparações de lipase imobilizada: Lipozyme IM²⁰ (a) e Novozym 435 (b) a 60°C, agitação magnética, reator fechado.

Entre as lipases imobilizadas em POS-PVA, o melhor desempenho foi alcançado pela lipase PS Amano (Figura 4.15a), revelando uma formação de 10% (m/m) de monoglicerídeos em apenas 3 h de reação. Esta mesma lipase imobilizada em Celite 435, foi também testada por KAEWTHONG *et al.* (2005), na glicerólise do óleo de palma, obtendo-se 25% de MAG em 8 h de reação.

Tanto a preparação experimental de lipase AK imobilizada em POS-PVA (Figura 4.15b) como a preparação comercial da lipase imobilizada Lipozyme IM²⁰ (Figura 4.16a) forneceram uma concentração de MAG inferior ao constatado pela lipase PS, com produção média de 7,5% de MAG em 3 e 6 h de reação, respectivamente. Este fato evidencia a elevada eficiência e adequação da lipase PS para produção de MAG por glicerólise do óleo de babaçu.

As preparações das lipases Calb L e G imobilizadas em POS-PVA (Figura 4.15c e 4.15d), não apresentaram resultados satisfatórios, produzindo cerca de 1,65% de MAG. Destaca-se, que em reações de esterificação essa limitação, não foi observada.

Na Figura 4.17, a superioridade da lipase PS Amano em relação às outras lipases testadas fica ainda mais evidente.

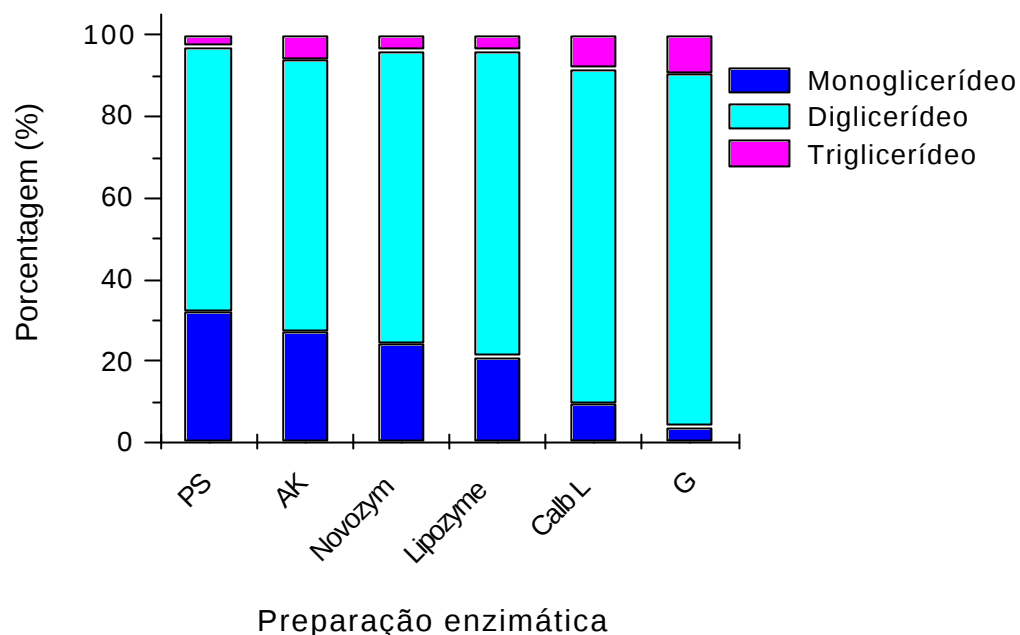


Figura 4.17. Distribuição dos produtos formados na reação de glicerólise do óleo de babaçu catalisada por diferentes lipases.

4.4. Seleção da rota enzimática para maior produção de MAG

Uma comparação do desempenho das duas rotas estudadas para obtenção de monoglicerídeos é mostrada na Figura 4.18, tomando como parâmetro os dados obtidos na esterificação do glicerol com ácido láurico catalisada pela lipase Calb L e da glicerólise do óleo de babaçu empregando a lipase PS.

Comparando as duas rotas, verifica-se que a esterificação foi mais eficiente, produzindo cerca de 24% (m/m) de MAG, enquanto que a glicerólise forneceu apenas 10% (m/m) de MAG.

Com base nesses resultados, selecionou-se a esterificação como a rota mais eficiente para a produção de MAG. As condições iniciais estabelecidas foram ainda otimizadas empregando a técnica do planejamento experimental visando determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de monoglicerídeos a partir do glicerol e ácido láurico.

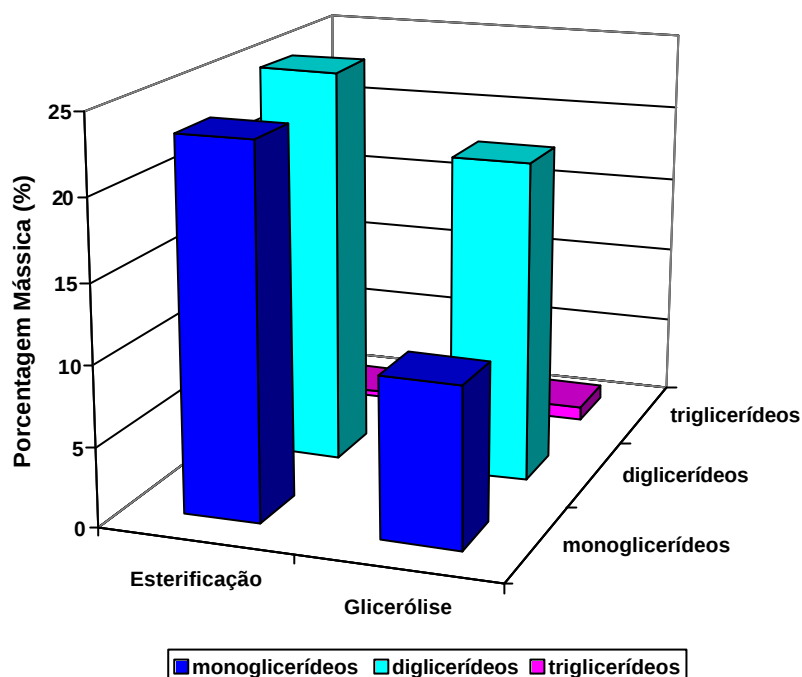


Figura 4.18. Comparação das rotas (esterificação e glicerólise) para a produção de monoglicerídeos

4.5. Planejamento de experimentos

Nesta etapa buscou-se, por meio da ferramenta de planejamento experimental, determinar os efeitos das variáveis: temperatura (x_1) e razão molar (x_2) entre glicerol e ácido láurico na formação de monolaurina. Todos os experimentos foram efetuados com 2% (m/m) de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA (biocatalisador) e os níveis selecionados foram baseados em dados descritos na literatura.

O progresso destas reações em função do tempo está ilustrado na Figura 4.19. A distribuição da mistura glicerídica formada nos ensaios experimentais (tempo reacional em que houve maior formação de MAG), é mostrada na Figura 4.20. A matriz proposta, juntamente com os resultados obtidos para a produção de MAG (%), é mostrada na Tabela 4.11, cujo detalhamento encontra-se no Apêndice 8.10.

Os resultados mostram claramente que a formação de monolaurina foi influenciada pela razão molar dos materiais de partida independente da temperatura de incubação utilizada. As concentrações variaram entre 15 e 30% e os resultados mais elevados foram obtidos para razão molar no nível máximo (ensaios 3 e 4).

