

Estudo da Glicerólise Enzimática na Produção de Mono e Diacilgliceróis Utilizando Óleo de Oliva

Study of the Enzymatic Glycerolysis in the Production of Mono and Diacylglycerols Using Olive Oil

Roberta Letícia Kruger

Doutora em Engenharia de Alimentos
Universidade Paranaense – UNIPAR, Toledo, PR
betakruger@unipar.br

Melânia Sychoski

Graduanda em Engenharia de Alimentos
Universidade Regional Integrada – URI, Erechim, RS
mel.sychoski@yahoo.com.br

Manuela Balen

Mestranda em Engenharia Química
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR
Manuela_balen@yahoo.com.br

Jorge Luiz Ninow

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC
jorge@enq.ufsc.br

Marcos Lúcio Corazza

Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR
corazza@ufpr.br

Resumo: Este trabalho apresenta um estudo da glicerólise de óleo de oliva usando a enzima Novozym 435 em sistema com solvente orgânico terc-butanol na produção de monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs). Os experimentos foram

Recebido em 12/08/2011 - Aceito em 25/11/2011.

RECEN Guarapuava, Paraná v. 13 n° 3 p. 331-351 Edição Especial 2011

desenvolvidos em sistema batelada para avaliação dos efeitos da temperatura, concentração de enzima imobilizada e relação molar de glicerol: óleo (G:O). Os resultados mostraram que é possível maximizar a produção de MAGs e/ou DAGs, dependendo da relação molar de G:O utilizada. Altos conteúdos de MAGs (~73% m/m) e DAGs (~56% m/m) foram obtidos usando relação molar de G:O de 9:1 e 0,8:1 e concentrações de enzima de 15 e 10% (m/m), respectivamente, ambos em 12 horas de reação a 55°C e 600 rpm. Os maiores conteúdos da mistura de MAGs + DAGs (~89% m/m) foram obtidos utilizando relação molar de G:O de 6:1, a 70°C, 600 rpm e concentração de enzima de 10% (m/m). Este trabalho também apresenta um estudo de modelagem matemática dos dados experimentais. Reações paralelas de glicerólise e hidrólise foram consideradas para estimar as constantes da velocidade por minimização da função objetivo. De um modo geral, correlações satisfatórias foram obtidas entre os dados experimentais e o modelo proposto.

Palavras-chave: enzima imobilizada; estudo cinético; glicerólise enzimática; óleo de oliva.

Abstract: This work reports a study regarding the glycerolysis of olive oil using Novozym 435 in tert-butanol organic system aiming at the production of monoacylglycerols (MAGs) and diacylglycerols (DAGs). Experiments were performed in batch mode, recording the reaction kinetics and evaluating the effects of temperature, immobilized enzyme concentration, glycerol:oil molar ratio and using tert-butanol:oil/glycerol. Experimental results showed that it is possible to maximize the production of MAGs and/or DAGs, depending on the glycerol to oil molar ratio employed in the reactional system. Higher contents of MAGs (~73wt%) and DAGs (~56wt%) were achieved using glycerol to oil molar ratio of 9:1 and 0.8:1, and enzyme concentration of 15 and 10wt%, respectively, both in 12 hours of reaction at 55°C and 600 rpm. Higher contents of the mixture of MAGs + DAGs (~89wt%) were achieved using glycerol to oil molar ratio of 6:1, at 70°C, 600 rpm, enzyme concentration of 10% (wt%). This work also reports the kinetic modeling of experimental data. The glycerolysis and hydrolysis parallel reactions were considered with

rate constants estimated by minimizing a maximum likelihood function. In general, a satisfactory agreement between experimental data and model results was obtained.

Key words: enzymatic glycerolysis; immobilized enzyme; kinetic study; oil olive.

1 Introdução

Há um grande interesse nas áreas da biotecnologia visando obter novos produtos a partir de óleos e gorduras pelo fato destes serem derivados de recursos renováveis [1]. Adicionalmente, o uso de enzimas para modificar a estrutura e a composição de óleos e gorduras vem crescendo consideravelmente, caracterizando-se em avanços significativos na área de biotransformação [2].

Os mono (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs) são os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como estabilizantes de emulsões) e farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) [3, 4]. Além disso, os DAGs têm grande aplicação como aditivos funcionais em alimentos, trazendo benefícios para saúde, tal como, a redução da gordura abdominal visceral [5]. Pelo método convencional, a produção de MAGs e DAGs é realizada pela reação de transesterificação empregando-se temperaturas acima de 240°C e catalisadores químicos. Os rendimentos obtidos são relativamente baixos e os produtos são de baixa qualidade [6]. Por outro lado, os processos enzimáticos destacam-se por utilizarem baixas temperaturas de operação e lipases específicas como catalisadores [7], podendo garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas a ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos [8]. A produção destes emulsificantes através da reação de glicerólise é também de grande interesse econômico e tecnológico por haver a possibilidade de se utilizar como um dos substratos o glicerol, subproduto do processamento de biodiesel [9].

