

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EFEITO DO ULTRASSOM NA CINÉTICA DA REAÇÃO DE  
GLICERÓLISE DE ÓLEO DE MILHO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Douglas Takeshi Kuamoto

Porto Alegre – RS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EFEITO DO ULTRASSOM NA CINÉTICA DA REAÇÃO DE  
GLICERÓLISE DE ÓLEO DE MILHO**

Douglas Takeshi Kuamoto

Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre  
em Engenharia Química.

Área de concentração: Reatores e Cinética de  
Reações Químicas.

Orientadores:

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo  
Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Cesar Liberato Petzhold

Porto Alegre – RS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação intitulada “EFEITO DO ULTRASSOM NA CINÉTICA DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE DE ÓLEO DE MILHO” elaborada por Douglas Takeshi Kuamoto, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Débora Jung Luvizetto Faccin

---

Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>o</sup>. Fernando Augusto Pedersen Voll

---

Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>o</sup>. Nilson Romeu Marcilio

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais e minha irmã por todo apoio, paciência e suporte dado durante esta especialização.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo do departamento de engenharia química da UFRGS por me orientar durante estes anos de trabalhos no programa de mestrado em engenharia química. Agradeço igualmente ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Cesar Liberato Petzhold do departamento de química da UFRGS por todo o esclarecimento e suporte dado durante as etapas de planejamento deste trabalho. Ao doutorando João Antônio Pessoa da Silva e aluna de graduação Victória de Castro pelo incentivo, companheirismo e presença em todas as etapas que compõem esta dissertação. A constante ajuda e incentivo que vocês me forneceram permitiu enriquecer mais ainda este trabalho. Agradeço a professora Paula B. Staudt, professor Rafael P. Soares e ao aluno Gabriel Pastorello pelo auxílio nas etapas finais referentes ao programa JCOSMO. O seu auxílio imediato permitiu a aquisição de resultados que não eram esperados durante o andamento deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, especialmente os colegas do Anne Frank e Tiradentes, por sempre estarem presentes nos momentos de dificuldade. Agradeço à Cristina Pigozzo por sempre me incentivar a prosseguir neste caminho.

Não posso também deixar de citar aos professores e funcionários do departamento de engenharia química da UFRGS, especialmente aos técnicos da Central Analítica pelas inúmeras análises realizadas.

Obrigado à CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro fornecido nesta especialização.

Para todos que foram citados acima e a aqueles que não foram, mas que mesmo assim presenciaram esta jornada, meus sinceros agradecimentos. Uma página não faz jus ao seu papel neste trabalho.

Douglas Takeshi Kuamoto

## Resumo

A glicerólise de óleos vegetais é um método amplamente utilizado para a produção de monoglicerídeos e diglicerídeos através do consumo de triglicerídeos (uma molécula altamente presente em gorduras e óleos) e glicerol (um coproduto gerado a partir da produção de biodiesel). Industrialmente, a glicerólise catalisada por rota alcalina é a mais empregada para esta reação, porém apresenta desvantagens como a necessidade de altas temperaturas (200 – 260 °C) de reação e rendimentos relativamente baixos (em torno de 40%), o que estimula a busca de rotas catalíticas alternativas como a enzimática. Neste trabalho estudamos a cinética da reação de glicerólise do óleo de milho por rota enzimática assistida por ultrassom. Os efeitos da temperatura de reação e da aplicação de ultrassom no meio de reação sobre o rendimento total de monoglicerídeo foram investigados. A reação foi realizada em um reator do tipo batelada nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, empregando uma razão molar de 6:1 de glicerol e óleo de milho usando t-butanol como solvente. O ultrassom foi aplicado na frequência de 38 kHz em ciclos de 30 minutos durante a reação. A quantificação dos produtos de interesse, mono-, di-, triglicerídeos e água, foi realizada por cromatografia líquida e análise de Karl Fischer. Um modelo implementado no software Matlab 2012 foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos da reação, com e sem aplicação de ultrassom. Resultados experimentais mostraram que, assim como relatado para outros óleos, o uso de ultrassom aumentou o rendimento da reação sem comprometer a estrutura do catalisador enzimático.

**Palavras-chave:** *glicerólise, modelagem cinética, óleo de milho, catálise enzimática, monoacilglicerol, ultrassom*

## **Abstract**

Glycerolysis of vegetable oils is a widely used method for producing monoglycerides and diglycerides through the consumption of triglycerides (a highly present molecule in fats and oils) and glycerol (an extensive generated coproduct from the biodiesel production). Industrially, the alkaline catalytic glycerolysis is the most employed route for this reaction, however it presents disadvantages such as the necessity of high reaction temperatures (200 – 260 °C) and relatively low yields (around 40%), stimulating the search of alternative catalytic routes such as enzymatic. In this work we study the kinetics of the glycerolysis reaction of corn oil by ultrasound assisted enzymatic route. The effects of reaction temperature and ultrasound application on the reaction media over the total monoglyceride yield was investigated. The reaction was carried out in a batch reactor at temperatures of 40, 50 and 60 °C, employing a 6:1 molar ratio of glycerol and corn oil using t-butanol as solvent. Ultrasound was applied at a frequency of 38 kHz in 30 min cycles during the reaction. Quantification of the products of interest, mono-, di-, triglycerides and water, was performed by liquid chromatography and Karl Fischer analysis. A model implemented in Matlab 2012 software was used to estimate the kinetic parameters of the reaction, with and without ultrasound application. Experimental results showed that, as reported for other oils, the use of ultrasound increased the reaction yield without compromising the enzymatic catalyst structure.

**Keywords:** *glycerolysis, kinetic modeling, corn oil, enzymatic catalyst, monoacylglycerol, ultrasound*

## Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Sumário	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xi
1 Introdução	1
2 Objetivos do Trabalho	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica	5
3.1 Biodiesel e glicerol	5
3.2 Óleos Vegetais	7
3.3 Monoglicerídeos e diglicerídeos	9
3.4 Óleo de milho	10
3.5 Glicerólise de óleos vegetais	11
3.6 Enzimas	13
3.7 Cinética de Catalisadores Enzimáticos	14
3.8 Modelagem cinética da glicerólise de TAGs	17
3.8.1 Modelo Cinético de Valério et al.	17
3.8.2 Modelo Cinético de Voll et al.	19
3.9 Aplicação de ultrassom em reações catalisadas por enzimas	24
4 Metodologia	28
4.1 Experimental	28
4.1.1 Materiais	28
4.1.2 Glicerólise em reator batelada	28
4.1.3 Quantificação dos produtos	30
4.1.4 Atividade enzimática	30
4.2 Modelagem cinética	31
4.2.1 Implementação dos modelos	31
4.2.2 Estimação de parâmetros	32
4.2.3 Teste das funções implementadas em Matlab com o modelo e o procedimento de estimação de parâmetros cinéticos	33
4.2.4 Análise dos parâmetros cinéticos estimados para o óleo de milho	33

5	Resultados	38
5.1	Avaliação das implementações em Matlab do modelo cinético e do procedimento de estimação de parâmetros	38
5.2	Curvas de calibração para a HPLC	40
5.3	Quantificação das espécies e sua evolução temporal nas reações de glicerólise do óleo de milho com e sem uso de ultrassom	42
5.4	Cinética da reação de glicerólise do óleo de milho	44
5.4.1	Resultados da estimação dos parâmetros para o modelo cinético de Valério et al.	44
5.4.2	Comparação das constantes cinéticas obtidas pela Eq. (51) para os diferentes sistemas considerados	48
5.5	Avaliação da influência da estrutura das moléculas de MAGs, DAGs e TAGs presentes nos óleos nos resultados cinéticos obtidos	50
5.5.1	Otimização das estruturas e perfis $\sigma$	50
5.5.2	Coeficientes de atividade	56
5.6	Testes de estabilidade do catalisador enzimático sob as condições de reação	67
6	Conclusão	71
7	Sugestões para Trabalhos Futuros	73
8	Referências	a

## Lista de Figuras

Figura 3.1 – Reação esquemática de transesterificação de triglicerídeos para a produção de biodiesel.....	5
Figura 3.2– Estrutura representativa de monoglicerídeos (1-MAG) e de diglicerídeos (1,2-DAG).....	9
Figura 3.3 – Reação bissubstrato sequencial do tipo Bi Bi para catalisadores enzimáticos adaptado do esquema apresentado por Voet et Voet (2013).....	16
Figura 3.4 – Reação bissubstrato Ping Pong Bi Bi para catalisadores enzimáticos adaptado do esquema apresentado por Voet et Voet (2013). ....	16
Figura 4.1 – Aparato experimental (reator, agitador mecânico e chapa de aquecimento) utilizado para realizar os testes de glicerólise do óleo de milho padrão.....	29
Figura 5.1 – Glicerólise de óleo de sardinha catalisada por Lipozyme 435 a 303 K, 313 K, 323 K e 333 K: comparação entre os resultados experimentais de Solaesa et al. (2016) e os das simulações com o código implementado usando os valores de parâmetros cinéticos reportados no referido trabalho. ....	38
Figura 5.2– Curvas de calibração para 1-monooleína (a), 1,3-dioleína (b) e trioleína (c)...	41
Figura 5.3– Sobreposição de cromatogramas obtidos através da análise de HPLC do meio reacional para a reação de glicerólise de óleo de milho em 60 °C com e sem o uso de ultrassom nos tempos 0 e 480 min .....	42
Figura 5.4 – Dados experimentais para a concentração de MAG no meio reacional para reações sem o uso de ultrassom (MAG_std) e com o uso de ultrassom (MAG_ult) nas temperaturas de: 313 K (a), 323 K (b) e 333 K (c). ....	44
Figura 5.5 – Resultados da estimação das concentrações de MAGs, DAGs e TAGs para a glicerólise de óleo de milho padrão a 313 K (A), 323 K (B) e 333 K (C) e glicerólise de óleo de milho com uso de ultrassom a 313 K (D), 323 K (E) e 333 K (F) usando o modelo proposto por Valério et al. (2009) .....	46
Figura 5.7 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de TAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo <i>software</i> Avogadro utilizando a função de otimização UFF .....	51
Figura 5.8 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de DAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo <i>software</i> Avogadro utilizando a função de otimização UFF .....	52
Figura 5.9 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de MAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo <i>software</i> Avogadro utilizando a função de otimização UFF .....	52
Figura 5.10 – Perfil $\sigma$ das moléculas-modelo de TAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO .....	53
Figura 5.11 – Perfil $\sigma$ das moléculas-modelo de DAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO .....	54

Figura 5.12 – Perfil $\sigma$ das moléculas-modelo de MAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO .....	55
Figura 5.13 – Relação de razões de coeficientes de atividade entre glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos lipídeos envolvidos em reação para a glicerólise do óleo de sardinha (TAGs e DAGs).....	61
Figura 5.14 – Relação de razões de coeficientes de atividade de glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos TAGs envolvidos em reação para a glicerólise do óleo de milho padrão .....	62
Figura 5.15 – Relação de razões de coeficientes de atividade de glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos DAGs envolvidos em reação para a glicerólise do óleo de milho padrão .....	63
Figura 5.16 – Imagens de MEV das partículas de catalisador enzimático Lipozyme 435 com aproximação de 300 (esquerda) e 1000 (direita): a) antes da reação; b) depois da reação sem uso de ultrassom; c) depois da reação com sob ação de ultrassom. ....	68

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Lista de principais ácidos graxos naturais encontrados em óleos vegetais e suas simbologias.....	8
Tabela 3.2 – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de milho refinado de acordo com Carrillo et al. (2017) .....	11
Tabela 3.3 – Reações esquematizadas da glicerólise de triglicerídeos proposta por Valério et al. (2009).....	18
Tabela 3.4 – Reações esquematizadas da glicerólise de triglicerídeos proposta por Voll et al. (2011).....	20
Tabela 4.1 – Condições reacionais utilizadas no estudo cinético da glicerólise do óleo de milho com e sem a aplicação de ultrassom.....	30
Tabela 4.2 – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de sardinha e óleo de milho. ....	34
Tabela 4.3 – Moléculas modelo para os triglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos. ....	35
Tabela 4.4 – Moléculas modelo para os diglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos. ....	36
Tabela 4.5 – Moléculas modelo para os monoglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos. ....	37
Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos estimados para a glicerólise de óleo de sardinha através de dados obtidos por Solaesa et al. (2016). ....	40
Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos estimados para glicerólise de óleo de milho utilizando o modelo de Valério et al. (2009) para reações padrão e com o uso de ultrassom. ....	45
Tabela 5.4 – Constantes cinéticas da glicerólise do óleo de sardinha estimadas pelo trabalho de Solaesa et al. (2016), da glicerólise padrão do óleo de milho e da glicerólise do óleo de milho assistida por ultrassom estimadas pelo modelo de Valério et al. (2009). ...	49
Tabela 5.5 – Ordenamento das constantes cinéticas referentes às reações diretas da glicerólise de óleo de sardinha (Solaesa et al. (2016)) e da glicerólise do óleo de milho padrão do maior (1º) para o menor (6º) .....	50
Tabela 5.6 – Coeficientes de atividade para moléculas de monoglicerídeos (MAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e constantes cinéticas de hidrólise de monoglicerídeos ( $k_{11}$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K).....	57
Tabela 5.7 – Coeficientes de atividade para moléculas de diglicerídeos (DAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e constantes cinéticas de glicerólise ( $k_3$ ) e hidrólise de diglicerídeos ( $k_9$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K).....	58
Tabela 5.8 – Coeficientes de atividade para moléculas de triglicerídeos (TAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e	

constantes cinéticas de glicerólise ( $k_1$ ) e hidrólise de triglicerídeos ( $k_7$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K)..... 58

Tabela 5.9– Constantes cinéticas de glicerólise ( $k_1$ ) e hidrólise ( $k_7$ ) de TAGs e coeficientes de atividade para o 1-palmitoil-2-oleil-3-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{TAG1}$ ), 1-oleil-2-3-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG2}$ ), 1-palmitoil-2-3-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG3}$ ) e 1-palmitoil-2-oleil-3-linoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho. .... 65

Tabela 5.10– Constantes cinéticas de glicerólise ( $k_3$ ) e hidrólise ( $k_9$ ) de DAGs e coeficientes de atividade para o 1-oleil-2-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{DAG1}$ ), 1-palmitoil-2-oleil-glicerol ( $\gamma_{DAG2}$ ), 1-2-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{DAG3}$ ) e 1-oleil-2-linoleil-glicerol ( $\gamma_{DAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho. .... 65

Tabela 5.11– Constantes cinéticas de hidrólise ( $k_{11}$ ) de MAGs e coeficientes de atividade para o 2-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{MAG1}$ ), 2-oleil-glicerol ( $\gamma_{MAG2}$ ), 2-palmitoil-glicerol ( $\gamma_{MAG3}$ ) e 2-linoleil-glicerol ( $\gamma_{MAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho. .... 66

Tabela 5.12 – Atividade catalítica em PLU (Unidades de Lauril de Propil) para a glicerólise de triglicerídeos proveniente de óleo de milho para reações com e sem o uso de ultrassom a uma temperatura de 60 °C e tempo de reação de 480 min..... 69

## Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Abaixo constam os símbolos presentes neste trabalho de conclusão:

$[X]$	Concentração da espécie $X$ ( $MAG, DAG, TAG, G, W, FA$ )
$r_x$	Taxa de reação da espécie $X$ ( $MAG, DAG, TAG, G, W, FA$ )
$MAG$	Monoglicerídeo
$DAG$	Diglicerídeo
$TAG$	Triglicerídeo
$G$	Glicerol
$W$	Água
$FA$	Ácidos graxos ( <i>Free Fatty Acids</i> )
$R$	Radical alquila derivado de ácidos graxos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
$E$	Enzima
$S$	Substrato
$P$	Produto
$ES$	Complexo substrato/enzima
$V_{max}$	Velocidade máxima de reação
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$[E]_T$	Concentração total de enzima

## 1 Introdução

A crescente preocupação global com relação ao esgotamento dos recursos naturais, em especial os combustíveis fósseis, vem incentivando diversas linhas de pesquisas a procurar técnicas capazes de contornar o cenário atual. Uma destas linhas de pesquisa é a obtenção de combustíveis provenientes de fontes alternativas e renováveis capazes de suprir as altas demandas energéticas globais. Dentre as diversas opções levantadas, o biodiesel apresentou vantagens que o tornaram um potencial substituto para combustíveis fósseis como o petróleo, por exemplo. Tais vantagens incluem ser proveniente de fontes naturais renováveis, ser biodegradável, ser livre de enxofre, possuir alta lubricidade e possuir elevada capacidade calorífica (RAJKUMAR et al. 2019).

