

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

**Modificação enzimática de óleos vegetais
visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos
através do emprego de reatores de tanque
agitado e leito fixo**

Natália Bassan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Processo CNPq 446371/2014-9

Araraquara

2017

Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores de tanque agitado e leito fixo

Natália Bassan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Processo CNPq 446371/2014-9

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Bassan, Natália

B317m Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores de tanque agitado e leito fixo / Natália Bassan. – Araraquara, 2017.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciências dos Alimentos.

Orientador: Rubens Monti.

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.

1. Triglicerídeos do tipo MLM. 2. Óleo de semente de uva. 3. Óleo de algodão.
4. Reatores. I. Monti, Rubens, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 50700006

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores batelada e leito fixo

AUTORA: NATÁLIA BASSAN

ORIENTADOR: RUBENS MONTI

COORIENTADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS pela Comissão Examinadora:



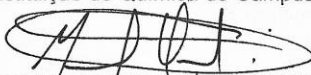
Prof. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Doutor RAFAEL RODRIGUES HATANAKA

Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, biocombustíveis, petróleo e derivados / Instituição de Química do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 28 de novembro de 2017

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter conseguido chegar até aqui.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Rubens Monti e também sou muitíssimo grata a minha Coorientadora Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, pois sem ela este trabalho não teria sido desenvolvido.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP pelo suporte e apoio no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao CNPq (Processo 446371/2014-9) pelo apoio financeiro cedido.

Agradeço ao CEMPEQC pelo apoio analítico.

Agradeço à técnica Adriana Moura pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Agradeço a todos que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, sendo algumas pessoas de suma importância para eu ter conseguido concluí-lo, são elas: o IC Cauê Garbeline Oliveira e o IC Vinícius Guerso Batista.

Finalmente, agradeço a todos que estiveram ao meu lado nesta jornada, familiares e amigos.

A todos o meu muito obrigado!

Enzima

*Existe uma enzima
dentro de mim.
Sendo enzima
quebra e constrói
e sua ausência
em meu peito dói.*

*A baixo pH
poderá se desnaturar
não quero que isto
aconteça.
Nesse sentido
hei de trabalhar.*

*Minha enzima
me enche de poesia.
Tece laços energéticos,
ataca pontos estratégicos,
me ilumina, me fermenta.
Com ela eu rio,
de tristezas esqueço.
Sinto que voo, cresço.*

*Ela não requer
energia de ativação,
o meu coração basta
para iniciar a reação.*

*Não tem porção metálica.
Não precisa de cofator.
Ela foi feita sob medida
à base de muito amor.*

*É eterna, não se acaba,
é única
e é rara.
E me é muito cara.*

*É. Existe uma enzima
dentro de mim
e eu amo
essa enzima.
(Regine Limaverde)*

Resumo

Objetivo: o presente trabalho teve como objetivo a síntese enzimática de lipídeos estruturados a partir dos óleos de semente de uva e algodão, especificamente os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM (médio:longo:médio), ou seja, aqueles que possuem ácidos graxos de cadeia média (M), em posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa (L), na posição interna da molécula de triacilglicerol. **Métodos:** fez-se a caracterização das matérias primas (óleos de semente de uva e algodão) e dos TAGs (triglicerídeos) modificados em relação aos índices de acidez, peróxido, perfil em ácidos graxos por cromatografia gasosa e determinação da posição *sn*-2. Determinou-se as atividades de hidrólise e de esterificação das lipases empregadas. Utilizou-se um planejamento de experimentos (DCCR- *Central Composite Rotatable Design*) para verificar a influência de razão molar e temperatura sobre o grau de incorporação (GI) do ácido graxo de cadeia média. Por fim fez-se a caracterização hidrodinâmica do reator de leito fixo e/ou empacotado. **Resultados:** os resultados mostraram que as matérias primas estão dentro dos padrões de especificação (0,6 mg KOH/g para acidez e 10 meq/kg para peróxido), fornecendo valores semelhantes, independentemente do óleo analisado. Os óleos foram ainda caracterizados quanto à composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa. Ambos apresentaram altas quantidades de ácidos graxos insaturados, ressaltando-se o essencial ácido linoleico (C18:2n6). Em seguida, foram efetuadas reações de acidólise, visando-se à seleção do ácido graxo e do biocatalisador. Para o óleo de uva, foram obtidos valores de grau de incorporação (GI, %) que variaram de 23,62±1,34 a 34,53±0,05%. Os melhores resultados foram obtidos empregando-se C10 como ácido graxo e a lipase Lipozyme RM IM (34,53±0,05%). Para o óleo de algodão, os melhores resultados de GI também foram obtidos empregando-se C10:0 e a lipase Lipozyme RM IM (36,63±0,23%), e o GI variou de 22,92±4,35 a 36,63±0,23%. Finalmente, realizou-se um planejamento de experimentos (DCCR) que avaliou a influência de razão molar e temperatura sobre o grau de incorporação, observando-se que apenas razão molar obteve influência significativa sobre o grau de incorporação. Com relação às reações de acidólise em leito fixo, estas foram conduzidas empregando-se tempo espacial de 1 hora, e o GI máximo foi em torno de 35% para ambos os óleos. **Conclusão:** diante do exposto, foi possível sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM a partir dos óleos de semente de uva e algodão, utilizando reatores de tanque agitado e leito fixo.

Palavras-Chave: Triglicerídeos do tipo MLM; Óleo de semente de uva; Óleo de algodão; Reatores.

Abstract

Objective: the objective of the present work was the enzymatic synthesis of structured lipids from grape and cottonseed oils, specifically the MLM type dietary triglycerides, that is, those with medium chain fatty acids (M), in positions *sn*-1 and *sn*-3, and long-chain (L), in the internal position of the triacylglycerol molecule. **Methods:** The raw materials (grape and cottonseed oils) and the modified TAGs (triglycerides) were characterized in relation to the acid, peroxide, fatty acid profile by gas chromatography and the *sn*-2 position determination. The hydrolysis and esterification activities of the lipases employed were determined. A DCCR (Central Composite Rotatable Design) was used to verify the influence of molar ratio and temperature on the degree of incorporation (ID) of the medium chain fatty acid. Finally, the hydrodynamic characterization of the fixed bed reactor and / or packaged was performed. **Results:** The results showed that the raw materials are within the specification standards (0.6 mg KOH / g for acidity and 10 meq / kg for peroxide), providing similar values regardless of the oil analyzed. The oils were further characterized for fatty acid composition by gas chromatography. Both presented high amounts of unsaturated fatty acids, emphasizing the essential linoleic acid (C18: 2n6). Then, acidolysis reactions were carried out, aiming at the selection of the fatty acid and the biocatalyst. For the grape oil, values of degree of incorporation (ID,%) ranging from 23.62 ± 1.34 to $34.53 \pm 0.05\%$ were obtained. The best results were obtained using C10:0 as fatty acid and Lipozyme RM IM lipase ($34.53 \pm 0.05\%$). For cotton oil, the best ID results were also obtained using C10 and Lipozyme RM IM lipase ($36.63 \pm 0.23\%$), and ID ranged from 22.92 ± 4.35 to $36.63 \pm 0.23\%$. Finally, an experiment planning (DCCR) was carried out, which evaluated the influence of molar ratio and temperature on the degree of incorporation, observing that only molar ratio had a significant influence on the degree of incorporation. In relation to the fixed bed acidolysis reactions, these were conducted using 1 hour spatial time, and the maximum ID was around 35% for both oils. **Conclusion:** in view of the above, it was possible to synthesize MLM type dietary triglycerides from the grape and cottonseed oils, using batch and fixed bed reactors.

Key-words: MLM-type triglycerides; Grape seed oil; Cotton oil; Reactors.

Sumário

1. Introdução	8
2. Revisão de literatura.....	12
2.1. Óleos e gorduras	12
2.2. Triglicerídeos de baixa caloria.....	14
2.3. Lipases e suas aplicações	16
2.4. Matérias-primas	18
2.5. Biorreatores enzimáticos	21
3. Proposição	26
4. Material e métodos	27
4.1. Material.....	27
4.1.1. Biocatalisadores	27
4.1.2. Matérias primas	27
4.2. Métodos.....	27
4.2.1. Determinação da atividade hidrolítica	27
4.2.2. Determinação da atividade enzimática de esterificação	28
4.2.3. Determinação de umidade dos biocatalisadores	29
4.2.4. Caracterização dos óleos de semente de uva e algodão	29
4.3. Reações de acidólise em reator de tanque agitado	29
4.3.1. Estabelecimento da metodologia de análise do produto: reação com azeite.....	29
4.3.2. Reações de acidólise para síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir dos óleos de semente de uva e algodão	30
4.3.3. Planejamento experimental (DCCR)	32
4.4. Reações de acidólise em reator de leito fixo.....	33
4.4.1. Caracterização hidrodinâmica do reator de leito fixo: distribuição do tempo de residência (DTR).....	33
4.4.1.1. Curva analítica do corante lipossolúvel	33
4.4.1.2. Teste de traçador	33
4.4.2. Reações de acidólise para síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir dos óleos de semente de uva e algodão	35
4.5. Métodos para análise dos produtos de reação.....	37
4.5.1. Separação dos triglicerídeos por neutralização dos ácidos graxos residuais	37
4.5.2. Metilação dos triglicerídeos purificados.....	37
4.5.3. Composição em ácidos graxos	38
4.5.4. Análise da posição sn-2	38
4.5.5. Determinação do grau de incorporação dos ácidos graxos (GI)	39
4.5.6. Estabelecimento da metodologia de determinação de perfil de ácidos graxo	39
5. Resultados	40
5.1. Caracterização dos óleos de semente de uva e algodão	40
5.1.1. Caracterização físico-química	40
5.1.2. Perfil em ácidos graxos	41
5.2. Atividade hidrolítica e de esterificação das lipases	44

5.3. Reações em reator de tanque agitado	45
5.3.1. Estabelecimento da metodologia de análise do produto: reação com azeite.....	45
5.3.2. Perfil de acidez em função do tempo reacional.....	47
5.3.3. Reações de acidólise dos óleos de uva e algodão em reator de tanque agitado	48
5.3.3.1 Caracterização físico-química dos triglicerídeos modificados	48
5.3.3.2. Grau de incorporação dos ácidos cáprico e caprílico	50
5.3.3.3. Determinação da posição Sn-2 dos óleos de semente de uva e algodão e seus produtos de reação.....	54
5.3.4. Planejamento experimental (DCCR)	56
5.3.4.1 Caracterização físico-química dos produtos de reação do planejamento experimental (DCCR).....	56
5.3.4.2. Grau de incorporação do planejamento experimental (DCCR).....	57
5.3.4.3. Posição sn-2	61
5.5. Estabelecimento da metodologia de determinação de perfil de ácidos graxos.....	63
5.6. Reações de acidólise em reator de leito fixo.....	64
5.6.1 Caracterização hidrodinâmica do reator: distribuição do tempo de residência ...	65
5.6.1.1. Curva de calibração do corante lipossolúvel	65
5.6.1.2. Teste de traçador	65
5.6.2. Caracterização físico-química dos triglicerídeos modificados.....	67
5.6.3. Grau de incorporação do ácido cáprico.....	69
5.6.4. Posição sn-2	73
 6. Conclusão	 75
 7. Perspectivas futuras.....	 77
 Referências	 78

1. Introdução

As exigências do consumidor por produtos mais saudáveis, associadas às novas descobertas científicas sobre os efeitos de diversos alimentos na saúde humana, têm motivado a busca por processos adequados à produção de alimentos com características específicas. Entre eles, os óleos e gorduras modificadas têm recebido especial atenção, graças à importância do consumo adequado dos mesmos na dieta visando à promoção e manutenção da saúde. São os denominados *Lipídeos Estruturados* (1), óleos e gorduras, modificados química ou enzimaticamente que apresentam propriedades nutracêuticas (2).

Dentre estes novos produtos apreciados pelos consumidores, pode-se citar os triglicerídeos do tipo MLM, que possuem ácidos graxos de cadeia média M, em posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa L, na posição interna *sn*-2 da molécula de triglicerídeo. O interesse por MLM aumentou, pois, apresentam baixa caloria e são indicados para pessoas com deficiências metabólicas. Os triglicerídeos MLM podem ser sintetizados por via química ou enzimática (3-5).

A síntese enzimática destes compostos é normalmente catalisada por lipases (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3), biocatalisadores que catalisam reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Este fenômeno é primariamente devido à sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e também à sua quimio-regio e enantiosseletividade. Estas enzimas têm sido utilizadas em diversos segmentos industriais, como

o setor alimentício, farmacológico, oleoquímico, formulação de detergentes, entre outros (6-7).

Existem muitas vantagens na produção dos lipídios estruturados por via enzimática, pois as reações catalisadas por lipases apresentam menores efeitos nocivos quando comparadas às catalisadas por agente químicos, principalmente relacionadas a não produção de subprodutos tóxicos que agredem o meio ambiente; porém a maior vantagem, do uso de lipases é a capacidade destas de incorporar ácidos graxos em posições específicas sobre o esqueleto de glicerol produzindo lipídios com melhores propriedades funcionais ou também aumentando a biodisponibilidade desta molécula (8).

No entanto, a aplicação industrial da biocatálise não é tão imediata, devido à estabilidade operacional de uma enzima depender de uma série de fatores que limitam sua utilização em escala industrial (3 ,9). É de conhecimento que a utilização de derivados enzimáticos (enzimas imobilizadas) pode favorecer a utilização industrial, pois há o aumento da estabilidade operacional da enzima assim como sua reutilização (10).

O emprego desses biocatalisadores em processos em escala laboratorial tem sido realizado em diferentes configurações de reatores. A seleção do reator mais apropriado para um dado bioprocessamento depende das características da bioconversão e de condições reacionais e cinéticas ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo (11). Existem diferentes configurações de reatores utilizadas, porém, para processos enzimáticos são utilizados principalmente

quatro tipos: o de tanque agitado (operando em modo batelada ou contínuo), os reatores de leito fixo e os de leito fluidizado (12-14).

Para as reações de acidólise em reatores de tanque agitado e leito fixo foram selecionados os óleos de semente de uva e algodão devido ao alto valor nutricional que apresentam, além de terem sido pouco explorados nestas reações visando-se à obtenção de TAGs dietéticos. O óleo de semente de uva possui alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, como o essencial ácido linoleico (58 a 78%), maior que em outros óleos como milho (34 a 66 %) e soja (48 a 59%) (15). Além de apresentar uma alta quantidade de compostos antioxidantes, como tocoferol (vitamina E), o tocotrienol e os fitosteróis, compostos possuem capacidade anti-arteriosclerótica (16-17). Além disso, atualmente existe um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria do vinho (18-19).

Com relação ao óleo de algodão, destaca-se o fato deste ser rico em vitamina E (antioxidante natural que auxilia no combate aos radicais livres), além de ser uma fonte equilibrada dos ácidos graxos essenciais ômega 3 e 6, o óleo de algodão possui boa estabilidade térmica, podendo ser utilizado amplamente em processos da indústria alimentícia (20). Vale ressaltar que a utilização do óleo de algodão contribui para a valorização da produção de algodão do pequeno produtor, uma vez que o caroço do algodão pode ser vendido para a indústria alimentícia (21-23). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a síntese enzimática de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, por acidólise de óleos vegetais, semente de uva e algodão, e

ácidos graxos de cadeia média, caprílico e/ou cáprico, em reator de tanque agitado e leito fixo.

2. Revisão de literatura

2.1. Óleos e gorduras

Óleos e gorduras são componentes essenciais da dieta humana e possuem também um amplo leque de aplicações industriais. Desempenham duas importantes funções na alimentação humana: fornecer energia e transportar agentes químicos orgânicos solúveis como os ácidos graxos essenciais, as vitaminas e os hormônios (24-25).

Os ácidos graxos podem ser de origem animal ou vegetal. Diferem entre si pelo comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, pelo número e posição de suas duplas ligações. Portanto, as propriedades físicas, químicas e nutricionais dos óleos e das gorduras dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos. Os ácidos graxos são divididos em 3 classes, os de cadeia curta que são aqueles com até seis carbonos, de cadeia média que são aqueles que possuem mais de seis carbonos e menos de doze e os de cadeia longa que são aqueles ácidos graxos que possuem mais do que doze carbonos (26).

Uma importante classe de ácidos graxos são os essenciais, aqueles que o organismo humano é incapaz de produzir, tornando-se necessária sua ingestão através da alimentação (27). Existem dois ácidos graxos essenciais, o ácido linoleico (ômega-6, C18:2) e o ácido linolênico (ômega-3, C18:3). O ácido graxo ômega 3 é encontrado principalmente nos peixes e óleos destes (28). Por outro lado, as melhores fontes alimentares de ácido graxo ômega 6 são os óleos vegetais convencionais. A importância destes ácidos graxos está na sua capacidade de se transformar em ácidos poli-

insaturados de cadeia longa, que desempenham papel fundamental no crescimento, manutenção e funcionamento de processos fisiológicos (29). Na Figura 1 estão apresentadas as fórmulas estruturais dos ácidos graxos essenciais, linoleico e linolênico.