Além da glicerólise enzimática, outros estudos foram desenvolvidos para a produção de MAGs e DAGs, como por exemplo, o uso da tecnologia de fluidos supercríticos e/ou gases pressurizados como solventes [10–13] que também procuram melhorar o rendimento e a qualidade dos produtos obtidos. Porém, fica evidente que

o maior número de estudos em glicerólise envolvem a aplicação de lípases, principalmente da enzima *Novozym 435* [7, 14–17].

Devido à natureza polar do glicerol e apolar dos óleos vegetais, tais compostos apresentam miscibilidade mútua bastante limitada e uma alternativa para dispersar o glicerol no óleo é utilizar um solvente orgânico. Um meio reacional com um solvente satisfatório melhora a miscibilidade entre os substratos tornando o sistema mais homogêneo e com melhor transferência de massa [18].

Objetivou-se realizar um estudo cinético da glicerólise de óleo de oliva, catalisada por uma lipase imobilizada em meio com solvente orgânico e tratar matematicamente os dados experimentais, buscando um maior entendimento da influência das variáveis nesta reação.

2 Material e métodos

2.1 Condições cromatográficas e preparo das amostras

O azeite de oliva comercial da marca Arisco (extra virgem) e glicerol (99,5%, Merck) foram utilizados como substratos. O solvente orgânico foi o *tert*-butanol (99%, Vetec) e o catalisador foi a lipase comercial *Novozym 435* (*Candida antarctica* – EC.3.1.1.3) (Novozymes A/S), imobilizada em resina acrílica aniônica macroporosa (diâmetro na faixa de 0,3 - 0,9 mm), a qual atua randomicamente nas três posições do triglicerídeo. O solvente *n*-hexano (Quimex, 99,5%) foi utilizado na etapa de lavagem das enzimas ao final da reação.

Nas análises cromatográficas, foram utilizados *n*-heptano, piridina, derivatizante MSTFA (N-methy-N-trimethylsilylfluoroacetamide), padrões externos: monooleína, dioleína, trioleína e ácido oléico (ácido graxo livre), todos de grau cromatográfico e de procedência da Sigma-Aldrich, os quais foram escolhidos para a calibração por serem os majoritários em cada uma de suas classes, no caso do óleo de oliva.

As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano) de 30 m × 0,25

mm \times 0,1 μ m (J e W Scientific, n^o de série: US7162944H). As condições de operação, calibração e análise das amostras foram baseadas na Norma n^o 14.105, do Comitê Europeu para Padronizações [19], sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C por 1 min, seguido pelo aumento de 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8 min. A temperatura do detector era 380°C, pressão do gás de arraste (hélio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 μ L. As amostras encaminhadas para análise apresentavam concentração de 5 mg amostra/mL n-heptano.

2.2 Descrição do aparato e procedimento experimental utilizado nas reações de glicerólise enzimática em batelada

A unidade experimental utilizada na condução das reações consistiu em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostático para controle da temperatura e a um agitador mecânico (IKA, modelo RW 20).

A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada de forma destrutiva e o procedimento experimental consistiu nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C/1 h para acondicionamento. Após, eram adicionados ao reator, o óleo de oliva e o glicerol, no volume total de 15 mL, o solvente orgânico (15 mL) e a enzima (na concentração pré-definida para cada experimento) e a reação era iniciada. Ao final do tempo da reação, todo o meio reacional era recolhido e filtrado a vácuo com sucessivas lavagens com n-hexano para separar toda a amostra da superfície das enzimas imobilizadas. As amostragens foram feitas nos tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480 e 720 min. As amostras eram transferidas para frascos de amostragem e levadas à estufa a vácuo (70°C; 0,5 bar) até peso constante para eliminação dos solventes.

2.3 Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico

As faixas de temperatura utilizadas nos testes cinéticos foram baseadas na temperatura ótima de atuação da enzima (*Novozym 435*) fornecida pelo fabricante (*Novozy-*

mes A/S), que é de 70°C e em dados da literatura que sugerem outras temperaturas para a reação de glicerólise utilizando lipases, entre 35°C e 65°C [20, 21]. A faixa da relação molar G:O, da concentração de enzima e a agitação de 600 rpm foram baseadas nos resultados obtidos em estudos anteriores [17, 22]. A concentração de solvente terc-butanol utilizada foi de 1:1 (v/v) em relação aos substratos em todos os estudos. Para uma melhor visualização da influência das variáveis, as velocidades iniciais de cada reação (r) da produção de MAGs e DAGs foram calculadas, por meio da equação 1:

$$r = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C - C_0}{t - t_0} \quad (1)$$

em que r = velocidade inicial da reação ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$); C = conversão de MAGs ou DAGs no tempo t (mol); C_0 = conversão de MAGs ou DAGs no tempo 0 (mol); t = tempo (min) e t_0 = tempo do início da reação (min).

2.4 Modelagem matemática da reação de glicerólise

Considerando a complexidade dos mecanismos cinéticos que envolvem reações enzimáticas, os quais, nem sempre são claros, se propôs neste trabalho, a obtenção de um modelo matemático para glicerólise enzimática, adicionando apenas um parâmetro empírico de redução da atividade enzimática aparente, o qual considera a redução pelo excesso de glicerol e por perda natural de atividade.