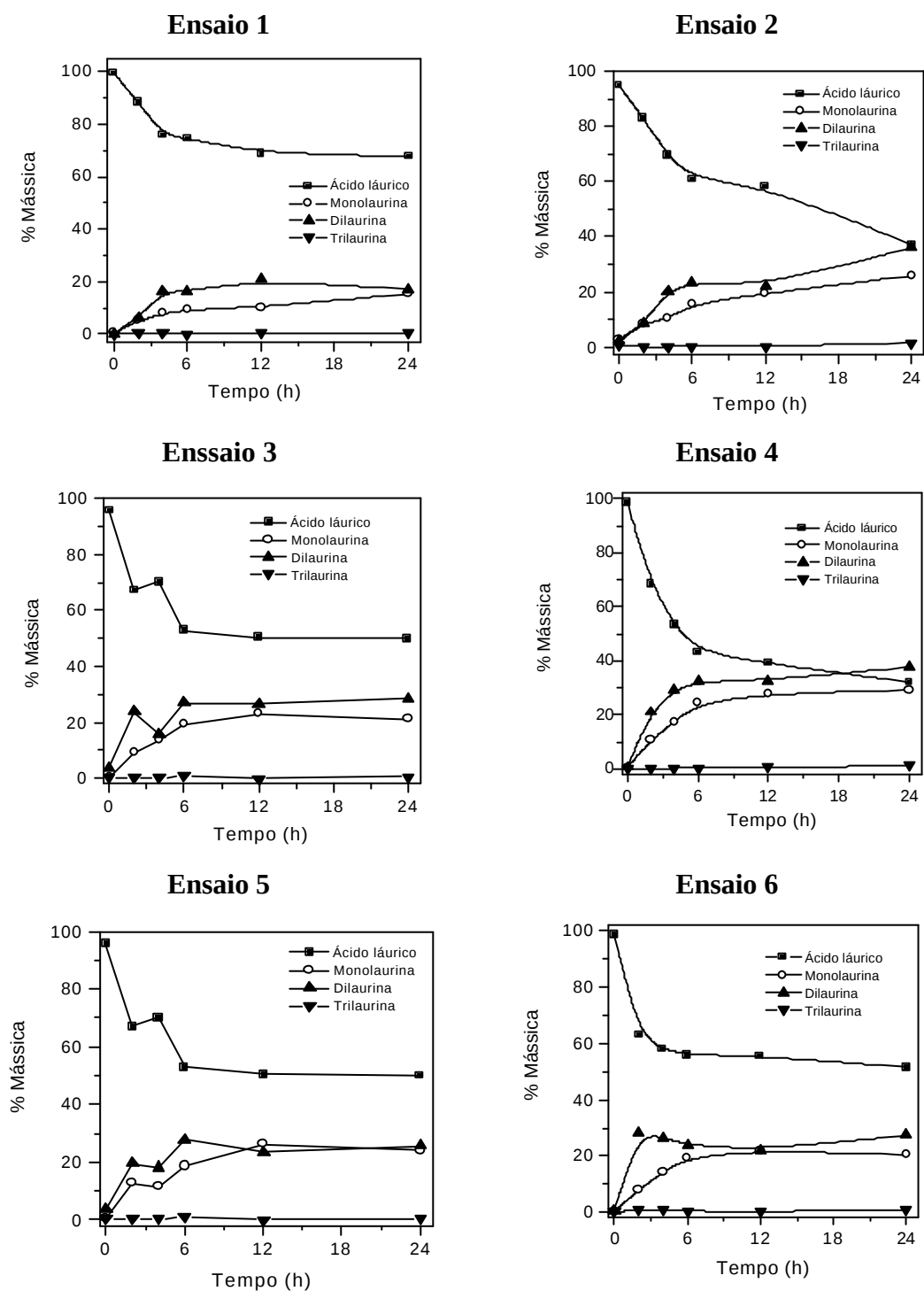


Figura 4.19. Perfil do consumo do ácido graxo e formação de mono, di e triglicerídeos, nas reações de esterificação catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais.

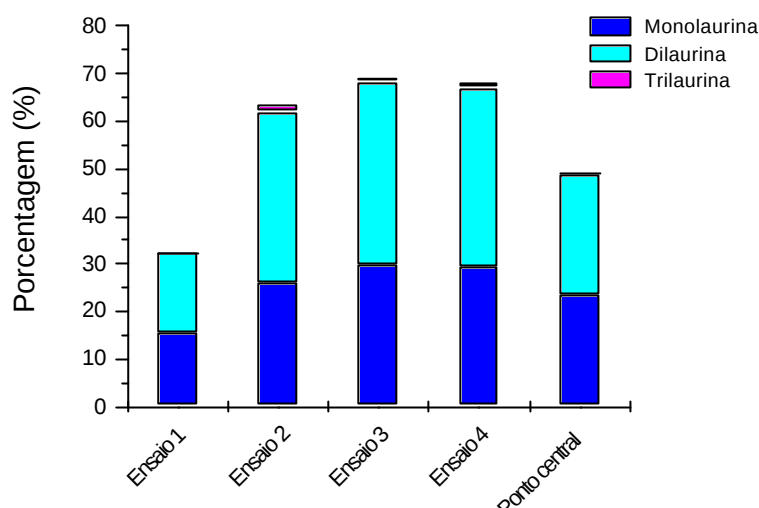


Figura 20. Distribuição dos produtos formados nas reações de esterificação do glicerol com ácido láurico catalisada pela lipase Calb L imobilizada em POS-PVA nas diferentes condições ensaiadas no planejamento de experimentos.

Tabela 4.11. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 e resultados obtidos

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Variável resposta
	x_1	x_2	T (°C)	Razão molar	Produção de MAG (%)
1	–	–	45	1:1	15,31
2	+	–	65	1:1	25,80
3	–	+	45	5:1	29,66
4	+	+	65	5:1	29,19
5	0	0	55	3:1	23,00
6	0	0	55	3:1	22,01

x_1 = temperatura

x_2 = razão molar glicerol/ ácido láurico

Com o auxílio do programa STATÍSTICA 5.0, os efeitos individuais e de interação dos fatores (temperatura e razão molar), foram analisados estatisticamente, considerando como variável resposta a produção de MAG, especificamente monolaurina. A Tabela 4.12 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's. Dentro da região analisada, verifica-se que apenas a razão molar (x_2) apresentou influência significativa ao nível de 90% de confiança. Entretanto, por meio de uma análise minuciosa pode-se observar que tanto o efeito da variável (x_1) como o da interação temperatura e razão molar ($x_1 x_2$) apresentaram valores similares (2,50 e 2,74) e significativos ao nível de 85% de confiança, permitindo assim a manutenção desses efeitos na determinação do modelo estatístico que representa o processo na região experimental estudada.

Tabela 4.12. Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student para a produção de monolaurina de acordo com o planejamento fatorial 2^2 .

Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de t	p
Média	24,16	$\pm 0,85$	28,34	0,001*
Temperatura (x_1)	2,50	$\pm 1,04$	2,40	0,138
Razão molar (x_2)	4,44	$\pm 1,04$	4,24	0,051*
Interação $x_1.x_2$	-2,74	$\pm 1,04$	-2,62	0,119

* $p < 0,10$; $R^2 = 0,93879$

Para este propósito procedeu-se a análise de variância cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.13. Os valores obtidos indicam que todos os fatores apresentaram influência na variável resposta (formação de monolaurina), confirmando desta forma a análise anteriormente efetuada ao nível de 85% de confiança.

Tabela 4.13. Análise de Variância para a formação de monolaurina de acordo com planejamento fatorial 2^2 .

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
x_1	25,100	1	25,100	5,754	0,138
x_2	78,677	1	78,677	18,037	0,051*
Interação $x_1.x_2$	30,030	1	30,030	6,885	0,119
Erro	8,724	2	4,362		

Erro total=142,531

* $p < 0,10$; $R^2 = 0,93879$

Os efeitos principais para a concentração de monolaurina foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo linear e a melhor função ajustada pode ser demonstrada pela equação 4.1.

$$y = 24,16 + 2,51 x_1 + 4,43x_2 - 2,74 x_1x_2 \quad (4.1)$$

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

A validade do modelo proposto verificada por meio da análise de variância (Tabela 4.14) constatou que a regressão obtida foi estatisticamente significativa ($p < 0,10$),

apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9387, justificando 93,87% a variação total da resposta. Na região experimental testada o modelo é linear.

Tabela 4.14. Análise de Variância para o ajuste do modelo proposto que representa a produção de monolaurina a partir da esterificação do glicerol com ácido láurico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	133,807	3	44,603	10,23	0,09
Resíduo	8,724	2	4,362		
Erro total	142,531	5			

$$R^2 = 0,93879$$

Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta (Figura 4.21) indicam que a concentração máxima de monolaurina (29,7%) pode ser obtida numa temperatura de 45°C e razão molar do glicerol/ ácido láurico em 5:1 (ensaio 3).

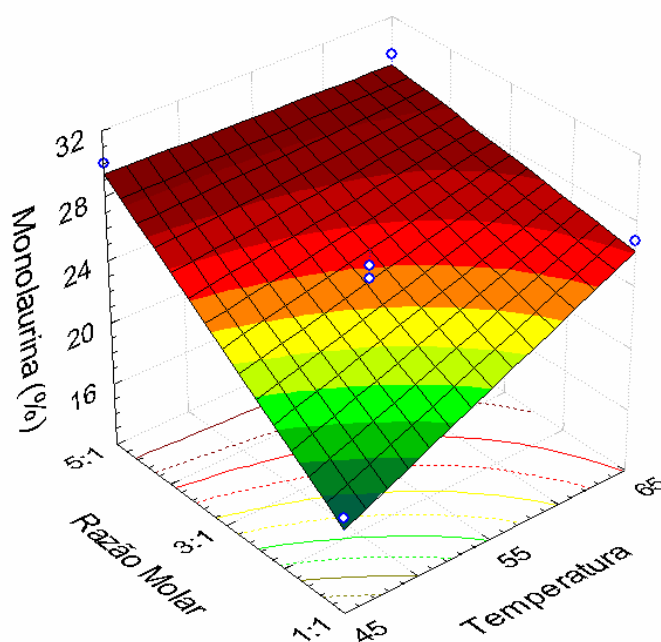


Figura 4.21. Superfície de resposta para a produção de MAG na esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA, descrita pela equação 4.1.