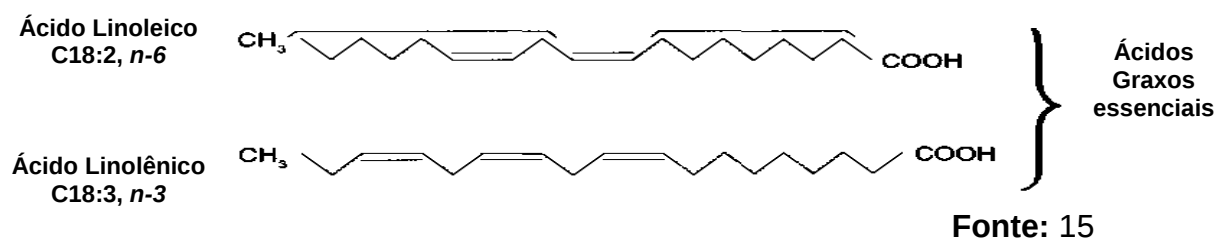


Figura 1. Fórmulas estruturais dos ácidos graxos essenciais, linoleico e linolênico.

Atualmente, muito tem se falado na síntese dos lipídeos estruturados, definidos como lipídeos que foram modificados quimicamente ou enzimaticamente (1), com o objetivo de conferir características específicas aos triglicerídeos. A síntese de lipídeos estruturados empregando lipases permite não somente modificar ou melhorar as características físicas e químicas dos óleos e gorduras, como também confere propriedades nutricionais aos triglicerídeos (30). O valor nutricional de um triglicerídeo depende tanto da composição em ácidos graxos quanto da distribuição posicional dos grupos acila na molécula. A composição molecular dos triglicerídeos é importante porque a biodisponibilidade depende deste fator, uma vez que apenas a composição em ácidos graxos pode não ser suficiente para definir o valor nutricional (2). A literatura relata, por exemplo, que a relação entre a ingestão de determinados tipos de ácidos graxos, através do consumo de óleos e gorduras, promove efeitos benéficos à saúde

como, a diminuição dos níveis de colesterol (LDL) e os riscos de doenças cardiovasculares (1).

Exemplos de lipídeos estruturados obtidos por modificação enzimática de óleos e gorduras, incluem os substitutos da gordura de leite humano, os substitutos da manteiga de cacau, os triglicerídeos ricos em ácidos graxos específicos (ômega 3 e 6), e os triglicerídeos de baixa caloria, chamados dietéticos (31).

2.2. Triglicerídeos de baixa caloria

Os triglicerídeos de baixa caloria são sintetizados visando-se a obtenção de aplicações nutricionais específicas, para atender à crescente necessidade de alimentos mais saudáveis (1).

Sabe-se que a posição dos ácidos graxo nas moléculas dos triacilgliceróis (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) pode ter um impacto significativo no metabolismo humano (4). Portanto, os triglicerídeos de baixa caloria podem ser de diferentes tipos: (i) SLS, um TAG (triglicerídeo) com ácidos graxos de cadeia curta, S, nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa, L, na posição interna; (ii) MLM, um TAG com ácidos graxos de cadeia média, M, nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa, L, na posição interna; e (iii) MMM, um TAG com ácidos graxos de cadeia média, M, em todas as posições da cadeia de TAG (31).

Esta classe de lipídeos estruturados apresenta menor valor calórico do que os óleos e gorduras convencionais (31). Além disso, devido o seu tamanho reduzido e maior solubilidade em relação ao ácido graxo de cadeia longa, os ácidos graxos de cadeias curta e média são transportados

diretamente para o fígado, proporcionando assim uma rápida fonte de energia (32). Adicionalmente, os monoglicerídeos restantes, como ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2, são facilmente absorvidos através da via linfática, sendo incorporados a diferentes tecidos (33-34).

Especificamente neste trabalho, propõe-se a síntese de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM. O interesse por estes TAGs aumentou recentemente, devido à sua principal característica nutricional, isto é, apresentarem baixa caloria. Portanto, são indicados para o controle da obesidade e também para as pessoas que apresentam de má absorção de gordura e outros problemas metabólicos (3-4). Podem ser administrados por via oral, através de sondas ou misturados a outros alimentos, no tratamento de pacientes que apresentam dificuldades metabólicas relacionadas a doenças como AIDS, fibrose cística, cirrose e anorexia. Também são usados em pacientes severamente desnutridos (2).

Os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM podem ser sintetizados por via química ou enzimática. Dependendo do tipo de substrato disponível, podem ser usados os seguintes métodos de produção: (i) alcoólise; (ii) acidólise e (iii) interesterificação (35).

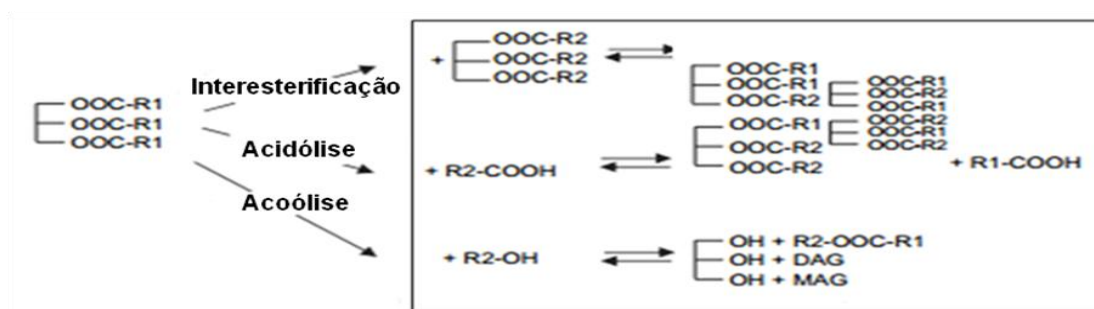
A síntese enzimática de lipídeos estruturados é normalmente catalisada por lipases 1,3 específicas. A reação de acidólise, catalisada por lipases, têm sido bastante empregada para se introduzir os ácidos graxos cáprico e caprílico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 de diferentes óleos vegetais (36-39), mantendo-se os ácidos graxos insaturados de cadeia longa na posição *sn*-2, tornando a absorção destes mais eficiente (34).

2.3. Lipases e suas aplicações

As lipases (EC 3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas para aplicações biotecnológicas. São amplamente encontradas na natureza, sendo obtidas de fontes animais, vegetais e principalmente microbiana. Vale ressaltar que a origem do biocatalisador implica diretamente em suas propriedades catalíticas (40).

Estes biocatalisadores são responsáveis pela hidrólise total ou parcial do triacilglicerol (TAG) numa interface óleo-água (41), atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula e promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (42). Como as lipases são capazes de catalisar tanto a hidrólise quanto a reação inversa, ou seja, a síntese de ésteres, os dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação), dependendo dos reagentes empregados (43).

Na Figura 2 estão apresentadas de forma simplificada as reações de interesterificação, acidólise e alcólise.



Fonte: 44

Figura 2. Esquema reacional das reações de interesterificação, acidólise e alcólise.

Além de serem os únicos biocatalisadores capazes de hidrolisar moléculas de triacilgliceróis, as lipases vem ganhando destaque por demonstrar melhor desempenho nas reações de síntese do que os processos químicos. Este fato relaciona-se a uma propriedade que só a lipase tem, que é a sua quimio-regio e enantiosseletividade, característica que possibilita a aplicação desta enzima em sínteses com alto grau de especificidade (6-7).

Com base na especificidade destes biocatalisadores, as lipases podem ser divididas em três grupos.

- Lipases não específicas: hidrolisam os triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos em qualquer uma das três posições (*sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3) (41, 45, 46).
- Lipases 1,3 específicas: hidrolisam apenas as posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triglicerídeos (41, 45, 46).
- Lipases ácido graxo específicas: catalisam a hidrólise de ésteres com ácidos graxos de cadeia longa com duplas ligações *cis* entre C-9 e C-10 (41, 45, 46).

As lipases estão sendo cada vez mais aplicadas em diversos ramos industriais, devido às grandes vantagens que tem demonstrado quando comparada sua síntese com a síntese química. São importantes catalisadores para indústria farmacêutica, na síntese de drogas que não possuem efeitos colaterais e também são amplamente utilizadas em alimentos (produtos lácteos), produção de detergentes, processamento do

couro, indústria de papel, e vem ganhando destaque a produção de forma limpa de biodiesel (47-48).

Com a ampla aplicabilidade destes biocatalisadores, as lipases vêm ganhando destaque no uso para catalisar as reações de acidólise entre óleos vegetais e ácidos graxos de cadeia média, para produzir os TAGs dietéticos, desta forma foram selecionados os óleos de semente de uva e algodão, por serem óleos ricos nutricionalmente e pouco explorados neste tipo de reação.

2.4. Matérias-primas

Com o crescimento pela busca por alimentos mais saudáveis, é que se tem explorado o uso de óleos vegetais para produção de lipídios estruturados. Alguns óleos como, soja, canola, abacate, azeite de oliva, linhaça, girassol, entre outros, estão sendo muito explorados para a síntese de triglicerídeos dietéticos, visando gerar um produto final com maior funcionalidade aos consumidores (3, 4, 5, 30, 34, 49, 50).

Para a síntese dos triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, foram selecionados os óleos de semente de uva e de algodão, justificados principalmente pelo valor nutricional e o fato de que ambos não foram ainda muito explorados na literatura em reações de acidólise visando-se à obtenção de TAGs dietéticos. Os óleos mais utilizados para síntese dos triglicerídeos do tipo MLM são os óleos de soja e oliva.

A seleção do óleo de semente de uva deve-se ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico (72 a 76%, m/m), maior que em outros óleos como girassol (60 a 62%) e soja (50 a 55%) (51-52).

Estudos têm demonstrado que o óleo de semente de uva apresenta diversas atividades farmacológicas, como propriedades contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, prevenção de trombose e doenças cardiovasculares, redução do colesterol, dilatação dos vasos sanguíneos, e regulação do sistema nervoso autônomo (51-52).

Por apresentar características tão atrativas é que a aplicação do óleo de semente de uva vem crescendo, principalmente na indústria de alimentos. Este óleo já está sendo usado como substituinte da gordura de porco em derivados cárneos (salames, mortadelas, hambúrgueres), para diminuição do colesterol, dos ácidos graxos saturados e taxa calórica nos produtos e também sendo empregado na produção de nano emulsões para encapsulação de antioxidantes instáveis, como o resveratrol (17, 53).

Além da indústria de alimentos outros ramos industriais usam o óleo de semente de uva como matéria prima de seus produtos, sendo elas a farmacêutica e a cosmética, justamente pelo fato do óleo ser rico em antioxidantes naturais. Esses compostos estão relacionados ao controle de doenças circulatórias e inibição do envelhecimento da pele devido ao estresse oxidativo causado pelos raios ultravioletas (54).

Com uma ampla gama de aplicações é do óleo de semente de uva, é importante destacar que atualmente existe um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria de vinho (55). As sementes representam em torno de 15% do resíduo sólido produzido e contêm de 14 a 17% de óleo (51, 56).

Com relação ao óleo de algodão, a seleção para este trabalho se justifica pelo fato de ser rico em antioxidantes naturais como a vitamina E (tocoferol) e o gossipol, além de ser uma fonte equilibrada dos ácidos graxos essenciais ômega 3 e 6 (21). O óleo de algodão apresenta um rendimento superior aos outros e também maior resistência à oxidação, o que permite ser utilizado por mais vezes com boa qualidade e características sensoriais aos alimentos (22).

Apesar de grande parte do óleo de algodão ter sua aplicação direcionada para a síntese de biodiesel (57), sua utilização na indústria de alimentos vem crescendo. Este óleo já está sendo usado na substituição parcial do óleo de palma na produção de cookie, sem alterar as características, físico-químicas e sensoriais do produto (58). Além disso, devido a sua estabilidade térmica, o óleo de algodão está sendo empregado em processos de fritura de alguns alimentos como substituto do óleo de soja e da gordura hidrogenada (22).

Finalmente, a utilização do óleo de algodão constitui uma forma de se agregar valor à produção de algodão do pequeno produtor, uma vez que o caroço do algodão pode ser vendido para a indústria alimentícia. Isso é importante, uma vez que pode aumentar a renda e estimular o pequeno produtor a permanecer nesta atividade agrícola (23).

Ressalta-se também que os óleos de semente de uva e algodão foram selecionados devido a estes terem sido pouco explorados para uso em reações de acidólise catalisadas por lipases.

Além da matéria prima, outro fator importante interfere diretamente nas reações enzimáticas, que é a configuração correta do biorreator a ser empregado. Para as reações de acidólise as principais configurações empregadas para a produção dos triglicerídeos dietéticos, são reatores de tanque agitado (batelada e contínuo) e de leito fixo e/ou empacotado (14).

2.5. Biorreatores enzimáticos

Industrialmente, o sucesso do emprego de enzimas não foi imediato. Estes biocatalizadores em sua forma livre são muito instáveis aos processos industriais, que na maioria dos casos envolvem condições extremas de pH e temperatura, responsáveis pela perda da atividade dos catalisadores ou desnaturação. Com o tempo técnicas para dar maior estabilidade e estas moléculas foram surgindo, e atualmente a principal delas é a imobilização (59).

A imobilização de uma enzima nada mais é que a ligação deste biocatalisador um material suporte hidrofóbico de origem conhecida. Existem diferentes métodos de imobilização enzimática, sendo os principais: confinamento, encapsulação, adsorção (ligação iônica ao suporte), ligação covalente (unipontual e multipontual) e reticulação (60). Uma enzima imobilizada tem muitas vantagens sobre um biocatalisador em sua forma livre, sendo a principais delas: estabilidade térmica, estabilidade ao pH, estabilidade a solventes e ácidos orgânicos e a reutilização do derivado imobilizado por várias vezes no processo catalítico (59, 61).

A imobilização possibilitou o emprego dos derivados imobilizados em bioprocessos realizados em biorreatores, possibilitando uma maior

quantidade de produto após a catálise. Um reator ou biorreator enzimático pode ser definido como o equipamento no qual o derivado imobilizado é colocado em contato com o substrato, em condições de pH e temperatura pré estabelecidos (62).

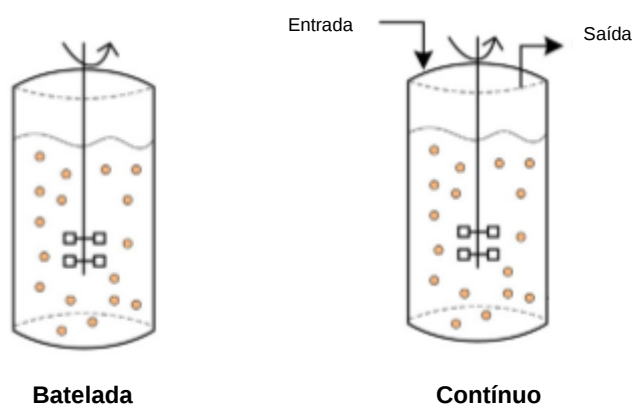
A escolha do melhor tipo de reator a ser empregado no processo depende de inúmeras condições, como as descritas por Christopher et al. (63) e Poppe et al. (14):

- Características físicas do suporte: molécula, fibra ou membrana;
- Características físicas do substrato: suspensão coloidal, fluído ou suspensão sólida;
- Condições operacionais: temperatura, pH e fluxo controlados;
- Reações químicas: reação entre suporte e substrato, possível inibição da reação enzimática por excesso de substrato e produto ou ambos;
- Substituição de biocatalizador e reativação: tempo reacional;
- Construção do biorreator: determinar a geometria e as condições hidrodinâmicas do fluído (substrato);
- Custo operacional: energia, manutenção e alimentação do biorreator;
- Modo de operação: batelada ou contínuo (específico para o tipo de processo, formato do suporte e condição física do substrato).

Existem diferentes configurações de reatores, porém, para processos enzimáticos são utilizados principalmente quatro tipos: o de tanque agitado (operando em modo batelada ou contínuo), os reatores de leito fixo e os de leito fluidizado (12-14). A seguir serão apresentados os quatro tipos de reatores e suas principais características.

• Reator de tanque agitado (batelada e contínuo): é a configuração mais simples de reator, onde substrato e enzima são colocados em contato sob agitação e temperatura controlados e tempo reacional pré-estabelecido. A separação do produto e do biocatalisador pode ser feita por diferentes formas, sendo elas, centrifugação, filtração ou decantação. As vantagens do uso desse biorreator são: alto grau de dispersão do substrato, uso de equipamentos com estrutura simples e reação de fácil controle. Já as desvantagens estão associadas à baixa taxa de conversão de substrato em produto, tempo gasto no descarregamento, limpeza e recarregamento do reator e em alguns casos, devido a agitação, cisalhamento do suporte. Porém essas desvantagens podem ser superadas operando este reator de forma contínua, colocando-se uma membrana na saída do reator e coletando o produto periodicamente (14, 59, 63, 64, 65, 66). Na Figura 3 apresenta-se de forma simples o desenho do reator de tanque agitado (batelada e contínuo).

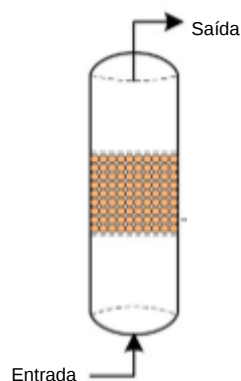
Reatores de tanque agitado



Fonte: 14

Figura 3. Representação de um tanque agitado (batelada e contínuo)

- **Reator de leito empacotado (leito fixo):** os reatores de leito empacotado são reatores de coluna. Eles recebem este nome, pois o derivado imobilizado é fixo dentro da coluna e o meio é bombeado em toda ela sob um fluxo específico o que determinará o tempo espacial deste biorreator. Os suportes utilizados neste biorreator não devem ter menos que 0,05 mm, pois a pressão precisa ser mantida estável. São reatores normalmente utilizados para reações em grande escala devido sua alta eficiência, facilidade de montagem e operação. Contudo, este tipo de reator possui algumas desvantagens, como facilidade de obstrução do leito, formação de caminhos preferenciais e ineficiência de transferência de massa e calor (67-73). Na Figura 4, apresenta-se de forma simplificada, um reator de leito empacotado, operado em modo contínuo.