As equações cinéticas utilizadas estão apresentadas a seguir, sendo para as etapas de glicerólise, as equações 2 a 4 e para as etapas de hidrólise, as equações 5 a 7 (que ocorrem paralelamente se houver presença de água no sistema).





em que TAG, DAG, MAG, AGL, Gly e H₂O são as frações molares em termos de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol e água, respectivamente.

A partir das equações e do balanço de massa realizado, em reator batelada para cada componente, foram obtidas as equações 8 a 13, que representam as velocidades das reações que envolvem a produção de MAGs e DAGs obtidas:

$$\begin{aligned} \frac{dTAG}{dt} = & -k_1(Gly)(TAG) + k_2(DAG)(MAG) - k_5(TAG)(MAG) \quad (8) \\ & + k_6(DAG)^2 - k_7(TAG)(H_2O) + k_3(DAG)(AGL) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dDAG}{dt} = & k_1(Gly)(TAG) - k_2(DAG)(MAG) - k_3(Gly)(DAG) + k_4(MAG)^2 \quad (9) \\ & + 2k_5(TAG)(MAG) - 2k_6(DAG)^2 + k_7(TAG)(H_2O) - k_8(DAG)(AGL) \\ & - k_9(DAG)(H_2O) + k_{10}(MAG)(AGL) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dMAG}{dt} = & k_1(Gly)(TAG) - k_2(DAG)(MAG) + 2k_3(Gly)(DAG) - 2k_4(MAG)^2 \quad (10) \\ & - k_5(TAG)(MAG) + k_6(DAG)^2 + k_9(DAG)(H_2O) - k_{10}(MAG)(AGL) \\ & - k_{11}(H_2O)(MAG) + k_{12}(Gly)(AGL) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dGly}{dt} = & -k_1(Gly)(TAG) + k_2(DAG)(MAG) - k_3(Gly)(DAG) + k_4(MAG)^2 \quad (11) \\ & + k_{11}(MAG)(H_2O) - k_{12}(Gly)(AGL) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dAGL}{dt} = & k_7(TAG)(H_2O) - k_8(DAG)(AGL) + k_9(DAG)(H_2O) \quad (12) \\ & - k_{10}(MAG)(AGL) + k_{11}(H_2O)(MAG) - k_{12}(Gly)(AGL) \end{aligned}$$

$$\frac{dH_2O}{dt} = -k_7(TAG)(H_2O) + k_8(DAG)(AGL) - k_9(DAG)(H_2O) + k_{10}(MAG)(AGL) - k_{11}(MAG)(H_2O) - k_{12}(Gly)(AGL) \quad (13)$$

em que $k_i = K_i^*[E_t]$, sendo $i = 1, \dots, 12$ e $[E_t]$ = concentração de enzima no meio reacional (g enzima/g substratos).

Os parâmetros do modelo (k_{0i} , Ea_i/R e kd) foram estimados do ajuste dos dados experimentais através da minimização da função objetivo, como segue:

$$f = \sum_j^{NOBS} \sum_k^{Nvar} (C_{jk}^{exp} - C_{jk}^{calc})^2 \quad (14)$$

em que C_{jk}^{exp} e C_{jk}^{calc} representam as concentrações de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs experimentais e calculadas pelo modelo (Equações 2 a 7), expressas em fração mássica percentual em base livre de solvente, água e glicerol. *NOBS* refere-se ao número de observações experimentais e *Nvar* o número de variáveis usadas na regressão (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs).

Um programa computacional foi desenvolvido para o procedimento de estimação dos parâmetros utilizando o software Matlab 7.0. A subrotina “ode23s” (ferramenta da biblioteca do Matlab 7.0) foi usada para a resolução das equações diferenciais. Para a estimação de parâmetros cinéticos da reação foi empregado o Método de estocástico Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization*) [23] e a subrotina de otimização “fmincon” (ferramenta da biblioteca do Matlab 7.0) foi implementada para a minimização da função objetivo.

3 Resultados e discussão

3.1 Análise das soluções de calibração

As equações obtidas com as curvas padrões (concentração *versus* área) para cada componente foram:

$$y = 0,0000325.x; y = 0,0000513.x; y = 0,0000634.x; y = 0,0000434.x;$$

respectivamente para MAGs, DAGs, TAGs e AGLs, em que y = concentração (mg/L)

e $x = \text{Área (UA)}$. O resultado encontrado para cada composto era dividido pela concentração inicial da amostra e multiplicado por 100, obtendo-se, assim, resultados em porcentagem do componente em relação à massa total da amostra (% m/m). Em relação ao glicerol, optou-se por determiná-lo por diferença entre a massa total e a soma dos demais constituintes.