Considerando que o ensaio 4 apresentou concentração de monolaurina similar ao ensaio 3 (29,2%) sob os seguintes níveis: 65°C de temperatura e 5:1 de razão molar

glicerol/ ácido láurico, conclui-se que este delineamento fatorial atingiu a região de otimização. Contudo esses resultados sugerem que esse planejamento fatorial constituiu apenas em uma etapa no processo de otimização da formação de monolaurina, sendo ainda necessário estudos adicionais para determinar os níveis ótimos da temperatura de incubação e razão molar dos materiais de partida.

Experimentos adicionais foram ainda efetuados para confirmação do modelo proposto, testando além da lipase selecionada (Calb L) a lipase de *Penicillium camembertii* (lipase G, comercializada pela Amano), descrita na literatura como adequada para a produção de monoglicerídeos (WATANABE *et al.*, 2005 e WATANABE *et al.*, 2004).

As Figuras 4.22 e 4.23 mostram o perfil do consumo do ácido láurico e formação de monolaurina, dilaurina e trilaurina obtidos na reação de esterificação do glicerol e ácido láurico catalisadas por essas duas preparações de lipase (Apêndice 8.11).

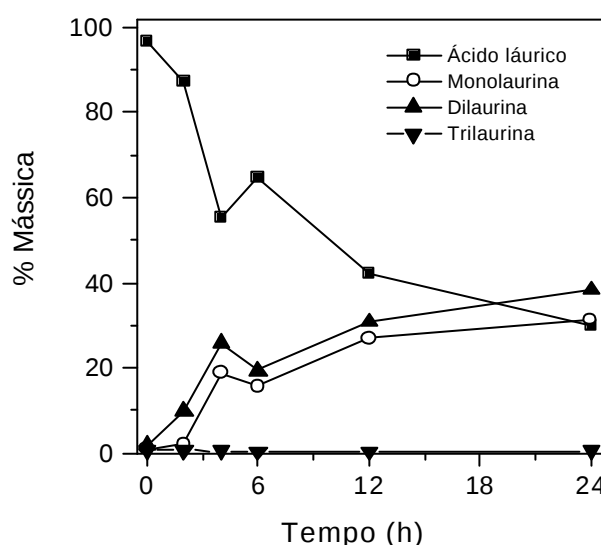


Figura 4.22. Perfil de formação de monolaurina, dilaurina e trilaurina na reação de esterificação do glicerol com ácido láurico (5:1) catalisada pela preparação de lipase Calb L imobilizada em POS-PVA biocatalisador a 45°C.

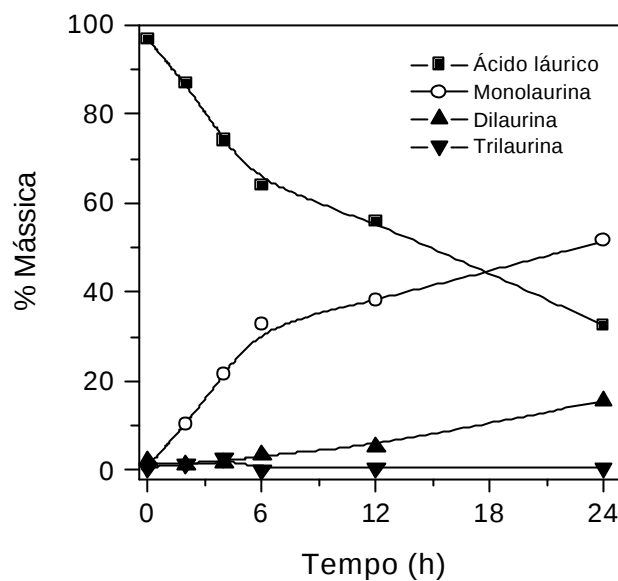


Figura 4.23. Perfil de formação de monolaurina, dilaurina e trilaurina na reação de esterificação do glicerol com ácido láurico (5:1) catalisada pela preparação de lipase G imobilizada em POS-PVA a 45°C.

Com relação a lipase Calb L o modelo matemático foi confirmado sendo obtido 31,35% de monolaurina. O comportamento da lipase G imobilizada em POS-PVA foi também altamente eficiente para obtenção de monolaurina, alcançando valores mais competitivos (51%), podendo, portanto, ser uma alternativa interessante para desenvolvimento de futuros trabalhos.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar a metodologia enzimática mais eficiente (esterificação ou glicerólise) para a produção de monoglicerídeos (produtos considerados naturais), empregando preparações de lipases imobilizadas em matriz híbrida de polissiloxano álcool polivinílico (POS-PVA). Os resultados obtidos foram satisfatórios, e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

1. Na esterificação do glicerol com ácidos graxos, verificou-se que meios reacionais contendo excesso de glicerol favoreceram o grau de esterificação, sendo selecionada a razão molar de 1:3 (ácido graxo: glicerol), para os demais testes. O tamanho da cadeia carbônica e o grau de insaturação do ácido graxo interferiram acentuadamente tanto na conversão molar quanto na velocidade de reação de esterificação. Dentre todas as preparações de lipases imobilizadas no suporte híbrido (POS-PVA), a lipase Calb L foi a que forneceu conversões molares mais elevadas apresentando ainda desempenho similar ao obtido para esta mesma preparação de lipase disponível comercialmente na forma imobilizada (Novozym 435). Esses resultados sugerem que o suporte utilizado para imobilização das diversas lipases foi bastante adequado para síntese de ésteres glicéricos. A ativação do suporte com glutaraldeído foi também uma técnica adequada para imobilização das lipases, não sendo observadas mudanças de desempenho da lipase Calb quando imobilizada em POS-PVA previamente ativado com diferentes compostos químicos, como metaperiodato de sódio ou carbodiimidazol.
2. Na rota de glicerólise do óleo de babaçu, a lipase Calb L não foi eficiente para produção de monoglicerídeos e entre todas as preparações enzimáticas testadas, a lipase PS da Amano foi a que forneceu o rendimento mais elevado desse produto (10% m/m).
3. Entre as duas rotas testadas para a obtenção de monoglicerídeos, a esterificação mostrou-se mais eficiente; produzindo cerca de 24% (m/m) de MAG.

4. A otimização das condições de produção de MAG mediada pela lipase Calb L imobilizada em POS-PVA foi efetuada por meio de uma matriz de planejamento fatorial, avaliando simultaneamente a influência da temperatura do sistema reacional e a razão molar entre os reagentes na variável resposta considerada (concentração de monolaurina). De acordo com a análise estatística, a formação de monolaurina foi fortemente influenciada pela variável (x_2) razão molar entre glicerol e ácido láurico. O modelo matemático proposto $y = 24,16 + 2,51 x_1 + 4,43x_2 - 2,74 x_1x_2$ permitiu prever as condições necessárias que favorecem o alcance de elevadas concentrações de monolaurina, sendo a reação maximizada (31,35%) para meios reacionais constituídos de glicerol e ácido láurico numa razão molar de 5:1 e temperatura de incubação na faixa de temperatura entre 45 a 65°C.
5. As condições estabelecidas foram também adequadas para obtenção de monolaurina empregando outras fontes de lipase, como a lipase de *Penicillium camembertii*, alcançando valores mais competitivos (51%), podendo, portanto, ser uma alternativa interessante para desenvolvimento de futuros trabalhos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos nos levam a uma posição bem definida e de franco otimismo consoante ao prosseguimento das investigações tanto no que concerne à técnica de otimização por planejamento experimental da formação de monoglicerídeos por esterificação direta, como também aos aspectos da aplicação de sistemas imobilizados em meios orgânicos. Para dar continuidade e complementar os estudos de obtenção de monoglicerídeos pelas rotas de esterificação direta ou glicerólise, sugere-se:

- 1) Realizar experimentos adicionais na região pré-otimizada empregando a lipase G, para estabelecer o ponto ótimo das variáveis que afetam a obtenção de monoglicerídeos por esterificação direta. Após o estabelecimento dessas condições é de interesse completar o estudo integral das etapas desse processo enzimático, incluindo a síntese de monoglicerídeos em batelada alimentada, com adição seqüencial do glicerol, reduzindo a inibição da atuação da enzima pelo álcool.
- 2) Testar a preparação de lipase selecionada (PS) para complementar os estudos de obtenção de monoglicerídeos pela rota de glicerólise, aplicando estratégias que podem aumentar a concentração do produto almejado, por exemplo, testar a condução das reações em atmosfera inerte e remover o produto formado para reduzir seu efeito inibitório na atuação da enzima.