O biodiesel é produzido através da reação de transesterificação de óleos e gorduras provenientes de origem animal ou vegetal. Esta reação produz uma grande quantidade de glicerol como subproduto (SARMA et al., 2019). Considerando a necessidade de produção extensiva deste combustível, a quantidade de subproduto gerada para suprir a alta demanda global é preocupante. Apenas no Brasil foram produzidos cerca 4,3 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel no ano de 2017, resultando em cerca de 374,5 mil m<sup>3</sup> de glicerol como subproduto (ANP, 2018). Este cenário levou diversos cientistas a procurar formas alternativas de aproveitamento deste subproduto, seja como matéria-prima para outros processos ou como precursor de um outro produto com maior valor agregado (VALÉRIO et al. 2009).

Dentre as diferentes formas de aproveitamento do glicerol, a produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da mistura de glicerol com óleos e gorduras é uma forma comercialmente atrativa devido ao valor agregado destes compostos. Monoglicerídeos (MAGs) e diglicerídeos (DAGs) são emulsificantes que possuem elevada aplicação na indústria de cosméticos, alimentícia e farmacêutica. Além disso, estudos mostraram que estas moléculas também possuem propriedades medicinais, como a prevenção da obesidade e da lipemia (GARZON-ABURBEH et al., 1983, 1986).

A produção de MAGs e DAGs é realizada a nível industrial através da reação de glicerólise de triglicerídeos (proveniente de óleos e gorduras) utilizando catalisadores alcalinos. Apesar desta reação ser consolidada devido ao seu baixo tempo de reação, este processo possui diversas desvantagens como a baixa taxa de conversão de triglicerídeos,

enegrecimento e sabor adusto do produto final, alto consumo energético e necessidade de aplicar destilação molecular após a reação (VOLL et al., 2011). Catalisadores enzimáticos, por sua vez, utilizam menores temperaturas reacionais, apresentam elevada especificidade, resultando em produtos mais puros, não enegrecidos com sabor palatável e apresentando maiores taxas de rendimento reacional (VOLL et al., 2011). A maior desvantagem desta tecnologia consiste no custo elevado das enzimas. Por isso diversas pesquisas relacionadas à reação de glicerólise por rota enzimática são estudadas, visando viabilizar esta técnica no ponto de vista comercial.

Os esforços encontrados na literatura para melhorar o rendimento desta reação incluem a otimização de parâmetros experimentais como a temperatura, razão molar de glicerol/óleo e escolha de solvente orgânico (KRÜGER et al. 2009; NAIK et al. 2014; VOLL et al. 2011); testes com diferentes lipases (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2016); irradiação de micro-ondas sobre o meio reacional (GOLE et al. 2014); assistência de ultrassom (DELGADO et al. 2015). Linhas de pesquisas paralelas também buscam otimizar as reações de glicerólise livres de solventes orgânicos. Reações desta natureza são atrativas do ponto de vista ambiental, pois removem do processo as etapas de purificação do produto após a reação e o descarte de solventes em centros de reciclagem, recuperação ou incineração. A principal desvantagem desta técnica é a diminuição de área de transferência de massa entre glicerol e óleo provocada pela baixa miscibilidade entre estes substratos a temperatura ambiente, resultando em uma natural diminuição de rendimento reacional (KAEWTHONG et al., 2005). Com respeito a esta limitação em termos de transferência de massa, o uso de tensoativos (VALÉRIO et al. 2009) e pré-tratamento dos substratos com ultrassom (TIAN et al., 2004) já foi sugerido como alternativa para redução do problema.

Devido à sua simplicidade de aplicação e potencial aumento no rendimento e taxa de formação de produto quando aplicado em reações com e sem o uso de solventes, o ultrassom mostra-se como uma técnica atrativa para aumentar a viabilidade econômica da reação de glicerólise catalisada por enzimas. A aplicação desta técnica em diferentes etapas da glicerólise já foi estudada para alguns tipos de sistemas, como o óleo de oliva (FIAMETTI et al. 2012), banha de porco (LIU et al. 2018) e óleos de soja e canola (REMONATTO et al. 2015). Todos estes trabalhos utilizaram a enzima Lipozyme 435 como catalisador e realizaram a reação de glicerólise em meios livres de solvente.

Apesar de que os trabalhos citados comprovaram um efeito positivo do ultrassom no rendimento final da reação, ainda há carência de informação detalhada sobre a influência do uso desta técnica na cinética da glicerólise enzimática ou sobre a dependência deste efeito com as características do sistema específico em estudo. Dentre os trabalhos citados, somente FIAMETTI et al. (2012) avaliaram os parâmetros cinéticos das reações de glicerólise sob influência do ultrassom. Além disso, a interpretação direta de dados cinéticos obtidos em reações enzimáticas realizadas sem o uso de solvente é dificultada pela interferência da resistência a transferência de massa.

No presente trabalho se faz o estudo específico da influência do uso de ultrassom na cinética da reação de glicerólise de óleo de milho, cuja produção é extensiva no continente americano e que contém em sua composição diferentes moléculas com reconhecidos benefícios para a saúde humana. Será considerado o sistema com uso de solventes orgânicos, a fim de diminuir a resistência a transferência de massa e, assim, obter maiores taxas de reação e uma interpretação mais direta dos dados cinéticos.

## **2 Objetivos do Trabalho**

### **2.1 Objetivo geral**

Com foco na glicerólise enzimática de óleo de milho, o principal objetivo deste trabalho é o estabelecimento de um modelo cinético para a reação assistida por ultrassom no meio reacional.

### **2.2 Objetivos específicos**

Para atingir o objetivo principal proposto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Implementar um modelo cinético descritivo para a reação de glicerólise de triglicerídeos em plataforma computacional;
- Obter dados experimentais, tanto de literatura como de autoria própria, referentes à evolução temporal das concentrações das espécies de interesse em função das condições reacionais;
- Testar a consistência da implementação do modelo escolhido para as reações enzimáticas padrão e assistida por ultrassom;
- Estimar os parâmetros cinéticos regentes do modelo implementado para a reação de glicerólise padrão e submetida à influência de ultrassom;
- Avaliar a viabilidade do ultrassom como uma alternativa para aumentar o rendimento de reação e/ou a taxa de formação de MAGs.

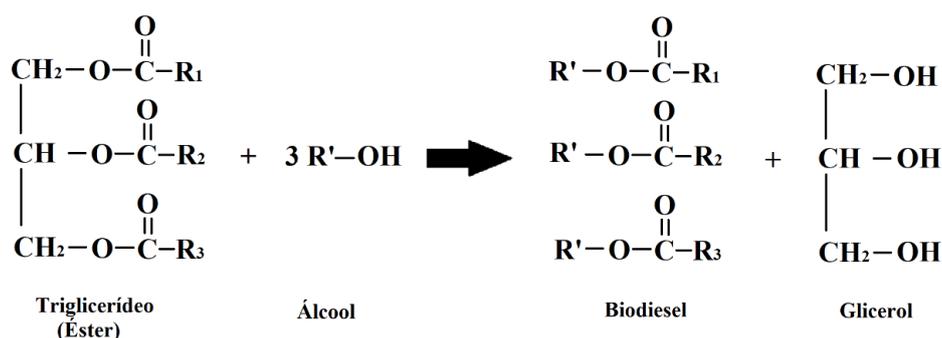
### 3 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são abordados primeiramente temas considerados relevantes para o melhor entendimento deste trabalho, incluindo: glicerol, composição de óleos vegetais, mono e diglicerídeos. Posteriormente, se apresenta a revisão bibliográfica referente a reações de glicerólise de óleos vegetais e à modelagem da cinética destas reações, com a descrição dos dois principais modelos descritos na literatura para este tipo de sistema. Finalmente, se apresenta a revisão sobre o efeito do uso de ultrassom em reações de glicerólise de óleos vegetais.

#### 3.1 Biodiesel e glicerol

O biodiesel é um biocombustível composto por ésteres de ácidos graxos proveniente da reação de transesterificação de triglicerídeos (TAGs) encontrados em gorduras e óleos de origem animal e/ou vegetal com álcoois de cadeias curtas (KNOTHE et al. 2005). Esta reação é definida pela reação entre um éster e um álcool, formando um novo éster e um novo álcool, sendo o metanol (CH<sub>3</sub>OH) o álcool de cadeia curta mais utilizado para a produção de biodiesel. A Figura 3.1 representa um esquema da reação de transesterificação de triglicerídeos para a formação de biodiesel.

Figura 3.1 – Reação esquemática de transesterificação de triglicerídeos para a produção de biodiesel.



O interesse pelo biodiesel como fonte energética alternativa teve seu primeiro crescimento acentuado entre 1970 e meados da década de 1980, decorrente da crise energética global que ocorreu neste período (KNOTHE et al. 2005). Desde então, o

biodiesel vem adquirindo espaço dentro do mercado mundial como um possível substituto de combustíveis fósseis, os quais tem seu uso cada vez mais questionado devido a sua natureza não renovável e nociva ao meio ambiente. As vantagens do biodiesel com relação ao petrodiesel incluem sua procedência (produzido através de fontes naturais e renováveis), ausência de enxofre, poder altamente lubrificante, e elevada capacidade calorífica (RAJKUMAR et al. 2019). Devido a estas vantagens e visando à diminuição da taxa de importação de petrodiesel, diversos países vêm incentivando o uso de biodiesel como um combustível alternativo para veículos (BHUIYA et al. 2015; GUMUS et al. 2010). A completa miscibilidade deste combustível com o petrodiesel e o fato de que motores a base de petrodiesel não precisam ser alterados para comportar o uso de biodiesel puro ou de misturas (independentes de suas concentrações) levam a vendas de blends deste biocombustível com petrodiesel (QI et al., 2009; SHAHABUDDIN et al., 2013; TAKASE et al., 2015). A mistura destes dois combustíveis não pode ser considerada como biodiesel puro para venda e é comumente referida por acrônimos como B10 (10% biodiesel com petrodiesel), por exemplo (KNOTHE et al. 2005).

Mesmo com as inúmeras vantagens no ponto de vista ambiental do uso de biodiesel em relação ao petrodiesel, é necessário ressaltar que a transesterificação de triglicerídeos resulta na formação de grande quantidade de glicerol como subproduto de reação. O glicerol é ainda um produto de baixo valor agregado e representa uma média de 10% do volume total de produto da reação descrita na Figura 3.1 (ANP, 2018). Conhecido por sua alta estabilidade a temperatura ambiente e por não causar irritação em contato com a pele ou quando ingerido, o glicerol é usado como aditivo para cosméticos, artigos de higiene pessoal, na composição de fármacos e alimentos (PAGLIARO et al. 2008). Este subproduto vinha sendo produzido primariamente a partir das indústrias de ácidos graxos e sabão até meados de 1999, porém, devido ao crescimento da demanda global de biodiesel, grandes quantidades de glicerol não refinado passaram a ser continuamente injetados no mercado, resultando em um aumento de 200% de sua produção em 2011, quando comparado com a década passada (ANITHA et al. 2016). Considerado hoje como o subproduto mais abundante no mundo (LAPUERTA et al., 2019), o mercado de glicerol se encontra saturado, o que acarreta na diminuição de seu valor de revenda e impacta negativamente na viabilidade econômica e ambiental da produção de biodiesel.

Uma das alternativas para solucionar este problema é o desenvolvimento de processos capazes de consumir o glicerol como matéria-prima para a geração de novos produtos de

maior valor agregado, buscando reduzir a quantidade excedente deste subproduto no mercado. Pode-se citar como exemplos de alternativas propostas para a utilização do glicerol como matéria-prima para a obtenção de produtos de maior valor agregado:

- ➔ Combustível para células de combustível de álcool direto (*Direct alcohol fuel cells* - DAFC) visando à produção de energia elétrica (ZHANG et al. 2012).
- ➔ Produção de commodities químicas como o DHA (ácido docosahexaenóico) para a indústria de cosméticos; ácido fórmico como aditivo antibacteriano para ração na pecuária; poliésteres utilizados na indústria têxtil e plástica; acroleína, entre outros (ANITHA et al. 2016).
- ➔ Produção de emulsificantes utilizados nas indústrias têxteis e farmacêuticas como monoglicerídeos e diglicerídeos (CHEIRSILP et al. 2007).

Dentre os diferentes processos citados, a glicerólise de óleos vegetais é uma das rotas mais estudadas para a obtenção de produtos de alto valor agregado a base do glicerol, apresentando elevado potencial econômico na sua rota alcalina.

### 3.2 Óleos Vegetais

Lipídeos no estado líquido à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) são denominados óleos. Óleos vegetais, assim como gorduras animais, são compostos predominantemente por triglicerídeos (98%), com o restante de sua composição consistindo de uma mistura de ácidos graxos, fosfolipídeos, monoacilgliceróis e diacilgliceróis (NEUZA JORGE, 2009). Os triglicerídeos são triésteres com cadeias de ácidos graxos unidas a uma molécula de glicerol (ŘEZANKA et al. 2017). A Figura 3.1 apresenta a estrutura básica dos triglicerídeos, onde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> são radicais alquila derivados de ácidos graxos que possuem geralmente comprimentos de cadeias de 16, 18, 20 ou 22 carbonos (ŘEZANKA et al. 2017).

Os ácidos graxos correspondentes aos radicais que constituem a estrutura dos triglicerídeos são caracterizados pelo seu comprimento de cadeia carbônica, assim como

pelo seu nível de saturação. A representação simbólica utilizada para estes ácidos graxos consiste em:

$$CN_1:N_2 \quad (1)$$

onde N1 e N2 representam, respectivamente, o número de carbonos e o número de insaturações presentes na cadeia. A Tabela 3.1 mostra alguns dos principais ácidos graxos presentes nas cadeias dos triglicerídeos.

Tabela 3.1 – Lista de principais ácidos graxos naturais encontrados em óleos vegetais e suas simbologias

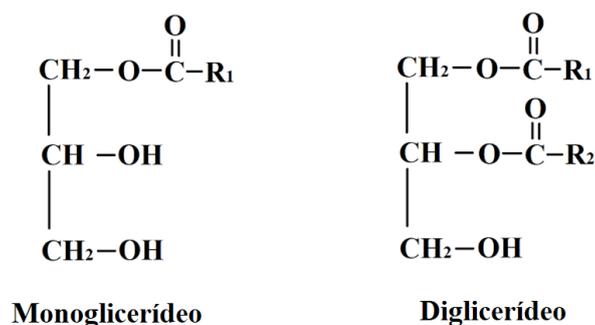
<b>Representação simbólica</b>	<b>Nome</b>
C4:0	Ácido butírico
C6:0	Ácido capróico
C8:0	Ácido caprílico
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolênico
C20:0	Ácido araquídico
C24:0	Ácido lignocérico

Os triglicerídeos são amplamente utilizados como aromatizantes, umectantes e agentes carregadores de aromas e produção de emulsificantes (NEUZA JORGE, 2009). No caso dos emulsificantes, estes podem ser produzidos através de diversas rotas reacionais, como hidrólise, epoxidação e glicerólise de triglicerídeos (MIAO et al., 2014). Outras rotas para a sua produção incluem a esterificação direta do glicerol com ácidos graxos e transesterificação de glicerol com metil-ésteres (NAIK et al. 2014). Os triglicerídeos também são utilizados como matérias primas em outras reações visando à formação de produtos de elevado valor agregado. Dentre estes, destaca-se a reação de transesterificação com álcoois de cadeias curtas como o metanol ou etanol para a formação do biodiesel (DUNN, 2009).

### 3.3 Monoglicerídeos e diglicerídeos

Monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG) são moléculas anfifílicas (ou seja, apresentam uma parte de sua estrutura polar (hidrofílica) e outra parte apolar (hidrofóbicas)) biodegradáveis, amplamente utilizadas nas indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica na forma de emulsificantes (GHAMGUI et al., 2006). A Figura 3.2 apresenta uma estrutura representativa das moléculas de monoglicerídeos e diglicerídeos, sendo  $R_1$  e  $R_2$  radicais alquila derivados de ácidos graxos como os descritos na Tabela 3.1.

Figura 3.2– Estrutura representativa de monoglicerídeos (1-MAG) e de diglicerídeos (1,2-DAG).



Os monoglicerídeos são amplamente usados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos na forma de emulsificantes. Alguns exemplos de seu uso para a indústria farmacêutica são: emulsões para a mucosa bucal como um antibactericida, antiviral ou antimicrobiano (monocaprina); prevenção de efeitos danosos provocados por desordem vascular (monoglicerídeos de ácidos EPA e DHA); uso em medicamentos com efeitos antivirais, bactericidas e antimicrobianos, ou como um agente penetrante em membranas mucosas, reduzindo o tempo necessário para o início da atuação de medicamentos e a quantidade de medicamento que permeia a membrana (monolaurina); sistema de liberação de drogas, emulsificante e carregador farmacêutico (monooleína) (FREITAS et al., 2008). Para a indústria alimentícia, MAGs são usados como emulsificantes para margarinas e produtos lácteos, além de estabilizante de emulsões na maionese e outros molhos (citrato de monoglicerina); agente modificador de massas e emulsificantes na produção de bolos industriais (succinato de monoglicerina) (FREITAS et al., 2008). Cosméticos empregam

MAGs como agentes texturizantes visando melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG et al., 2005). Outras aplicações que podem ser citadas são a de tratamento de cabelo (monopentanoglicerol) e, devido a sua excelente propriedade lubrificante, aplicação em processos têxteis, produção de plásticos e óleos para maquinários (VOLL et al., 2011).