3.2 Desenvolvimento do modelo e determinação dos parâmetros cinéticos

Foi adicionado ao modelo um termo de desativação enzimática pelo excesso de glicerol ao longo da reação [24]. Para o cálculo desta desativação, definiu-se primeiramente, a atividade da enzima que é representada pelo termo “ a ”, e é definida como a relação entre a concentração de enzima ativa ($[E_{act}]$) e o total da concentração de enzima ($[ET]$), como segue:

$$a = [E_{act}]/[ET] \quad (15)$$

Para representar a sensibilidade da reação de glicerólise em relação à variação da temperatura (T), constantes da velocidade aparente (K_i) foram expressas em termos de temperatura por uma equação tipo Arrhenius (Equação 16):

$$k_i = k_{0i} \cdot \exp\left(\frac{-Ea_i}{RT}\right) \quad i = 1, \dots, 12 \quad (16)$$

em que k_i ($i = 1, \dots, 12$) = constantes de velocidade aparente (mol/(g.min)); k_{0i} ($i = 1, \dots, 12$) = fatores pré-exponenciais (mol/(g.min)); Ea_i/R ($i = 1, \dots, 12$) = parâmetros de energia.

Um fator empírico de redução da atividade enzimática foi proposto para descrever a desativação da enzima em função da concentração do glicerol no meio reacional, a qual segundo Fogler [25] pode ser expressa como a equação 17:

$$\frac{da}{dt} = -kd \cdot a^n \cdot [G]^q \quad n = 1 \text{ ou } 2; \quad q = 1 \text{ ou } 2 \quad (17)$$

em que k_d = constante de redução da atividade enzimática $((\text{min.mol}_{\text{glicerol}})^{-1})$; a = termo relacionado à atividade residual da enzima; $[G]$ = concentração de glicerol $(\text{mol/g}_{\text{substrato}})$; n = ordem da redução da atividade da enzima e q = ordem da redução da atividade enzimática relacionada com a concentração de glicerol.

No início da reação o valor de a é assumido ser unitário ($a = 1$). A determinação de n e q está detalhada no estudo de Kruger [24], onde se fixou $n = 2$ e $q = 1$. Os parâmetros estimados pelo modelo cinético proposto para esta abordagem encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Constantes cinéticas obtidas na modelagem dos dados experimentais

i	$Ea_i / R(K)$	$K_i (\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1})$
1	4.775,03	837,55
2	2.324,87	2.263,72
3	815,99	956,10
4	1.529,71	1.036,06
5	1.945,2	1.183,76
6	3.572,25	2.509,06
7	1.804,99	429,76
8	2.641,07	953,45
9	4.544,51	962,34
10	108,59	1.092,09
11	938,91	1.245,96
12	3.930,29	609,25
Valor da função f (Eq. 4.7)		630,43

Para o ajuste dos parâmetros foram utilizados os dados obtidos no estudo da cinética da glicerólise enzimática deste trabalho, compreendendo 13 conjuntos de experimentos (cinéticas), com seis a nove pontos cada conjunto, totalizando 110 pontos experimentais do conteúdo de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs.

Tabela 2. Parâmetros estimados pelo modelo cinético (Equação da redução da atividade enzimática)

$k_d (\text{min.mol}_{\text{glicerol}})^{-1}$	n	q
21,89	2	1

Para o cálculo dos valores dos desvios quadráticos médios (*rmsd*) utilizou-se a equação 18, como segue:

$$rmsd_k = \sqrt{\frac{\sum_j^{NOBS} (X_j^{exp} - X_j^{calc})^2}{NOBS}} \quad k \equiv TAG, DAG, MAG e AGL \quad (18)$$

Assim, os valores obtidos foram: $rmsd_{TAG} = 18,39$; $rmsd_{DAG} = 7,87$; $rmsd_{MAG} = 5,50$ e $rmsd = 1,59$ para TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, respectivamente.

3.3 Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico

Os resultados encontram-se em termos de fração mássica do sistema em base livre de solvente e de glicerol. Todos os experimentos foram realizados utilizando a agitação de 600 rpm, relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 e enzima imobilizada *Novozym 435*. As velocidades iniciais de formação de DAGs e MAGs e de consumo de TAGs foram calculadas para os primeiros 60 minutos de reação, os quais corresponderam à faixa linear da curva. No decorrer do item 3.3 estão discutidos os resultados obtidos para as velocidades iniciais de formação dos produtos, bem como o ajuste dos dados experimentais com o modelo desenvolvido (com os parâmetros cinéticos da tabela 1).

3.3.1 Influência da concentração de enzima imobilizada no meio reacional

Na figura 1, são comparadas três cinéticas realizadas nas mesmas condições, porém variando a concentração de enzima utilizada nas reações.

Pode ser observado, a partir das figuras 1(a) e (b), que o aumento da concentração do catalisador aumenta a velocidade da reação, o que fica evidenciado ao se observar as velocidades iniciais obtidas: 0,514 e 1,872 mmol.min⁻¹ para produção de MAGs e 0,155 e 0,394 mmol.min⁻¹ para a produção de DAGs, respectivamente para as reações com 2,5 e 10% (m/m) de enzima no meio reacional. Porém, a partir da figura 1(c) observa-se que a variação na concentração de enzima de 10 para 15% (m/m) pouco

altera o comportamento cinético, principalmente em relação ao rendimento, após 12 h de reação, em MAGs (55,6 e 56,4% (m/m), respectivamente). Observando as velocidades iniciais desta última cinética (com 15% de enzima (m/m)), os valores obtidos se aproximam aos da cinética com 10% de enzima (m/m): 2,021 e 0,501 mmol.min⁻¹ para produção de MAGs e DAGs, respectivamente.