7. REFERÊNCIAS

- AASLYNG, D.; GORMSEN, E.; MALMOS, H. (1991). Mechanistic studies of proteases and lipases for the detergent industry, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 50, n.3 p.321-330.
- ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, (2005), site: www.aboissa.com.br, acessado em 12/10/2005.
- AKGOL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. (2001). Hidrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres, *Food Chemistry*, v.74, n.3, p. 281-288.
- AKOH, C. C.; COOPER, C.; NWOSU, C. V. (1992). Lipase G catalyzed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.69, n.3, p. 257-260.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. (1997). Characterization of the equilibrium behavior of lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100 L (from *Humicola*) onto Accurel EP100, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.3, n. 1-4, p. 177-188.
- AMANO ENZYME Inc, (2006), site: www.amano-enzyme.co.jp, acessado em 12/06/2006.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (1990). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 4ed. Champaign.
- ARAKAKI, L. N. H, AIROLDI, C. (1999). The considerable role of silylant agente in polymer surface modification, *Química Nova*, v.22, n.2, p.246-253.
- ARCOS, J. A.; OTERO, C. (1996). Enzyme, medium and reaction engineering to design a low-cost selective production method for mono and dioleyglycerols, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, n.6, p. 673-682.
- ARCOS, J. A.; OTERO, C.; HILL, C. G. Jr. (1998). Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system, *Biotechnology Letters*, v.20, n.6, p.617-621.
- BAILLARGEON, M. W.; SONNET, P. E. (1991). Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL y-553 lipase, *Biotechnology Letters*, v.13, n.12, p.871-874.
- BANAT, I. M. (2000). Biosurfactants, more in demand than ever, *Biofutur*, v. 198, n.44-47, p. 44-47.
- BASRI, M.; YUNUS, W. M. Z. W.; YOONG, W. S.; AMPON, K.; RAZAK, C. N. A.; SALLEH, A. B. (1996). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, n.2, p. 169-173.

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

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

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

BOGNOLO, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspect*, v.152, n.1-2, p.41-52.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. (2004). Biocatalysis Fundamentals and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, cap.1 e 2.

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

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

BORNSCHEUER, U. T.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; YAMANE, T.; KOLISIS, F. N. (1994). A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides, *Biotechnology Letters*, v.16, n.7, p.697-702.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase, *Nature*, v. 343, n.6260, p. 767-770.

BRAGA, L. P. (2005) Estabilização da lipase de *Candida rugosa* em suportes híbridos de polisiloxano e álcool polivinílico obtidos pela técnica sol-gel. Relatório de Atividades de Iniciação Científica. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (Projeto FAPESP 04/06087-1).

BROCKMAN, H.L. (1984). General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Borgstrom, B.; Brockman, H.L. (Eds.). *Lipases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1-46.

BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J.L.; MELO, E. H. M.; CASTRO, H. F. (2004). Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehe* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p.189-200.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, n.5, p.520-529.

CARNEIRO DA CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. (2002). Covalent immobilisation of lipase on different supports, *Latin American Applied Research*, v.32, n.1, p.69-72.

CARNEIRO DA CUNHA, M. G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. (1999). Lipase immobilisation on to polymeric membranes, *Biotechnology Techniques*, v.13, n.6, p. 403-409.

CARREA, G.; RIVA, S. (2000). Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents, *Angewandte Chemie-International Edition*, v.39, n.13, p.2226-2254.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. (1995). Fine chemicals by biotransformation using lipases, *Química Nova*, v.18, n.6, p. 544-554.

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

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

COLLINSON, M. M. (1998). Analytical applications of organically modified silicates, *Mikrochimica Acta*, v. 129, n.3-4, p.149-165.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*, *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.1, p.173-176.

COPENAT- Companhia de Pesquisa e Aproveitamento de Recursos Naturais & Instituto Estadual do Babaçu-INEB. (1981). Mapeamento das ocorrências e prospecção potencial atual do babaçu no Maranhão. São Luís: INEB.

COSTA NETO, P. R. (2002). Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. (Tese de Doutorado). Departamento de Química; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas-UFSC.

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

da SILVA, M. A. M.; MEDEIROS, V. C.; FREIRE, D. M. G.; LANGONE, M. A. P. (2002) Síntese de monocaprina catalisada por lipase em meio sem solvente. In: XIV COBEQ 2002- Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal (CD ROM, 6 pp).

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros, *Química nova*, v.27, n. 4, p.623-630.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, n.1, p.47-8.

EGLOFF, M. P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. (1995). Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In: Malcata, F.X. (Ed.). *Engineering off/ with lipases*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

FABER, K. (1997). *Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook*, 3rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, Cap. 1, 2 e 3.

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

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 75, n. 7, p. 569-576.

FLASZ, A.; ROCHA, C. A.; MOSQUERA, B. (1998). A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925, *Medical Science Research*, v.26, n.3, p. 181-185.

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

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

FONTANA, J. D.; BECK, R.; BARON, M.; ALMEIDA, E.R.A.; NOGOGKEKE, E. (1993). Neolipid enzymatic synthesis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39-40, p. 249-263.

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

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

GANDHI, N. N. (1997). Applications of lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society* v. 74, n.6, p.621.

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

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

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

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

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

HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. (1999). Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: a systematic study, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n.3-4, p. 181-190.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. (1999). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis*, *Enzyme Microbial and Technology*, v. 25, n. 1-2, p. 80-87.

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

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

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

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

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. (2000). Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid, *Biotechnology Letters*, v. 22, n.2, p.165-168.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. (1999). Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases, *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315-351.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. (1994). Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Review*, v.15, n.1, p. 29-63.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, v. 16, n.9, p. 396-403.

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

JENSEN, R.G. (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources, *Lipids*, v. 18, n.9, p. 650-657.

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

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

KÄPPELI, O.; FINNERTY, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*, *Journal of Bacteriology*, v. 140, n.2, p. 707-712.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. (1998). *Biotransformation with lipases*, In: A Multi-Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J. W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, p. 37-192.

KLIBANOV, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature Insight*, v. 409, n. 6817, p.241-246.

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

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

LANGONE, M. A. P (1998). Síntese de triglicerídeos catalisada por lipase (Tese de Doutorado) Departamento de Engenharia Química da COPPE – UFRJ, 168pp.

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

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

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

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

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

MAUGARD, T.; REMAUD-SIMEON, M.; PETRE, D.; MONSAN, P. (1998). Enzymatic synthesis of surfactants via amide bonds, *Biocatalysis and Biotransformations*, v. 16, n.5, p. 383-393.

MAZUR, A. W., HILER, G. D. I., EL-NOKALY, M. (1991), Preparation of 2-monoglycerides. In: *Microemulsions and Emulsions in Foods*. ACS Symposium Series, v. 448, p.51-61.

MCNEILL, G. P.; BERGER, R. G. (1993). Enzymatic glycerolysis of palm oil fractions and a palm oil based model mixture - relationship between fatty-acid composition and monoglyceride yield, *Food Biotechnology*, v.7, n.1, p.75-87.

MCNEILL, G. P.; BOROWITZ, D.; BERGER, R. G. (1992). Selective distribution of saturated fatty-acids into the monoglyceride fraction during enzymatic glycerolysis, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.69, n.11, p.1098-1103.

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

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

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

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

MILLQVIST-FUREBY, A., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. (1996). Glyceride synthesis in a solvent-free system, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, p.1489-1495.

- MILLQVIST-FUREBY, A., TIAN, P., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. (1997). Preparation of diglycerides by lipase catalyzed alcoholysis of triglycerides, *Enzyme and Microbial Technology*, v.20, p.198-206.
- MIRANDA, M.; da SILVA, M. L. C. P.; de CASTRO, H. F. (2006). Optimised immobilisation of microbial lipase on hydrous niobium oxide, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.841, n.4, p. 566-572.
- MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. (2003). Lipase-catalysed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system, *Biotechnology Letters*, v. 25, n.8, p.641-644.
- MORAES, R. (2004), site: www.quimica.com.br/revista/qd432/atualidades3.htm, acessado em 2/09/2005.
- MYRNES, B.; BATSTAD, H.; OLSEN, R. L.; ELVEOLL, E. O. (1995). Solvent-free enzymic glycerolysis of marine oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.72, n.11, p.1339-1344.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. (2002). Biossurfatantes: Propriedades e Aplicações, *Química Nova*, v.25, n.5, p.772-776.
- OHTA, Y.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. (1989). Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n.7, p.1885-1890.
- OTERO, C.; ARCOS, J. A.; BERRENDERO, M. A. (2001). Emulsifiers from solid and liquids polyols: different strategies for obtaining optimum conversions and selectivities, *Journal of the Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, n.4-6, p. 883-892.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. (1999). The realm of micribial lipases in biotechnology, *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v.65, n.2, p.252-254.
- PASTOR, E., OTERO, C., BALLESTEROS, A. (1995). Synthesis of mono and dioleyglycerols using an immobilized lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 50, n.3, p.251-263
- PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. (1993), Produção de monoleína por lipase microbiana, *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, v.13, n.1, p.13-21.
- PAULA, A. V.; BARBOSA, J. C. S.; CASTRO, H. F. (2005), Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcar, *Química Nova*, v.28, n.5, p.792-796.
- PENCREAC'H, G.; E BARATTI, J. C. (1996). Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: simple test for the determination of lipase activity in organic media, *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, n.6, p.417-422.