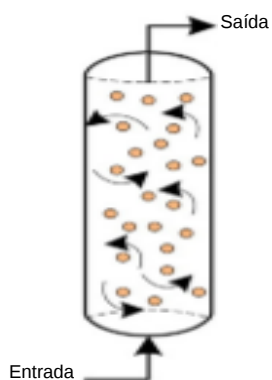


Fonte: 14.

Figura 4. Representação de um reator de leito empacotado.

- **Reator de leito fluidizado:** este tipo de reator é uma variação do reator de leito empacotado, que opera apenas no modo de fluxo ascendente. O reator de leito fluidizado é alimentado de uma forma que o fluxo movimenta as moléculas do leito (fluidiza). A expansão do leito durante as reações depende de vários fatores, sendo os principais: natureza do suporte,

velocidade do fluxo, geometria do reator e viscosidade do substrato utilizado na alimentação. A vantagem do uso deste biorreator é que neste, o leito pode ser composto por moléculas menores sem prejudicar a pressão do meio, evitando a formação de caminhos preferenciais. Para ter eficiência, este reator necessita de menor carga enzimática, porém sua maior desvantagem está relacionada ao aumento de escala ocasionando interferências na taxa de fluxo do substrato que causam efeitos inesperados sobre a taxa de conversão devido a mudanças complexas no padrão do fluxo. Na Figura 5 apresenta-se o desenho simplificado de um reator de leito fluidizado (74-77).



Fonte: 14.

Figura 5. Representação de um reator de leito fluidizado.

A produção de triglicerídeos dietéticos utilizando reatores vem sendo amplamente explorada utilizando principalmente os óleos de soja e azeite. Para a execução deste trabalho foram selecionados os reatores de tanque agitado operando em regime batelada, uma vez que esta é a mais utilizada para a produção de triglicerídeos dietéticos e o reator de leito fixo e/ou empacotado, ainda pouco explorada para este tipo de reação (4, 30).

3. Proposição

Objetivo: otimizar a síntese enzimática de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, por acidólise de óleos vegetais, semente de uva e algodão, e ácidos graxos de cadeia média, caprílico e/ou cáprico, em reator de tanque agitado. E após seleção das melhores condições reacionais realizar reações em reator de leito fixo.

Etapas do projeto

1. Caracterizar as matérias primas e estabelecimento de metodologias de análise dos produtos de reação;
2. Selecionar o ácido graxo e do biocatalisador adequado para catalisar a síntese enzimática de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM;
3. Avaliar a influência da temperatura e razão molar ácido:óleo nas reações de acidólise em regime batelada;
4. Realizar reações de acidólise enzimática em reator de leito fixo operando em modo contínuo.

4. Material e métodos

4.1. Material

4.1.1. Biocatalisadores

As enzimas comercialmente imobilizadas utilizadas como biocatalisadores foram: Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) e Novozym 435 (*Candida antarctica*), gentilmente cedidas pela empresa Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). A lipase de pâncreas de porco foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

4.1.2. Matérias primas

Os óleos vegetais utilizados foram de semente de uva e algodão (Distriol, São Paulo, BRASIL). Os ácidos graxos utilizados foram o ácido cáprico (Merck, Darmstadt, ALEMANHA) e o ácido caprílico (Sigma Aldrich, São Paulo, BRASIL).

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da atividade hidrolítica

Foi utilizado o método titulométrico usando emulsão de azeite de oliva. A emulsão foi constituída por água:azeite de oliva:goma arábica (50%:50%:7% sobre o valor da água m/m/m). A hidrólise ocorreu na temperatura de 37 °C, sob agitação (200 rpm) em banho Dubnoff (Marconi, São Paulo, BRASIL), por 5 minutos. Para a inativação da enzima foram adicionados 10 mL de álcool:acetona:água (1:1:1v/v/v). Adicionou-se hidróxido de potássio (0,05 M) em excesso, o qual foi titulado com ácido clorídrico (0,05 M), previamente padronizado (78 modificado). Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de ácido graxo

por minuto, nas condições do ensaio. A equação 1 representa o cálculo de atividade hidrolítica.

$$A(U / g) = \frac{(V_b - V_a).M.10^6}{t.m} \quad (1)$$

Onde:

V_b = volume médio de solução de HCl utilizado nos brancos (L); V_a = o volume de HCl utilizado na amostra (L); M = molaridade da solução de HCl; m = massa de enzima (g); t = tempo em minutos de incubação da enzima no substrato.

4.2.2. Determinação da atividade enzimática de esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada pelo consumo de ácido oleico. A reação de esterificação do ácido oleico (10,1 mL) etanol (1,9 mL), ocorreu a 40 °C, sob agitação magnética (200 rpm), por 1 hora. Foram adicionados de 0,2 g de enzima ao meio reacional e alíquotas de 300 µL foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos de reação. As amostras foram diluídas em 10 mL de acetona:etanol:água (1:1:1 v/v/v). A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por método titulométrico com solução de hidróxido de sódio 0,02 M, previamente padronizada. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que consumiu 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (79).

4.2.3. Determinação de umidade dos biocatalisadores

A umidade do biocatalisador foi quantificada diretamente em balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (MARTE ID 50, São Paulo, BRASIL).

4.2.4. Caracterização dos óleos de semente de uva e algodão

Os índices de acidez (método Ca 5a-40) e peróxido (método Cd 8b-90) foram determinados de acordo com os métodos oficiais da American Oil Chemist's Society (80).

4.3. Reações de acidólise em reator de tanque agitado

4.3.1. Estabelecimento da metodologia de análise do produto: reação com azeite

Foi efetuada reação de acidólise utilizando azeite de oliva da marca Carbonell extra virgem, ácido cáprico e Lipozyme TL IM em reator de vidro, encamisado (diâmetro interno de 3 cm, altura de 6 cm), operando em regime batelada. A reação ocorreu sob temperatura de 45 °C, com agitação constante de 400 rpm, razão molar óleo:ácido (1:2), porcentagem de enzima de 5% (em relação à massa de óleo) e 30 g de meio reacional total (azeite + ácido). Este procedimento foi efetuado para fim de verificar-se a incorporação do ácido graxo adicionado, seguindo as condições estabelecidas pela literatura (4), e assim dar prosseguimento às reações de interesse, envolvendo os óleos de semente de uva e algodão, os ácidos graxos cáprico e/ou caprílico e as lipases Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435.

4.3.2. Reações de acidólise para síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir dos óleos de semente de uva e algodão

Foram efetuadas reações de acidólise entre os óleos vegetais (semente de uva e algodão) e os ácidos graxos (caprílico e/ou cáprico), em reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 3 cm, altura de 6 cm), operando em regime batelada, catalisados por três lipases comerciais imobilizadas (Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435). Na Figura 6 está apresentado o esquema reacional para obtenção dos TAGs dietéticos em reator de tanque agitado operando em batelada.

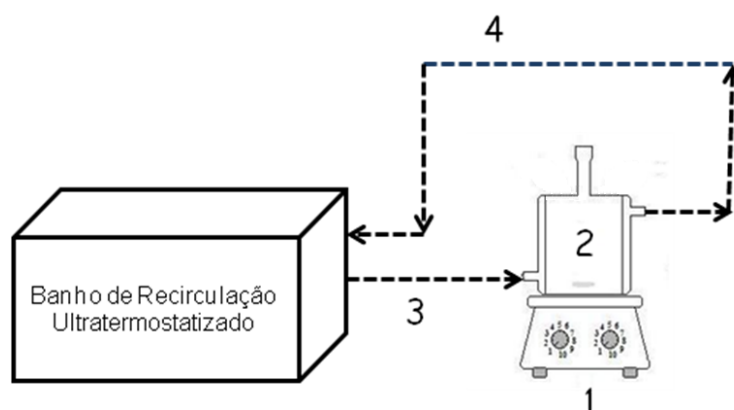


Figura 6. Esquema reacional para obtenção dos TAGs dietéticos em reator de tanque agitado operando em batelada: (1) agitador magnético; (2) reator de tanque agitado com meio reacional; (3) entrada da água de recirculação; (4) saída da água de recirculação.

As reações (30 g de meio reacional) ocorreram sob temperatura de 45 °C, com agitação constante de 400 rpm em agitador magnético com auxílio de barra magnética de 7mm de diâmetro X 20mm de comprimento, razão molar óleo:ácido (1:2) e porcentagem de enzima de 8%. Foram coletadas amostras nos tempos 0 e 24 horas, e estas foram quantificadas com relação à acidez, peróxido, composição em ácidos graxos e posição *sn*-2. A partir destes resultados, selecionou-se o ácido graxo a ser incorporado em cada um dos óleos vegetais, bem como o melhor biocatalisador para catálise das reações.

A Tabela 1 apresenta a descrição das misturas das reações de acidólise com óleo de semente de uva e algodão.

Tabela 1. Reações de acidólise com óleo de semente de uva e algodão.

Ácido graxo	Óleo	Enzima	Código
Caprílico	Algodão	Lipozyme TL IM	C8.AL.TL
Caprílico	Algodão	Lipozyme RM IM	C8.AL.RM
Caprílico	Algodão	Novozym 435	C8.AL.435
Caprílico	Uva	Novozym 435	C8.UV.435
Caprílico	Uva	Lipozyme TL IM	C8.UV.TL
Caprílico	Uva	Lipozyme RM IM	C8.UV.RM
Cáprico	Uva	Lipozyme TL IM	C10.UV.TL
Cáprico	Uva	Lipozyme RM IM	C10.UV.RM
Cáprico	Uva	Novozym 435	C10.UV.435
Cáprico	Algodão	Novozym 435	C10.AL.435
Cáprico	Algodão	Lipozyme TL IM	C10.AL.TL
Cáprico	Algodão	Lipozyme RM IM	C10.AL.RM

4.3.3. Planejamento experimental (DCCR)

Após a seleção do melhor sistema reacional (óleo:ácido e lipase), avaliou-se a influência da razão molar (RM) óleo: ácido caprílico (ou cáprico) e da temperatura (T) na reação de acidólise, visando-se otimizar as condições reacionais que maximizem a incorporação de ácido caprílico (ou cáprico). Foi empregado um planejamento central composto rotativo (DCCR-Central Composite Rotatable Design) constituído por uma matriz fatorial 2^2 , (níveis +1 e -1), complementada com quatro ensaios dos pontos axiais e a repetição do ponto central (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz codificada e decodificada do planejamento da reação de acidólise (DCCR), em função da temperatura (T) e da razão molar óleo/ácido (RM).

Exp.	Etapa	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
		T	RM	T	RM (óleo:ácido)
1	Planejamento fatorial 2^2	-1	-1	45	1:2
2		-1	+1	45	1:6
3		+1	-1	65	1:2
4		+1	+1	65	1:6
5	Região axial	-1,41	0	41	1:4
6		+1,41	0	69	1:4
7		0	-1,41	55	1:1
8		0	+1,41	55	1:7
9	Ponto central	0	0	55	1:4
10		0	0	55	1:4
11		0	0	55	1:4

Assumiu-se como resposta o grau de incorporação de ácido cáprico ao óleo de semente de uva. Os resultados experimentais obtidos foram tratados com o auxílio do programa Statistica, Statsoft, Tulsa, versão 6. O

modelo polinomial ajustado aos resultados experimentais foi validado através da realização de ensaios independentes, com diferentes valores de temperatura e razão molar, dentro do intervalo experimental considerado no estudo.

4.4. Reações de acidólise em reator de leito fixo

4.4.1. Caracterização hidrodinâmica do reator de leito fixo: distribuição do tempo de residência (DTR)

4.4.1.1. Curva analítica do corante lipossolúvel

Foi necessário a construção de uma calibração para a mistura (óleo+corante) lipossolúvel de Corante verde MIX. Foram preparadas soluções com concentrações distintas, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. As concentrações foram (g/L): 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0. Com os resultados da média das absorbâncias, construiu-se um gráfico relacionando a absorbância com a concentração do traçador.

4.4.1.2. Teste de traçador

A caracterização da mistura no reator foi realizada a partir da determinação da dispersão axial, conforme Zanin (83). O desvio do comportamento ideal do escoamento do fluido no reator foi determinado através da curva de distribuição de concentração no fluxo de saída, usando-se teste de traçador tipo pulso. O traçador utilizado foi uma solução de corante lipossolúvel (corante verde, grau alimentício da marca MIX).

Foram realizados diferentes testes, com massa de suporte (4, 5, 6 e 7 g), vazão (0,14 e 0,36 mL/min.) e concentração (0,5, 1 e 5%) de traçador variados. As condições que se apresentaram ideais foram as que utilizaram 6 g de suporte, vazão de 0,36 mL/min. e concentração de traçador de 1%. O teste foi realizado a uma temperatura de 65° C e razão molar de 1:4 óleo:ácido, sendo estas estabelecidas a partir do planejamento de experimentos (item 4.3.3). A forma de operação foi contínua, utilizando uma bomba peristáltica da marca Gilson (Gilson's MINIPULS® 3) e reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 2 cm, altura de 13 cm e volume de 40,82 mL). Inicialmente (30 min.) o reator foi operado até estabilização das condições de temperatura, vazão e altura de leito. Em seguida, foi aplicado o pulso de traçador, o qual foi injetado na linha de alimentação do reator com auxílio de uma seringa contendo 0,5 mL de uma solução com concentração conhecida (1%). Na saída do reator, foram retiradas amostras de 5 em 5 minutos, por 2 horas e 45 minutos, sendo que nas mesmas foi realizada a dosagem da quantidade de traçador pela leitura de absorbância a 415 nm , que foi convertida em concentração de corante através de uma curva “concentração versus absorbância” previamente estabelecida. Os resultados obtidos foram avaliados em um gráfico de concentração de traçador (mg/mL) em função do tempo (s), e utilizados para determinação do número de dispersão e tempo de residência (ZANIN, 1989).

Para obter o volume útil do reator fez-se o cálculo apresentado na Equação 2. Para verificar a formação de caminhos preferenciais, comparou-

se o resultado do tempo espacial teórico obtido na Equação 3, com o resultado do tempo de residência médio, calculado pela Equação 4.

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{enzima}} \quad (2)$$

Onde: V_{reator} é o volume total de reator e V_{enzima} é o volume ocupado pela enzima.

O tempo de residência teórico foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q_{\text{vol}}} \quad (3)$$

Onde: $V_{\text{útil}}$ é o volume útil de reator e Q_{vol} vazão do reator (mL/min.).

O tempo de residência médio foi calculado de acordo com Equação 4.

$$tm = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (4)$$

Onde: t é o tempo, $E(t)$ é função de distribuição de tempo de residência.

A função de distribuição do tempo de residência (DTR), foi calculada pela Equação 5.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (5)$$

Onde: $C(t)$ corresponde à concentração do traçador em um determinado tempo (t) e o denominador da equação corresponde à área sob curva $C(t) \times t$.

4.4.2 Reações de acidólise para síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir dos óleos de semente de uva e algodão

A partir do resultado de tempo de residência médio (1 hora) obtido com o teste de traçador foram efetuadas as reações de acidólise com os

óleos vegetais (semente de uva e algodão) e o ácido graxo cáprico (C10:0), utilizando-se reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 2 cm, altura de 13 cm e volume de 40,82 mL), operando em regime contínuo e fluxo ascendente com auxílio de uma bomba peristáltica da marca Gilson (Gilson's MINIPULS® 3) catalisadas pela lipase imobilizada Lipozyme RM IM. As reações ocorreram sob temperatura de 65 °C, razão molar óleo:ácido (1:4), 6 g de lipase imobilizada, vazão de 0,36 mL/min., e tempo de residência de 1 hora. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 24 horas, e estas foram quantificadas com relação à acidez, peróxido, composição em ácidos graxos e posição *sn*-2. Na Figura 7 está apresentada o esquema reacional para obtenção de TAGs dietéticos utilizando reator de leito fixo.

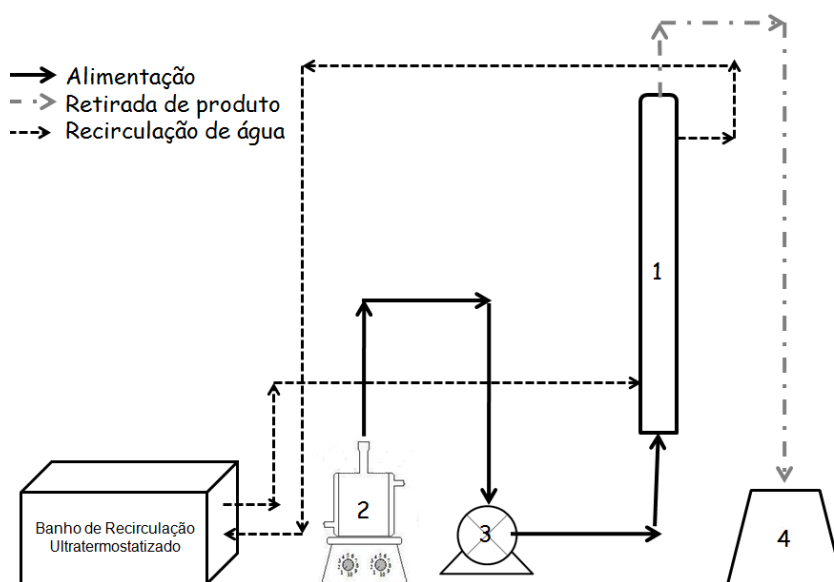


Figura 7. Sistema reacional para obtenção de TAGs dietéticos utilizando reator de leito fixo: (1) reator de coluna; (2) meio reacional de alimentação; (3) bomba peristáltica; (4) produto.