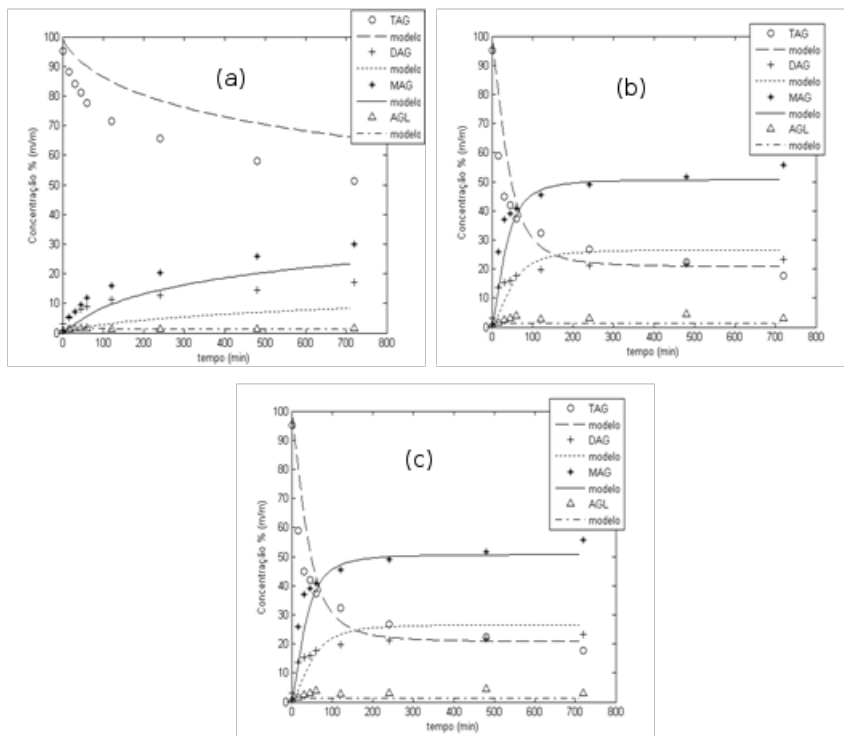


Figura 1. Modelo e dados experimentais do efeito da concentração de enzima na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1 e 70°C. Concentração de enzima (m/m): (a) 2,5%; (b) 10%; (c) 15%

Segundo Valério *et al.* [13], Yang *et al.* [21] e Damstrup *et al.* [26], a partir de uma determinada concentração de enzima, podem ocorrer limitações de homogeneidade do meio pela formação de agregados, o que afetaria a transferência de massa pela dificuldade de contato entre o sítio ativo da enzima com os substratos.

Deste grupo de experimentos, pode-se observar que o aumento da concentração de enzima de 10 a 15% (m/m) não se justifica, ou mesmo pode ser desnecessário,

uma vez que os rendimentos dos produtos finais são pouco influenciados. Em relação ao comportamento do modelo, obteve-se um ajuste satisfatório para as cinéticas utilizando 10 e 15% (m/m) de enzima e um ajuste mais pobre para a concentração de 2,5% (m/m).

3.3.2 Influência da temperatura da reação

Na figura 2, são comparadas as cinéticas realizadas em diferentes temperaturas na faixa de 40 a 70°C.

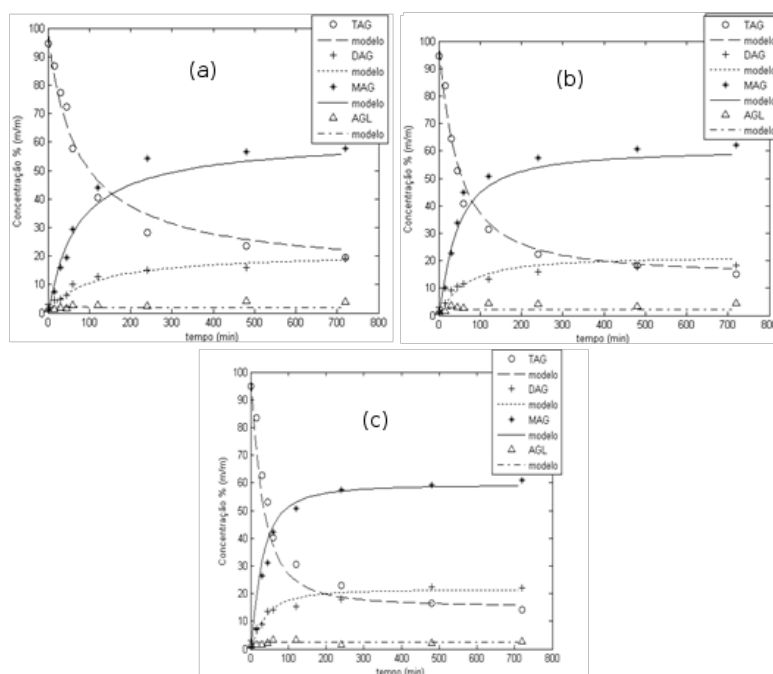


Figura 2. Modelo e dados experimentais do efeito da temperatura na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1 e 10% (m/m) de enzima. (a) 40°C; (b) 55°C; (c) 70°C