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

REETZ, T. M. (2002). Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, v.6, p.145-150.

ROCHA NETO, P, D, da. (1993). O mito do babaçu: A esfinge da indústria maranhense. São Luís: Secretaria do Estado de Fomento à Indústria e Comércio (SINC), Estado do Maranhão.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. (2001). The effect of conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor, *Process Biochemistry*, v.36, n. 10, p.947-953.

SANCHEZ, C.; LIVAGE, L.; HENRY, M., BABONNEAU, F. (1988). Chemical modification of alkoxide precursors, *Journal of Non-crystalline Solids*, v.100, n.1-3, p.65-76.

SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. (2006). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of butyl butyrate using a factorial design, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, in press.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion, *Biochemistry Biophysical Acta*, v. 30, n.3, p. 513-521.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. (1991). Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*, *Nature*, v. 351, n.6329, p. 761-764.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. (1998). Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium, *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, n.3-4, p.182-186.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, V. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, v.19, n.8, p.627-662.

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R.S.; SAWANT, S.B (2002) Lipolase catalysed synthesis of benzyl esters of fatty acids, *Biochemical Engineering Journal*, v. 12, n.2, p.131-141.

SINGFIELD, P. (2006). Alternative medicine in Belize, site: <http://ambergriscaye.bz/pages/medicine6.html>, acessado em 31/05/2006.

SINGH, C. P.; SHAD, D. O.; HOLBERG, K. (1994). Synthesis of monoglycerides and diglycerides in water-in-oil microemulsions, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, n.6, p.583-587.

SOARES, C. M. F. (2004). Encapsulação da enzima lipase em matrizes sol-gel e sua aplicação em reações de hidrólise e esterificação. (Tese de Doutorado). Departamento de Engenharia Química; Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá-PR, pp.213.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.77-9, p. 745-757.

SONNTAG, N. O. V. (1982) Glycerolysis of fats and esters-status, review and critique, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v 59, n.10, p.795-802.

STEFFEN, B.; ZIEMANN, A.; LANG, S.; WAGNER, F. (1992). Enzymatic monoacylation of trihydroxy compounds, *Biotechnology Letters*, v. 14, n.9, p.773-778.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R. A.; FURNEAUX, R. H. (1993). Glycerolysis of tallow with immobilized lipase. *Biotechnology Letters* v.15, n.10, p.1043-1048.

STINSON, S. C. (2001). Chiral chemistry, *Chemical & Engineering News*, v.79, n.20, p.45-57.

TASSARO, H. (1996), site: www.bibvirt.futuro.usp.br, acessado em 07/10/2005.

TORRES, C.; OTERO, C. (1999). Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols, *Enzyme Microbial Technology*, v.25, n.8-9, p. 745-752.

TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. (1977). Glyceride synthesis by 4 kinds microbial lipase, *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 489, n.3, p.415-422.

TUTER, M.; BABALI, B.; KOSE, O.; DURAL, S.; AKSOY, H, A. (1999). Solvent-free glycerolysis of palm and kernel oils catalized by a 1,3-specific lipase and fatty acid composition of glycerolysis products, *Biotechnology Letters*, v.21, n.3, p.245-248.

URIOSTE, D. (2004). Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta (Dissertação de mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 107p.

URIOSTE, D.; CASTRO, H. F. (2004). Biotransformação de óleo de babaçu para produção de biodiesel. In: XV COBEQ 2004 - Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Curitiba (CD ROM, 6pp).

VAN DER PADT, A.; KEURENTJES, J. T. F.; SEWALT, J.J.W.; VAN DAM, E.M.; VAN DORP, L.J.; VANT RIET, K. (1992). Enzymatic synthesis of monoglycerides in a membrane bioreactor with an in-line adsorption column, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.69, n.8, p.748-754.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. (1991). Applications of microbial surfactants, *Biotechnology Advances*, v.9, n.2, p.241-252.

VIRTO, M. D.; LASCARAY, J. M.; SOLOZABAL, R. (1991). Enzymatic-hydrolysis of animal fats in organic-solvents at temperatures below their melting-points, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.68, n.5, p.324-327.

WANG, Y. F.; WONG, C. H. (1988). Lipase-catalyzed irreversible transesterification for preparative synthesis of chiral glycerol derivatives. *Journal of Organic Chemistry* v.53, n.13, p.3127-3129.

WATANABE, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; NEGISHI, S.; TERA, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMADA, Y. (2005). Production of MAG of CLA by esterification with dehydration at ordinary temperature using *Penicillium camembertii* lipase, *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 82, n.9, p.619-623.

WATANABE, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SHIMADA, Y. (2004). Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v.27, n. 4-6, p.249-254.

WEBER, H. K.; STECHER, H.; FABER, K. (1995). Some properties of commercially available crude lipase preparations, in: *Preparative Biotransformations* (Roberts, S. M., Ed.), p. 5:2.1-5:2.10.

WEISS, A. (1990). Enzymic preparation of solid fatty acid monoglycerides, *Fat Science Technology*, v.92, n.10, p.392-396.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, v. 343, n. 6260, p. 771-774.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T. (1991). High yield synthesis of monoglyceride by mono and diacylglycerol lipase from *Penicillium camemberti* U-150, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 72, n.3, p.162-167.

YAMANE, T.; HOQ, M. M.; ITOH, S.; SHIMIZU, S. (1986). Glycerolysis of fat by lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 35, p.625-631.

YAMANE, T.; HOQ, M. M.; SHIMIZU, S.; ISHIDA, S.; FUNADA, T. (1984). Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane bioreactor, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 434, p.558-568.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees, *Science*, v. 224, n.4654, p. 1249-1251.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. (1985). Enzyme-catalysed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n.10, p. 3192-3196.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media, *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 17, p. 8017-8021.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A.M. (1988). Enzymic catalysis in non-aqueous solvents, *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 3194-3201.

ZAKS, A.; GROSS, A. T. (1990), Production of monoglycerides by enzymatic transesterification. World Patent WO 90/040333. Enzytech Inc. *Chemistry Abstr.* 113:76643

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. (2004). Enzimas Imobilizadas. In: *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Editado por: Suraia Said e Rosimeire C. L. R. Pietro, Ribeirão Preto, Legis Summa, Cap.4, p.35-85.

ZHANG, X.; KAMIYA, T.; OTSUBO, N.; ISHIDA, H.; KISO, M. (1999). Chemoenzymatic synthesis of ganglioside GM4 analogs as potencial immunosuppressive agents, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 18, p. 225-239.

ZOPPI, R. A.; De CASTRO, C. R.; YOSHIDA, I. V. P. (1997). Hybrids of SiO₂ and poly (amide 6-b-ethylene oxide), *Polymer*, v.38, n.23, p.5705-5712.

8. APÊNDICES

8.1 Dados referentes ao estudo da influência da razão molar entre o glicerol e ácido láurico na conversão molar

Tempo (min)	Glic: AcLau 1:1		Glic: AcLau 3:1		Glic: AcLau 1:3	
	Ácidos graxos (M)	Conversão molar (%)	Ácidos graxos (M)	Conversão molar (%)	Ácidos graxos (M)	Conversão molar (%)
0	4,10	-	4,02	-	3,96	-
5	3,96	3,52	3,98	0,83	3,87	2,39
30	3,69	10,12	3,34	16,95	3,65	7,89
60	3,18	22,48	3,12	24,80	3,48	12,24
90	2,64	35,86	1,90	47,27	3,06	22,85
120	2,04	50,45	1,88	53,13	2,94	25,84
150	1,98	51,65	1,35	66,38	2,52	36,40
180	1,11	73,06	0,71	82,40	2,40	39,33
210	0,85	79,35	0,57	85,74	2,23	43,64
240	0,67	83,70	0,26	94,36	2,08	47,38

8.2. Dados referentes à quantificação da mono, di e trilaurina na esterificação do glicerol com ácido láurico em meio isento de solvente

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	100	0	0	0
2	45,16	24,98	29,25	0,61
4	32,46	28,09	37,98	1,46

8.3. Dados referentes à influência do tamanho de cadeia do ácido graxo na síntese de laurato de glicerila

A) Esterificação do glicerol com ácido mirístico utilizando Lipozyme

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	520,17	2,27	-
1	444,65	1,95	14,52
1,5	391,38	1,71	24,76
2	354,82	1,56	33,52
2,5	291,17	1,27	44,02
3	246,35	1,08	52,67
3,5	267,15	1,17	48,64
4	241,89	1,06	53,49
5	160,67	0,70	69,11
6	198,53	0,87	61,83
7	189,90	0,83	63,49
8	200,96	0,88	61,36
20	170,20	0,75	67,27
24	167,15	0,73	67,86
48	159,23	0,70	69,38