Os diglicerídeos mostraram nos últimos anos vantagens para a saúde humana, principalmente na redução de gordura visceral abdominal. Em sua forma *sn-1-3-diacilglicerol*, pode ter efeitos benéficos para a prevenção de doenças como a obesidade e a lipemia (KASAMATSU et al., 2005).

Devido à alta aplicabilidade que estas moléculas possuem em diferentes ramos industriais, sua obtenção é altamente desejável. MAGs e DAGs podem ser encontrados em baixas concentrações dentro da mistura que compõem os óleos e gorduras. No entanto, sua produção a nível industrial é realizada através da conversão de triglicerídeos nestas duas moléculas. Reações de hidrólise de triglicerídeos ou de glicerólise de triglicerídeos são as principais rotas utilizadas para a produção de MAGs e DAGs a partir de TAGs.

### 3.4 Óleo de milho

Milho (*Zea mays*) é um cereal da família Poaceae, popularmente conhecidas como gramíneas. Devido a sua alta adaptabilidade a diversos ecossistemas e a criação de espécies geneticamente modificadas que possuem elevado rendimento, a produção extensiva de milho foi favorecida ao longo dos anos. Hoje ele é considerado como o cereal mais produzido mundialmente (seguido pelo arroz e o trigo), tendo atingido em 2019 uma marca de 1,099 bilhão de toneladas colhidos (LARA et al. 2019). Os principais produtores de milho são os EUA, representando 31,6% de toda a produção mundial, seguido da China (23 %) e o Brasil (9,2 %) (CONAB, 2019).

O milho é utilizado primariamente na forma de alimento para pecuária e para a produção de bioetanol, tendo 85% de toda a sua produção voltada para estes dois destinatários em 2016 (LARA et al. 2019). Seu óleo é rico em fitoesteróis como o  $\beta$ -sitoesterol e tocoferóis como o  $\gamma$ -tocoferol. Estas substâncias são consideradas benignas para a saúde humana, havendo estudos que demonstram seus efeitos contra a pressão alta, agregação de plaquetas e diabetes por exemplo (GHAZANI et al. 2015). A composição de

ácidos graxos presentes no óleo de milho é apresentada na Tabela 3.2. Pode-se observar um alto percentual de cadeias insaturadas presentes na composição deste óleo.

Tabela 3.2 – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de milho refinado de acordo com Carrillo et al. (2017)

Ácido Graxo	Composição molar
C16:0	12 %
C18:0	2 %
C18:1	29 %
C18:2	52 %
C18:3	1 %
C20:0	0,3 %

Devido a sua elevada disponibilidade recorrente de sua extensiva produção e aos potenciais benefícios que este óleo pode trazer à saúde humana, optou-se pelo seu uso para a produção de agentes emulsificantes como os DAGs e MAGs.

### 3.5 Glicerólise de óleos vegetais

A glicerólise de óleos vegetais consiste na conversão de triglicerídeos (TAGs) em monoglicerídeos (MAGs) e diglicerídeos (DAGs) através da reação com glicerol. A glicerólise de triglicerídeos pode ser realizada por duas rotas catalíticas: a catálise alcalina e a catálise enzimática.

A glicerólise por rota alcalina utiliza catalisadores alcalinos inorgânicos como o NaOH, CaOH e KOH. É a reação mais utilizada para a produção de MAGs e DAGs a nível industrial, tendo se consolidado devido ao seu baixo tempo de reação. Entretanto este processo possui diversas desvantagens como a baixa taxa de conversão de triglicerídeos (aproximadamente 40%), escurecimento e sabor adusto no produto final (indesejáveis para a indústria cosmética e alimentícia), alto consumo energético devido a altas temperaturas reacionais empregadas (200 – 260 °C) e necessidade de aplicar técnicas de purificação, como a destilação molecular, após a reação (NOUREDDINI et al. 2004; VOLL et al. 2011).

A glicerólise por rota enzimática surgiu como uma alternativa para a obtenção de produtos mais limpos. O uso de catalisadores enzimáticos leva a maiores rendimentos reacionais que a alcalina (atingindo até 98% de conversão), menores temperaturas reacionais empregadas (30 – 70 °C), apresentam elevada especificidade e formam produtos

não enegrecidos com sabor palatável. A maior desvantagem desta tecnologia consiste no custo elevado do catalisador, o qual tem motivado diversas pesquisas que tentam viabilizar o uso desta técnica (ZHONG et al., 2010).

Diversos tipos de óleos vegetais foram utilizados como substrato para a produção de MAGs e DAGs através de reações de glicerólise de triglicerídeos tanto por rota alcalina como enzimática. Estudos da segunda rota são mais recentes, contando com um menor número de trabalhos apresentados na literatura. Alguns dos exemplos de trabalhos encontrados na literatura para reações de glicerólise catalisadas por enzimas são: glicerólise de óleo de sardinha por Solaesa et al. (2016) usando Lipozyme 435, glicerólise de azeite de dendê por Cheirsilp et al. (2007) usando Lipase PS (*Pseudomonas* sp.), glicerólise de óleo de girassol por Naik et al. (2014) usando Fermase 10000 e glicerólise do óleo de mamona por Sun et al. (2018) usando Lipozyme 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM.

Uma vez que a separação de MAGs e DAGs dos TAGs ainda presentes após a reação não pode ser realizada de maneira trivial, é altamente desejável obter elevadas conversões de triglicerídeos e elevada pureza do produto final com relação à espécie de interesse (DECLERCQ et al. 2008). A seletividade da reação de glicerólise de triglicerídeos pode ser controlada através do uso de catalisadores regioseletivos ou pelas condições reacionais aplicadas, como a razão molar de glicerol/óleo e utilização de solventes orgânicos.

No que se refere à razão molar utilizada de glicerol/óleo, reações mais concentradas em glicerol com relação ao óleo tendem a favorecer a formação de monoglicerídeos enquanto menores razões de glicerol/óleo levam à formação prioritária de diglicerídeos (NAIK et al. 2014). A razão molar glicerol/óleo ótima reportada por Yang et al. (2005) e Naik et al. (2014) para reações de glicerólise de óleo de girassol foi de aproximadamente 6:1, sendo que em ambos os trabalhos foi observado que razões de glicerol/óleo superiores levam a uma diminuição da concentração final de MAGs. Atribui-se este efeito a possível desativação da enzima ou de aglomeração da mesma (NAIK et al. 2014; YANG et al. 2005).

O uso de solventes orgânicos aumenta as taxas de produção de MAGs e DAGs devido à diminuição da viscosidade da mistura glicerol/óleo, aumentando a taxa de transferência de massa do sistema. Naik et al. (2014) realizou testes com diferentes solventes orgânicos para a reação de glicerólise de óleo de girassol e constatou que o t-butanol foi o solvente

que apresentou maior produção de MAGs ao longo da reação sem interferir nas espécies formadas nos produtos de reação.

### 3.6 Enzimas

O estudo das enzimas começou por volta do século XIX quando pesquisadores investigavam as reações de digestão e fermentação de açúcares para a formação de etanol e gás carbônico (VOET et al. 2013). Louis Pasteur foi o primeiro a propor que as reações de fermentação/digestão eram catalisadas por agentes biológicos, diferente de outros pesquisadores que atribuíam à elementos inorgânicos a ação catalítica dessas reações. Em 1897, o termo enzima foi utilizado pela primeira vez por Friedrich Wilhelm Kühne ao descrever a ação enzimática presentes nas leveduras que catalisavam as reações de fermentação (VOET et al. 2013).

As enzimas são uma classe de proteínas que atuam como catalisadores biológicos para inúmeras reações essenciais para o funcionamento de nosso metabolismo. Por serem proteínas, são, na sua maioria, macromoléculas constituídas por longas cadeias de aminoácidos. Exceções a esta regra existem em casos específicos, onde enzimas constituídas por RNAs (ácidos ribonucleicos) apresentam também atividade catalítica (CAMPBELL et al. 2008). Estes catalisadores biológicos diminuem a energia de ativação de reações que fornecem produtos indispensáveis para o funcionamento do metabolismo que, sem sua presença, ocorreriam em taxas muito inferiores às taxas de consumo energético ou até não ocorreriam (VOET et al. 2013).

Quando comparados com a maioria dos catalisadores inorgânicos, catalisadores enzimáticos possuem como diferencial as seguintes características:

- a) **Elevadas taxas de reação:** Catalisadores enzimáticos tendem a possuir uma atividade maior quando comparados a um catalisador não-enzimático, sendo que a diferença das ordens de grandeza nas taxas de reação pode ser bastante elevada (VOET et al. 2013, CAMPBELL et al. 2008).
- b) **Condições brandas de reação:** Reações catalisadas por enzimas utilizam temperaturas mais brandas (abaixo de 100 °C), pH neutro e baixas pressões, sendo que a maioria dos catalisadores não-enzimáticos possuem como condições otimizadas de reação: elevada temperatura e elevada pressão (VOET et al. 2013).

- c) **Alta especificidade:** Enzimas possuem elevada especificidade com relação aos substratos com as quais irão interagir. Esta característica é atrativa comercialmente, pois produz produtos mais puros, apresentando raramente subprodutos após o término da reação (VOET et al. 2013). Dependendo da enzima a especificidade é tão elevada que esta é capaz de diferenciar estereoisômeros de um determinado composto (CAMPBELL et al. 2008).

A elevada especificidade junto com altas taxas de reação são as principais características que tornam os catalisadores enzimáticos muito atrativos industrialmente. Por outro lado, catalisadores enzimáticos são relativamente mais caros que os alcalinos, além de ser mais sensíveis à temperatura. A sensibilidade com relação à temperatura da reação catalisada por enzimas pode resultar em menores taxas de reação que a alcalina a baixas temperaturas (próxima a ambiente) ou na desnaturação da lipase para temperaturas mais elevadas (acima de 100 °C) (NAIK et al. 2014). Além disso, as condições brandas de operação podem ser vistas como desvantagens para o uso destes catalisadores em certos processos industriais, pois processos a elevadas temperaturas possuem vantagens como o aumento da solubilidade entre substratos e produtos, redução do tempo de hidrólise e redução de contaminação por microrganismos (ATALAH et al., 2019). Neste sentido, enzimas provenientes de organismos termofílicos (que suportam faixas de temperaturas mais elevadas como 50 °C a 80 °C) como *Geobacillus* e *Anoxybacillus*, por exemplo, possibilitam contornar a baixa estabilidade das enzimas em temperaturas mais elevadas (ZHANG et al., 2016). Outra técnica utilizada para conferir maior estabilidade térmica às enzimas é o uso de enzimas suportadas. Neste caso ainda pode-se citar como vantagem a possibilidade de reuso devido a sua maior facilidade de separação da mistura reacional.

### 3.7 Cinética de Catalisadores Enzimáticos

O estudo da cinética de reações envolvendo catalisadores enzimáticos permitiu o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nestas reações, resultando em um elevado impacto na história desta ciência (ANDERSEN et al., 2018).

Um dos primeiros modelos propostos para o cálculo das taxas de reações catalisadas por enzimas consiste na famosa equação de Michaelis-Menten. Esta equação, embora simples, é amplamente utilizada até os dias atuais. Primeiramente, Adrian Brown propôs

em 1902 uma reação esquemática para a reação de hidrólise de sacarose catalisada por fermento (enzima). Esta reação pode ser representada esquematicamente pela Equação 2:



onde  $E$ ,  $S$  e  $P$  representam as espécies envolvidas na reação: enzimas, substratos e produtos, respectivamente. Na Equação 2 se considera a etapa de formação do complexo  $ES$  muito mais rápida que a sua etapa de conversão em produto, a qual é assumida como como etapa limitante de reação. Além disto, em concentrações muito elevadas de  $S$ , a variação da concentração do complexo  $ES$  é aproximadamente igual a zero ao longo do tempo (após um pequeno intervalo de tempo de transição). Desta forma, considera-se que a taxa de formação de  $ES$  é aproximadamente igual à de sua conversão ( $\frac{dS}{dt} \approx 0$ ), caracterizando um estado pseudo-estacionário.

Realizando a manipulação das taxas de reação da Equação 2 e considerando-se um sistema em estado pseudo-estacionário, obtém-se a equação de taxas de reações enzimáticas proposta por Michaelis-Menten.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

onde  $v_0$  é a taxa de formação de produto  $P$ ,  $K_M$  é denominada como a constante de Michaelis-Menten, e  $V_{max}$  a taxa máxima de reação, que pode ser definida como:

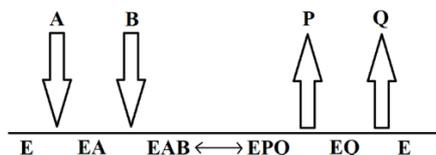
$$V_{max} = k_2[E]_T \quad (4)$$

onde  $[E]_T$  é a concentração total de enzima adicionada no sistema.

A equação de Michaelis-Menten é amplamente empregada em situações que possam ser descritas pela presença de monossustrato, devido à sua simplicidade e boa adequação na representação das taxas de reação. Entretanto, uma grande quantidade de reações envolvendo enzimas é realizada na presença de dois ou mais substratos (VOET et al. 2013). Reações do tipo bissustratos podem ser classificadas em:

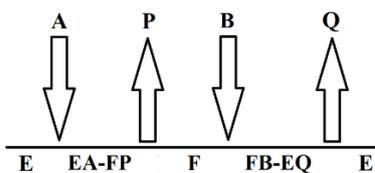
- Reações do tipo sequenciais Bi Bi: As reações sequenciais são reações onde todos os substratos participantes da reação devem se ligar à enzima para que a reação ocorra. Este tipo de reação pode ainda ser separado em reações ordenadas ou randômicas. Nas reações ordenadas, existe uma ordem específica de ligação a ser seguida para a formação de um complexo substrato/enzima específico. Neste caso um substrato A deve se ligar ao sítio ativo da enzima primeiramente para permitir a ligação de um segundo substrato B. Nas reações randômicas, ambos os substratos podem se ligar diretamente na enzima, não precisando seguir uma sequência específica para a formação do complexo. A Figura 3.3 mostra um esquema simplificado de reações sequenciais do tipo Bi Bi, onde A e B são os dois substratos participantes da reação e P e Q são os produtos de reação.

Figura 3.3 – Reação bissubstrato sequencial do tipo Bi Bi para catalisadores enzimáticos adaptado do esquema apresentado por Voet et Voet (2013).



- Reações do tipo Ping Pong Bi Bi: As reações do tipo Ping Pong são caracterizadas pela formação de complexos substrato/enzima e liberação de produtos antes que todos os substratos participantes na reação se liguem com a enzima. A Figura 3.4 representa um esquema de reações do tipo Ping Pong Bi Bi, onde o substrato A forma um complexo EA e logo em seguida se converte em um novo complexo FP. Apenas após a liberação do produto P ocorre a inserção de um segundo substrato na enzima, seguido da liberação do último produto Q.

Figura 3.4 – Reação bissubstrato Ping Pong Bi Bi para catalisadores enzimáticos adaptado do esquema apresentado por Voet et Voet (2013).



### 3.8 Modelagem cinética da glicerólise de TAGs

A modelagem da cinética de reações enzimáticas para a glicerólise de triglicerídeos voltadas para a produção de emulsificantes como monoglicerídeos e diglicerídeos ainda é pouco estudada na literatura (VOLL et al., 2011).

Um dos primeiros modelos para a produção de MAGs e DAGs através de TAGs foi o proposto por Cheirsilp et al. (2007) para a hidrólise do azeite de dendê. Usando adição de água ao meio reacional, de forma a garantir predominância das reações de hidrólise sobre as de glicerólise de TAGs, e desconsiderando a resistência à transferência de massa, os autores obtiveram um sistema de equações diferenciais a partir das reações intermediárias governantes para a reação. A hipótese com relação à ausência de resistência associada à transferência de massa foi baseada em dados reportados anteriormente na literatura para catalisadores enzimáticos heterogêneos com suporte poroso (CHEN et al. 1998; ROMERO et al. 2007).

Baseados no modelo de hidrólise de triglicerídeos proposto por Cheirsilp et al. (2007), Valério et al. (2009) implementaram um sistema de equações diferenciais para a glicerólise dos óleos vegetais baseado no modelo de Ping Pong Bi Bi para reações enzimáticas. Mesmo trabalhando sem a adição de água no meio reacional, os autores não removeram as etapas de hidrólise de seu equacionamento, pois consideraram que, mesmo sem a adição direta de água no sistema, é possível encontrar umidade nos substratos utilizados, especialmente do glicerol (2009).

Voll et al. (2011) utilizaram no seu equacionamento as mesmas reações consideradas no modelo de Valério et al. (2009), porém levando em consideração os complexos formados entre os substratos/enzimas e produtos/enzimas.

Os modelos de Valério et al. (2009) e de Voll et al. (2011) serão descritos mais detalhadamente a seguir.