Em relação à temperatura de reação não se observa influência significativa desta na faixa de 55 a 70°C na velocidade da reação, uma vez que com duas horas de reação os rendimentos atingiram valores acima de 50% (m/m) para MAGs e acima de 13% (m/m) para DAGs para ambas as cinéticas. As velocidades iniciais foram muito próximas para as reações na temperatura de 55 e 70°C: 2,047 e 1,940 mmol.min⁻¹

para a produção de MAGs e 0,228 e 0,293 mmol.min⁻¹ para a produção de DAGs, respectivamente. A temperatura de 40°C apresentou um perfil semelhante às demais temperaturas, tendo, porém uma velocidade inicial da reação menor (1,324 e 0,187 mmol.min⁻¹ para a produção de MAGs e DAGs, respectivamente). No entanto, ao final das 12 h de reação a 40°C foi obtido um rendimento em DAGs semelhante ao experimento a 55°C (19,0 e 18,4% (m/m), para as reações a 40 e 55°C, respectivamente) e rendimento em MAGs em torno de 5 e 8% (m/m) menor que as reações a 55 e 70°C, respectivamente.

Os resultados observados na figura 2 estão de acordo com resultados encontrados na literatura sobre a temperatura de atuação da *Novozym* 435 ser entre 40 e 70°C [1, 9, 21]. Cabe enfatizar que a temperatura apresenta um papel importante no sistema reacional. Um aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e o processo de difusão entre os substratos, e assim, limitações de transferência de massa podem ser reduzidas acarretando em aumento da velocidade de reação. Por outro lado, a perda da atividade da enzima pode ser acelerada com o aumento da temperatura.

Em relação ao ajuste do modelo ao grupo de experimentos da figura 2, pode-se observar que o ajuste foi satisfatório, representando fielmente os dados do estudo.

3.3.3 Influência da relação molar de glicerol:óleo (G:O)

Na figura 3, pode-se observar a influência da relação molar de G:O de 3:1 a 9:1, utilizando 55°C, 15% (m/m) de enzima e relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 (v/v).

As cinéticas utilizando relação molar de G:O de 3:1 e 6:1 apresentaram semelhante comportamento no rendimento de DAGs ao longo da reação, inclusive com velocidades iniciais bem próximas, 0,327 e 0,360 mmol.min⁻¹, respectivamente. Por outro lado, para a relação molar de 9:1, a velocidade inicial da reação foi de 0,233 mmol.min⁻¹. É interessante observar que o rendimento de DAGs é maior quanto menor a relação molar de G:O. Ao final das 12 h de reação, para as cinéticas com relação molar 3:1 e 6:1, a concentração de DAGs é cerca de 23% (m/m) em ambas e, para a relação molar 9:1 é cerca de 13% (m/m). A indicação de que a diminuição

da concentração de glicerol aumenta a produção de DAGs vem a colaborar com o entendimento de estudos semelhantes [11, 27].

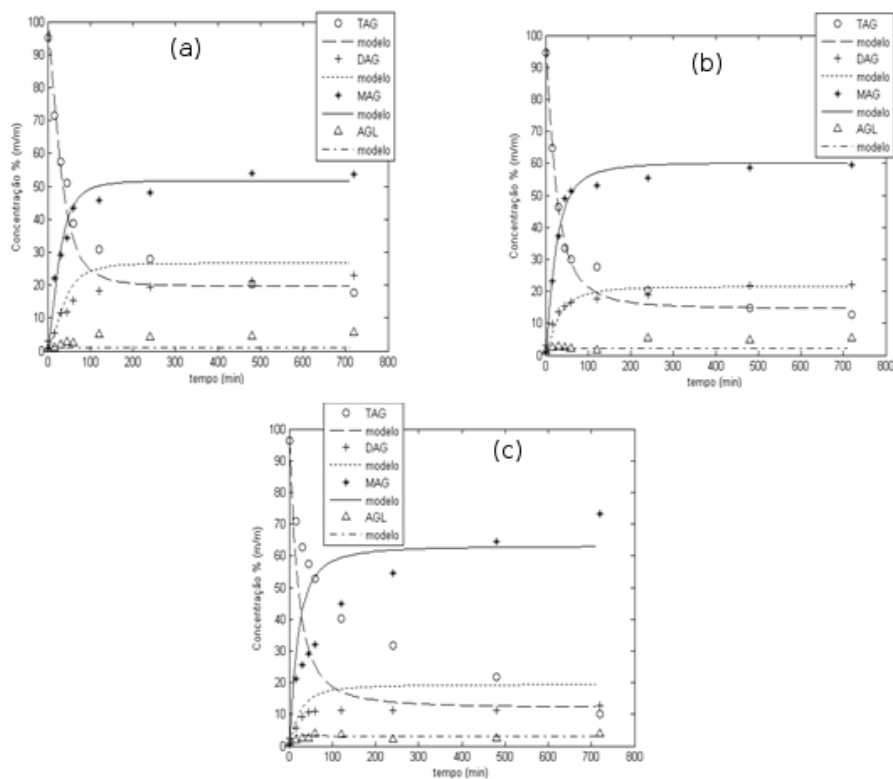


Figura 3. Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *terc-butanol*. Condições experimentais: 55°C e 15% (m/m) de enzima. Relação molar G:O: (a) 3:1; (b) 6:1; (c) 9:1