4.5. Métodos para análise dos produtos de reação

4.5.1. Separação dos triglicerídeos por neutralização dos ácidos graxos residuais

Foram pesados 1,5 g da amostra (24 h). Após, foram adicionados 30 mL de hexano e 10 mL da solução hidroalcóolica (30% etanol) de hidróxido de potássio (0,8 M). A mistura foi mantida sob agitação (500 rpm) e em seguida, foi mantida em repouso para separação de fases. A fase orgânica (superior) foi coletada, repetindo-se a extração dos triglicerídeos com hexano (10 mL) novamente. Com auxílio de um rotaevaporador, o solvente (hexano) foi extraído (40°C) e o triglicerídeo foi armazenado a baixa temperatura (6°C), para posterior metilação, análise de composição em ácidos graxos e determinação da posição *sn*-2 (34).

4.5.2. Metilação dos triglicerídeos purificados

A metilação foi realizada de acordo com ISO 12966-2 (81) modificado. Foram pesados aproximadamente 50 mg do triglicerídeos purificado (item 4.2.7 em um vial de 20 mL. Adicionaram-se 2 mL de uma solução metanólica de hidróxido de sódio (0,2 M) e aqueceu-se (80°C/15min), sob agitação vigorosa. Em seguida, a amostra foi resfriada e adicionaram-se 2 mL de uma solução metanólica de ácido sulfúrico (1 M). A amostra foi aquecida (80°C/15min), sob agitação vigorosa e posteriormente resfriada. Em seguida adicionou-se 1 mL de uma solução saturada de NaCl e 2 mL de hexano. A mistura foi agitada vigorosamente em vortex (30 segundos), sendo mantida em repouso para separação de fases. A fase superior (orgânica) foi transferida para outro vial de 20 mL, e o processo de extração com hexano

foi repetido por duas vezes. O hexano foi evaporado a 50 °C em chapa de aquecimento e o triglicerídeo metilado foi armazenado a baixa temperatura (6°C) para posterior análise em ácidos graxos.

4.5.3. Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, de acordo com o método Ce 2-66 da American Oil Chemist's Society (80).

4.5.4. Análise da posição *sn*-2

A composição em ácidos graxos na posição 2 do triaglicerídeo foi analisada de acordo com o procedimento de hidrólise por lipase de pâncreas de porco adaptado de Caballero et al. modificado (5). Em um tubo de centrífuga foram pesados 100 mg de lipase de Pâncreas de porco (LPP), adicionados 1 mL de tampão Tris (pH 8,0), 0,250 mL de sal biliar, 0,1 mL de cloreto de cálcio e por fim o triglicerídeo (100 mg). A reação se deu na temperatura de 40°C, em banho Maria, por 30 minutos. A hidrólise foi cessada com a adição de 1 mL ácido clorídrico (6M) e 1 mL éter. Após, a mistura foi centrifugada (5000 rpm/10 min) e a fase superior foi coletada e aplicada a uma placa de cromatografia de camada delgada (TLC). A placa de TLC (placa de sílica gel com indicador de fluorescência, 254 nm) foi levada para uma cuba contendo hexano, éter e ácido acético nas proporções de 70/30/1 v/v/v. Após a eluição da amostra, a placa foi revelada com uma solução alcoólica de 2,7 diclofluoresceína (0,2%) e a banda do monoglicerídeo foi raspada, estes foram extraídos adicionando-se éter etílico

(2 mL por 3 vezes) recolhendo a fase orgânica a qual foi evaporada, metilada e analisada em cromatógrafo gasoso (item 4.2.9).

4.5.5. Determinação do grau de incorporação dos ácidos graxos (GI)

O grau de incorporação (GI) foi calculado de acordo com a equação 6 (82).

$$GI(\%) = \frac{MFA}{MT} * 100 \quad (6)$$

Onde: MFA é o número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C8:0 ou C10:0) no triglicerídeo e MT é o número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo.

4.5.6. Estabelecimento da metodologia de determinação de perfil de ácidos graxo

Para estabelecimento da metodologia de determinação de perfil de ácidos graxos no Departamento de Alimentos e Nutrição, foram utilizados um mix de padrões de esteres de ácidos graxos (mix de FAMES, C₄ à C₂₅). Os testes foram realizados em um cromatógrafo a gás (PerkinElmer) utilizando-se injetor Split, detector de ionização por chama (FID) e coluna Supelcowax (L × I.D. 30 m × 0.32 mm, d_f 0.50 µm). A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, sendo o modo de injeção split (1:10), utilizando-se nitrogênio na vazão de 0,5 mL/min., como gás de arraste. A rampa de aquecimento do forno foi: temperatura inicial de 60°C até 210°C (20°C/min); a temperatura de 210°C foi mantida por 7 min., e uma taxa de aquecimento 20°C/min., foi empregada para que fosse atingida a temperatura final de 250°C, sendo esta mantida por 25 min.

5. Resultados

5.1. Caracterização dos óleos de semente de uva e algodão

5.1.1. Caracterização físico-química

Inicialmente, as matérias primas (óleos vegetais) foram caracterizadas com relação às propriedades físico-químicas e composição em ácidos graxos. Com relação às análises cromatográficas estas foram realizadas nas dependências do CEMPEQC, no Instituto de Química da UNESP. Na Tabela 3 estão expressos os resultados da caracterização físico-química dos óleos de semente de uva e algodão.

Tabela 3. Caracterização físico-química do óleo de semente de uva e algodão.

Índice	Óleo de semente de uva	Óleo de algodão
Acidez (mg KOH/g)	0,225 ± 0,021	0,280 ± 0,000
Peróxido (mEq/kg)	0,905 ± 0,148	1,320 ± 0,431

*média ±desvio padrão

Os resultados (Tabela 3) apresentados mostraram que as matérias primas estão dentro dos padrões especificados (15): 0,6 mg KOH/g para acidez e 10 meq/kg para peróxido. Os valores obtidos para os índices de acidez e peróxido foram semelhantes, independentemente do óleo analisado. A determinação destes índices é de suma importância, pois a partir destes parâmetros é que um óleo pode ser considerado como adequado para ser empregado em alimentos ou utilizado como matéria para geração de outros produtos.

O índice de acidez (Tabela 3) mostra a quantidade de ácidos graxos livres no óleo, portanto Pardo et al. (84) em seu estudo de caracterização do

óleo de semente de uva encontrou 0,37 mgKOH/g de acidez no óleo da cultivar Monastrell, valor este próximo ao do presente estudo. Isaac e Ekpa (85), em sua pesquisa sobre aplicação de óleo de algodão para produção de biopolímeros, obtiveram um índice de acidez de 1,122 mg KOH/g, maior que o encontrado.

A determinação do índice de peróxido (Tabela 3) avalia o quanto os ácidos graxos insaturados estão com suas duplas ligações rompidas. Desta forma Dalmolin et al. (86) estudando sobre o comportamento do óleo de semente de uva na presença de dióxido e de carbono e etanol, encontraram índice de peróxido de 5 mEq/Kg, resultado este superior ao obtido no presente trabalho (Tabela 3). Os resultados obtidos por Dalmolin et al. (86), encontram-se dentro do especificado pela legislação vigente, mostrando que o óleo de semente de uva possui boa estabilidade oxidativa, isso por que, este óleo é rico em compostos antioxidantes, como o tocoferol e o tocotrienol (86-88).

Com relação ao óleo de algodão, Adelola e Ndudi (89), em seu estudo de extração e caracterização do referido óleo, obtiveram um índice de peróxido de 9,25 meq/kg, valor este muito acima do apresentado (Tabela 3).

5.1.2. Perfil em ácidos graxos

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das composições em ácidos graxos dos óleos de semente de uva e algodão, empregando-se cromatografia. Ressalta-se que estas análises foram efetuadas nas dependências do CEMPEQC, no Instituto de Química da UNESP.

Tabela 4. Perfil composicional do óleo de semente de uva e de algodão

	Óleo de semente de uva	Óleo de Algodão
Ácido Graxo	%	%
C16:0	11,10	11,27
C18:0	6,72	4,83
C18:1n9	26,57	26,94
C18:2n6	46,25	50,24
C20:0	-	0,42
C20:1	-	0,02
C20:1	-	0,44
C18:3n3	3,46	4,50
C20:2	-	0,02
C20:3	2,11	0,03
C20:4	-	0,05
C22:0	1,16	-
NI*	2,63	1,24
Total	100	100

*NI = não identificados

Alguns ácidos graxos não foram identificados (NI). Além disso, ambos os óleos apresentaram altas quantidades de ácidos graxos insaturados como ácido oleico (C18:1n9), ressaltando-se a alta quantidade do essencial ácido linoleico (C18:2n6). Por apresentar altas quantidades dos ácidos graxos oleico e linoleico e também por sua alta quantidade de tocoferol (vitamina E), poderoso antioxidante, é que o uso do óleo de semente de uva (MM=824,10g/mol) vem ganhando destaque e sendo aplicado em diferentes setores industriais, como por exemplo nas indústrias de alimentos e cosmética. Além de possuir características químicas atrativas, este óleo

apresenta suavidade no sabor e aroma agradável, tornando sua aplicabilidade ainda mais efetiva (90-95).

A ingestão de óleos ricos nestes ácidos graxos traz grandes benefícios à saúde humana, ou seja, o consumo de óleos com grande quantidade de ácido oleico está associada à produção de oleoetanolamina, composto que promove o catabolismo e ajuda a dar saciedade na ingestão de alimentos (96). Além disso, o consumo deste ácido graxo ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares, diminuição da LDL (proteínas de baixa densidade), supressão de tumorigênese e melhora de doenças inflamatórias (97-98).

Já o consumo do essencial ácido linoleico está relacionado à redução de carcinogênese, aterosclerose, diabetes assim como promoção e auxílio na formação óssea e atua também como agente anti-inflamatório (99-100).

Estudos relatam que as quantidades de ácido oleico em óleo de semente de uva podem variar de 10 a 22% e de ácido linoleico de 60 a 75% (101-103). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, o óleo de uva empregado no presente trabalho apresenta teores de ácido oleico (26,57%) e linoleico (46,25%), respectivamente, um pouco acima e abaixo do que é relatado na literatura.

Já o óleo de algodão ($MM=852,70$ g/mol) é mais utilizado na produção de biodiesel, porém seu emprego na indústria alimentícia tem aumentado. Isso porque, este óleo possui alta estabilidade térmica, podendo ser utilizado em processos que envolvem alta temperatura, além do mais possui sabor e

odor suaves, os quais não interferem nas características sensoriais do produto final (57, 104, 105).

Alguns estudos relatam que as quantidades de ácido oleico em óleo de algodão podem variar de 11 a 16,9% e de 50 a 58% para o ácido linoleico, além de possuir quantidade considerável de tocoferol (vitamina E) (20, 106, 107). De acordo com os resultados da Tabela 4, o óleo de algodão possui alta quantidade de ácido linoleico (C18:2n6, 50,24%), além de quantidades expressivas de ácido oleico (C18:1n9, 26,94%). Portanto, a quantidade de ácido oleico presente no óleo de algodão empregado no presente trabalho foi superior ao apresentado na literatura, enquanto o teor de ácido linoleico apresentou-se adequado.

A quantidade de alguns ácidos graxos variou para ambos os óleos quando comparado os dados do presente estudo com os da literatura, mas esta variação é facilmente justificada por diversos fatores, como por exemplo: o tipo de cultivar da planta, mudanças climáticas, região cultivada, solo, entre outros (108-109). Salienta-se que os óleos empregados no presente trabalho foram adquiridos comercialmente, em grau alimentício.

5.2. Atividade hidrolítica e de esterificação das lipases

Reações de transesterificação de óleos e gorduras, dentre elas a acidólise, envolve, em nível molecular, reações sequenciais de hidrólise e esterificação (re-síntese) dos triacilgliceróis (110). Portanto, julgou-se interessante a avaliação das atividades de hidrólise e síntese (esterificação) dos biocatalisadores empregados no presente trabalho. Na Tabela 5 estão

expressos os resultados das atividades hidrolíticas das lipases durante o tempo de armazenamento.

Tabela 5. Perfil das atividades hidrolíticas de esterificação das lipases Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM.

	Lipozyme RM IM	Lipozyme TL IM	Novozym 435
Umidade (%)	5,11	7,86	6,86
Atividade Hidrolítica (U/g)*	568,09±42,45	5678,55±263,20	-
Atividade de Esterificação (U/g)	5543,87	-	6286,01

* média ± desvio padrão

Os resultados de atividade hidrolítica (Tabela 5) apresentados mostram que a maior atividade hidrolítica é da Lipozyme TL IM, sendo que a Novozym 435 apresentou atividade hidrolítica igual à zero. Com relação à atividade de esterificação (Tabela 5) dos biocatalisadores é possível observar que é inversa a hidrolítica, pois quanto maior a atividade de esterificação menor a hidrolítica e vice-versa. A lipase Lipozyme TL IM, em todos os testes realizados, sempre forneceu atividade de esterificação igual à zero.

5.3. Reações em reator de tanque agitado

5.3.1. Estabelecimento da metodologia de análise do produto: reação com azeite

Para o estabelecimento da metodologia de análise dos produtos formados na reação de acidólise, uma reação empregando-se azeite de oliva e ácido cáprico (C10) como substrato, catalisada por Lipozyme TL IM, foi efetuada. Essa reação foi conduzida nas mesmas condições da literatura (4).

O objetivo desta etapa foi avaliar se o grau de incorporação obtido estaria de acordo com a literatura, confirmando a metodologia de análise de produto empregada. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de composição em ácidos graxos do azeite de oliva sem modificação e modificado.

Tabela 6. Composição em ácidos graxos do azeite de oliva sem modificação e modificado.

	Azeite sem modificação	Azeite modificado
Ácidos graxos	%	%
C10:0	0,18	24,04
C16:0	12,35	8,96
C16:1	0,77	0,77
C17:1	0,11	0,11
C18:0	1,80	1,80
C18:1n9	71,79	55,00
C18:2n6	10,02	7,83
C20:0	0,34	0,25
C20:1	0,22	0,16
C18:3n3	0,60	0,46
C22:0	0,10	0,07
C20:3	0,09	0,14
N.I	0,42	0,40
Total	100,00	100,00

*NI = não identificados

É possível observar (Tabela 6) algumas modificações no perfil em ácidos graxos após a reação de acidólise, como por exemplo diminuição de ácido linoleico de 71,79 % para 55%. Este fato se deve a hidrólise dos ácidos graxos das posições sn-1 e sn-3 para consequente esterificação de ácido cáprico.

A partir da composição em ácidos graxos, efetuou-se o cálculo do grau de incorporação. Obteve-se grau de incorporação de ácido cáprico de

29,59%, enquanto Nunes et al. (4) obtiveram 28,80%. Portanto, os métodos empregados para análise (separação dos TAGs e perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa) são válidos e podem ser reproduzidos.

5.3.2. Perfil de acidez em função do tempo reacional

Inicialmente, com base na literatura, foi estabelecido que as reações de acidólise seriam conduzidas por 24h. Nesta etapa do trabalho, avaliou-se a acidez das amostras em diferentes tempos reacionais (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24h). Na Figura 8 estão expressos os dados da acidez (mg KOH/g de óleo) em função do tempo de reação de acidólise em azeite de oliva.

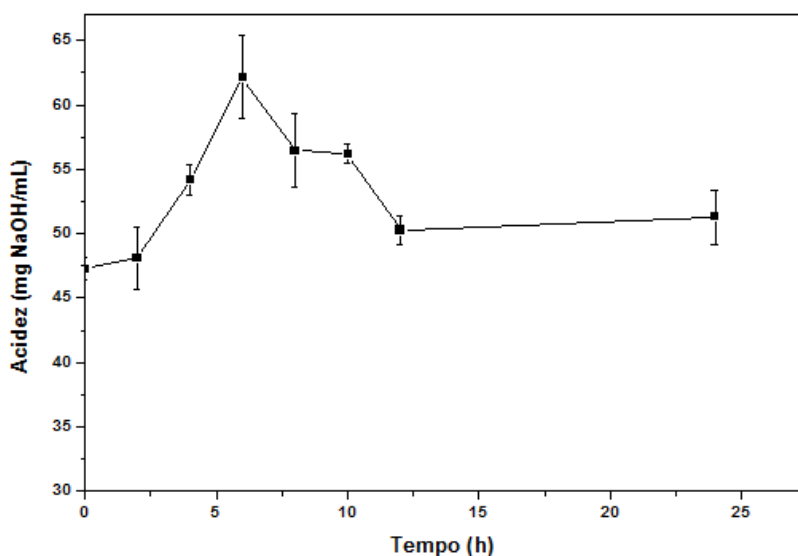


Figura 8. Perfil de acidez em função do tempo reacional utilizando azeite de oliva, ácido cáprico e lipozyme RM IM.

É possível observar que houve um pico de acidez no tempo de 6 horas, indicando uma maior liberação de ácidos graxos. A partir deste tempo reacional, a acidez sofreu decaimento, atingindo a estabilidade a partir de 12 horas de reação (aproximadamente 48mg KOH/g). Este fato está

relacionado às reações de hidrólise e de esterificação que a lipase realiza simultaneamente (110).

5.3.3. Reações de acidólise dos óleos de uva e algodão em reator de tanque agitado

Após o estabelecimento adequado das metodologias de análise e conclusão das reações iniciais com azeite de oliva, deu-se início às reações de acidólise empregando os óleos de semente de uva e algodão como substratos. Nesta etapa, foram conduzidas 12 reações com cada óleo vegetal. Foram avaliados dois ácidos graxos (ácidos cáprico e caprílico) e três lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM). Foram realizadas análises de determinação dos índices de acidez e peróxido bem como de perfil em ácidos graxos. Os resultados são apresentados a seguir.