#### 3.8.1 Modelo Cinético de Valério et al.

A glicerólise de TAGs com glicerol pode ser representada pela seguinte reação global:



No entanto, esta reação envolve várias etapas intermediárias, como a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos. A Tabela 3.3 mostra a sequência de reações intermediárias que compõem a reação global de glicerólise de triglicerídeos proposta por Valério et al. (2009). As reações intermediárias (6) e (7) representam, respectivamente, a glicerólise de TAGs provenientes de óleos vegetais e de DAGs provenientes da primeira reação. A reação (8) representa a reação de interesterificação de triglicerídeos com monoglicerídeos. As reações (9), (10) e (11) descritas na Tabela 3.3 são as reações de hidrólise dos lipídeos descritas por Cheirsilp et al. (2007).

Tabela 3.3 – Reações esquematizadas da glicerólise de triglicerídeos proposta por Valério et al. (2009)

Reações	Reações Esquemáticas
Glicerólise de triglicerídeos	$TAG + G \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} MAG + DAG \quad (6)$
Glicerólise de diglicerídeos	$DAG + G \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} 2MAG \quad (7)$
Interesterificação de triglicerídeos com monoglicerídeos	$TAG + MAG \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} 2DAG \quad (8)$
Hidrólise de triglicerídeos	$TAG + W \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} DAG + FA \quad (9)$
Hidrólise de diglicerídeos	$DAG + W \xrightleftharpoons[k_{10}]{k_9} MAG + FA \quad (10)$
Hidrólise de monoglicerídeos	$MAG + W \xrightleftharpoons[k_{12}]{k_{11}} G + FA \quad (11)$

Assim, as equações das taxas de reação que constituem o modelo de Valério et al. (2009), obtidas a partir das Equações 6 - 11, são escritas como:

$$\begin{aligned}
r_{MAG} = & k_1[TAG][G] - k_2[DAG][MAG] + 2k_3[DAG][G] \\
& - 2k_4[MAG]^2 - k_5[TAG][MAG] + k_6[DAG]^2 \\
& + k_9[DAG][W] - k_{10}[MAG][FA] - k_{11}[MAG][W] \\
& + k_{12}[G][FA]
\end{aligned} \tag{12}$$

$$\begin{aligned}
r_{DAG} = & k_1[TAG][G] - k_2[DAG][MAG] - k_3[DAG][G] + k_4[MAG]^2 \\
& + 2k_5[TAG][MAG] - 2k_6[DAG]^2 + k_7[TAG][W] \\
& - k_8[DAG][FA] - k_9[DAG][W] + k_{10}[MAG][FA]
\end{aligned} \tag{13}$$

$$\begin{aligned}
r_{TAG} = & -k_1[TAG][G] + k_2[DAG][MAG] - k_5[TAG][MAG] \\
& + k_6[DAG]^2 - k_7[TAG][W] + k_8[DAG][FA]
\end{aligned} \tag{14}$$

$$\begin{aligned}
r_G = & -k_1[TAG][G] + k_2[DAG][MAG] - k_3[DAG][G] + k_4[MAG]^2 \\
& + k_{11}[MAG][W] - k_{12}[G][FA]
\end{aligned} \tag{15}$$

$$\begin{aligned}
r_{FA} = & k_7[TAG][W] - k_8[DAG][FA] + k_9[DAG][W] - k_{10}[MAG][FA] \\
& + k_{11}[MAG][W] - k_{12}[G][FA]
\end{aligned} \tag{16}$$

$$\begin{aligned}
r_W = & -k_7[TAG][W] + k_8[DAG][FA] - k_9[DAG][W] \\
& + k_{10}[MAG][FA] - k_{11}[MAG][W] + k_{12}[G][FA]
\end{aligned} \tag{17}$$

onde:

$$r_i = \frac{dG_i}{dt} \tag{18}$$

sendo  $i$  as espécies envolvidas na reação de glicerólise de triglicerídeos (MAG, DAG, TAG, G, FA e W).

### 3.8.2 Modelo Cinético de Voll et al.

Voll et al. (2011) usaram no seu equacionamento as mesmas reações consideradas no modelo de Valério et al. (2009), porém levando em consideração os estados intermediários de reação e as respectivas taxas de formação dos complexos substrato/enzima e

produto/enzima. A Tabela 3.4 mostra a sequência de reações intermediárias que compõem a reação global de glicerólise de triglicerídeos proposta por Voll et al. (2011).

Tabela 3.4 – Reações esquematizadas da glicerólise de triglicerídeos proposta por Voll et al. (2011)

Reações	Reações Esquemáticas
Glicerólise de triglicerídeos	$TAG + G + E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} TAGxGxE \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} MAGxDAGxE \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} MAG + DAG + E$ (19)
Glicerólise de diglicerídeos	$DAG + G + E \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} DAGxGxE \xrightleftharpoons[k_{10}]{k_9} MAGxMAGxE \xrightleftharpoons[k_{12}]{k_{11}} 2 MAG + E$ (20)
Interesterificação de triglicerídeos	$TAG + MAG + E \xrightleftharpoons[k_{14}]{k_{13}} TAGxMAGxE \xrightleftharpoons[k_{16}]{k_{15}} DAGxDAGxE \xrightleftharpoons[k_{18}]{k_{17}} 2 DAG + E$ (21)
Hidrólise de triglicerídeos	$TAG + W + E \xrightleftharpoons[k_{20}]{k_{19}} TAGxWxE \xrightleftharpoons[k_{22}]{k_{21}} DAGxFaxE \xrightleftharpoons[k_{24}]{k_{23}} DAG + FA + E$ (22)
Hidrólise de diglicerídeos	$DAG + W + E \xrightleftharpoons[k_{26}]{k_{25}} DAGxWxE \xrightleftharpoons[k_{28}]{k_{27}} MAGxFaxE \xrightleftharpoons[k_{30}]{k_{29}} MAG + FA + E$ (23)
Hidrólise de monoglicerídeos	$MAG + W + E \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{31}} MAGxWxE \xrightleftharpoons[k_{34}]{k_{33}} GxFaxE \xrightleftharpoons[k_{36}]{k_{35}} G + FA + E$ (24)

Portanto, as equações das taxas de reação que constituem a base do modelo de Voll et al. (2011), obtidas a partir das Equações 19 - 24, são dadas por:

$$\begin{aligned}
 r_{MAG} = & k_5[MAGxDAGxE] - k_6[MAG][DAG][E] + 2k_{11}[MAGxMAGxE] \\
 & - 2k_{11}[MAG]^2[E] - k_{13}[TAG][MAG][E] \\
 & + k_{14}[TAGxMAGxE] + k_{29}[MAGxFaxE] - k_{30}[MAG] * [FA] \\
 & * [E] - k_{31}[MAG][W][E] + k_{32}[MAGxWxE]
 \end{aligned} \quad (25)$$

$$\begin{aligned}
 r_{DAG} = & k_5[MAGxDAGxE] - k_6[MAG][DAG][E] - k_7[DAG][G][E] \\
 & + k_8[DAGxGxE] + 2k_{17}[DAGxDAGxE] - 2k_{18}[DAG]^2[E] \\
 & + k_{23}[DAGxFaxE] - k_{24}[DAG][FA][E] - k_{25}[DAG][W][E] \\
 & + k_{26}[DAGxWxE]
 \end{aligned} \quad (26)$$

$$\begin{aligned} r_{TAG} = & -k_1[TAG][G][E] + k_2[TAGxGxE] - k_{13}[TAG][MAG][E] \\ & + k_{14}[TAGxMAGxE] - k_{19}[TAG][W][E] + k_{20}[TAGxWxE] \end{aligned} \quad (27)$$

$$\begin{aligned} r_G = & -k_1[TAG][G][E] + k_2[TAGxGxE] - k_7[DAG][G][E] + k_8[DAGxGxE] \\ & + k_{35}[GxFxE] - k_{36}[G][FA][E] \end{aligned} \quad (28)$$

$$\begin{aligned} r_{FA} = & k_{23}[DAGxFxE] - k_{24}[DAG][FA][E] \\ & + k_{29}[MAGxFxE] - k_{30}[MAG][FA][E] + k_{35}[GxFxE] \\ & - k_{36}[G][FA][E] \end{aligned} \quad (29)$$

$$\begin{aligned} r_W = & -k_{19}[TAG][W][E] + k_{20}[TAGxWxE] \\ & - k_{25}[DAG][W][E] + k_{26}[DAGxWxE] - k_{31}[MAG][W][E] \\ & + k_{32}[MAGxWxE] \end{aligned} \quad (30)$$

Uma vez que as concentrações dos complexos substrato/enzima e produto/enzima não podem ser mensuradas diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography), é necessário remover estas concentrações do equacionamento das equações cinéticas governantes. Para isto, Voll et al. (2011) usaram a hipótese de que as taxas de variação das concentrações dos complexos substrato/enzima e produto/enzima podem ser consideradas nulas. Esta aproximação pode ser realizada uma vez que a reação de formação produtos a partir do complexo substrato-enzima ocorre muito mais rápido que a formação destes complexos. Desta forma, pode-se considerar as seguintes equações para as concentrações dos complexos substrato/enzima e produto/enzima:

$$\begin{aligned} \frac{d[TAGxGxE]}{dt} = & k_1[TAG][G][E] - k_2[TAGxGxE] - k_3[TAGxGxE] \\ & + k_4[MAGxDAGxE] = 0 \end{aligned} \quad (31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAGxGxE]}{dt} = & k_7[DAG][G][E] - k_8[DAGxGxE] - k_9[DAGxGxE] \\ & + k_{10}[MAGxMAGxE] = 0 \end{aligned} \quad (32)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAGxDAGxE]}{dt} &= k_3[TAGxGxE] - k_4[MAGxDAGxE] \\ &\quad - k_5[MAGxDAGxE] + k_6[MAG][DAG][E] = 0 \end{aligned} \quad (33)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAGxMAGxE]}{dt} &= k_9[DAGxGxE] - k_{10}[MAGxMAGxE] \\ &\quad - k_{11}[MAGxMAGxE] + k_{12}[MAG]^2[E] = 0 \end{aligned} \quad (34)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[TAGxMAGxE]}{dt} &= k_{13}[TAG][MAG][E] - k_{15}[TAGxMAGxE] \\ &\quad - k_{14}[TAGxMAGxE] + k_{16}[DAGxDAGxE] = 0 \end{aligned} \quad (35)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAGxDAGxE]}{dt} &= k_{15}[TAGxMAGxE] - k_{16}[DAGxDAGxE] \\ &\quad - k_{17}[DAGxDAGxE] + k_{18}[DAG]^2[E] = 0 \end{aligned} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[TAGxWxE]}{dt} &= k_{19}[TAG][W][E] - k_{20}[TAGxWxE] \\ &\quad - k_{21}[TAGxWxE] + k_{22}[DAGxFxE] = 0 \end{aligned} \quad (37)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAGxWxE]}{dt} &= k_{25}[DAG][W][E] - k_{26}[DAGxWxE] \\ &\quad - k_{27}[DAGxWxE] + k_{28}[MAGxFxE] = 0 \end{aligned} \quad (38)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAGxWxE]}{dt} &= k_{31}[MAG][W][E] - k_{32}[MAGxWxE] \\ &\quad - k_{33}[MAGxWxE] + k_{34}[GxFxE] = 0 \end{aligned} \quad (39)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAGxFxE]}{dt} &= k_{21}[TAGxWxE] - k_{22}[DAGxFxE] \\ &\quad - k_{23}[DAGxFxE] + k_{24}[DAG][FA][E] = 0 \end{aligned} \quad (40)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAGxFxE]}{dt} &= k_{27}[DAGxWxE] - k_{28}[MAGxFxE] \\ &\quad - k_{29}[MAGxFxE] + k_{30}[MAG][FA][E] = 0 \end{aligned} \quad (41)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[GxFxE]}{dt} &= k_{33}[MAGxWxE] - k_{34}[GxFxE] \\ &\quad - k_{35}[GxFxE] + k_{36}[G][FA][E] = 0 \end{aligned} \quad (42)$$

Adicionalmente, a concentração total de enzima usada no meio reacional pode ser representada pela soma de todas as concentrações de complexos envolvendo enzima com a concentração de enzima livre no meio reacional:

$$\begin{aligned}
[Et] = & [E] + [TAGxGxE] + [MAGxDAGxE] + [DAGxGxE] + [MAGxMAGxE] \\
& + [TAGxMAGxE] + [DAGxDAGxE] + [TAGxWxE] + [DAGxWxE] \\
& + [MAGxWxE] + [DAGxFAxE] + [MAGxFAxE] + [GxFAxE]
\end{aligned} \tag{43}$$

Assim, obtendo-se as expressões para as concentrações dos complexos substrato/enzima e produto/enzima, a partir das Equações 31 - 42, e substituindo-as nas Equações 25 - 30 e na Equação 43, obtém-se:

$$\mathbf{r}_{MAG} = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} V_1[TAG][G] - V_2[MAG][DAG] + 2V_3[DAG][G] \\ -2V_4[MAG]^2 - V_5[MAG][TAG] + V_6[DAG]^2 + V_9[DAG][W] \\ -V_{10}[MAG][FA] - V_{11}[MAG][W] + V_{12}[G][FA] \end{bmatrix} \tag{44}$$

$$\mathbf{r}_{DAG} = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} V_1[TAG][G] - V_2[MAG][DAG] - V_3[DAG][G] \\ +V_4[MAG]^2 + 2V_5[MAG][TAG] - 2V_6[DAG]^2 + V_7[TAG][W] \\ -V_8[DAG][FA] - V_9[DAG][W] + V_{10}[MAG][FA] \end{bmatrix} \tag{45}$$

$$\mathbf{r}_{TAG} = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} -V_1[TAG][G] + V_2[MAG][DAG] - V_5[MAG][TAG] \\ +V_6[DAG]^2 - V_7[TAG][W] + V_8[DAG][FA] \end{bmatrix} \tag{46}$$

$$\mathbf{r}_G = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} -V_1[TAG][G] + V_2[MAG][DAG] - V_3[DAG][G] \\ +V_4[MAG]^2 + V_{11}[MAG][W] - V_{12}[G][FA] \end{bmatrix} \tag{47}$$

$$\mathbf{r}_{FA} = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} V_7[TAG][W] - V_8[DAG][FA] + V_9[DAG][W] \\ -V_{10}[MAG][FA] + V_{11}[MAG][W] - V_{12}[G][FA] \end{bmatrix} \tag{48}$$

$$\mathbf{r}_W = \left( \frac{[E_T]}{DEN} \right) * \begin{bmatrix} -V_7[TAG][W] + V_8[DAG][FA] - V_9[DAG][W] \\ +V_{10}[MAG][FA] - V_{11}[MAG][W] + V_{12}[G][FA] \end{bmatrix} \tag{49}$$

onde  $[E_T]$  é a concentração total de enzima e o denominador  $DEN$  é dado por:

$$\begin{aligned}
 DEN = 1 + K_1[TAG][G] + K_2[MAG][DAG] + K_3[DAG][G] + K_4[MAG]^2 \\
 + K_5[MAG][TAG] + K_6[DAG]^2 + K_7[TAG][W] + K_8[DAG][FA] \\
 + K_9[DAG][W] + K_{10}[MAG][FA] + K_{11}[MAG][W] + K_{12}[G][FA]
 \end{aligned} \quad (50)$$

As Equações 44 - 50 constituem a forma final do modelo de Voll et al. (2011). Observa-se que este modelo apresenta maior complexidade que o proposto por Valério et al. (2009), incluindo um número maior de constantes cinéticas a serem estimadas. Maiores manipulações podem ser realizadas através do uso da equação de Michaelis-Menten, entretanto estas manipulações não foram estudadas neste trabalho.

### 3.9 Aplicação de ultrassom em reações catalisadas por enzimas

A utilização de ultrassom ganhou espaço dentro do campo da bioquímica e biotecnologia em meados de 1950 - 1960 (SUSLICK et al., 1999). Posteriormente, o interesse nos gradientes locais de temperatura e pressão provocados no meio reacional pela cavitação gerada pelo ultrassom levou a extensão de seu uso em reações catalisadas por enzimas. Alguns exemplos de reações enzimáticas para as quais o uso de ultrassom mostrou impacto positivo no rendimento de reação incluem: esterificação de álcoois de cadeias curtas com ácido butírico (FALLAVENA et al., 2014); esterificação de acetato de butila (ALVES et al., 2014); esterificação de ácidos graxos (SANTIN et al., 2014); hidrólise de azeite de dendê (GONALVES et al., 2012); metanólise de graxa branca para produção de FAMES (*fatty acid methyl ester*) (ADEWALE et al. 2015); transesterificação para a produção de carbonato de glicerol (WAGHMARE et al. 2015).