Por outro lado, o rendimento em MAGs, ao final das 12 h de reação, é influenciado pelo aumento da relação molar de G:O, cerca de 54, 64 e 73% (m/m) para as relações molares de 3:1, 6:1 e 9:1, respectivamente. Esta afirmação fica clara ao ser observado as velocidades iniciais na formação de MAGs, para as condições com 3:1 e 6:1 que foram de 1,994 e 2,351 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. A cinética utilizando a relação molar de G:O de 9:1 conduziu a uma velocidade inicial mais baixa, 1,474 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$, aparentemente pelo aumento da viscosidade do meio causada pela grande quantidade de glicerol e conseqüente diminuição da transferência de massa inicial. Porém, a partir de 8 horas de reação, o rendimento desta última re-

ação ultrapassou as outras duas cinéticas que utilizaram relação molar de G:O de 3:1 e 6:1.

Observa-se, na figura 3, que para as reações que utilizam uma relação molar de G:O de até 6:1 o modelo apresenta ajustes satisfatórios. Porém, para a relação molar de 9:1, o modelo não é capaz de correlacionar de forma adequada os dados e assim, o ajuste é prejudicado. Isto se deve aos fenômenos causados pela aderência do glicerol no suporte da enzima. Estes fenômenos envolvem as alterações na transferência de massa, a formação de aglomerados e a formação da “capa” de glicerol ao redor da enzima, entre outros. A consideração de todos estes fenômenos pelo modelo o tornaria altamente complexo.

Foram realizados dois experimentos, na presença de solvente orgânico terc-butanol e com restrição de glicerol. Isto porque simulações preliminares [26] confirmaram que a maior produção de DAGs está intimamente ligada à baixa concentração de glicerol no meio reacional. Os resultados obtidos com razões molares de G:O de 0,8:1 e 0,33:1 encontram-se na figura 4 e mostram a tendência de que quando há restrição de glicerol no meio, prioriza-se a produção de DAGs.

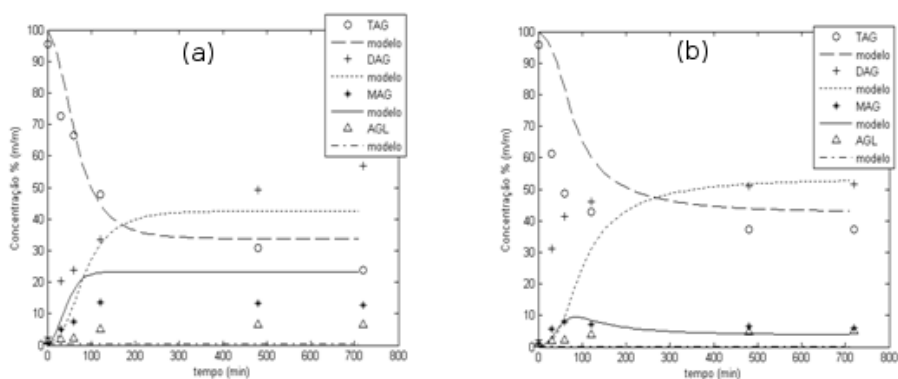


Figura 4. Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente terc-butanol. Condições experimentais: 55°C e 10% (m/m) de enzima. Relação molar G:O: (a) 0,8:1; (b) 0,33:1.

Na figura 4(a) observa-se um rendimento em DAGs em torno de 57% (m/m) ao final da reação e na condição de maior restrição de glicerol (Figura 4(b)) obteve-se

em torno de 51% (m/m) de DAGs em 8 h de reação. É interessante observar na figura 4(b) que ao final das 12 h de reação, ainda há uma quantidade significativa de TAGs (em torno de 37% (m/m)), indicando, por exemplo, se para estas condições fosse adotado um sistema de batelada alimentada e alimentando de forma controlada o glicerol, poderiam-se conseguir altos rendimentos em DAGs. Para este grupo de experimentos, não se obteve uma correlação satisfatória, principalmente para a menor concentração de glicerol, em parte justificada pelos poucos dados cinéticos disponíveis nestas condições de restrição de glicerol, comparado ao volume de dados em outras condições experimentais.

4 Conclusões

Ao final deste estudo, pode-se concluir que a relação molar de G:O é um fator seletivo, onde valores mais altos de glicerol favorecem a formação de MAGs, enquanto que valores mais baixos favorecem a formação de DAGs. Em relações molares médias de glicerol e óleo (6:1) pode-se obter a maximização da mistura de MAGs + DAGs.