5.3.3.1 Caracterização físico-química dos triglicerídeos modificados

Na Tabela 7 estão apresentados os índices de acidez das misturas dos ácidos graxos (caprílico ou cáprico).

Tabela 7. Índices de acidez das misturas dos óleos de semente de uva e algodão com os ácidos graxos (caprílico ou cáprico).

Índice de Acidez (mg KOH/g)*		
	Óleo de semente de uva	Óleo de algodão
Ácido caprílico	118,61 ± 1,07	118,79 ± 0,84
Ácido cáprico	123,07 ± 0,75	121,91 ± 1,62

*média±desvio padrão

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química dos produtos de reação, os triglicerídeos modificados.

Tabela 8. Caracterização físico-química dos triglicerídeos modificados.

Triglicerídeos Modificados*	Índice de Acidez (mg KOH/g)**	Índice de Peróxido (mEq/Kg)**
C8.AL.TL	143,30 ± 1,13	2,73 ± 0,00
C8.AL.RM	142,71 ± 0,58	1,03 ± 0,28
C8.AL.435	138,55 ± 0,14	1,48 ± 0,15
C8.UV.435	131,12 ± 0,92	1,34 ± 0,24
C8.UV.TL	133,43 ± 0,14	3,15 ± 0,00
C8.UV.RM	131,54 ± 0,73	1,04 ± 0,02
C10.UV.TL	128,25 ± 1,40	2,41 ± 0,41
C10.UV.RM	119,52 ± 0,29	0,33 ± 0,07
C10.UV.435	122,04 ± 1,02	0,44 ± 0,12
C10.AL.435	128,56 ± 2,52	0,53 ± 0,00
C10.AL.TL	135,20 ± 5,41	1,90 ± 0,09
C10.AL.RM	129,98 ± 0,00	0,27 ± 0,00

*código apresentado na tabela 1

**média±desvio padrão

O índice de acidez (Tabela 8) aumentou ligeiramente quando comparado com as misturas iniciais (tabela 7). Isso é facilmente explicado, pois os biocatalizadores hidrolisam os triglicerídeos do meio reacional, liberando ácidos graxos de cadeia maior, desta forma deixando a mistura levemente mais ácida.

Já o índice de peróxido (Tabela 8) sofreu pequenas modificações na faixa de 0,33 a 3,15 (mEq/Kg) para óleo de uva e de 0,27 a 2,73 (mEq/Kg) para óleo de algodão, revelando que a oxidação do meio reacional foi mínima nestas condições (temperatura de 45°C).

5.3.3.2. Grau de incorporação dos ácidos cáprico e caprílico

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os perfis em ácidos graxos das reações de acidólise com óleo de algodão e semente de uva, respectivamente.

Tabela 9. Perfis em ácidos graxos das reações de acidólise com óleo de algodão

Ácidos graxos	Amostras (%) [*]					
	C8.AL.TL	C8.AL.RM	C8.AL.435	C10.AL.435	C10.AL.TL	C10.AL.RM
C8:0	11,41±2,75	15,94±1,78	12,89±1,20	-	-	-
C10:0	0,04±0,00	0,3±0,00	0,02±0,00	20,41±2,85	16,85±1,87	26,78±0,90
C14:0	-	-	0,03±0,00	-	-	0,02±0,00
C16:0	9,61±0,40	6,60±0,58	8,20±0,59	7,72±0,00	2,69±0,38	5,18±0,54
C16:1	0,05±0,00	-	0,02±0,01	0,04±0,00	-	0,04±0,00
C17:0	0,05±0,00	-	0,04±0,00	0,04±0,01	-	0,02±0,00
C17:1	0,03±0,00	-	-	0,02±0,00	-	0,02±0,00
C18:0	3,41±0,06	2,38±0,18	2,15±0,34	2,96±0,26	2,98±0,23	1,82±0,24
C18:1n9	20,48±0,70	20,73±0,06	21,69±0,20	19,86±2,79	19,48±1,14	18,27±0,33
C18:2n6	48,82±1,69	49,49±0,66	50,23±0,35	46,62±4,28	46,46±2,27	44,34±0,49
C18:3n3	5,22±0,09	5,09±0,04	5,44±0,09	5,11±0,60	5,02±0,27	4,41±0,05
C18:3n6	0,22±0,00	-	0,22±0,00	0,21±0,02	0,27±0,00	0,19±0,01
C20:0	0,29±0,00	0,20±0,00	0,22±0,02	0,23±0,01	0,23±0,02	0,17±0,02
C20:1	0,33±0,01	0,34±0,01	0,30±0,00	0,30±0,04	0,33±0,03	0,29±0,02
C21:0	-	-	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
C20:2	0,02±0,00	-	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
C22:0	0,36±0,01	0,28±0,00	0,28±0,03	0,30±0,02	0,29±0,03	0,23±0,03

^{*}média±desvio padrão

Tabela 10. Perfis em ácidos graxos das reações de acidólise com óleo de semente de uva.

Ácidos graxos	Amostras (%)*					
	C8.UV.435	C8.UV.TL	C8.UV.RM	C10.UV.TL	C10.UV.RM	C10.UV.435
C6:0	0,22±0,00	-	-	-	-	-
C8:0	15,55±0,34	13,90±0,74	20,05±1,07	0,08±0,00	0,01±0,00	-
C10:0	0,05±0,00	0,03±0,00	-	18,49±0,80	24,61±0,03	16,65±0,90
C14:0	-	-	0,02±0,01	0,03±0,00	0,02±0,00	-
C16:0	8,80±0,15	8,97±0,06	5,93±0,04	8,03±0,00	5,55±0,14	7,97±0,13
C16:1	0,05±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
C17:0	-	-	0,04±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00
C17:1	0,04±0,00	-	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	-
C18:0	3,16±0,05	3,19±0,06	2,10±0,30	2,90±0,08	1,95±0,00	2,84±0,05
C18:1n9	21,27±0,37	20,97±0,98	19,30±0,18	19,70±0,25	18,42±0,01	19,79±1,01
C18:2n6	48,37±0,81	47,30±1,35	46,90±0,92	44,45±0,49	44,16±0,44	46,17±0,89
C18:3n3	5,14±0,09	5,17±0,06	4,73±0,05	4,83±0,18	4,44±0,00	4,98±0,25
C18:3n6	0,22±0,00	0,021±0,00	0,20±0,00	0,20±0,00	0,19±0,01	0,21±0,00
C20:0	0,23±0,00	0,25±0,01	0,19±0,00	0,23±0,02	0,18±0,00	0,23±0,01
C20:1	0,27±0,00	0,31±0,03	0,31±0,01	0,30±0,04	0,29±0,013	0,33±0,02
C21:0	-	-	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	-
C20:2	-	0,02±0,00	-	-	-	-
C20:4	0,13±0,02	-	-	-	-	-
C22:0	0,27±0,02	0,32±0,02	0,25±0,00	0,29±0,03	0,23±0,01	0,29±0,01
C24:0	0,13±0,02	-	-	-	-	-

*média±desvio padrão

A partir da composição em ácidos graxos, foram calculados os valores de grau de incorporação dos ácidos cáprico e caprílico nos óleos de algodão e semente de uva. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Grau de incorporação dos ácidos cáprico e caprílico nos óleos de algodão e semente de uva.

Código*	GI (%)**
C8.AL.TL	22,92 ± 4,35
C8.AL.RM	26,49 ± 2,17
C8.AL.435	21,80 ± 3,12
C8.UV.435	25,24 ± 0,00
C8.UV.TL	23,62 ± 1,34
C8.UV.RM	32,64 ± 1,42
C10.UV.TL	26,88 ± 1,11
C10.UV.RM	34,53 ± 0,05
C10.UV.435	24,47 ± 2,94
C10.AL.435	28,83 ± 2,63
C10.AL.TL	24,73 ± 2,02
C10.AL.RM	36,63 ± 0,23

*código apresentado na tabela 1

*média±desvio padrão

De acordo com os resultados das Tabelas 9 e 10, observa-se que a reação de acidólise promoveu alterações no perfil composicional de ácidos graxos. Comparando-se a composição em ácidos graxos dos óleos (Tabela 3) e dos produtos acidificados (Tabelas 9 e 10), observam-se diminuições na porcentagem dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9) e linoleico (C18:2n6), independentemente do óleo empregado. Esta diminuição está relacionada à incorporação dos ácidos de cadeia média (C8:0 e C10:0), uma vez que estes ácidos graxos foram quantificados apenas nos produtos, não estando presentes nas matérias primas. Quanto aos demais ácidos graxos, pouca ou nenhuma variação foi observada.

A partir da composição em ácidos graxos, foram calculados os valores de grau de incorporação dos ácidos cáprico e caprílico nos óleos de algodão e semente de uva (Tabela 11). O grau de incorporação máximo é de

66, 33%, uma vez que a incorporação dos ácidos graxos só ocorre nas posições *sn* - 1 e *sn* - 3, uma vez que estas reações foram catalisadas por lipases 1, 3 específicas.

Para o óleo de uva, foram obtidos valores de GI que variaram de $23,62 \pm 1,34$ a $34,53 \pm 0,05\%$. Os melhores resultados obtidos foram, empregando-se C10:0 como ácido graxo de cadeia média e a lipase Lipozyme RM IM. Para o óleo de algodão ocorreu o mesmo, ou seja, os melhores resultados de GI foram com C10 e a lipase Lipozyme RM IM, sendo que os valores de GI variaram de $21,80 \pm 3,12$ a $36,63 \pm 0,23\%$. Nunes et al. (3) obtiveram um grau de incorporação (27,1%) menor que o do presente trabalho utilizando a Lipozyme RM IM, azeite de oliva e ácido cáprico. O mesmo não aconteceu com a Lipozyme TL IM e a Novozym 435, pois os resultados do presente trabalho estão próximos aos descritos por Nunes et al. (3) 28,8% e 30,4% respectivamente. Caballero et al. (5) assim como no presente trabalho obteve maior grau de incorporação utilizando a Lipozyme RM IM, porém em seu trabalho ele utilizou óleo de abacate e ácido caprílico. O GI alcançado foi de 29,2%, resultado este, próximo ao do presente trabalho quando utilizou-se este mesmo ácido graxo.

A Lipozyme RM IM forneceu melhor desempenho de incorporação ($36,63 \pm 0,23\%$ para o óleo de algodão e $34,53 \pm 0,05\%$ para o óleo de semente de uva), pois, diferentemente dos outros biocatalisadores possui atividade hidrolítica e de esterificação (Tabela 5). Além do mais a maior incorporação do ácido cáprico (C10:0) se deve ao fato de este possuir uma cadeia carbônica mais longa, em comparação ao ácido caprílico (C8:0). Isso

porque, a literatura relata que a especificidade desta lipase está diretamente relacionada ao tamanho da cadeia dos ácidos graxos, sendo a enzima apresenta preferência por ácidos graxos de maior cadeia carbônica. (5, 111, 112).

5.3.3.3. Determinação da posição *Sn-2* dos óleos de semente de uva e algodão e seus produtos de reação

Na Figura 9 é possível observar a separação das camadas de monoglicerídeo, diglicerídeo, ácido e triglicerídeo. Considerando-se que os melhores resultados de grau de incorporação nas reações de acidólise foram utilizando o ácido graxo de cadeia média C10:0 e lipase Lipozyme RM IM para ambos os óleos, os produto modificados obtidos foram avaliados quanto aos ácidos graxos presentes na posição *sn-2* do triacilglicerol.

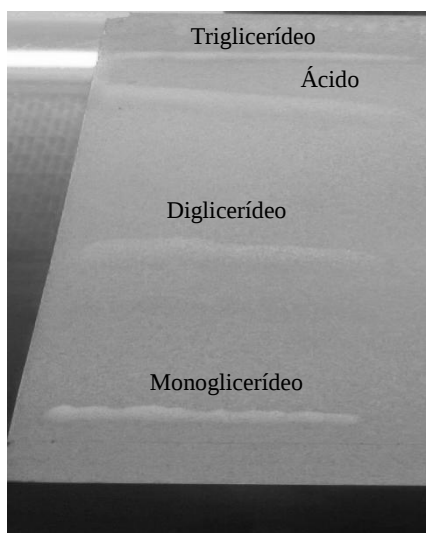


Figura 9. Exemplo de separação de monoglicerídeo por cromatografia em camada delgada (TLC), empregando-se padrões cromatográficos de ácido, mono, di e triglicerídeos.

Na Tabela 12 estão expressos os resultados obtidos da determinação da posição Sn-2 dos óleos de semente de uva e de algodão e dos produtos de reação que obtiveram os melhores graus de incorporação.

Tabela 12. Perfil composicional da posição sn - 2 dos óleos de semente de uva e de algodão e dos produtos de reação de ambos utilizando C10:0 e Lipozyme RM IM .

	Óleo de semente de uva	Óleo de semente de uva modificado	Óleo de algodão	Óleo de algodão modificado
Ácidos Graxos	%	%	%	%
C10:0	-	3,36	-	3,58
C16:0	2,89	2,19	2,87	2,35
C18:0	0,90	0,89	0,89	0,92
C18:1n9	28,15	24,33	32,24	31,54
C18:2n6	63,23	63,56	60,78	57,43
C18:3n3	4,83	5,03	3,32	4,14
NI*	-	0,64	-	0,03
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

*NI = não identificados

É possível observar (Tabela 12) que grande parte dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa presentes na matéria prima ocupam a posição sn-2 do triglicerol. Após a acidólise dos óleos, o perfil composicional desta posição foi praticamente inalterado. A posição 2 ser mantida já era um resultado esperado, uma vez que se empregou uma lipase sn-1,3 regio-seletiva (113). Sabe-se que esta conformação de TAG garante uma melhor absorção de ácidos graxos de cadeia longa (oleico e linoleico), já que a ingestão dos mesmos está associada à prevenção de doenças como, por exemplo, as doenças cardíacas, doenças relacionadas à má absorção lipídica, doenças inflamatórias, câncer, entre outras (114, 34).

Além disso, observa-se uma pequena incorporação de C10:0 nesta posição o que pode estar relacionado à acilmigração deste ácido graxo. Segundo Wang et al. (34) que realizaram um estudo da influência do aumento da temperatura sobre o processo de acilmigração no qual concluíram que a migração estava associado ao aumento de temperatura, ou seja quanto maior a temperatura empregada, maior a chance do ácido graxo de cadeia média migrar para a posição 2 do triglicerídeo.

5.3.4. Planejamento experimental (DCCR)

5.3.4.1 Caracterização físico-química dos produtos de reação do planejamento experimental (DCCR)

Na Tabela 13 estão expressos os resultados da caracterização físico-química dos produtos gerados no planejamento de experimentos.

Tabela 13. Caracterização físico-química dos produtos gerados no planejamento de experimentos (DCCR)

Planejamento (DCCR)	T (°C)	RM (óleo: ácido)	Índice de acidez (mg KOH/g)*	Índice de peróxido (mEq/Kg)*
1	45	1:2	124,75 ± 0,59	0,45 ± 0,05
2	45	1:6	164,56 ± 1,24	0,88 ± 0,05
3	65	1:2	140,69 ± 3,40	9,18 ± 0,04
4	65	1:6	174,33 ± 1,36	9,05 ± 0,22
5	41	1:4	129,84 ± 0,16	0,42 ± 0,02
6	69	1:4	196,58 ± 1,95	26,13 ± 0,92
7	55	1:1	131,90 ± 2,18	4,82 ± 0,30
8	55	1:7	189,99 ± 4,91	5,48 ± 0,12
9	55	1:4	162,64 ± 2,46	5,70 ± 0,04
10	55	1:4	163,70 ± 1,75	5,95 ± 0,27
11	55	1:4	163,50 ± 0,33	6,34 ± 0,25

*média±desvio padrão

O índice de acidez foi maior quando se utilizaram razões molares maiores, porém isto já era esperado, pois, nem todo o ácido graxo foi

incorporado, além disso é visto que quanto mais ácido graxo oferecido no meio reacional houve um maior GI (Tabela 14) e consequentemente maior hidrólise e liberação de outros ácidos graxos no meio.

O contrário aconteceu com o índice de peróxido, que aumentou quando se utilizou temperaturas mais elevadas, dando destaque para 69°C, que forneceu um índice de $26,13 \pm 0,92$ mEq/Kg, resultado este muito acima do especificado pela FAO (15) que é de 10 mEq/Kg. Um índice de peróxido elevado indica que óleo sofreu oxidação devido alguns fatores, sendo os principais deles, processos que envolvem temperaturas elevadas, oxigênio no meio e presença de luz. Além disso, a presença de ácidos graxos poli-insaturados no óleo de semente de uva pode ter facilitado o processo oxidativo (115-116). Este processo consiste na quebra das duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados, formando os hidroperóxidos, que serão novamente quebrados e formam assim produtos de peso molecular menor, como aldeídos, alcoóis e cetonas, que geram sabor e odor desagradáveis ao produto (117). Vale ressaltar, que além prejudicar as características sensoriais dos produtos, estes compostos também são nocivos a saúdes, estando a associados ao aparecimento de doenças cardíacas e câncer (118).

5.3.4.2. Grau de incorporação do planejamento experimental (DCCR)

Foram obtidos os valores de grau de incorporação nos 5 diferentes níveis testados para a temperatura e a razão molar. A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento e o grau de incorporação de ácido cáprico no óleo de semente de uva.