Com base neste fato, diversos autores têm estudado o efeito do uso de ultrassom em reações catalisadas por enzimas ao longo dos últimos anos, podendo-se citar como exemplos mais relevantes: hidrólise de gorduras para a produção de ácidos graxos (LERIN et al., 2014); produção de lipídeos estruturados, como o *1,3-dioleato-2-palmitato de glicerila* (OPO), por meio da acidólise de triglicerídeos (ZHOU et al. 2001); transesterificação de álcool isoamílico e ácido butírico gerando butirato de isoamila (BANSODE et al. 2014); glicerólise de triglicerídeos gerando MAGs e DAGs (BANSODE et al. 2017). Dentre as reações listadas, observou-se que de maneira geral o ultrassom

umenta o rendimento de reação (DELGADO et al. 2015). Entretanto, o uso do ultrassom está atrelado com diversos parâmetros operacionais que apresentam um impacto significativo tanto no rendimento da reação como na taxa de desativação da enzima. Estes parâmetros incluem o tipo de aparelho de ultrassom, potência aplicada, frequência e intensidade de ultrassom (DELGADO et al. 2015). Este aspecto dificulta a comparação direta entre resultados obtidos por diferentes autores, devido às diferenças nas condições de ultrassom utilizadas, podendo-se até encontrar aparentes inconsistências ao comparar resultados de diferentes trabalhos (DELGADO et al. 2015). A degradação dos catalisadores pelo efeito do ultrassom é um exemplo deste problema.

No caso das reações de glicerólise assistidas por ultrassom, estas são comumente realizadas usando um dos seguintes procedimentos: (i) pré-tratamento do substrato com ultrassom antes da reação; (ii) aplicação de ultrassom no meio reacional durante a glicerólise. No primeiro caso, a cavitação gerada pelo ultrassom provoca uma redução no tamanho de partículas, resultando no aumento da área superficial de interação entre glicerol/óleo (TIAN et al., 2004). Esta técnica é utilizada em sistemas sem o uso de solventes devido aos problemas de miscibilidade entre os substratos. No segundo caso, é comum observar um aumento da taxa de reação com o aumento da intensidade do ultrassom (DELGADO et al. 2015). O motivo para este aumento da taxa de reação pode ser atribuído a diferentes causas, como o aumento da temperatura provocado pela cavitação, a existência de um gradiente de temperatura no meio reacional provocado pela cavitação e até a indução do deslocamento da conformação enzimática, causando variações na energia de ativação do sistema (TIAN et al. 2004). No entanto este segundo procedimento deve ser realizado com cautela, pois pode causar a desnaturação da enzima durante a reação (DELGADO et al. 2015).

O uso de ultrassom em reações de glicerólise de triglicerídeos para a produção de MAGs e DAGs foi pouco estudado na literatura. Até o momento foram encontradas apenas as seguintes publicações relacionadas a este tema:

(i) Fiametti et al. (2012) estudaram a reação de glicerólise de óleo de oliva catalisada por Lipozyme 435 a uma frequência de 37 kHz e potência de 132 W, sem uso de solventes orgânicos. Ultrassom foi aplicado através de um banho de ultrassom durante todo o período da reação de glicerólise. Os autores obtiveram um conjunto de parâmetros cinéticos para os modelos de Valério et al. (2009) e Voll et al. (2011) capazes de ajustar de forma satisfatória o comportamento experimental do sistema para as temperaturas de 50,

60 e 70 °C. Constatou-se que para estes sistemas livres de solventes o uso de ultrassom é altamente desejável uma vez que a sua ausência leva a rendimentos na faixa de 5% de produto devido a dificuldades de transferência de massa proporcionadas pela imiscibilidade entre os substratos. Além disso, Fiametti et al. (2012) estudaram o efeito da concentração de enzima no meio reacional. Observou-se que concentrações superiores a 7,5% (wt) tendem a formação de aglomerados de lipase, resultando em uma maior dificuldade dos lipídeos de acessarem os sítios ativos do catalisador, diminuindo o rendimento de reação. Análises feitas após as reações indicaram que as enzimas utilizadas não apresentaram mudanças na conformação ou de atividade durante o processo. Rendimentos de 50% de DAGs foram obtidos nas condições otimizadas de temperatura de 70 °C, concentração de enzima de 7,5% (wt) e razão molar de glicerol:óleo de 2:1.

(ii) Remonatto et al. (2015) efetuaram a glicerólise do óleo de soja e canola catalisadas por Lipozyme 435 a uma frequência de 37 kHz e potência de 132 W; As reações foram realizadas sem o uso de solventes orgânicos e auxiliadas por um banho de ultrassom durante todo o período da glicerólise. Neste trabalho o efeito da agitação mecânica e intensidade do ultrassom foi estatisticamente avaliado sobre o rendimento da reação para cada um dos óleos testados. Em ambos os óleos se constatou que o aumento da agitação apresentou um efeito positivo no rendimento de MAGs e DAGs, enquanto o aumento da intensidade de ultrassom demonstrou um efeito negativo neste parâmetro. O rendimento de reação mais elevado (62.12%) foi obtido nas seguintes condições reacionais: 70 °C; razão molar de glicerol e óleo de 0.8:1; concentração de enzima de 10% (wt); agitação de 900 rpm; intensidade de ultrassom de 132 W\*cm<sup>-2</sup> durante 2 h de reação para o óleo de canola; e intensidade de ultrassom de 52,8 W\*cm<sup>-2</sup> durante 3 h de reação para o óleo de soja.

(iii) Liu et al. (2018) estudaram a glicerólise de banha de porco catalisada por Lipozyme RMIM assistida por uma sonda de ultrassom a uma frequência de 25 kHz e potência de 250 W. O pré-tratamento dos substratos com ultrassom aumentou o rendimento de DAGs da reação de glicerólise, além de diminuir o tempo de reação necessário para atingir determinadas concentrações de DAGs no produto. Nas condições utilizadas neste trabalho averiguou-se que a composição do meio reacional em 4 h de reação com o uso de um pré-tratamento de ultrassom foi similar a composição em 11 h de reação sem o uso de ultrassom. O efeito de outros parâmetros como a potência de ultrassom utilizado no pré-tratamento e a temperatura de pré-tratamento também foi analisado. Concluíram que determinadas potências de ultrassom (100 a 250 W) são

capazes de afetar positivamente o rendimento da reação, mas valores muito elevados de potência podem desnaturar a enzima. No caso da temperatura observou-se que a melhor temperatura de reação com o uso de ultrassom foi a de 45 °C. Temperaturas inferiores a 45 °C reação sofre com a alta viscosidade dos substratos, e acima de 45 °C observou-se uma diminuição na atividade enzimática.

Destes trabalhos, somente Fiametti et al. (2012) realizaram a modelagem da cinética de reação, usando os modelos de Valério et al. (2009) e Voll et al. (2011) para um sistema sem o uso de solvente orgânico. Desta forma, a estimativa dos parâmetros cinéticos para reações de glicerólise assistidas por ultrassom em um meio homogêneo constitui um tema de interesse prático, devido à falta de dados cinéticos para este tipo de reação na literatura e à potencial importância do uso de ultrassom como alternativa para aumentar a eficiência de reações de glicerólise de óleos vegetais.

## 4 Metodologia

### 4.1 Experimental

#### 4.1.1 Materiais

Óleo de milho comercial (Bunge Alimentos; Brasil) foi adquirido em uma rede de supermercados local. Glicerol e álcool terc-butílico foram obtidos da companhia Neon Comercial (Suzano; Brasil). O catalisador enzimático utilizado neste trabalho, Lipozyme 435 (*Candida antarctica* imobilizada), foi gentilmente fornecido pela empresa LNF Latino America (Bento Gonçalves; RS; Brasil). Padrões específicos de 1-monooleína, 1,3-dioleína e trioleína para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis; EUA). Os seguintes solventes também foram utilizados: álcool metílico grau HPLC (Quemis; Jundiaí; Brasil), álcool isopropílico grau HPLC (Scientific Exodus; Hortolândia; Brasil), éter etílico (Scientific Exodus; Hortolândia; Brasil) e álcool n-propílico (Scientific Exodus; Hortolândia; Brasil).

#### 4.1.2 Glicerólise em reator batelada

As reações de glicerólise de óleo de milho foram realizadas em um balão de vidro sob agitação mecânica constante de 1000 rpm. A enzima Lipozyme 435 (*Candida Antarctica* suportada) foi utilizada na proporção de 3% wt com relação à massa de substrato total. Esta concentração de enzima foi otimizada em relação ao rendimento de MAGs e minimização de consumo de lipase em trabalhos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa (DA SILVA et al. 2018). Glicerol e óleo de milho foram adicionados dentro do balão em uma proporção molar glicerol:óleo de 6:1. Esta proporção foi utilizada visando o deslocamento da reação no sentido da formação majoritária de monoglicerídeos em relação aos diglicerídeos (NAIK et al. 2014). A reação foi realizada utilizando álcool terc-butílico como solvente, a uma proporção de 150% de volume por massa de substrato (vol/wt). O volume total da mistura reacional composta por glicerol, óleo de milho e álcool terc-butílico foi de aproximadamente 40,5 mL. Controlou-se a temperatura do meio reacional através de um banho de óleo de silicone. Foram efetuadas reações em três temperaturas: 40, 50 e 60 °C. A duração dos experimentos foi de 8 h, com retirada de amostras de aproximadamente 1 µL do meio reacional nos tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360 e 480 min através de uma pipeta volumétrica. As amostras foram

pesadas em uma balança analítica (Ohaus Adventurer™) e colocadas no refrigerador de imediato até o momento em que eram preparadas para futuras análises de HPLC. A Figura 4.1 mostra uma imagem do aparato experimental utilizado para realizar as reações de glicerólise.

Figura 4.1 – Aparato experimental (reator, agitador mecânico e chapa de aquecimento) utilizado para realizar os testes de glicerólise do óleo de milho padrão.



As reações que utilizaram ultrassom tiveram sua temperatura controlada por um banho de ultrassom da marca Sanders, modelo SW200FI. Ultrassom foi aplicado em períodos de 30 min ligado e 30 min desligado, sob a potência de 132 W e frequência de 38 kHz. Este ciclo foi aplicado durante as 8 h de reação. Optou-se pelo uso de ciclos de exposição do meio reacional ao ultrassom para evitar a exposição prolongada da lipase à cavitação provocada pelo ultrassom, sendo que as condições de potência e frequência utilizadas foram escolhidas em função das especificações fornecidas pelo equipamento. A Tabela 4.1 apresenta simplificada as diferentes condições de reação testadas neste estudo.

Tabela 4.1 – Condições reacionais utilizadas no estudo cinético da glicerólise do óleo de milho com e sem a aplicação de ultrassom.

Parâmetro	Sem aplicação de Ultrassom	Com aplicação de Ultrassom
Temperatura (°C)	40, 50, 60	40, 50, 60
rG:O	6:1	6:1
Enzima (g <sub>cat</sub> /g <sub>subt</sub> )	3%	3%
Parâmetros da aplicação de ultrassom	---	132 W, 38 KHz e sequência on/off de 30 min/ 30 min
Tempo de reação (min)	480	480

Após o término da reação a mistura reacional foi filtrada através de uma peneira Tyler Mesh 400 e lavada com álcool terc-butílico. O catalisador foi recuperado, secado a temperatura ambiente e guardado no congelador para futuros testes de atividade, enquanto o produto da reação foi rotaevaporado posteriormente.

#### 4.1.3 Quantificação dos produtos

A quantificação dos triglicerídeos (TAGs), diglicerídeos (DAGs) e monoglicerídeos (MAGs) da mistura reacional foi realizada através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um cromatógrafo Agilent© 1260 Infinity da Agilent Technologies, EUA, com um detector de arranjo de diodos (DAD) em uma faixa de 205 nm. Foi utilizada uma coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/água (9:1 v/v) e isopropanol, na qual a concentração de isopropanol foi variada no período inicial de corrida (30 min), seguindo uma rampa linear de 0 a 80% de volume de isopropanol, e mantida, então, em 80% por 5 min. A quantificação dos MAGs, DAGs e TAGs foi feita com base nos cromatogramas obtidos, usando como referência as curvas de calibração obtidas com padrões de: 1-monooleína (MAG), 1,3-dioleína (DAG) e trioleato de glicerina (TAG).

A concentração de água dos substratos (tanto óleo de milho como o glicerol) foi mensurada através do uso de um Karl Fischer Coulométrico 831 da Metrohm.

#### 4.1.4 Atividade enzimática

As atividades da lipase antes da glicerólise e da lipase recuperada após a reação foram mensuradas através do grau de esterificação do ácido láurico por álcool n-propílico. Para

esta reação foram primeiramente adicionados ácido láurico e álcool n-propílico em um balão de vidro, deixando-se a mistura a 50 °C até ocorrer a total solubilização do ácido. Em seguida, adicionou-se a lipase e a reação foi realizada na mesma temperatura, sob agitação magnética constante durante 1 h. Amostras foram coletadas no início e no final da reação e tituladas por NaOH (0,52 mol/L), para determinar a concentração de ácido láurico na reação. A atividade da lipase (em PLU) foi calculada através da diferença entre as concentrações de ácido láurico no início e no final da reação de esterificação.

## 4.2 Modelagem cinética

### 4.2.1 Implementação dos modelos

Os modelos cinéticos de Valério et al. (2009) (Equações 06 – 11) e Voll et al. (2011), (Equações 19 – 24) foram implementados no *software* Matlab 2012.

A dependência com a temperatura das constantes cinéticas  $k_1$  até  $k_{12}$  que compõem o modelo de Valério et al. (2009) foi expressa através da equação de Arrhenius:

$$k_{i,T_j} = k_{0,i} \exp\left(\frac{-E_{ak_i}}{RT_j}\right) \quad (51)$$

onde  $k_{i,T_j}$  é a constante cinética  $i$  ( $i = 1$  a  $12$ ) na temperatura  $T_j$ ,  $k_{0,i}$  é o parâmetro pré-exponencial da equação de Arrhenius e  $E_{ak_i}$  é a energia de ativação da reação para a constante  $k_i$ .

O mesmo procedimento foi realizado para os parâmetros cinéticos do modelo de Voll et al. (2011), que possui 24 parâmetros:  $V_1$  até  $V_{12}$ , que representam as constantes aparentes das taxas de reação, e  $K_1$  até  $K_{12}$  que representam as constantes de equilíbrio de reação. Seguindo a proposta de Voll et al. (2011), as constantes de equilíbrio  $K_1 - K_{12}$  foram consideradas constantes no intervalo de temperaturas considerado, devido à estreita faixa de temperaturas testadas (40-60 °C). Também para os parâmetros  $V_1 - V_{12}$ , a dependência com a temperatura foi modelada por Arrhenius:

$$V_{i,T_j} = v_{0,i} \exp\left(\frac{-E_{av_i}}{T_j}\right) \quad (52)$$

Para a resolução dos sistemas de equações diferenciais que definem os dois modelos utilizados, utilizou-se a função `ode23s` do Matlab.

Cabe ressaltar que, apesar de terem sido implementados os dois modelos, somente os resultados com o modelo de Valério et al. (2009) são discutidos no Capítulo 5, visto que a quantidade e tipo de dados experimentais disponíveis não são suficientes para estimar valores confiáveis dos parâmetros do modelo de Voll et al. (2011).

#### 4.2.2 Estimação de parâmetros

A estimação dos parâmetros cinéticos foi realizada pela técnica de mínimos quadrados, com a seguinte função objetivo:

$$S_{error} = \sum_{m=1:N} \sum_{l=1:N_{exp}} (X_{exp,l,m} - X_{mod,l,m})^2 \quad (53)$$

onde  $S_{error}$  é a função objetivo a ser minimizada no problema de otimização,  $N$  é o número de espécies quantificadas experimentalmente,  $N_{exp}$  é o número de pontos de medida experimental,  $X_{exp,l,m}$  é o valor experimental da fração molar das espécies  $m$  (MAG, DAG, TAG, Gly) em relação a soma das concentrações totais de MAGs, DAGs e TAGs (lipídeos) e  $X_{mod,l,m}$  é o valor predito pelo modelo para estas frações molares em base de lipídeos. O uso da fração molar com base na soma total de lipídeos foi realizado visando facilitar a comparação entre os resultados obtidos pelo trabalho de Solaesa et al. (2016) com os resultados obtidos na glicerólise do óleo de milho neste trabalho. No trabalho de Solaesa et al. (2016) as concentrações de glicerol ao longo do tempo foram quantificadas, enquanto que para o sistema envolvendo o óleo de milho apenas o seu valor inicial foi calculado. Desta forma o cálculo da fração molar global do sistema se torna inviável, fazendo-se necessário utilizar uma nova base de cálculos para realizar a adimensionalização dos valores de concentrações das espécies envolvidas em reação. A Equação 54 apresenta a fórmula utilizada para o cálculo das frações molares adimensionais das espécies envolvidas nas reações de glicerólise do óleo de sardinha como para o óleo de milho.

$$X_i = C_i / (C_{MAG} + C_{DAG} + C_{TAG}) \quad (54)$$

onde  $C$  são as concentrações das respectivas espécies e  $i$  são os MAGs, DAGs, TAGs, Gly, W e FFA envolvidos nas reações de glicerólise.