B) Esterificação do glicerol com ácido palmítico utilizando Lipozyme

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	742,49	2,96	-
0,5	631,74	2,52	16,26
1	578,85	2,31	22,04
2	411,40	1,64	44,60
3	359,63	1,44	51,56
3,5	302,59	1,21	59,26
4,0	290,39	1,16	60,89
5	215,70	0,86	70,95
6	214,78	0,86	71,07
7	247,50	0,99	66,80
24	244,99	0,98	67,00
30	215,05	0,86	71,04
48	235,81	0,94	68,25

C) Esterificação do glicerol com ácido esteárico utilizando Lipozyme.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	447,39	1,57	-
0,5	337,88	1,19	24,47
1	265,07	0,93	40,75
2	230,13	0,81	48,56
3	189,67	0,67	57,60
4	165,54	0,58	62,99
5	161,70	0,57	63,86
6	128,10	0,45	71,37
7	123,35	0,44	72,43
24	119,13	0,42	73,37
30	108,42	0,38	75,76
48	99,43	0,35	77,77

D) Esterificação do glicerol com ácido oleico utilizando Lipozyme.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	629,20	2,23	-
1	625,47	2,21	0,59
2	624,64	2,21	0,72
2,5	624,46	2,21	0,75
3	576,60	2,04	8,36
3,5	568,03	2,01	9,72
4	554,90	1,96	11,80
5	483,68	1,71	23,13
6	341,04	1,21	45,79
7	349,90	1,24	44,39
8	338,04	1,20	46,27
20	277,22	0,98	55,94
24	242,01	0,86	61,50
48	208,32	0,74	66,89

8.4. Dados referentes à simulação do óleo de babaçu em ácidos graxos, na esterificação com glicerol

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador

Tempo (min)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	805,59	4,02	-
5	798,91	3,98	0,83
30	669,04	3,34	16,95
60	605,76	3,12	24,80
90	380,80	1,90	47,27
120	377,60	1,88	53,13
150	270,83	1,35	66,38
180	141,76	0,71	82,40
210	126,97	0,57	85,74
240	50,23	0,26	94,36

B) Sistema composto por glicerol, ácido láurico e mirístico utilizando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	755,50	3,72	-
0,5	694,25	3,33	8,10
1	598,17	2,87	22,82
2	420,51	2,02	44,34
3	214,46	1,03	71,61
4	221,68	1,06	80,55
4,5	141,74	0,68	81,24
5	131,25	0,63	82,63
6	127,53	0,61	83,12
7	115,74	0,56	84,68
8	166,22	0,80	77,99
24	165,08	0,79	78,15
30	157,54	0,76	79,14
48	166,93	0,80	77,90

C) Sistema composto por glicerol, ácido láurico, mirístico e palmítico utilizando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	700,17	3,27	-
0,5	657,77	3,07	6,05
1	450,81	2,11	3,61
2	360,08	1,68	48,57
3	271,27	1,27	61,26
4	222,55	1,04	68,21
5	193,66	0,90	72,34
6	173,74	0,81	75,18
7	162,61	0,76	76,77
8	135,12	0,63	80,70
24	143,72	0,67	79,47
30	135,03	0,63	80,71
48	131,91	0,62	81,16

D) Sistema composto por glicerol, ácido láurico, mirístico, palmítico e oleico utilizando Lipozyme IM²⁰ como biocatalisador

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	714,99	3,17	-
1	478,20	2,12	33,12
2	469,32	2,08	34,36
3	329,73	1,46	53,88
4	275,35	1,22	61,49
5	241,57	1,07	66,21
6	185,72	0,82	74,02
7	182,39	0,81	74,49
8	133,36	0,59	81,35
24	168,12	0,74	76,48
30	173,84	0,77	75,69
48	166,15	0,74	76,76

8.5. Dados referentes ao estudo da influência de diferentes fontes de lipase imobilizadas em POS-PVA, na esterificação do glicerol com ácido láurico em meio isento de solvente

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	751,84	3,75	-
0,5	712,21	3,55	5,27
6	253,78	1,27	66,25
24	196,22	0,97	73,90
29	192,46	0,96	74,40
48	159,36	0,79	78,80

B) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipolase imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	687,32	3,43	-
0,5	533,01	2,66	22,45
1	377,47	1,88	45,08
3	349,23	1,74	49,19
24	332,52	1,66	51,62
30	520,09	2,59	24,33
48	566,15	2,83	17,63

C) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando *Candida rugosa* imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	809,92	4,04	-
0,5	640,39	3,19	20,93
2	616,75	3,08	23,85
3	609,49	3,04	24,74
6	609,15	3,04	24,78
24	514,06	2,57	36,56
30	551,79	2,75	31,87
48	386,12	1,93	32,32

D) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando lipase Pancreática imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	772,41	3,86	-
2	745,28	3,72	3,90
18	739,19	3,69	4,30
24	423,13	2,11	45,22
42	336,46	1,68	56,44
48	303,71	1,52	60,68

E) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando lipase AK “Amano” 20 imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	639,84	3,19	-
0,25	636,04	3,17	0,59
0,5	628,20	3,14	1,82
1	628,22	3,14	1,82
2	628,42	3,14	1,78
3	587,30	2,93	8,21
5	554,06	2,76	13,40
8	531,76	2,65	16,89
24	535,52	2,67	16,30
30	533,42	2,66	16,63
48	521,58	2,60	18,48

F) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando lipase PS “Amano” imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	625,72	3,12	-
0,25	591,06	2,95	5,54
0,5	561,50	2,80	10,26
1	575,26	2,87	8,06
2	556,78	2,78	11,02
3	509,74	2,54	18,53
5	378,34	1,89	39,53
8	358,22	1,79	42,75
24	322,12	1,60	48,52
30	292,46	1,47	53,26
48	293,52	1,46	53,09

G) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme TL 100L imobilizada em POS-PVA.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	671,04	3,35	-
0,25	662,80	3,31	1,23
0,5	612,12	3,05	8,78
1,0	534,60	2,67	20,33
1,5	508,66	2,54	24,19
2,0	469,14	2,34	30,09
4,0	429,30	2,14	36,05
6,0	433,64	2,16	35,38
8,0	383,12	1,91	42,90
24	516,34	2,58	23,05
48	546,48	2,73	18,56

8.6. Dados referentes ao estudo da influência de diferentes fontes de lipase imobilizadas comercialmente, na esterificação do glicerol com ácido láurico em meio isento de solvente.

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme IM²⁰

Tempo (min)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	805,59	4,02	-
5	798,91	3,98	0,83
30	669,04	3,34	16,95
60	605,76	3,12	24,80
90	380,80	1,90	47,27
120	377,60	1,88	53,13
150	270,83	1,35	66,38
180	141,76	0,71	82,40
210	126,97	0,57	85,74
240	50,23	0,26	94,36

B) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Novozym 435.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	542,85	2,71	-
0,5	375,13	1,87	30,87
1	238,30	1,19	56,10
2	193,57	0,97	64,84
3	179,23	0,89	66,99
4	175,50	0,88	67,67
6	178,57	0,89	67,01
8	168,98	0,84	68,88
24	122,09	0,61	76,49
30	118,53	0,59	76,89
48	126,66	0,63	76,66

C) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme RM IM.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	671,06	3,35	-
15 min	564,00	2,81	15,95
0,5	441,58	2,20	34,19
1,0	348,48	1,74	48,07
1,5	282,60	1,41	57,88
2	230,90	1,15	65,59
2,5	214,92	1,07	67,97
3	212,70	1,06	68,31
3,5	225,58	1,12	66,38
4	210,44	1,05	68,64
5	219,40	1,09	67,30
6	142,24	0,71	78,80
7	138,06	0,69	79,43
8	126,58	0,63	81,13
24	124,40	0,62	81,46
30	127,02	0,63	81,07
48	93,52	0,47	86,06

D) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Lipozyme TL IM.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	709,70	3,54	-
0,5	685,32	3,42	3,43
1,0	654,18	3,26	7,82
1,5	633,08	3,16	10,79
2	610,24	3,05	14,01
3	538,00	2,68	24,19
4	510,00	2,55	28,14
5	499,44	2,49	29,63
6	485,06	2,42	31,65
7	459,70	2,29	35,23
8	414,86	2,07	41,54
24	426,62	2,13	39,88
30	410,74	2,05	42,12
48	390,18	1,95	45,02

8.7. Dados referentes a influência do agente de ativação do suporte no sistema imobilizado.

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA, sendo o suporte ativado com glutaraldeído.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	751,84	3,75	-
0,5	712,21	3,55	5,27
6	253,78	1,27	66,25
24	196,22	0,97	73,90
29	192,46	0,96	74,40
48	159,36	0,79	78,80

B) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA, sendo o suporte ativado com metaperiodato de sódio.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	626,30	3,12	-
1	501,22	2,50	19,97
2	492,22	2,46	21,41
3	321,58	1,60	48,65
4	217,94	1,09	65,21
5	174,22	0,87	72,18
6	186,76	0,93	70,18
8	180,72	0,90	71,15
24	162,88	0,81	73,99
29	150,78	0,75	75,93
48	145,68	0,73	76,74

C) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA, sendo o suporte ativado com carbonildiimidazol.