Tabela 14. Matriz do planejamento e grau de incorporação (GI) de ácido cáprico no óleo de semente de uva.

Planejamento (DCCR)	T	RM	GI (%)
1	-1	-1	35,91
2	-1	+1	42,79
3	+1	-1	34,40
4	+1	+1	54,36
5	-1,41	0	41,70
6	+1,41	0	47,26
7	0	-1,41	21,29
8	0	+1,41	48,45
9	0	0	38,60
10	0	0	43,72
11	0	0	41,09

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular os efeitos principais e a interação das variáveis temperatura e razão molar sobre o grau de incorporação de ácido cáprico no óleo de semente de uva. Na Tabela 15 estão apresentados os efeitos da razão molar e temperatura sobre o grau de incorporação.

Tabela 15. Efeitos principais, lineares (L) e quadráticos (Q), da temperatura(T) e da razão molar (RM), e da interação que influenciaram o grau de incorporação de ácido cáprico no óleo de semente de uva, obtido por acidólise catalisada pela Lipozyme RM IM

	Efeito	P
Efeitos Principais		
T (L)	4,48076	0,075283
T (Q)	4,43833	0,121414
RM (L)	16,31251	0,000451
RM (Q)	-5,17167	0,081991
Interação		
Temperatura x RM	6,54	0,068812

Como se pode observar a razão molar apresentou um efeito linear altamente significativo ($p < 0,001$) no grau de incorporação de ácido cáprico ao óleo de semente de uva. Contudo, os restantes efeitos lineares e quadráticos e a interação apresentaram valores de p não muito elevados e, por isso, podem ser desprezados. Os efeitos lineares positivos da temperatura e da RM indicam que o grau de incorporação aumenta com os valores destes fatores. O efeito quadrático é positivo para a T e negativo para a RM . Tal indica que o GI é descrito por uma superfície convexa, em função da temperatura e por uma superfície côncava, em função da razão molar. A interação $T \times RM$ é positiva indicando que um aumento em ambos os fatores se traduz num aumento no GI. A Figura 9 apresenta a superfície de resposta, e respectiva projeção, ajustada aos resultados experimentais. Como se pode observar, trata-se de uma superfície em forma de sela (*saddle-like surface*) que não apresenta nenhum ponto ótimo no intervalo experimental. Contudo, pode-se observar que os maiores graus de incorporação de ácido cáprico foram alcançados em temperaturas e razões molares mais elevadas.

A superfície de resposta para o GI (%) pode ser descrita pelo seguinte modelo polinomial de segundo grau (Equação 7):

$$GI = 105,26 - 2,87T + 0,022T^2 + 0,257RM - 0,646RM^2 + 0,164(T \times RM) \quad (7)$$

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) são 0,946 e 0,893, respectivamente. Tal demonstra um elevado ajuste dos modelos aos resultados experimentais.

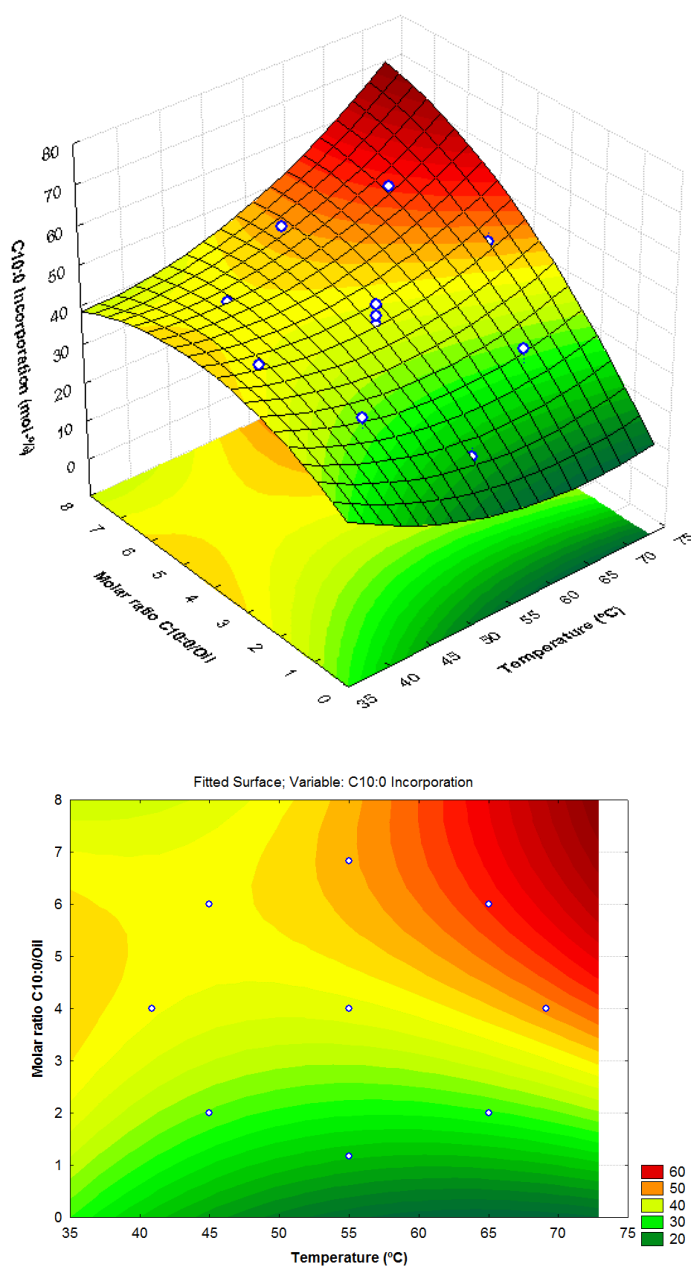


Figura 9. Superfície de resposta e respectiva projeção (B) ajustada para grau de incorporação de ácido cárpico em óleo de semente de uva, obtido por acidólise catalisada pela Lipozyme RM IM.

Após a obtenção do modelo estatístico, realizou-se um ensaio experimental empregando-se as condições reacionais que maximizavam o GI (RM = 1:7; T = 69 °C). O GI predito pelo modelo (equação 2) foi de

61,70%, e o obtido experimentalmente foi de 61,50%. Portanto, este resultado comprova que o modelo obtido no presente trabalho representa adequadamente a influencia da temperatura e da razão molar sobre o grau de incorporação das reações de acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisada com Lipozyme RM IM.

5.3.4.3. Posição *sn*-2

Para a determinação da posição *sn*-2 do planejamento de experimentos foram selecionados os pontos de validação do modelo (69°C e RM 1:7) e o ponto de melhor rendimento de incorporação (65°C e RM 1:6). Na Tabela 16 estão expressos o resultados obtidos da determinação da posição *sn*-2 do planejamento experimental.

Tabela 16. Posição *sn*-2 do ponto de melhor GI e do ponto de validação do planejamento de experimentos

	Óleo de semente de uva sem modificação	Ponto de melhor GI*	Ponto de validação do modelo**
Ácidos Graxos	%	%	%
C10:0	-	16,07	13,91
C16:0	2,89	2,81	2,57
C18:0	0,90	1,16	1,02
C18:1n9	28,15	22,97	22,72
C18:2n6	63,23	52,73	55,41
C18:3n3	4,83	4,25	4,36
Total	100,00	100	100,00

*T=65°C RM=1:6

**T=69°C RM=1:7

Partindo dos resultados obtidos (Tabela 16), é possível observar que grande parte dos ácidos graxos de cadeia longa foram mantidos na posição 2 do TAG, em ambas as reações, porém houve uma pequena diminuição de alguns ácidos graxos, principalmente dos ácidos oleico e linoleico. Além disso, o ácido graxo de cadeia média (C10:0) migrou do meio reacional para a posição 2 do triglicerídeo. A acilmigração de ácidos graxos para posição *sn*-2 é um dos grandes problemas enfrentados na produção dos triglicerídeos estruturados (119-120). Este problema está relacionado a alguns fatores, como o relatado por Liu et al (2), o uso de altas temperaturas, tempos reacionais longos e altas quantidades de ácidos graxos livres no meio.

Wang e seus colaboradores (34) confirmaram em seu trabalho a influência da temperatura com a relação ao processo de acilmigração: quanto maior a temperatura empregada (30 a 70°C) mais os ácidos graxos de cadeia média migraram para posição *sn*-2.

Desta forma explica-se o a presença de ácido cáprico na posição 2 de ambos os pontos do planejamento de experimentos, pois trataram-se de reações realizadas em altas temperaturas (65 e 69°C), longos tempos de reação (24 horas) e razões molares elevadas (1:6 e 1:7).

Embora tenha-se utilizado dois óleos vegetais diferentes (óleo de semente de uva e algodão), optou-se por realizar o planejamento de experimentos (DCCR) apenas com o óleo de semente de uva, pois ambos os óleos tem um perfil em ácidos graxos parecido. Além disso, a execução de um planejamento de experimentos demanda grandes quantidades de

matérias primas, e provavelmente, devido á semelhança composicional, os resultados obtidos seriam semelhantes. Julgou-se mais interessante dar continuidade aos experimentos, avaliando-se a reação de acidólise em reator de leito fixo.

5.5. Estabelecimento da metodologia de determinação de perfil de ácidos graxos

Na Figura 10 está apresentado o cromatograma do perfil de padrões de FAMES utilizado para padronizar o método de detecção de ésteres de ácidos graxos das amostras de TAGs (item 4.5.6.).

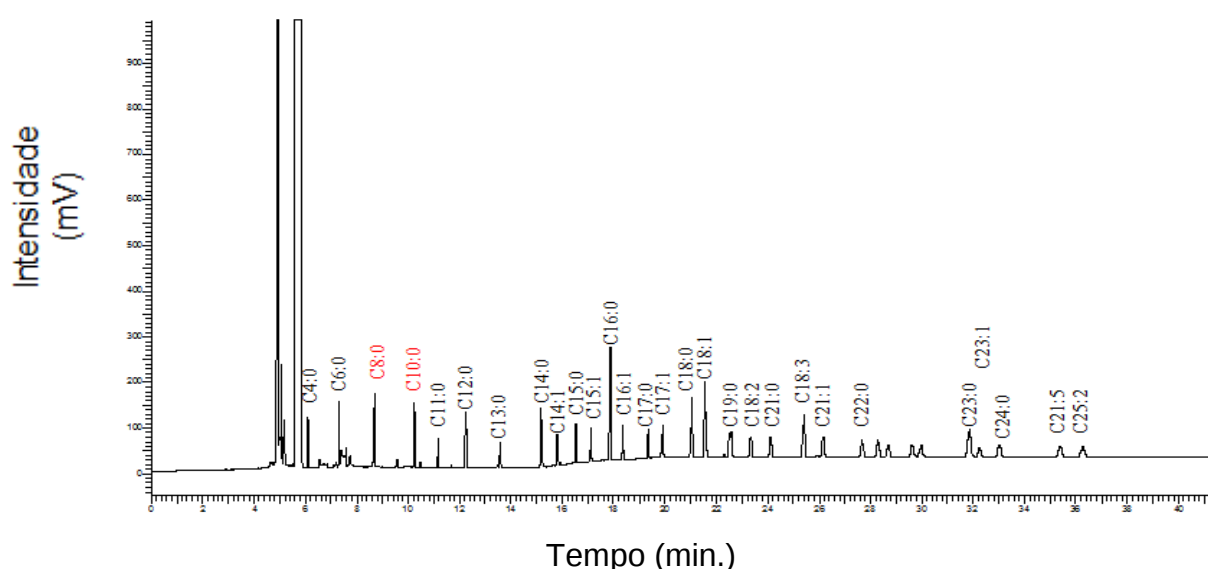


Figura 10. Cromatograma do perfil de padrões de FAMES utilizado para padronizar o método de detecção de ésteres de ácidos graxos das amostras de TAGs.

O estabelecimento desta metodologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas foi de extrema importância, uma vez que possibilitou a execução das análises com maior agilidade. Observa-se que o método

utilizado foi ideal para a detecção dos ésteres de ácidos graxos, pois todos os picos apareceram no cromatograma.

O estabelecimento desta metodologia foi validado através da comparação dos resultados obtidos com o método do item 4.5.6. com o método utilizado pelo centro de pesquisa CEMPEQ, ou seja o método oficial do INMETRO. Partindo disto foi possível confirmar que as condições utilizadas fornecem dados confiáveis, assim como na metodologia oficial. O teste de validação foi realizado aplicando-se diferentes padrões de ésteres de ácidos graxos como C8:0, C10:0, C12:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3, os quais obtiveram o mesmo tempo de retenção do método oficial.

5.6. Reações de acidólise em reator de leito fixo

Nesta etapa do trabalho, foram efetuadas duas reações de acidólise utilizando o ácido graxo de cadeia média C10:0, sendo uma com óleo de semente de uva e outra com óleo de algodão. Optou-se por utilizar as condições reacionais de 65°C e razão molar de 1:4 óleo:ácido, a fim de minimizar os problemas encontrados quando se utilizou condições mais extremas, como por exemplo a oxidação do óleo e a acilmigração do ácido graxo de cadeia média para a posição 2 do triglicerídeo. Além disso, vale ressaltar, que foi pré estabelecido um tempo de residência de 1 hora minimizando os processos de oxidação e acilmigração como demonstrado nas Tabelas 17 e 18.

5.6.1 Caracterização hidrodinâmica do reator: distribuição do tempo de residência

5.6.1.1. Curva de calibração do corante lipossolúvel

A figura 11 mostra a curva de calibração obtida para a solução lipossolúvel do corante empregado no teste de traçador. A curva relaciona a absorbância com a concentração do corante, podendo ser observada uma boa correlação dos dados experimentais ($R^2 = 0,992$).

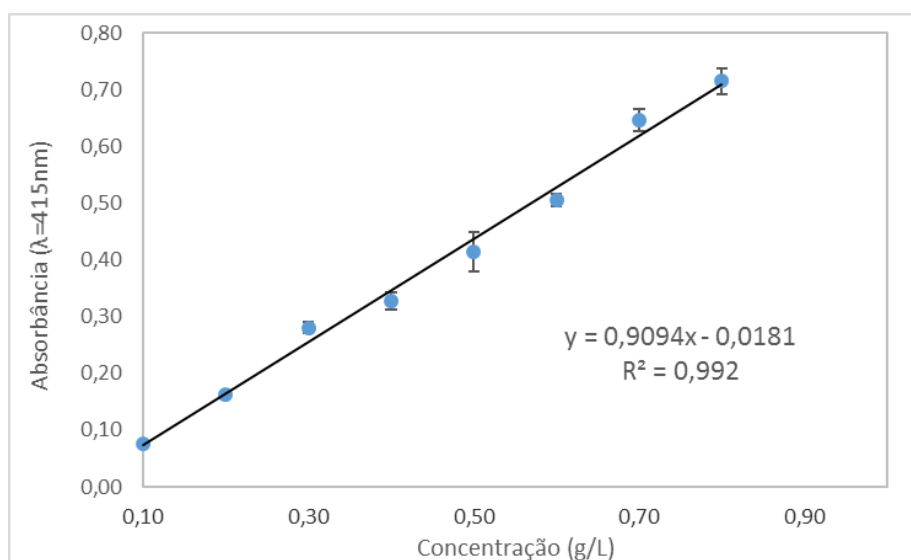


Figura 11. Curva de calibração do corante verde MIX.

5.6.1.2. Teste de traçador

Na Figura 12 apresenta-se a Distribuição de Tempo de Residência (DTR) para o reator de coluna utilizado nas reações de acidólise.

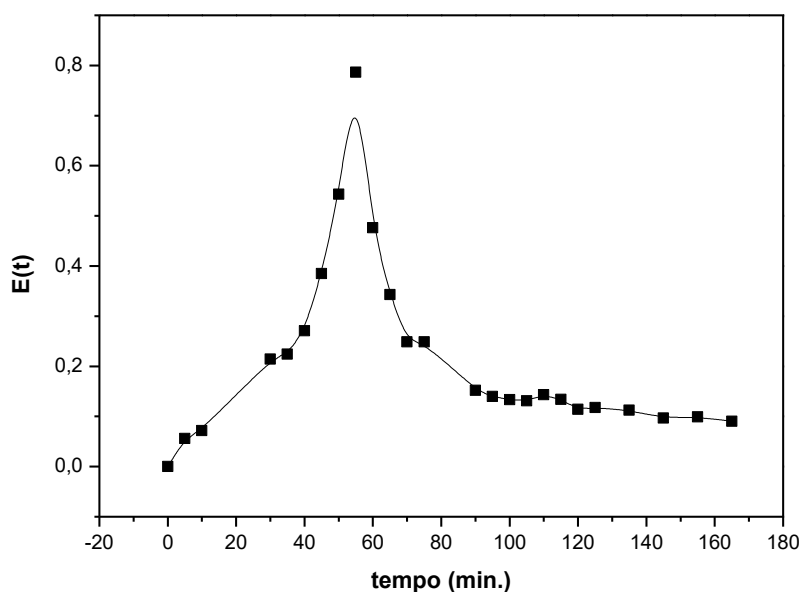
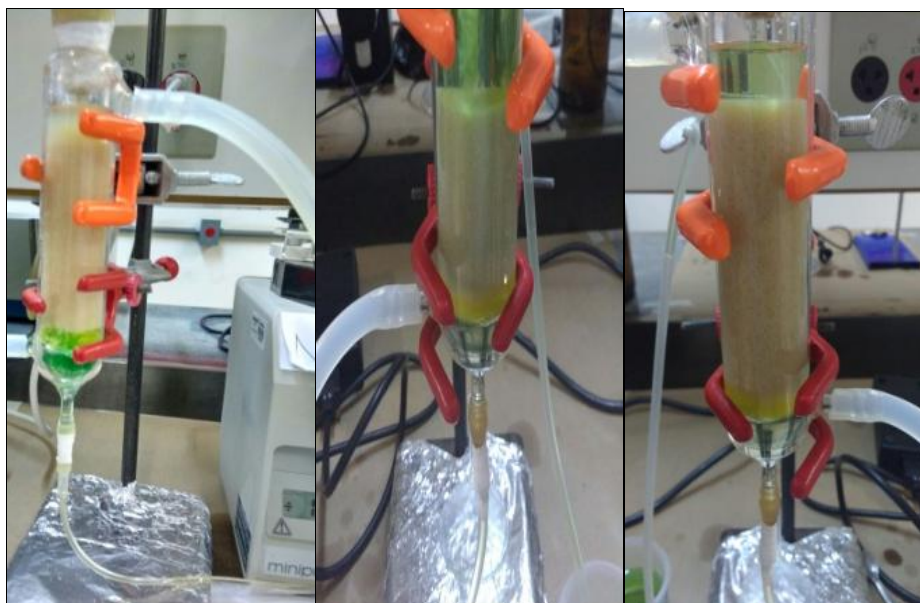


Figura 12. Distribuição do tempo de residência para o reator de coluna utilizado nas reações de acidólise.