Para a busca do mínimo da função objetivo foi utilizada a função de otimização *fmincon*, disponível no Matlab.

#### 4.2.3 Teste das funções implementadas em Matlab com o modelo e o procedimento de estimação de parâmetros cinéticos

As funções implementadas em Matlab com o modelo de Valério et al. (2009) e o procedimento de estimação de parâmetros foram testadas por meio da comparação com resultados reportados para a reação de glicerólise de óleo de sardinha com catálise enzimática (Lipozyme 435) usando t-butanol como solvente orgânico realizado por Solaesa et al. (2016).

Os resultados reportados pelos autores foram os valores das concentrações das espécies do meio reacional ao longo do tempo, apresentada na forma de gráficos, e os valores dos parâmetros cinéticos estimados a partir dos dados originais. Os valores das frações molares experimentais do trabalho de Solaesa et al. (2016) foram obtidos através dos gráficos apresentados em seu trabalho com o auxílio do *software* “Pega Ponto”.

O teste das funções implementadas foi feito em duas etapas: (i) análise dos valores de concentração dos reagentes ao longo do tempo preditos pelo modelo implementado usando os parâmetros cinéticos estimados por Solaesa et al. (2016); (ii) estimação dos parâmetros cinéticos a partir dos dados de concentração de Solaesa et al. (2016) como ponto de partida da estimação.

#### 4.2.4 Análise dos parâmetros cinéticos estimados para o óleo de milho

Os parâmetros cinéticos estimados para a glicerólise do óleo de milho foram comparados com os reportados no trabalho de Solaesa et al. (2016) para óleo de sardinha. As diferenças verificadas foram analisadas do ponto de vista de consistência teórica, levando em consideração as diferenças de composição entre os dois óleos e as diferenças dos sistemas reacionais utilizados no presente trabalho e no de Solaesa et al. (2016).

Um dos fatores considerados nesta análise foram os valores de coeficiente de atividade das espécies reativas de interesse no meio reacional, obtidos pelo *software* JCOSMO. A avaliação dos coeficientes de atividades no JCOSMO foi feita de acordo com os seguintes passos:

(i) definiram-se primeiramente moléculas representativas da composição média dos óleos considerados;

(ii) as moléculas propostas em (i) tiveram suas estruturas espaciais otimizadas através do *software* Avogadro, utilizando a função de otimização UFF e tomando como

inicialização para o processo de otimização da estrutura a estrutura espacial obtida pela substituição das cadeias de ácidos graxos presentes em uma estrutura previamente otimizada de trioleína (disponível na biblioteca de moléculas previamente otimizadas do programa JCOSMO) pelos ácidos graxos presentes nas moléculas de TAGs, DAGs e MAGs propostas em (i);

(iii) após as estruturas serem otimizadas, os perfis de distribuição eletrônica de cada molécula-modelo foram calculados através do programa JCOSMO, utilizando os modelos termodinâmicos do tipo COSMO – SAC (*Conductor-like Screening Model – Segment Activity Coefficient*) para averiguar a interação de cada molécula com o meio reacional.

(iv) através destes perfis obteve-se na sequência os valores de coeficientes de atividade e perfis  $\sigma$  das moléculas.

Para a definição das moléculas modelo, utilizou-se como base a informação sobre a composição de ácidos graxos presentes no óleo de sardinha e no óleo de milho, mostrada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de sardinha e óleo de milho.

Ácido Graxo	Óleo de Sardinha (SOLAESA et al. 2016) %	Óleo de Milho (NOUREDDINI et al. 1992) %
C14:0	8	---
C16:0	16	12
C16:1	9	---
C18:0	4	2
C18:1	11	29
C18:2	1	52
C18:3,4	3	1
C20:0	---	0,3
C20:1	3	---
C20:3,4,5	19	---
C22:1	4	---
C22:3,4,5,6	15	---

A partir das composições de ácidos graxos apresentadas na Tabela 4.2, moléculas de triglicerídeos foram propostas para representar aproximadamente a composição global teórica dos TAGs dos óleos estudados no ponto inicial de reação (moléculas-modelo). Uma vez que aproximadamente 98% da composição dos óleos é composta por triglicerídeos (NEUZA JORGE, 2009), estas moléculas-modelo foram consideradas como únicas fontes

de ácidos graxos do óleo. A Tabela 4.3 apresenta as moléculas modelo dos triglicerídeos presentes no óleo de sardinha e o óleo de milho.

Tabela 4.3 – Moléculas modelo para os triglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos.

Óleos Presentes	Nomenclatura	Molécula Modelo	Proporção molar no meio reacional (%)
Óleo de sardinha	1-Palmitoil-2-Oleil-3-Araquidonoil-Glicerol (TAG)	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C16:0} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C20:4} \end{array}$	100,00 %
Óleo de milho	1-Palmitoil-2-Oleil-3-Linoleil-Glicerol (TAG)	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C16:0} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \end{array}$	31,00 %
Óleo de milho	1-Oleil-2-3-Dilinoleil-Glicerol (TAG)	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \end{array}$	57,00 %
Óleo de milho	1-Palmitoil-2-3-Dilinoleil-Glicerol (TAG)	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C16:0} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \\   \\ \text{O} \\    \\ \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \end{array}$	12,00 %

De acordo com as moléculas de triglicerídeos apresentadas na Tabela 4.3 pode-se obter as moléculas de monoglicerídeos e diglicerídeos mais prováveis de se observar após a reação de glicerólise das moléculas modelo de triglicerídeos. Assim, as Tabelas 4.4 e 4.5

mostram as moléculas-modelo de diglicerídeos dos óleos de sardinha e milho e monoglicerídeos dos óleos de sardinha e milho, respectivamente.

Tabela 4.4 – Moléculas modelo para os diglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos.

Óleos Presentes	Nomenclatura	Molécula Modelo
Óleo de sardinha Óleo de milho	1-Palmitoil-2-Oleil- Glicerol (DAG)	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C16:0} \\  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\  \text{OH}  \end{array}  $
Óleo de milho	1-Oleil-2-Linoleil- Glicerol (DAG)	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \\  \text{OH}  \end{array}  $
Óleo de sardinha Óleo de milho	1-Oleil-2-Araquidonoil- Glicerol (DAG)	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:1} \\  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C20:4} \\  \text{OH}  \end{array}  $
Óleo de milho	1-2-Dilinoleil-Glicerol (DAG)	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \\  \text{O} \\     \\  \text{O}-\text{C}-\text{C18:2} \\  \text{OH}  \end{array}  $

Tabela 4.5 – Moléculas modelo para os monoglicerídeos dos óleos de sardinha e milho obtidos através da composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos.

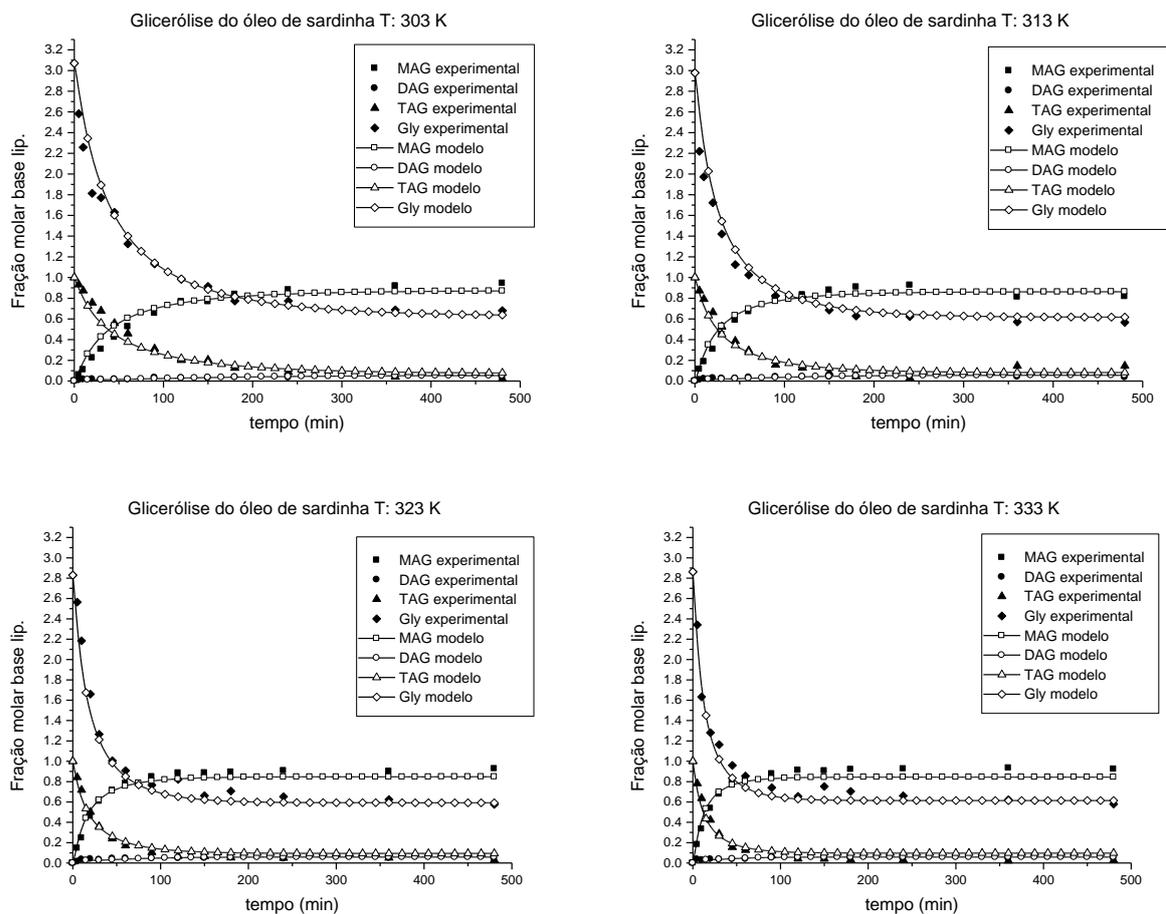
Óleos Presentes	Nomenclatura	Molécula Modelo
Óleo de sardinha Óleo de milho	2-Palmitoil-Glicerol (MAG)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C16:0} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Óleo de sardinha Óleo de milho	2-Oleil-Glicerol (MAG)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C18:1} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Óleo de milho	2-Linoleil-Glicerol (MAG)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C18:2} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Óleo de sardinha	2-Araquidonoil-Glicerol (MAG)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C20:4} \\   \\ \text{OH} \end{array}$

## 5 Resultados

### 5.1 Avaliação das implementações em Matlab do modelo cinético e do procedimento de estimação de parâmetros

A Figura 5.1 mostra a comparação entre os dados experimentais reportados por Solaesa et al. (2016) e as respectivas curvas obtidas na simulação com o modelo implementado em Matlab, usando o conjunto de parâmetros cinéticos fornecidos pelos autores.

Figura 5.1 – Glicerólise de óleo de sardinha catalisada por Lipozyme 435 a 303 K, 313 K, 323 K e 333 K: comparação entre os resultados experimentais de Solaesa et al. (2016) e das simulações com o código implementado usando os valores de parâmetros cinéticos reportados no referido trabalho.



A Tabela 5.1 apresenta a comparação das estimativas dos parâmetros cinéticos obtidas com o código implementado no presente trabalho e aqueles apresentados por Solaesa et al. (2016), juntamente com os respectivos valores de  $R^2$  na comparação dos valores experimental e do modelo para as concentrações das espécies. Observou-se que para os parâmetros  $k_{0,1}$ ,  $k_{0,3}$ ,  $k_{0,4}$  e  $E_{a5}$  a diferença dos parâmetros estimados com relação aos fornecidos pelos autores foi maior que 10%, chegando a um máximo de 31,90% para  $k_{0,1}$ . As constantes  $k_6$  e  $k_7$ , resultantes da aplicação da Equação de Arrhenius com os parâmetros  $k_{0,6}$ ,  $k_{0,7}$ ,  $E_{a6}$ ,  $E_{a7}$  e  $E_{a8}$ , foram consideradas zero no trabalho de Solaesa et al. (2016). Como consequência, os valores para estes parâmetros cinéticos não puderam ser obtidos para realizar uma comparação com os valores estimados pelo modelo implementado neste trabalho. Considerando que os valores finais das constantes  $k_6$  e  $k_7$  calculados com os parâmetros cinéticos estimados foram baixos (próximos de zero), os parâmetros obtidos neste trabalho foram considerados como estando em concordância com os resultados de Solaesa et al. (2016). Desta forma, apenas os parâmetros  $k_{0,1}$ ,  $k_{0,3}$ ,  $k_{0,4}$  e  $E_{a5}$  apresentam uma diferença considerável no seu valor de estimação entre ambos os grupos de parâmetros cinéticos.

Adicionalmente, o valor de  $R^2$  obtido para curvas preditas ao se aplicar os valores dos parâmetros cinéticos fornecidos pelos autores no modelo implementado neste trabalho foi de 0,9861, sendo 0,9832 o valor reportado por Solaesa et al. (2016). Esta pequena diferença nos valores de  $R^2$  pode ser atribuída à imprecisão no processo de aquisição dos valores das concentrações das espécies com o *software* “Pega Ponto”. Sendo assim, concluiu-se que a implementação do modelo em Matlab havia sido feita de maneira correta e que o código implementado para a estimação dos parâmetros cinéticos mostrou-se adequado para ser utilizado na etapa posterior do estudo da cinética da glicerólise do óleo de milho.

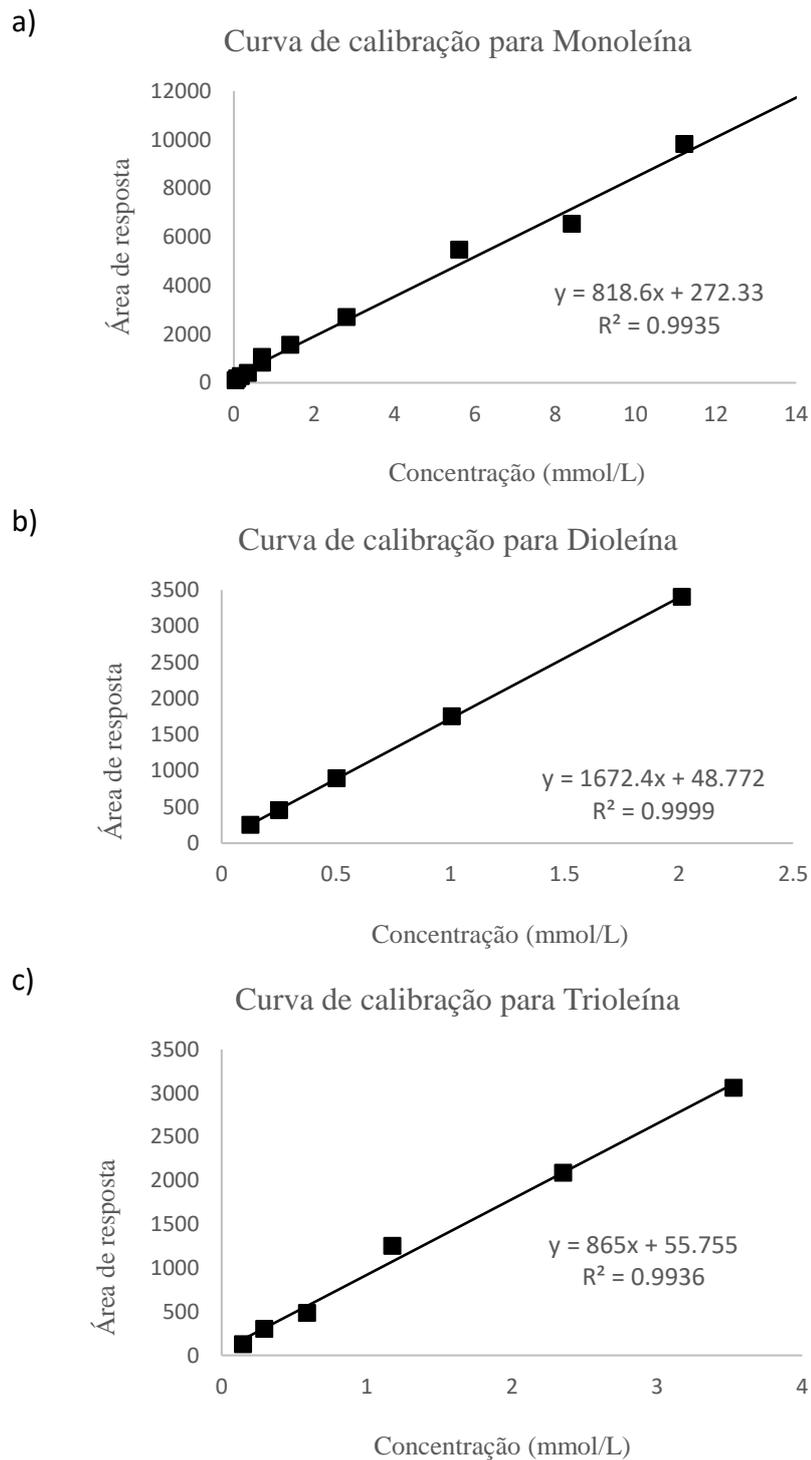
Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos estimados para a glicerólise de óleo de sardinha através de dados obtidos por Solaesa et al. (2016).