Tempo (h)	Ácidos Graxos (g/L)	Ácidos Graxos (M)	Conversão molar (%)
0	631,70	3,15	-
1	565,84	2,82	10,42
2	417,74	2,08	33,87
3	319,80	1,60	49,37
4	229,72	1,15	63,63
5	179,10	0,89	71,64
6	186,76	0,93	70,43
8	163,46	0,81	74,12
24	163,90	0,82	74,05
29	159,18	0,79	74,80
48	125,70	0,63	75,83

8.8. Dados referentes à quantificação dos mono, di e triglicerídeos na esterificação do glicerol com ácido láurico em meio isento de solvente, utilizando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA como biocatalisador

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	97,21	0,45	2,12	0,23
2	65,06	10,37	14,22	0,46
4	64,03	12,92	22,38	0,67
6	54,36	19,08	25,76	0,65
12	52,96	24,15	22,73	0,16
24	50,69	22,14	26,53	0,63

B) Esterificação do glicerol com ácidos graxos utilizando Calb L imobilizada em POS-PVA como biocatalisador

Tempo 0 h		Tempo 6 h		Tempo 24 h		Tempo 48 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Ácidos		Ácidos		Ácidos		Ácidos	
cáprico	3,92	cáprico	3,24	cáprico	2,57	cáprico	2,95
láurico	46,97	láurico	39,36	láurico	31,38	láurico	34,94
mirístico	16,56	mirístico	15,00	mirístico	12,00	mirístico	12,27
palmítico	11,60	palmítico	11,34	palmítico	9,66	palmítico	8,72
oléico	20,93	oléico	18,88	oléico	16,81	oléico	12,38
Total	100		87,90		72,43		71,26
Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,47	cáprico	0,48	cáprico	0,72
láurico	0	láurico	6,88	láurico	5,52	láurico	9,46
mirístico	0	mirístico	2,38	mirístico	2,04	mirístico	3,96
palmítico	0	palmítico	1,55	palmítico	1,29	palmítico	2,76
Oléico	0	oléico	1,21	oléico	1,06	oléico	2,34
Total			12,49		10,39		19,24
Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0	C ₂₃	0	C ₂₃	0,25	C ₂₃	0
C ₂₇	0	C ₂₇	4,70	C ₂₇	8,39	C ₂₇	4,55
C ₃₁	0	C ₃₁	2,82	C ₃₁	4,78	C ₃₁	2,81
C ₃₅	0	C ₃₅	0	C ₃₅	2,78	C ₃₅	1,69
C ₃₉	0	C ₃₉	0	C ₃₉	0,53	C ₃₉	0
Total			7,52		16,73		9,05
Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0	C ₃₃	1,41	C ₃₃	0,15	C ₃₃	0,15
C ₃₉	0	C ₃₉	0,68	C ₃₉	0,10	C ₃₉	0,30
C ₄₅	0	C ₄₅	0	C ₄₅	0	C ₄₅	0
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total			2,09		0,25		0,45

8.9. Dados referentes ao estudo da influência de diferentes fontes de lipase na glicerólise do óleo de babaçu em meio isento de solvente

A) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando Lipase PS Amano imobilizada em POS-PVA

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,72	cáprico	3,66	cáprico	0,24	cáprico	0,52
láurico	0,14	láurico	5,29	láurico	1,15	láurico	2,05	láurico	4,37
mirístico	0,04	mirístico	2,06	mirístico	0,86	mirístico	0,73	mirístico	1,42
palmítico	0	palmítico	0,97	palmítico	0,63	palmítico	0,36	palmítico	0,80
oléico	0,023	oléico	0,98	oléico	1,19	oléico	0,43	oléico	0,83
Total	0,203		10,02		7,49		3,81		7,94
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0,37	C ₂₃	2,75	C ₂₃	4,67	C ₂₃	3,59	C ₂₃	3,38
C ₂₇	0,66	C ₂₇	8,18	C ₂₇	12,82	C ₂₇	10,46	C ₂₇	9,03
C ₃₁	1,78	C ₃₁	3,39	C ₃₁	5,87	C ₃₁	5,13	C ₃₁	2,96
C ₃₅	12,22	C ₃₅	4,56	C ₃₅	2,94	C ₃₅	2,70	C ₃₅	2,55
C ₃₉	6,46	C ₃₉	1,38	C ₃₉	1,48	C ₃₉	1,50	C ₃₉	1,32
Total	21,49		20,26		27,78		23,38		19,24
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0,38	C ₃₃	0,13	C ₃₃	0,13	C ₃₃	0,14	C ₃₃	0,13
C ₃₉	2,00	C ₃₉	0,57	C ₃₉	0,53	C ₃₉	0,57	C ₃₉	0,46
C ₄₅	0,47	C ₄₅	0,18	C ₄₅	0,17	C ₄₅	0,18	C ₄₅	0,13
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total	2,85		0,88		0,83		0,89		0,72

B) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando lipase AK Amano 20 imobilizada em POS-PVA

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,49	cáprico	0,51	cáprico	0,56	cáprico	0,41
láurico	0,12	láurico	3,84	láurico	3,86	láurico	4,15	láurico	3,31
mirístico	0,04	mirístico	1,66	mirístico	1,48	mirístico	1,61	mirístico	0,98
palmítico	0	palmítico	0,77	palmítico	0,70	palmítico	0,76	palmítico	0,54
oléico	0,02	oléico	0,82	oléico	0,69	oléico	0,74	oléico	0,55
Total	0,18		7,58		7,24		7,82		5,24
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0,21	C ₂₃	2,40	C ₂₃	2,30	C ₂₃	2,73	C ₂₃	2,56
C ₂₇	0,48	C ₂₇	7,71	C ₂₇	6,63	C ₂₇	8,80	C ₂₇	2,83
C ₃₁	1,90	C ₃₁	3,40	C ₃₁	2,73	C ₃₁	3,62	C ₃₁	9,07
C ₃₅	12,13	C ₃₅	7,86	C ₃₅	2,06	C ₃₅	2,74	C ₃₅	3,10
C ₃₉	5,93	C ₃₉	2,47	C ₃₉	0,98	C ₃₉	1,30	C ₃₉	1,20
Total	20,65		23,84		14,7		19,19		18,76
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0,39	C ₃₃	0,18	C ₃₃	0,22	C ₃₃	0,18	C ₃₃	0,18
C ₃₉	1,95	C ₃₉	0,80	C ₃₉	0,99	C ₃₉	0,78	C ₃₉	0,74
C ₄₅	0,44	C ₄₅	0,25	C ₄₅	0,32	C ₄₅	0,29	C ₄₅	0,24
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total	2,78		1,23		1,53		1,25		1,16

C) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando lipase Calb L imobilizada em POS-PVA

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0	cáprico	0,06	cáprico	0,08	cáprico	0,06
láurico	0,19	láurico	0,39	láurico	0,38	láurico	0,62	láurico	1,19
mirístico	0,09	mirístico	0,07	mirístico	0,14	mirístico	0,09	mirístico	0,25
palmítico	0	palmítico	0,08	palmítico	0,07	palmítico	0	palmítico	0,05
oléico	0	oléico	0,04	oléico	0,08	oléico	0,03	oléico	0,1
Total	0,28		0,58		0,73		0,82		1,65
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0,35	C ₂₃	0,56	C ₂₃	0,93	C ₂₃	0,67	C ₂₃	1,03
C ₂₇	0,62	C ₂₇	1,39	C ₂₇	1,74	C ₂₇	1,61	C ₂₇	3,45
C ₃₁	1,62	C ₃₁	2,73	C ₃₁	1,75	C ₃₁	1,98	C ₃₁	3,08
C ₃₅	13,04	C ₃₅	21,9	C ₃₅	10,93	C ₃₅	10,07	C ₃₅	14,58
C ₃₉	6,08	C ₃₉	9,15	C ₃₉	6,0	C ₃₉	5,27	C ₃₉	7,78
Total	21,71		35,73		21,35		19,60		29,92
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0,33	C ₃₃	0,45	C ₃₃	0,33	C ₃₃	0,55	C ₃₃	0,53
C ₃₉	1,77	C ₃₉	2,72	C ₃₉	2,13	C ₃₉	3,39	C ₃₉	3,34
C ₄₅	0,40	C ₄₅	0,67	C ₄₅	0,55	C ₄₅	0,85	C ₄₅	0,84
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total	2,50		3,84		3,01		4,79		4,71

D) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando lipase G Amano imobilizada em POS-PVA

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,02	cáprico	0	cáprico	0,07	cáprico	0,08
láurico	0,20	láurico	0,31	láurico	0,04	láurico	0,75	láurico	0,70
mirístico	0,21	mirístico	0,06	mirístico	0,09	mirístico	0,34	mirístico	0,26
palmítico	0	palmítico	0,01	palmítico	0,04	palmítico	0,15	palmítico	0,09
oléico	0	oléico	0,01	oléico	0,03	oléico	0,34	oléico	0,17
Total	0,42		0,41		0,19		1,66		1,31
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0	C ₂₃	0,22	C ₂₃	0,84	C ₂₃	1,32	C ₂₃	0,98
C ₂₇	0,32	C ₂₇	0,53	C ₂₇	1,59	C ₂₇	3,53	C ₂₇	2,86
C ₃₁	1,64	C ₃₁	0,59	C ₃₁	1,45	C ₃₁	3,57	C ₃₁	1,91
C ₃₅	10,35	C ₃₅	3,00	C ₃₅	9,83	C ₃₅	20,76	C ₃₅	13,22
C ₃₉	7,01	C ₃₉	1,26	C ₃₉	5,05	C ₃₉	11,58	C ₃₉	6,35
Total	19,32		5,60		18,77		40,77		25,32
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0,56	C ₃₃	0,06	C ₃₃	0,66	C ₃₃	0,17	C ₃₃	0,71
C ₃₉	3,76	C ₃₉	2,43	C ₃₉	4,26	C ₃₉	3,30	C ₃₉	5,17
C ₄₅	1,03	C ₄₅	0,64	C ₄₅	1,16	C ₄₅	0,96	C ₄₅	1,57
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total	5,35		3,13		6,07		4,43		7,45

E) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando a preparação de lipase imobilizada disponível comercialmente (Lipozyme IM²⁰).

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,14	cáprico	0,44	cáprico	0,32	cáprico	0,44
láurico	0,048	láurico	1,74	láurico	3,62	láurico	2,31	láurico	3,26
mirístico	0,026	mirístico	0,54	mirístico	1,50	mirístico	0,86	mirístico	1,16
palmítico	0	palmítico	0,27	palmítico	0,79	palmítico	0,42	palmítico	0,53
oléico	0	oléico	0,53	oléico	0,98	oléico	0,49	oléico	0,55
Total	0,074		3,22		7,33		4,40		5,94
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0,16	C ₂₃	2,14	C ₂₃	2,59	C ₂₃	3,49	C ₂₃	1,87
C ₂₇	0,42	C ₂₇	7,17	C ₂₇	9,49	C ₂₇	12,11	C ₂₇	5,97
C ₃₁	2,41	C ₃₁	5,17	C ₃₁	4,71	C ₃₁	6,41	C ₃₁	4,06
C ₃₅	18,49	C ₃₅	5,13	C ₃₅	6,68	C ₃₅	4,94	C ₃₅	2,47
C ₃₉	9,74	C ₃₉	3,03	C ₃₉	3,33	C ₃₉	2,77	C ₃₉	1,21
Total	31,22		22,64		26,80		29,72		15,58
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	0,36	C ₃₃	0,29	C ₃₃	0,27	C ₃₃	0,22	C ₃₃	0,17
C ₃₉	2,25	C ₃₉	0,95	C ₃₉	1,0	C ₃₉	0,88	C ₃₉	0,76
C ₄₅	0,54	C ₄₅	0,21	C ₄₅	0,30	C ₄₅	0,26	C ₄₅	0,22
C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0	C ₅₁	0
Total	3,15		1,45		1,57		1,36		1,15

F) Glicerólise do óleo de babaçu utilizando a preparação de lipase imobilizada disponível comercialmente (Novozym 435).

Tempo 0 h		Tempo 3 h		Tempo 6 h		Tempo 12 h		Tempo 24 h	
	% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica		% Mássica
Monos		Monos		Monos		Monos		Monos	
cáprico	0	cáprico	0,12	cáprico	0,18	cáprico	0,41	cáprico	0,22
láurico	0,11	láurico	0,84	láurico	1,44	láurico	3,17	láurico	1,66
mirístico	0,04	mirístico	0,27	mirístico	0,51	mirístico	1,06	mirístico	0,57
palmítico	0,01	palmítico	0,12	palmítico	0,23	palmítico	0,49	palmítico	0,27
oléico	0,03	oléico	0,14	oléico	0,28	oléico	0,55	oléico	0,31
Total	0,19		1,49		2,64		5,68		3,03
Dis		Dis		Dis		Dis		Dis	
C ₂₃	0,18	C ₂₃	1,28	C ₂₃	1,25	C ₂₃	1,97	C ₂₃	2,65
C ₂₇	0,48	C ₂₇	4,33	C ₂₇	5,09	C ₂₇	7,57	C ₂₇	10,66
C ₃₁	1,74	C ₃₁	1,84	C ₃₁	2,57	C ₃₁	3,48	C ₃₁	5,24
C ₃₅	12,21	C ₃₅	8,13	C ₃₅	5,61	C ₃₅	2,78	C ₃₅	3,85
C ₃₉	6,12	C ₃₉	4,00	C ₃₉	3,47	C ₃₉	1,43	C ₃₉	2,27
Total	20,74		19,58		17,99		17,23		24,67
Tris		Tris		Tris		Tris		Tris	
C ₃₃	1,29	C ₃₃	0,26	C ₃₃	0,21	C ₃₃	0,12	C ₃₃	0,14
C ₃₉	8,57	C ₃₉	1,91	C ₃₉	1,50	C ₃₉	0,73	C ₃₉	0,61
C ₄₅	1,90	C ₄₅	0,51	C ₄₅	0,39	C ₄₅	0,26	C ₄₅	0,21
C ₅₁	-	C ₅₁	-	C ₅₁	-	C ₅₁	-	C ₅₁	-
Total	11,76		2,68		2,10		1,11		0,96

8.10. Dados referentes ao planejamento experimental 2² empregado na esterificação do glicerol com ácido láurico utilizando 2% (m/m) de Calb L imobilizada em POS-PVA

A) Ensaio 1

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	99,35	0,45	0,20	0
2	88,42	5,03	6,17	0,40
4	75,74	7,89	16,16	0,20
6	74,61	9,13	16,25	0
12	68,74	10,34	20,79	0,23
24	67,74	15,31	16,83	0,17

B) Ensaio 2

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	94,68	2,70	2,05	0,57
2	83,07	8,52	8,41	0
4	69,43	10,16	20,20	0,19
6	60,83	15,62	23,35	0,21
12	58,28	19,36	22,13	0,22
24	37,12	25,80	36,04	1,50

C) Ensaio 3

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	97,69	0,68	1,17	0,44
2	71,19	7,41	20,93	0,31
4	74,05	8,65	17,08	0,21
6	61,72	10,32	26,89	1,27
12	55,78	17,92	26,07	0,22
24	31,20	29,66	38,42	0,84

D) Ensaio 4

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	98,65	0,50	0,67	0,18
2	68,46	10,60	20,94	0
4	53,40	17,46	28,91	0,22
6	43,09	24,22	32,41	0,28
12	39,11	27,75	32,68	0,45
24	31,92	29,19	37,71	1,16

E) Ensaio 5

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	95,72	0,41	3,70	0,16
2	67,03	9,14	23,64	0,19
4	70,11	13,63	16,00	0,25
6	52,77	19,31	26,99	0,85
12	50,38	23,00	26,67	0
24	49,89	21,21	28,38	0,50

F) Ensaio 6

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	98,70	0,37	0,65	0,29
2	63,09	7,93	28,33	0,72
4	57,94	14,34	26,62	1,09
6	55,94	19,54	23,83	0,44
12	55,54	22,01	22,12	0,32
24	51,49	20,30	27,44	0,76

8.11. Dados referentes aos experimentos realizados para confirmação do modelo matemático proposto.

A) Esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase Cal L imobilizada em POS-PVA.

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	96,68	0,86	1,89	0,57
2	87,50	1,99	9,82	0,62
4	64,75	15,64	19,40	0,20
6	55,10	18,78	25,73	0,39
12	42,07	26,90	30,72	0,30
24	29,92	31,35	38,28	0,50

B) Esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase G imobilizada em POS-PVA.

Tempo (horas)	Ácido láurico (% m/m)	Monolaurina (% m/m)	Dilaurina (% m/m)	Trilaurina (% m/m)
0	96,68	0,90	1,83	0,58
2	86,77	10,36	1,23	1,28
4	74,11	21,51	1,75	2,62
6	63,85	32,67	3,31	0,10
12	55,95	38,08	5,41	0,55
24	32,44	51,47	15,59	0,48