O tempo médio de residência calculado foi de 71,78 minutos, indicando que a maior parcela do corante (traçador) injetado permaneceu por este tempo dentro do reator. A partir do volume útil do reator e da vazão empregada (0,36 mL/min), obteve-se o tempo de espacial de 61,10 minutos. Comparando-se este tempo com o tempo de residência médio (71,78 minutos), tem-se uma diferença de 10,68 minutos (erro de 17,51%). Esta diferença pode ser considerada aceitável para este tipo de experimento.

Além do pequeno erro apresentado, observa-se um espalhamento na curva de DTR, apesar da presença de um único pico. Houve uma pequena diferença entre o tempo espacial e o tempo de residência médio, indicando pouca ou nenhuma formação de caminhos preferenciais. A Figura 13 apresenta algumas fotos do experimento.



Fonte: o autor

Figura 13. Fotos do experimento de teste de traçador realizado no presente estudo.

5.6.2. Caracterização físico-química dos triglicerídeos modificados

Nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química dos produtos da acidólise dos de semente de uva e algodão respectivamente.

Tabela 17. Caracterização físico-química do produto da acidólise do óleo de semente de uva

Tempo reacional (horas)	Índice de acidez (mg de KOH/g)	Índice de peróxido (meq/kg)
1	151,38 ± 6,25	0,62 ± 0,07
2	173,41 ± 5,83	0,55 ± 0,08
3	158,15 ± 7,17	0,66 ± 0,05
4	152,34 ± 3,08	0,75 ± 0,12
5	176,47 ± 5,86	0,75 ± 0,02
6	149,89 ± 6,35	0,62 ± 0,09
7	144,27 ± 9,41	0,81 ± 0,07
8	133,72 ± 3,33	0,62 ± 0,07
9	151,94 ± 7,24	0,87 ± 0,05
10	146,03 ± 6,68	0,72 ± 0,02
11	139,90 ± 7,21	0,89 ± 0,05
12	170,57 ± 0,17	0,91 ± 0,02
24	147,58 ± 9,11	0,92 ± 0,07

*média±desvio padrão

Partindo dos resultados obtidos é possível observar que, o índice de acidez teve um pico no tempo de 5 horas, tanto para o óleo de uva quanto o óleo de algodão. Este resultado indica que houve uma maior liberação de ácidos graxos neste tempo, ou seja uma maior hidrólise enzimática. Este fato está relacionado às reações de hidrólise e de esterificação que a lipase realiza simultaneamente (110).

Com relação ao índice de peróxido, pouca ou nenhuma modificação foi observada para ambas as reações. Isso devido ao tempo de residência ser de apenas 1 hora, não degradando o óleo, apesar a lata temperatura utilizada (65°C).

Tabela 18. Caracterização físico-química do produto da acidólise do óleo de algodão.

Tempo reacional (horas)	Índice de acidez (mg de KOH/g)	Índice de peróxido (meq/kg)
1	142,33 ± 0,11	1,01 ± 0,04
2	156,55 ± 1,21	1,00 ± 0,11
3	150,21 ± 5,89	1,00 ± 0,03
4	148,49 ± 7,80	1,13 ± 0,05
5	195,51 ± 5,30	0,93 ± 0,05
6	155,87 ± 5,14	0,98 ± 0,03
7	141,29 ± 2,94	0,95 ± 0,02
8	138,36 ± 2,34	1,04 ± 0,01
9	152,76 ± 1,49	0,96 ± 0,08
10	156,98 ± 0,61	1,05 ± 0,11
11	142,30 ± 3,23	1,00 ± 0,05
12	138,40 ± 2,60	0,97 ± 0,06
24	140,98 ± 2,59	1,11 ± 0,09

*média±desvio padrão

5.6.3. Grau de incorporação do ácido cáprico

Nas tabelas 19 e 20 estão apresentados os resultados do perfil em ácidos graxos dos triglicerídeos modificados dos óleos de semente de uva e algodão, respectivamente.

Tabela 19. Perfil em ácidos graxos do óleo de semente de uva modificado.

Tempo de reação (h)	Ácido graxo (%)						Total
	C10:0	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6	C18:3n3	
1	26,48	4,23	1,25	20,67	45,01	2,37	100
2	26,86	5,47	2,18	18,59	42,67	4,23	100
3	27,52	5,45	2,11	18,3	42,44	4,17	100
4	24,17	5,82	2,24	19,55	44,15	4,07	100
5	26,41	5,66	1,96	18,75	43,03	4,19	100
6	21,82	5,69	2,35	20,1	45,71	4,32	100
7	23,41	5,98	2,22	19,54	44,55	4,3	100
8	23,39	6,01	2,49	20,29	43,72	4,09	100
9	24,66	6,32	2,23	19,04	43,47	4,27	100
10	16,32	6,38	2,5	21,46	48,64	4,69	100
11	17,15	6,25	3,21	19,25	48,97	5,16	100
12	20,28	5,91	2,88	19,81	46,83	4,29	100
24	19,72	6,95	2,08	16,63	51	3,63	100

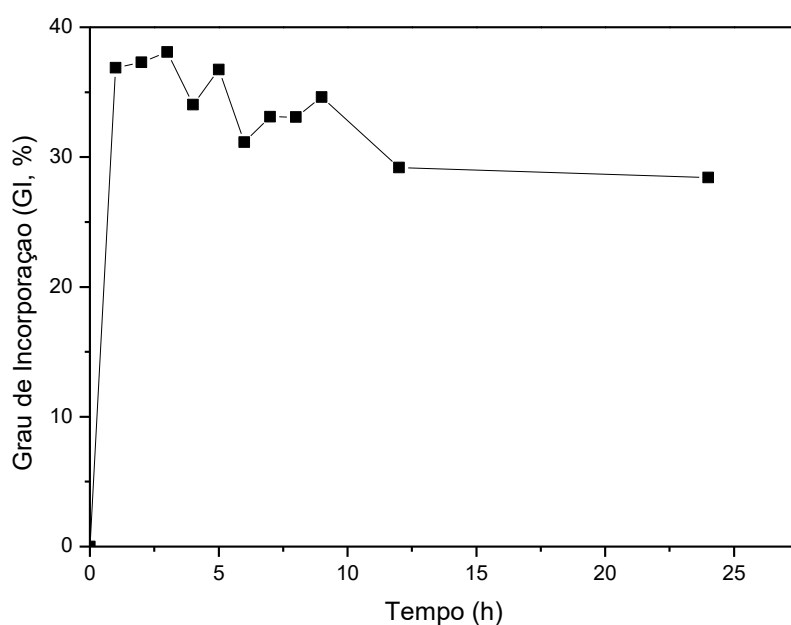
Tabela 20. Perfil em ácidos graxos do óleo de algodão modificado.

Tempo de reação (h)	Ácido graxo (%)						Total
	C10:0	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6	C18:3n3	
1	23,16	7,65	2,19	19,67	43,38	3,96	100
2	21,27	5,59	2,35	21,02	45,42	4,35	100
3	24,28	6	2,32	19,71	43,63	4,07	100
4	24,84	7,84	1,98	17,83	43,7	3,81	100
5	24,87	7,61	2,37	17,65	43,78	3,72	100
6	23,49	7,67	2,42	19,49	42,82	4,11	100
7	17,85	7,58	2,7	20,7	46,99	4,18	100
8	16,69	7,24	2,77	21,61	47,08	4,61	100
9	17	7,37	2,9	21,55	46,64	4,54	100
10	16,21	8,75	3,23	24,22	43,71	3,87	100
11	12,4	8,23	3,3	22,86	48,08	5,13	100
12	12,59	7,79	6,07	21,97	46,95	4,63	100
24	7,64	9,74	3,5	23,68	50,32	5,11	100

Comparando-se o perfil de ácidos graxos dos óleos sem modificação (Tabela 4) com os óleos modificados (Tabelas 19 e 20), é possível observar que para ambos, as alterações do perfil em ácidos graxos foi semelhante,

uma vez que houve a diminuição dos ácidos graxos de cadeia longa, ácido oleico e linoleico, principalmente. Isso ocorreu porque o biocatalisador utilizado tem maior facilidade de hidrolisar ácidos graxos de cadeia longa com insaturações (5).

Nas Figuras 14 e 15 respectivamente estão apresentados os graus de incorporação do ácido graxo de cadeia média (C10:0) nas reações de acidólise com os óleos de semente de uva e algodão em reator de leito fixo.



Figuras 14. Grau de incorporação do ácido graxo de cadeia média (C10:0) na reação de acidólise com óleo de semente de uva em reator de leito fixo.

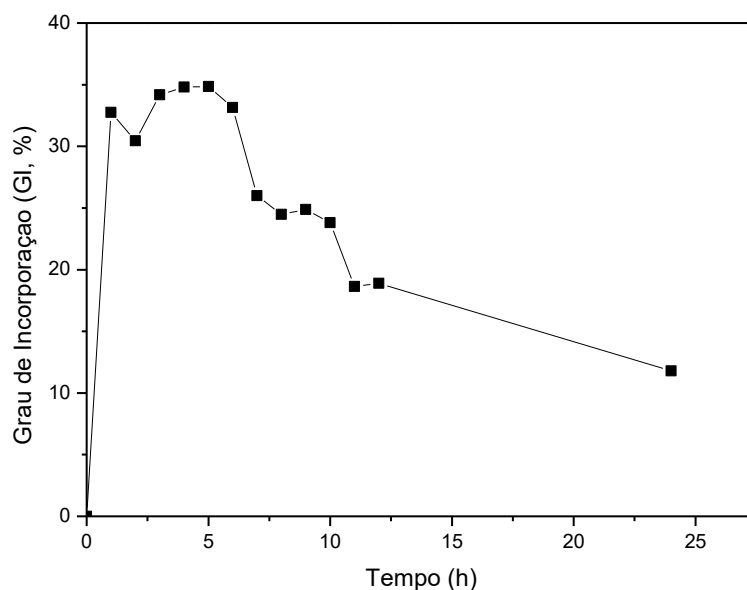


Figura 15. Grau de incorporação do ácido graxo de cadeia média (C10:0) na reação de acidólise com óleo de algodão em reator de leito fixo.

O tempo espacial empregado em ambas às reações foi de 1h aproximadamente. Logo, o estado estacionário foi atingido após 3h, ou seja, três tempos espaciais. Comparando-se a composição em ácidos graxos de ambos os óleos, esperava-se que os resultados de GI fossem semelhantes. No entanto, variações foram observadas.

Com relação à reação empregando-se o óleo de semente de uva (Figura 14), é possível observar que até o tempo de 9 horas o GI foi em torno de 35%. A partir de 10 horas, houve uma pequena queda de GI, porém este foi estável até o final da reação, o que já era esperado. No estado estacionário (entre 3 e 9h) o GI médio foi de $34,40 \pm 2,35\%$. Após este período, observou-se uma queda no GI de aproximadamente 22,44% até 12h, mantendo-se praticamente constante em 24h.

No caso do emprego de óleo de algodão, o período de duração do estado estacionário foi menor (entre 3 e 7h), em comparação com a reação de acidólise empregando-se óleo de semente de uva. Além disso, o GI médio no estado estacionário (entre 3 e 7h) foi em média $34,24 \pm 0,78\%$. Porém, neste caso, a queda no GI foi mais acentuada (65,57%), decrescendo até o final da reação (24h).

5.6.4. Posição *sn*-2

Na tabela 22 estão expressos os resultados da determinação da posição *sn*-2 das reações de acidólise em leito fixo com os óleos de semente de uva e algodão, ácido cáprico e Lipozyme RM IM.

Tabela 22. Posição *sn*-2 das reações de acidólise em leito fixo com os óleos de semente de uva e algodão, ácido cáprico e Lipozyme RM IM.

	Óleo de semente de uva	Óleo de semente de uva modificado	Óleo de algodão	Óleo de algodão modificado
Ácidos Graxos	%	%	%	%
C10:0	-	1,21	-	1,17
C16:0	2,89	0,99	2,87	1,40
C18:0	0,90	0,40	0,89	0,37
C18:1n9	28,15	25,68	32,24	34,94
C18:2n6	63,23	66,36	60,78	58,72
C18:3n3	4,83	5,37	3,32	3,41
Total	100,00	100	100,00	100

Com relação à posição *sn*-2 observa-se que a mesma foi mantida, assim como nas reações em batelada, para ambos os óleos. Ressalta-se

que, apesar do uso da temperatura de 65°C, que demonstrou porcentagem alta de acilmigração no planejamento de experimentos, o mesmo não ocorreu nas reações em leito fixo, isso por que o tempo espacial foi de apenas 1 hora, diminuindo assim o processo de migração dos ácidos graxos de cadeia média para a posição 2 do glicerol.

6. Conclusão

A seleção dos óleos de semente de uva e de algodão foi realizada com base em suas composições ricas em ácidos graxos insaturados. Os óleos foram submetidos às reações de acidólise em reator batelada, com ácidos graxos de cadeia média (caprílico e cáprico) utilizando lipases comerciais como biocatalizadores. Foi possível concluir a primeira etapa do projeto. Os melhores valores de grau de incorporação tanto em óleo de uva ($34,53 \pm 0,05 \%$) e algodão ($36,63 \pm 0,23 \%$) foram utilizando-se ácido cáprico (C10:0) e a enzima Lipozyme RM IM. Além de um satisfatório GI, os óleos após as reações de acidólise, mantiveram a posição *sn*-2 praticamente intacta, na qual grande parte dos ácidos graxos são os de cadeia longa (oleico, linoleico e linolênico), que trazem grandes benefícios à saúde e são melhores absorvidos pelo metabolismo nesta configuração de TAG.

Com os resultados obtidos nas 12 primeiras reações deu-se prosseguimento aos experimentos e realizou-se o planejamento de experimentos (DCCR), avaliando a influência de razão molar e temperatura sobre o grau de incorporação. Nesta etapa foi possível concluir que, apenas RM influenciou diretamente no grau de incorporação, uma vez que quanto maior, mais ácidos graxos de cadeia média eram incorporados. Porém a grande quantidade de ácidos graxos no meio, associada à alta temperatura e longos tempos reacionais, ocasionou um fenômeno chamado acilmigração, que nada mais é que a migração dos ácidos graxos de cadeia média para a posição 2 do TAG, processo este indesejado quando se quer produzir TAGs do tipo MLM.

Finalmente realizaram-se reações de acidólise em reator de leito fixo, operando em modo contínuo. Para dar início às estas reações, primeiramente, fez-se a caracterização hidrodinâmica do reator através do teste de traçador, onde o tempo espacial teórico foi de 61,10 min e o médio calculado de 71,78 min. Essa diferença de tempos (17,51%) está associada aos erros experimentais durante a execução do experimento, concluindo-se que houve pouco ou nenhuma formação de caminhos preferenciais; além disso, isto indica um bom empacotamento do leito. Para ambas as reações.

A execução deste projeto foi viável, pois foi possível produzir os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM a partir das reações de acidólise com os óleos de semente de uva e algodão, lipases comerciais e os ácidos graxos de cadeia média, cáprico e caprílico, em ambas as configurações de reatores, batelada e leito fixo.

7. Perspectivas futuras

A partir da análise dos resultados obtidos podem-se propor pesquisas futuras relacionadas ao emprego de diferentes configurações de reatores, avaliação de suportes de imobilização, e avaliação de propriedades dos TAGs sobre o metabolismo. Além disso, pode-se avaliar a possibilidade de encapsular os triglicerídeos dietéticos para aumentar sua gama de aplicações.

Referências

- 1- Cao Y, Qi S, Zhang Y, Wag X, Yan, B, Wag Y. Synthesis of structured lipids by Lipase-Catalyzed interesterification of triacetin with camellia oil methyl esters and preliminary evaluation of their plasma lipid-lowering effect in mice. *Molecules*, 2013; 18, 3734-3744.
- 2- Liu S, Dong X, Wei F, Wang X, Lv X, Zhong J, Wu L, et al.. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015; 23, 100 – 108.
- 3- Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 2011; 127(3), 993-998.
- 4- Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillen M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias, S. Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, 2011; 88, 473–480.
- 5- Caballero E, Soto C, Olivares A, Altamirano C. Potential use of avocado oil on structured Lipids MLM type production catalysed by commercial immobilised lipases. *Plos one*, 2014; 9, 1-7.
- 6- Horchani H, Aissa I, Ouertani S, Zarai Z, Gargouri Y, Sayari A. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012; 76, 125 – 132.
- 7- Miranda AS, Miranda MSL, Souza AMOR. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnology Advances*, 2015; 33, 372 – 393.