O modelo desenvolvido mostrou que há uma grande dificuldade de correlacionar as reações que utilizam relação molar G:O de 9:1, provavelmente pelos fenômenos causados pela aderência do glicerol no suporte da enzima, apesar de o modelo considerar um termo de desativação da enzima pelo excesso de glicerol. Por outro lado, para todas as demais cinéticas, o modelo foi satisfatório, apesar de não considerar os complexos enzimáticos formados ao longo das reações, e por consequência ser um modelo mais simples. O modelo apresentado trouxe uma contribuição ímpar para o estudo das reações de glicerólise. Isto porque não foi encontrado, até o presente momento, outro estudo na literatura que explore a modelagem matemática da glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença de terc-butanol para a produção de MAGs e DAGs.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a URI – Campus de Erechim, RS pela infra-estrutura disponibilizada e à Empresa INTECNIAL pelo apoio financeiro.

6 Referências

- [1] DAMSTRUP, M. L.; ABILDSKOV, J.; KIIL, S.; JENSEN, A. D.; SPARSO, F. V.; XU, X. Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis. *J Agric Food Chem*, v. 54, p. 7113–7119, 2006.
- [2] RENDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E. Solvent engineering applied to lipase-catalized glycerolysis of triolein. *J Am Oil Chem Soc*, v. 78, p. 1061–1066, 2001.
- [3] BOYLE, E.; GERMAN, J. B. Monoglycerides in membrane systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 36, p. 785–805, 1996.
- [4] BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb Technol*, v. 17, p. 578–586, 1995.
- [5] CHEONG, L. Z.; TAN, C. P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A.; ARIFIN, N.; LO, S. K.; LAI, O. M. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalysed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. *Food Chem*, v. 105, p. 1614–1622, 2007.
- [6] BOYLE, E. Monoglycerides in food systems: Current e future uses. *Food Technol*, v. 51, p. 52–59, 1997.
- [7] FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELA, C. B. Produção de monoglicérides e diglicérides via glicerólise enzimática e destilação molecular. *Quím Nova*, v. 32, p. 1539–1543, 2009.
- [8] KOBLITZ, M. G. B. Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus* sp. e sua Aplicação na Síntese de Monoacilglicéris. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 2003.

- [9] FELIZARDO, P. M. G. Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura. QUERCUS – Centro de Informação de Resíduos, out/2003.
- [10] TEMELLI, F.; KING, J. W.; LIST, G. R. Conversion of oils to monoglycerides by glycerolysis in supercritical carbon dioxide media. *J Am Oil Chem Soc*, v. 73, p. 699–706, 1996.
- [11] MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F.; SOVOVÁ, H.; SALDAÑA, M. D. A. Kinetic modeling of glycerolysis-hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data. *J Supercrit Fluids*, v. 37, p. 417–424, 2006.
- [12] ESMELINDRO, A. F. A.; FIAMETTI, K. G.; CENI, G.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Lipase-catalysed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant. *J Supercrit Fluids*, v. 47, p. 64–69, 2008.
- [13] VALÉRIO, A.; FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic production of mono and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant. *J Supercrit Fluids*, v. 49, p. 216–220, 2009.
- [14] YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. *J Food Lipids*, v. 12, p. 299–312, 2005.
- [15] DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. *J Am Oil Chem Soc*, v. 82, p. 559–564, 2005.
- [16] FIAMETTI, K. G. Produção enzimática de monoglicérides a partir de óleo de oliva na presença de surfactante. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2008.

- [17] VALÉRIO, A.; KRUGER, R. L.; NINOW, J. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis olive oil in surfactant system. *J Agric Food Chem*, v. 57, p. 8350–8356, 2009.
- [18] PAWONGRAT, R.; XU, X.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem*, v. 104, p. 251–258, 2007.
- [19] NR 14.105 (European Committee for Standardization) – Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride content (Reference method), Belgium, 2001.
- [20] TAN, T.; YIN, C. The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1,3 position specific lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biochem Eng J*, v. 25, p. 39–45, 2005.
- [21] YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system. *J Agric Food Chem*, v. 53, p. 1475–1481, 2005.
- [22] FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; de D. OLIVEIRA; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in aerosol-ot surfactant. *Ind Eng Chem Res*, v. 48, p. 708–712, 2009.
- [23] FERRARI, J. C. Equilíbrio de fases líquido-líquido do sistema reacional do biodiesel metílico de soja: Dados experimentais e modelagem. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2008.
- [24] KRUGER, R. L. Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia de Alimentos, UFSC – *Campus* de Florianópolis, 2010.

- [25] FOGLER, S. H. Elements of Chemical Reaction Engineering. Ed. Prentice Hall International Editions, 3^a ed., p. 640, 1999.
- [26] DAMSTRUP, M. L.; KIIL, S.; JENSEN, A. D.; SPARSO, F. V.; XU, X. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. *J Agric Food Chem*, v. 55, p. 7786–7792, 2007.
- [27] CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. *Biochem Eng J*, v. 35, p. 71–80, 2007.