- 8- Akanbi TO, Barrow CJ. Lipase-catalysed incorporation of EPA into meui oil: Formation and characterisation of new structured lipids. *Journal of Functional Food*, 2015; 19, 801-809.
- 9- Tecelão C, Silva J, Dubreucq E, Ribeiro MH, Ferreira-Dias S. Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010; 65(1), 122-127.
- 10- Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Rodrigues CR, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one – step immobilization – purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 2015; 33, 435 – 456.
- 11- Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JMS. Reactores enzimáticos Multifásicos. *Engenharia enzimática*, editors Lisboa: Lidel; 2003. cap. 8, p. 189-208.
- 12- Deng X, Fang Z, Liu Y. Ultrasonic transesterification of *Jatropha curcas* L. oil to biodiesel by a two-step process. *Energy Conversion and Management*, 2010; 51, 2802-2807.
- 13- Kumar D, Nagar S, Bhushan I, Kumar L, Parshad R, Gupta VK. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013; 87, 51-61.

- 14- Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 2015; 33, 511-525.
- 15- FAO. 1999. Codex Standards for fats and oils from vegetable sources.
- 16- Raeisi M, Tajik H, Aliakbarlu J, Mirhosseini SH, Hosseini MSH. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 2015; 64, 898-904.
- 17- Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*, 2015; 167, 205-212.
- 18- Rockencach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Fett R. Fatty acid composition of grape (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) seed oil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2010.
- 19- Rockenbach II, Jungfer E, Ritter C, Schübel-Santiago B, Thiele B, Fett R., Galensa R. Characterization of flavan – 3- ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-MSⁿ and LC –ESI- FTICR-MS. *Food Research International*, 2012; 48 848-855.
- 20- Taghvaei M, Jafari SM, Assadpoor E, Nowrouzie S, Alishah O. Optimization of microwave-assisted extraction of cottonseed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties. *Food chemistry*, 2014; 160, 90-97.
- 21- Fernandes MD, SEerqueira SD, Portela MF, Assunção MNR, Munoz AAR, Terrones HGM. Preparation and characterization of methyl biodiesel

from cottonseed oil and effect of tert – butylhydroquinone on its oxidative stability. *Fuel*, 2012; 97, 658-661.

22- Taghvaei M, Jafari SM, Nowrouzie S, Alishah O. The influence of cooking process on the microwave-assisted extraction of cottonseed oil. *Journal of food science and technology*, 2015; 52(2), 1138-1144.

23- Mesquita P, Ferraresi S. ABRAPA: Associação Brasileira dos produtos de Algodão. In: *ABRAPA: Associação Brasileira dos produtos de Algodão*. Cromosete Gráfica e Editora Ltda, Biênio 2011/2012. 240 p.

24- Lannes SCS, Ignácio MR. Structuring fat foods. *Food industry*, 2013; 22, 66 – 91.

25- Rios VR, Pessanha FDM, Almeida FP, Viana LC, Lannes SCC. Application of fats in some food products. *Food Science and Technology*, 2014; 34, 3-15.

26- Hansen CA, He BB, Engeseth JN. Food versus fuel characteristics of vegetable oils and animal fat. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 2011; 54, 1407 – 1414.

27- Calder CP. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2012; 75, 645-662.

28- Chowdhury R, Stevens S, Gorman D, Pan A, Warnakula S, Chowdhury S, et al. Association between fish consumption, long chain Omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta – analysis. *BMJ Research*, 2012; 30, 1 – 9.

- 29- Ruiz-Lopez N, Haslan PR, Napier AJ, Sayanova O. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *The Plant Journal*, 2014; 77, 198-208.
- 30- Araújo BMEM, Campos BRP, Noso MT, Alberici MR, Cunha SBI, Simas CR et al. Response surface modelling of the production of structured lipids from soybean oil using *Rhizomucor miechei* lipase. *Food Chemistry*, 2011; 127, 28-33.
- 31- Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2013; 16(3), 1-38.
- 32- Lee YY, Tang TK, Lai OM. Health benefits, enzyme production and application of medium-chain triglycerides and long (MLCT) in food industry: a review. *Journal of Food Science*, 2012; 77(8), 137-144.
- 33- Feltes MMC, Oliveira PL, Gomes JF, Grimaldi R, Block JM, Ninow JL. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil by chemical and enzymatic interesterification. *Grasas y Aceites*, 2009; 60(2), 168-176.
- 34- Wang Y, Xia L, Xu X, Xie L, Duan Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food and Bioprocess Processing*, 2012(4), 707-712.
- 35- Xu X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000; 102 (4), 287-303.

- 36- Kim IH, Kim H, Lee KT, Chung SH, Ko SN. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79(4), 363-367.
- 37- Akoh CC. Structured and Specialty Lipids. In: AKOH, C. C; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOSC PRESS, 2005. 762 p. ISBN: 1-893997-51-0.
- 38- Bebarta B, Kothastane, JMP, Sunkireddy, RY. Medium chain and behenic acid incorporated structured lipids from sal, mango and kokum fats by lipase acidolysis. *Food Chemistry*, 2013; 136, 889-894.
- 39- Xie W, Zhang C. Propylsulfonic and arenesulfonic functionalized SBA-15 silica as na efficient and reusable catalyst for the acidolysis of soybean oil with medium-chain fatty acids. *Food Chemistry*, 2016; 211, 74-82.
- 40- Treichel, H, Oliveira D, Marzutto AM, Di Luccio M, Oliveira VJ. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol*, 2010; 3, 182-196.
- 41- Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Riaz M, et al. Bacterial Lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2017; doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.
- 42- Pereira OE, Tsang A, Macallister TA, Menassa R. The production and characterization of a new active lipase from *Acreminium alcalophilum* use a plant bioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, 2013; 111(6), 2-10.
- 43- Messias MJ, Costa ZB, Lima GMV, Giese CE, Dekker HFR, Barbosa MA. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica*, 2011; 32(2), 213-234.

- 44- Bourlieu C, Bouhallab S, Lopez C. Biocatalyzed modifications of milk lipids: applications and potentialities. *Trends in Food Science & Technology*, 2009; 20, 458-469.
- 45- Ribeiro APB, Basso RC, Grimaldi R, Gioielli LA, Santos AO, Cardoso LP, et al. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International*, 2009; 42, 1153-1162.
- 46- Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 2012; 43, 555-569.
- 47- Esakkiraj P, Antonyraj CB, Meleppat B, Akaiah D, Ayyanna R, Ahamed SIB, et al. Molecular characterization and application of lipase from *Bacillus* sp. PU1 and investigation of structural changes based on pH and temperature using MD simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017; <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.111>.
- 48- Nguyen HC, Liang S, Doan TT, Su C, Yang P. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (*Hermetica illucens*): Optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management*, 2017; 145, 335-342.
- 49- Khodadadi M, Aziz S, St-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of flaxseed oil-based structured lipids. *Journal of Functional Foods*, 2013; 5, 424 – 433.

- 50- Palla C, Carrín EM. Kinetics modeling of the acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases for production of structured lipids from sunflower oil. *Biochemical Engineering Journal*, 2014; 90, 184 – 194.
- 51- Rockencach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Fett R. Fatty acid composition of grape (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) seed oil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2010.
- 52- Prado MJ, Dalmolin I, Carareto DDN, Basso CR, Meireles AJA, Oliveira VJ, et al. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 2012; 109, 246-257.
- 53- Choi Y, Choi J, Han D, Kim H, Lee M, Kim H, et al. Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems. *Meat Science*, 2010; 84, 212-218.
- 54- Mucsi G, Rácz A. Grinding kinetics of red grape seed residue in stirred media mill. *Advanced Powder Technology*, 2017; [dx.doi.org/10.1016/j.appt.2017.07.007](https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.07.007).
- 55- Poiana AM. Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012; 13, 9240-9259.
- 56- Rockenbach II, Jungfer E, Ritter C, Schübel-Santiago B, Thiele B, Fett R., Galensa R. Characterization of flavan – 3- ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-MSⁿ and LC –ESI- FTICR-MS. *Food Research International*, 2012; 48 848-855.

- 57- Dhamadaran G, Krishnan R, Pochareddy K, Pyarelal HM, Sivasubramanian H, Ganeshran AK. A comparative study of combustion, emission, and performance characteristics of rice-bran-, neem-, and cottonseed-oil biodiesels with varying degree of unsaturation. *Fuel*, 2017; 187, 296-305.
- 58- Waheed A, Rasool G, Asghar A. Effect of interesterified palm and cottonseed oil blends on cookie quality. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2010; 1(3), 402-406.
- 59- Liese A, Hilterhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Rev*, 2013; DOI: 10.1039/c3cs35511j.
- 60- Fernández-Fernández M, Sanromán MA, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*; 2013; 31(8), 1808-1825.
- 61- Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *Journal Chemical Biology*, 2013; 6, 185-205.
- 62- Zhang C, Xing HX. Ezyme bioreactors. *Comprehensive Biotechnology*, 2011; 34, 319-329.
- 63- Christopher LP, Kumar H, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 2014; 119, 497-520.
- 64- Nielsen PM, Brask J, Fjerbaek L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2008;110, 692–700.
- 65- Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances* 2010; 28, 628–634.

- 66- Mendes AA, Giordano RC, Giordano RLC, de Castro HF. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011; 68, 109–115.
- 67- Chang S, Shaw J, Shaw J, Yang C, Shieh C. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, 2007; 42, 1362-1366.
- 68- Halim SFA, Kamaruddin AH, Fernando WJN. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, 2009; 100, 710-716.
- 69- Séverac E, Galy O, Turon F, Monsan P, Marty A. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresource Technology*, 2011; 102, 4954-4961.
- 70- Itabaiana I, Miranda LSM, Souza ROMA. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013; 86, 1-9.
- 71- Hama S, Yoshida A, Tamadani N, Noda H, Kondo A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. *Bioresource Technology*, 2013; 135, 417-421.
- 72- Soares A, Pinto AF, Gonçalves AG, Mitchell DA, Krieger A. Biodiesel production from soybean soap stock acid oil by hydrolysis in subcritical water

followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2013; 81, 15-23.

73- Zhao H, Liu J, Lv F, Ye R, Bie X, Zhang C, et al. Enzymatic synthesis of lard-based ascorbyl esters in a packed-bed reactor: Optimization by response surface methodology and evaluation of antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 2014; 57, 393-399.

74- Kosseva MR, Panesar PS, Kaur G, Kennedy JF. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009; 45, 437-447.

75- Fernandes P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, 2010; doi:10.4061/2010/862537.

76- Ray S. Studies on fluidized bed column reactor for the substrate conversion using immobilised extracellular alkaline lipase of isolated strain of *Serratia sp* (C4). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2012; 2(4), 538-544.

77- Feng X, Patterson DA, Baladan M, Fauconnier G, Emanuelsson EAC. The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. *Chemical Engineering Journal*, 2013; 221, 407-417.

78- Paula AV. Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. [Tese]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2012. 212 f.

- 79- Pinto MCC, Freire DMG, Pinto JC. Influence of the morphology of Core-Shell supports on the immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. *Molecules*, 2014; 19, 12509-12530.
- 80- American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 2011 6th ed. AOCS Press.
- 81- ISO 12966-2 (2011). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. International Organization for Standardization, Switzerland.
- 82- Casas-Godoy L, Marty A, Sandoval G, Ferreira-Dias S. Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*, 2013; 77, 20 – 27.
- 83- Zanin GM, Moraes FF. Enzimas Imobilizadas. In: Said S, Pietro RCLR, editors .Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa; 2004. p. 35-85.
- 84- Pardo EJ, Fernández E, Rubio N, Alvarruíz A, Alonso LG. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal Lipids Science Technology*, 2009; 111, 188 – 193.
- 85- Isaac OI, Ekpa DO. Fatty Acid Composition of Cottonseed oil and its application in production and evaluation of biopolymer. *American Journal of Polymer Science*, 2013; 3(2), 13 – 22.
- 86- Dalmolin I, Mazutti AM, Batista CMAE, Meireles AA, Oliveira VJ. Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in

compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. Journal Chemical Thermodynamics, 2010; 42, 797 – 801.

87- Lutterodt H, Slavin M, Whent M, Turner E, Yu II. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. Food Chemistry, 2011; 128, 391 – 399.

88- Ismail AFM, Salem AAM, Eassawy MMT. Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of γ -irradiated rat. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2016; 160, 1 – 10.

89- Adelola BO, Ndudi AE. Extraction and Characterization of Cottonseed (*Gossypium*) Oil. International Journal of basica and applied science, 2012; 1(2), 1-6.

90- Bail B, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. Food Chemistry, 2008; 108, 1122 – 1132.

91- Passos PC, Silva MR Silva AF, Coimbra AM, Silva MC. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. Chemical Engineering Journal, 2010; 160, 634 – 640.

92- Glampedaki P, Dutschk V. Stability studies of cosmetic emulsions prepared from naturalproducts such as wine, grape seed oil and mastic resin. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014; 460, 306 – 311.

- 93- Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade ML, Kefalas P, Rakic V. Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. Journal american oil chemistry society, 2014; 91, 989 – 999.
- 94- Mohamed BH, Duba SK, Fiori L, Abdelgawed H, Tlili I, Tounekti A, et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of different grape (*Vitis vinifera L.*) seed oils extracted by supercritical CO₂ and organic solvent. LWT - Food Science and Technology, 2016; 74, 557 – 562.
- 95- Durante M, Montefusco A, Marrese PP, Soccio M, Pastore D, Piro G, et al. Seeds of pomegranate, tomato and grapes: A underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products. Journal of Food Composition and Analysis, 2017; [//dx.doi.org/doi:10.1016/j.jfca.2017.07.026](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.026).
- 96- Bowen KJ, Kris-Etherton PM, Shearer GC, West SG, Reddivari L, Jones PJH. Oleic acid-derived oleoylethanolamide: A nutritional science perspective. Progress in Lipid Research, 2017; 67, 1-15.
- 97- Dhakal KH, Jung K, Chae J, Shannon JG, Lee J. Variation of unsaturated fatty acids in soybean sprout of high oleic acid accessions. Food Chemistry, 2014; 164, 70-73.
- 98- Delgado GE, Krämer BK, Lorkowski S, März W, Schacky C, Kleber ME. Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The ludwigshafen risk and cardiovascular health study. Journal of Clinical Lipidology, 2017; 11, 126-135.

- 99- Yang B, Chen H, Stanton C, Ross RP, Zhang H, Chen Y, et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 2015; 15, 314-325.
- 100- Viladomiu M, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, 2016; 785, 87-95.
- 101- Mironeasa S, Leahua A, Codină GG, Stroea GS, Mironeas C. Grape seed: physicochemical, structural characteristic and oil content. *Journal of Agroalimentary Process and Technologies*, 2010; 16, 1-6.
- 102- Irandoost P, Ebraimi-Mameghani M, Pirouzpanah S. Does grape seed oil improve inflammation and insulin resistance in overweight or obese women?. *International journal of food sciences and nutrition*, 2013; 64(6), 706-710.
- 103- Rombaut N, Savoie R, Thomasset R, Bélliard T, Castello J, Hecke EV, et al. Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 2014; 17(3), 284-292.
- 104- Ribeiro APB, Basso RC, Grimaldi R, Gioielli LA, Santos AO, Cardoso LP, et al. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International*, 2009; 42, 1153-1162.
- 105- Athalye S, Sharma-Shivappa R, Peretti S, Kolar P, Davis JP. Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC# 34612 whole

cell biocatalysts: culture media and cultivation period optimization. *Energy for Sustainable Development*, 2013; 17(4), 331-336.

106- Carbonell-Verdu A, Bernard L, Garcia-Garcia D, Sanchez-Nacher L, Balart R. Development of environmentally friendly composite matrices from epoxidized cottonseed oil. *European Polymer Journal*, 2015; 63, 1-10.

107- Matthäus B, Musazcan Ö, Mehmet A. Oil content, fatty acid composition and distributions of vitamin-E-active compounds of some fruit seed oils. *Antioxidants*, 2015; 4(1), 124-133.

108-Fiori L, Lavelli V, Duba KS, Harsha SCSP, Mohamed HP, Guela G. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014; 94, 71-80.

109- Duba K, Simon FL. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2015; 98, 33-43.

110- Paula AV. Continuous enzymatic interesterification of milkfat with soybean oil produces a highly spreadable product rich in polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015; 117(5), 608-619.

111- Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010; 64(1), 1-22.

- 112- Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010; 66(1), 15-32.
- 113- Mustafa A, Karmali A, Abdelmoez W. Optimisation and economic assessment of lipase-catalysed production of monoesters using *Rhizomucor miehei* lipase in a solvent-free system. *Journal of Cleaner Production*, 2016; 137, 953-964.
- 114- Moreira DKT, Ract JNR, Ribeiro APB, Macedo GA. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. *Food Research International*, 2017; [//dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.034](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.034).
- 115- Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel; 2009. 511p.
- 116- Campbell-Platt, G. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri: Manoele; 2015. 536p.
- 117- Farhoosh R, Einafshar S, Sharayei P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chemistry*, 2009; 115, 933-938.
- 118- Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT - Food Science and Technology*, 2010; 43, 1379-1386.
- 119- Esteban L, Muñío MM, Robles A, Hitta E, Jiménez MJ, González PA, et al. Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of

fish oils using different reactor types. *Biochemical Engineering Journal*, 2009; 44, 271-279.

120- Esteban L, Jiménez JM, Hita E, Gonzáles AP, Martín L, Robles A. Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2011; 64, 62-69.