Parâmetros	Solaesa et al. (2016)	Este trabalho	$\pm \Delta$ (%)
$k_{0,1}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	193,160	131,534	31,90
$k_{0,2}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	1421,499	1417,375	0,29
$k_{0,3}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$1,568 \cdot 10^{-2}$	$1,182 \cdot 10^{-2}$	24,66
$k_{0,4}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$2,421 \cdot 10^{-3}$	$2,113 \cdot 10^{-3}$	12,72
$k_{0,5}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$4,302 \cdot 10^{-1}$	$4,210 \cdot 10^{-1}$	2,14
$k_{0,6}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	---	$8,909 \cdot 10^{-7}$	---
$k_{0,7}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	---	$1,000 \cdot 10^{-1}$	---
$k_{0,8}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$3,462 \cdot 10^{-4}$	$3,462 \cdot 10^{-4}$	0,00
$k_{0,9}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$3,021 \cdot 10^{-2}$	$3,021 \cdot 10^{-2}$	0,00
$k_{0,10}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$1,759 \cdot 10^{-3}$	$1,759 \cdot 10^{-3}$	0,00
$k_{0,11}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$1,425 \cdot 10^{-2}$	$1,425 \cdot 10^{-2}$	0,00
$k_{0,12}$ (L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$2,954 \cdot 10^{-2}$	$2,954 \cdot 10^{-2}$	0,00
$Ea_1$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	35,180	34,038	3,25
$Ea_2$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	40,120	39,928	0,48
$Ea_3$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	$2,000 \cdot 10^{-1}$	$2,040 \cdot 10^{-1}$	2,00
$Ea_4$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	3,520	3,728	5,91
$Ea_5$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	20,640	26,595	28,90
$Ea_6$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	---	$8,674 \cdot 10^{-2}$	---
$Ea_7$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	---	$1,000 \cdot 10^{-6}$	---
$Ea_8$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	4,100	4,100	0,00
$Ea_9$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	0,00
$Ea_{10}$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	4,200	4,200	0,00
$Ea_{11}$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	$9,000 \cdot 10^{-3}$	$9,000 \cdot 10^{-3}$	0,00
$Ea_{12}$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	$8,000 \cdot 10^{-2}$	$8,000 \cdot 10^{-2}$	0,00
$R^2$	0,9832	0,9861	---

## 5.2 Curvas de calibração para a HPLC

As curvas de calibração utilizadas para a quantificação das espécies envolvidas na glicerólise do óleo de milho foram obtidas a partir de HPLC. Os resultados são apresentados na Figura 5.2. Os valores de  $R^2$  para estas curvas foram de 0,9935 para 1-monooleína, 0,9999 para 1,3-dioleína e 0,9936 para trioleína.

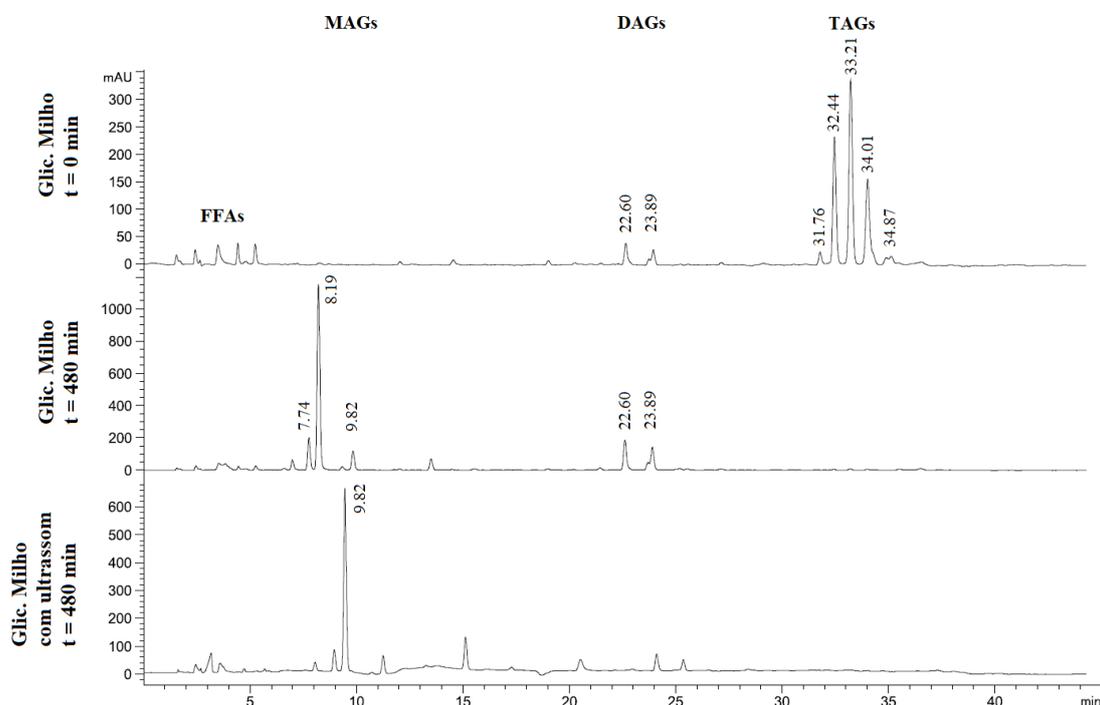
Figura 5.2– Curvas de calibração para 1-monooleína (a), 1,3-dioleína (b) e trioleína (c).



### 5.3 Quantificação das espécies e sua evolução temporal nas reações de glicerólise do óleo de milho com e sem uso de ultrassom

A Figura 5.3 apresenta os cromatogramas de HPLC de amostras do meio reacional nos tempos 0 min e 480 min (com e sem o uso de ultrassom) de reação, na glicerólise do óleo de milho a 60 °C. No tempo zero de reação, o cromatograma apresenta unicamente os picos referentes aos triglicerídeos. No entanto, com base na formulação utilizada, sabe-se que o meio reacional contém também glicerol, o qual não foi detectado na análise de HPLC devido às características do detector utilizado. Após 8 h (480 min) de reação, observa-se o consumo completo dos triglicerídeos e a predominância de monoglicerídeos em relação a diglicerídeos no produto de reação, com e sem o uso de ultrassom. Este resultado confirma que a proporção glicerol/óleo utilizada favorece a formação de MAGs sob DAGs.

Figura 5.3– Sobreposição de cromatogramas obtidos através da análise de HPLC do meio reacional para a reação de glicerólise de óleo de milho em 60 °C com e sem o uso de ultrassom nos tempos 0 e 480 min



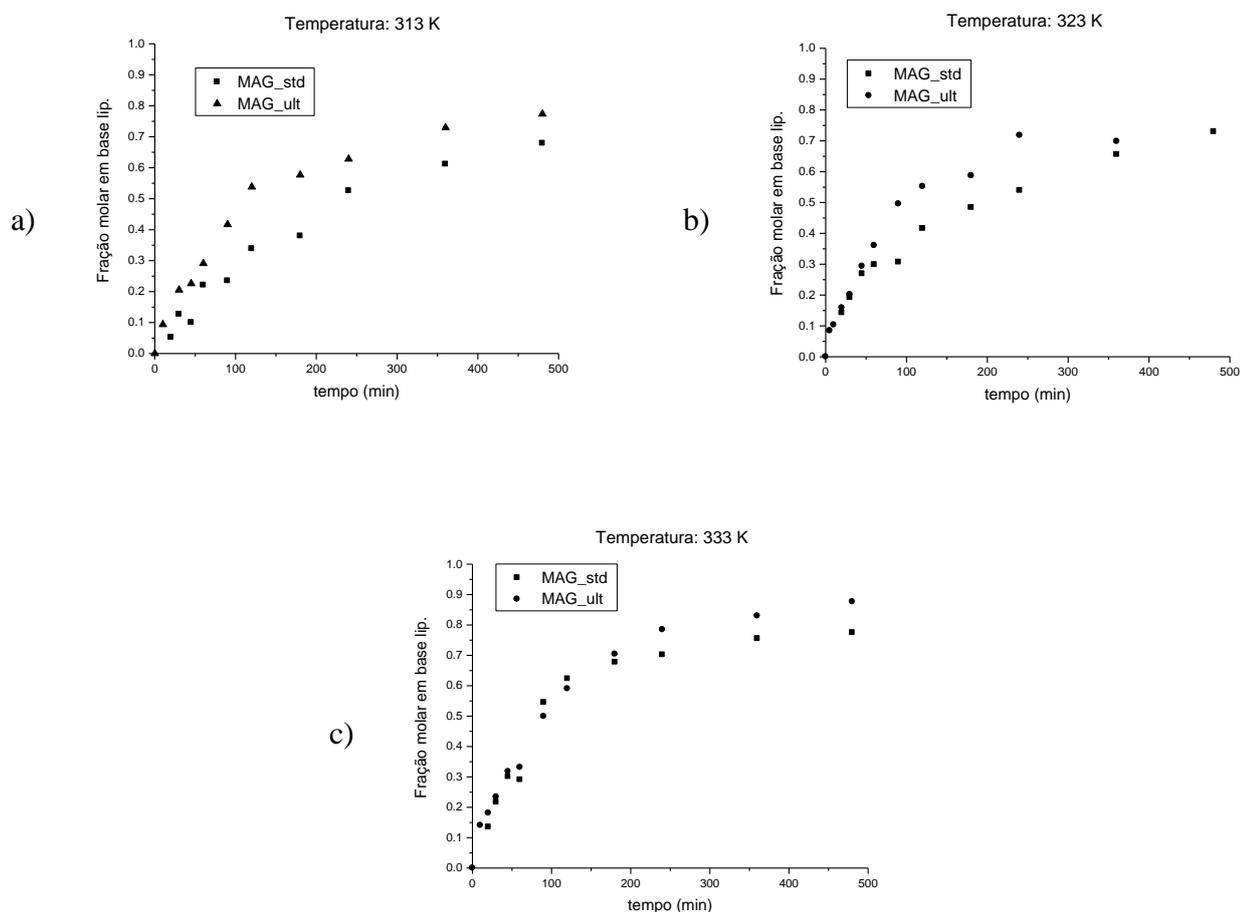
No cromatograma do produto da reação com ultrassom após 480 min observa-se um deslocamento dos picos de MAGs e DAGs para maiores tempos de retenção em relação à glicerólise sem ultrassom. No entanto, nota-se que estes picos apresentam o mesmo comportamento com relação ao posicionamento/altura relativa entre si em ambos os casos. Isto sugere que o deslocamento observado não está associado ao surgimento de novos produtos, podendo ser simplesmente o resultado de variações de tempos de retenção recorrentes das análises de HPLC serem realizadas em dias distintos.

A conversão de triglicerídeos para reações sem o auxílio de ultrassom e com o uso de ultrassom foi aproximadamente igual a 100% para a maior temperatura estudada (60 °C), não demonstrando uma diferença de rendimentos após as 8 horas de reação. Reações que utilizam a rota alcalina apresentam conversões consideravelmente mais baixas de triglicerídeos (em torno de 30 – 40%) (NAIK et al. 2014), além de utilizar temperaturas reacionais mais elevadas. Desta forma, o potencial da rota enzimática como um substituto para a rota alcalina para a produção de MAGs (independente do uso ou não de ultrassom) a partir da glicerólise de óleos e gorduras se confirma também para o caso do óleo de milho.

Os dados experimentais das reações descritas na Tabela 4.1 foram comparados para avaliar o efeito do ultrassom na concentração do produto de glicerólise. A Figura 5.4 apresenta a evolução da concentração de MAG no meio reacional com o tempo de reação para as reações assistidas e não-assistidas por ultrassom, em cada temperatura avaliada neste estudo. O efeito positivo do uso de ultrassom sobre a concentração final de produtos fica evidente, sendo ele mais intenso nas reações na temperatura mais baixa utilizada (Figura 5.4a). Este efeito diminuiu com o aumento da temperatura (Figura 5.4b e 5.4c), tornando-se praticamente igual ao rendimento da reação padrão para 333 K ao final da reação. Mesmo assim, a aceleração da taxa de reação é notada no início da reação de glicerólise, implicando na possível redução do tempo experimental para se atingir uma concentração desejada de produto. Estudos que utilizaram o ultrassom em sistemas livres de solvente apresentaram resultados melhores em relação ao aumento de rendimento de reação quando o ultrassom era aplicado no substrato (SOLAESA et al., 2016; WANG et al., 2011). O principal motivo desta diferença é a elevada imiscibilidade destes substratos nas condições experimentais estudadas quando o solvente não era utilizado, o que leva a crer que em elevadas temperaturas o efeito do ultrassom é quase nulo para sistemas homogêneos. Por outro lado, reações a temperaturas mais brandas (40 °C) apresentaram

um aumento considerável de rendimento, tornando reações com o uso de enzimas a condições com menores chances de causar sua desnaturação atraentes.

Figura 5.4 – Dados experimentais para a concentração de MAG no meio reacional para reações sem o uso de ultrassom (MAG\_std) e com o uso de ultrassom (MAG\_ult) nas temperaturas de: 313 K (a), 323 K (b) e 333 K (c).



## 5.4 Cinética da reação de glicerólise do óleo de milho

### 5.4.1 Resultados da estimação dos parâmetros para o modelo cinético de Valério et al.

Os resultados da estimação de parâmetros para o modelo cinético de Valério et al. (2009) aplicado às reações de glicerólise do óleo de milho são apresentados na Tabela 5.2,

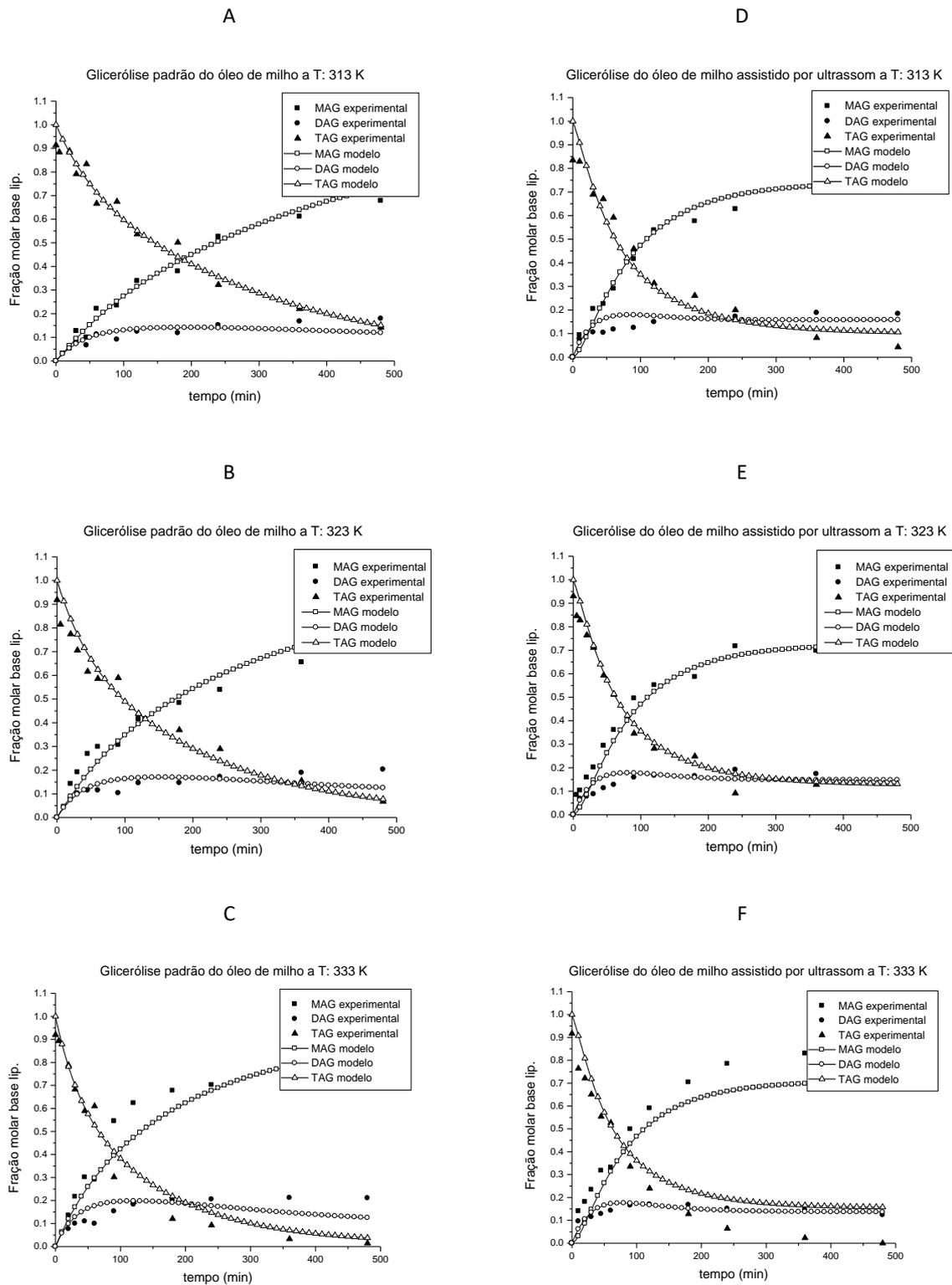
enquanto na Figura 5.5 os resultados de estimação utilizando este mesmo modelo são comparados com os dados experimentais .

Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos estimados para glicerólise de óleo de milho utilizando o modelo de Valério et al. (2009) para reações padrão e com o uso de ultrassom.

Glicerólise padrão do óleo de milho				Glicerólise do óleo de milho assistida por ultrassom			
$k_0$ [L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> ]		Ea [KJ/mol]		$k_0$ [L.mmol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> ]		Ea [KJ/mol]	
$k_{0,1}$	336,053	Ea <sub>1</sub>	31,572	$k_{0,1}$	296,968	Ea <sub>1</sub>	42,769
$k_{0,2}$	1271,558	Ea <sub>2</sub>	38,111	$k_{0,2}$	1456,423	Ea <sub>2</sub>	31,015
$k_{0,3}$	$3,552 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>3</sub>	$2,542 \cdot 10^{-1}$	$k_{0,3}$	$4,549 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>3</sub>	$2,232 \cdot 10^{-1}$
$k_{0,4}$	$3,304 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>4</sub>	2,559	$k_{0,4}$	$5,709 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>4</sub>	0,000
$k_{0,5}$	$4,316 \cdot 10^{-1}$	Ea <sub>5</sub>	19,778	$k_{0,5}$	$4,315 \cdot 10^{-1}$	Ea <sub>5</sub>	19,181
$k_{0,6}$	$9,966 \cdot 10^{-7}$	Ea <sub>6</sub>	$9,141 \cdot 10^{-2}$	$k_{0,6}$	$9,420 \cdot 10^{-7}$	Ea <sub>6</sub>	$1,145 \cdot 10^{-1}$
$k_{0,7}$	$6,221 \cdot 10^{-4}$	Ea <sub>7</sub>	$2,097 \cdot 10^{-6}$	$k_{0,7}$	$2,538 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>7</sub>	$2,046 \cdot 10^{-6}$
$k_{0,8}$	$3,481 \cdot 10^{-4}$	Ea <sub>8</sub>	4,138	$k_{0,8}$	$3,461 \cdot 10^{-4}$	Ea <sub>8</sub>	4,084
$k_{0,9}$	$2,827 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>9</sub>	$9,553 \cdot 10^{-4}$	$k_{0,9}$	$1,876 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>9</sub>	$1,066 \cdot 10^{-3}$
$k_{0,10}$	$2,094 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>10</sub>	4,059	$k_{0,10}$	$2,086 \cdot 10^{-3}$	Ea <sub>10</sub>	3,996
$k_{0,11}$	$3,064 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>11</sub>	$9,008 \cdot 10^{-3}$	$k_{0,11}$	$2,682 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>11</sub>	$8,985 \cdot 10^{-3}$
$k_{0,12}$	$8,689 \cdot 10^{-4}$	Ea <sub>12</sub>	$8,281 \cdot 10^{-2}$	$k_{0,12}$	$4,265 \cdot 10^{-2}$	Ea <sub>12</sub>	$7,952 \cdot 10^{-2}$
R <sup>2</sup>		0,965		R <sup>2</sup>		0,950	

Observou-se que os valores estimados das frações molares dos lipídeos na Figura 5.5 apresentam uma boa adequação aos dados obtidos experimentalmente tanto para reações de glicerólise padrão (sem o uso de ultrassom) como para reações com o uso de ultrassom, apresentando valores de R<sup>2</sup> de 0,965 e 0,950 respectivamente. Durante a estimação dos parâmetros cinéticos para os modelos testados observou-se uma alta dependência do modelo com os valores iniciais de estimação fornecidos ao programa, dificultando o processo de estimação devido à alta variação dos parâmetros estimados de acordo com os valores iniciais de estimação fornecidos ao código computacional. Uma metodologia iterativa foi aplicada para alcançar os valores das melhores constantes cinéticas apresentadas na Tabela 5.2. Primeiramente, valores na ordem de grandeza similares aos encontrados na literatura para outros óleos foram aplicados na rotina de estimação.

Figura 5.5 – Resultados da estimação das concentrações de MAGs, DAGs e TAGs para a glicerólise de óleo de milho padrão a 313 K (A), 323 K (B) e 333 K (C) e glicerólise de óleo de milho com uso de ultrassom a 313 K (D), 323 K (E) e 333 K (F) usando o modelo proposto por Valério et al. (2009)



De acordo com os resultados obtidos, aplicou-se variações de até  $10^5$  vezes a ordem de grandeza regente nestas constantes até que o conjunto de parâmetros cinéticos alcançasse uma convergência. De acordo com os parâmetros cinéticos referentes ao modelo de Valério et al. (2009) (Tabela 5.2), observou-se que na maioria das reações diretas ( $Ea_3$ ,  $Ea_5$ ,  $Ea_7$  e  $Ea_{11}$ ) as energias de ativação diminuíram com o uso de ultrassom. As exceções a esta tendência foram ocorreram para as reações de glicerólise de triglicerídeos ( $Ea_1$ ) e hidrólise de diglicerídeos ( $Ea_9$ ). Uma redução das energias de ativação favorece as taxas de reações diretas do sistema, explicando o aumento de geração de MAGs observado na Figura 5.4. A comparação entre os parâmetros cinéticos do óleo de milho presentes na Tabela 5.2 mostraram um aumento mais proeminente nas constantes pré-exponenciais com a aplicação do ultrassom em comparação com as energias de ativação. Uma vez que as constantes pré-exponenciais são funções do número de colisões entre as moléculas no sistema, este comportamento demonstra que o uso do ultrassom aumenta estas colisões mais do que causaria deslocamentos da conformação enzimática, provocando uma variação da energia de ativação (TIAN et al. 2004). Desta forma pode-se concluir que a cavitação provocada pelo ultrassom possui um impacto maior na redução de conglomerados de moléculas, acarretando uma maior miscibilidade do sistema e, por consequência, em um maior número de choques intermoleculares do que na mudança da conformação enzimática que causaria variações nas energias de ativação.

Comparando valores dos parâmetros cinéticos da glicerólise do óleo de sardinha (Tabela 5.1) com os parâmetros estimados para a glicerólise do óleo de milho (Tabela 5.2) nota-se que a maioria das constantes pré-exponenciais da glicerólise do óleo de sardinha apresentam valores menores que as do óleo de milho, com exceção das constantes  $k_{0,3}$ ,  $k_{0,7}$ ,  $k_{0,8}$  e  $k_{0,9}$ . De acordo com as moléculas modelo dos triglicerídeos listados na Tabela 4.3, o óleo de sardinha é composto basicamente pelo 1-palmitoil-2-oleil-3-araquidonoil-glicerol, sendo que esta molécula possui uma cadeia de ácido graxo de 20 carbonos com 4 insaturações. Em contrapartida, moléculas de triglicerídeos presentes no óleo de milho apresentam cadeias menores com um menor número de insaturações, resultando em uma possível vantagem estérica destes TAGs para interagir com as moléculas de glicerol e água em comparação com os presentes no óleo de sardinha. No caso da avaliação das energias de ativação ( $Ea$ ), constatou-se que a comparação direta dos sistemas de óleo de sardinha e óleo de milho sem o uso de ultrassom apresentaram valores similares para a maioria dos casos. Desconsiderando as energias de ativação  $Ea_3$ ,  $Ea_4$ ,  $Ea_5$ ,  $Ea_6$  e  $Ea_7$ , as variações

percentuais das energias de ativação foram menores que 8%, podendo-se considerar a esta diferença como desprezível uma vez que o método utilizado para a aquisição dos pontos experimentais do trabalho de Solaesa et al. (2016) possui um erro intrínseco do operador do *software* utilizado. No caso das energias de ativação que apresentaram uma variação entre os sistemas, não se observou uma variação maior que 53% em nenhuma delas. Esta similaridade de valores de energias de ativação para o óleo de milho com o óleo de sardinha pode ser explicada pela composição de ambos os sistemas ser próxima de ser a mesma quando consideramos as espécies químicas envolvidas, mesmo que diferentes triglicerídeos façam parte da composição de ambos os óleos.

#### **5.4.2 Comparação das constantes cinéticas obtidas pela Eq. (51) para os diferentes sistemas considerados**

A Tabela 5.4 apresenta os valores das constantes cinéticas calculadas pela Eq. (51) com os parâmetros estimados por Solaesa et al. (2016) para o óleo de sardinha e as obtidas neste trabalho para o óleo de milho, com e sem o uso de ultrassom.

No trabalho de Solaesa et al. (2016) a constante  $k_1$  apresentou valores menores que  $k_3$  na glicerólise do óleo de sardinha. Isto sugere que a reação de glicerólise dos TAGs seria a etapa limitante da reação, devido ao impedimento estérico maior que as moléculas de TAGs possuem em relação aos DAGs de reagir com o glicerol. Como observado na Tabela 5.4, este comportamento se repete para as mesmas constantes na glicerólise do óleo de milho, sem e com uso de ultrassom. Solaesa et al. (2016) também mencionou que a relação entre as constantes de reações inversas das reações de hidrólise dos lipídeos seguia a ordem  $k_{12} > k_{10} > k_8$  devido ao impedimento estérico dos lipídeos ao reagir com os ácidos graxos livres do sistema. Este comportamento é observado também nas constantes estimadas neste trabalho ( $k_{12} > k_{10} > k_8$ ). Por fim, espera-se que as constantes  $k_1$  e  $k_3$  sejam maiores que  $k_5$  devido ao impedimento estérico das reações que elas representam. Este comportamento foi observado na Tabela 5.4, reforçando a consistência dos valores de parâmetros cinéticos estimados para a glicerólise padrão do óleo de milho. No caso da glicerólise assistida por ultrassom este comportamento não foi observado, podendo indicar que o efeito o uso de ultrassom diminui a barreira energética para a reação inversa da transesterificação de triglicerídeos com monoglicerídeos, favorecendo sua taxa de reação direta.

Tabela 5.4 – Constantes cinéticas da glicerólise do óleo de sardinha estimadas pelo trabalho de Solaesa et al. (2016), da glicerólise padrão do óleo de milho e da glicerólise do óleo de milho assistida por ultrassom estimadas pelo modelo de Valério et al. (2009).

Constante cinética (L/mmol.s)	Glicerólise do óleo de sardinha			Glicerólise padrão do óleo de milho			Glicerólise do óleo de milho assistido por ultrassom		
	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K
<b>k<sub>1</sub></b>	2.74*10 <sup>-4</sup>	4.11*10 <sup>-4</sup>	6.02*10 <sup>-4</sup>	1.81*10 <sup>-3</sup>	2.63*10 <sup>-3</sup>	3.75*10 <sup>-3</sup>	2.16*10 <sup>-5</sup>	3.60*10 <sup>-5</sup>	7.81*10 <sup>-5</sup>
<b>k<sub>2</sub></b>	3.07*10 <sup>-4</sup>	4.94*10 <sup>-4</sup>	7.73*10 <sup>-4</sup>	5.55*10 <sup>-4</sup>	8.73*10 <sup>-4</sup>	1.33*10 <sup>-3</sup>	9.71*10 <sup>-3</sup>	1.40*10 <sup>-2</sup>	1.99*10 <sup>-2</sup>
<b>k<sub>3</sub></b>	1.09*10 <sup>-2</sup>	1.09*10 <sup>-2</sup>	1.10*10 <sup>-2</sup>	3.22*10 <sup>-3</sup>	3.23*10 <sup>-3</sup>	3.24*10 <sup>-3</sup>	4.17*10 <sup>-3</sup>	4.18*10 <sup>-3</sup>	4.19*10 <sup>-3</sup>
<b>k<sub>4</sub></b>	5.04*10 <sup>-4</sup>	5.27*10 <sup>-4</sup>	5.50*10 <sup>-4</sup>	1.24*10 <sup>-3</sup>	1.27*10 <sup>-3</sup>	1.31*10 <sup>-3</sup>	5.71*10 <sup>-3</sup>	5.71*10 <sup>-3</sup>	5.71*10 <sup>-3</sup>
<b>k<sub>5</sub></b>	1.53*10 <sup>-5</sup>	2.10*10 <sup>-5</sup>	2.83*10 <sup>-5</sup>	2.16*10 <sup>-4</sup>	2.73*10 <sup>-4</sup>	3.41*10 <sup>-4</sup>	2.72*10 <sup>-4</sup>	3.41*10 <sup>-4</sup>	4.23*10 <sup>-4</sup>
<b>k<sub>6</sub></b>	8.62*10 <sup>-7</sup>	8.62*10 <sup>-7</sup>	8.63*10 <sup>-7</sup>	9.62*10 <sup>-7</sup>	9.63*10 <sup>-7</sup>	9.64*10 <sup>-7</sup>	9.01*10 <sup>-7</sup>	9.03*10 <sup>-7</sup>	9.04*10 <sup>-7</sup>
<b>k<sub>7</sub></b>	9.99*10 <sup>-2</sup>	9.99*10 <sup>-2</sup>	1.00*10 <sup>-1</sup>	6.22*10 <sup>-4</sup>	6.22*10 <sup>-4</sup>	6.22*10 <sup>-4</sup>	2.54*10 <sup>-2</sup>	2.54*10 <sup>-2</sup>	2.54*10 <sup>-2</sup>
<b>k<sub>8</sub></b>	7.16*10 <sup>-5</sup>	7.52*10 <sup>-5</sup>	7.87*10 <sup>-5</sup>	7.10*10 <sup>-5</sup>	7.46*10 <sup>-5</sup>	7.81*10 <sup>-5</sup>	7.20*10 <sup>-5</sup>	7.56*10 <sup>-5</sup>	7.92*10 <sup>-5</sup>
<b>k<sub>9</sub></b>	3.02*10 <sup>-2</sup>	3.02*10 <sup>-2</sup>	3.02*10 <sup>-2</sup>	2.82*10 <sup>-2</sup>	2.83*10 <sup>-2</sup>	2.83*10 <sup>-2</sup>	1.87*10 <sup>-2</sup>	1.87*10 <sup>-2</sup>	1.87*10 <sup>-2</sup>
<b>k<sub>10</sub></b>	3.50*10 <sup>-4</sup>	3.68*10 <sup>-4</sup>	3.86*10 <sup>-4</sup>	4.40*10 <sup>-4</sup>	4.62*10 <sup>-4</sup>	4.83*10 <sup>-4</sup>	4.49*10 <sup>-4</sup>	4.71*10 <sup>-4</sup>	4.93*10 <sup>-4</sup>
<b>k<sub>11</sub></b>	1.42*10 <sup>-2</sup>	1.42*10 <sup>-2</sup>	1.42*10 <sup>-2</sup>	3.05*10 <sup>-2</sup>	3.05*10 <sup>-2</sup>	3.05*10 <sup>-2</sup>	2.67*10 <sup>-2</sup>	2.67*10 <sup>-2</sup>	2.67*10 <sup>-2</sup>
<b>k<sub>12</sub></b>	2.86*10 <sup>-2</sup>	2.87*10 <sup>-2</sup>	2.87*10 <sup>-2</sup>	8.42*10 <sup>-4</sup>	8.42*10 <sup>-4</sup>	8.42*10 <sup>-4</sup>	4.14*10 <sup>-2</sup>	4.14*10 <sup>-2</sup>	4.14*10 <sup>-2</sup>

Adicionalmente, a Tabela 5.5 apresenta uma comparação da grandeza relativa, pela sua apresentação em ordem crescente, das constantes cinéticas das reações diretas de ambos os sistemas. Observa-se que o ordenamento é o mesmo quando se compara as reações de hidrólise de DAGs e transesterificação de MAGs e TAGs no óleo de sardinha e nas reações para o óleo de milho sem uso de ultrassom. Entretanto, as reações restantes apresentaram variações de posicionamento relativo de suas constantes de um óleo para o outro. Alguns dos motivos que podem ser levantados como causadores destas mudanças são: variações de favorecimentos de reações específicas devido a diferenças de volume ou distribuição de cargas das estruturas de TAGs, DAGs e MAGs presentes em cada óleo; ou variações de transferência de massa provocadas pelas diferenças de miscibilidade de certas moléculas no meio reacional.

Tabela 5.5 – Ordenamento das constantes cinéticas referentes às reações diretas da glicerólise de óleo de sardinha (Solaesa et al. (2016)) e da glicerólise do óleo de milho padrão do maior (1º) para o menor (6º)

Ordem	Reações diretas	
	Glicerólise do óleo de sardinha	Glicerólise do óleo de milho padrão
1º	Hidrólise TAGs ( $k_7$ )	Hidrólise MAGs ( $k_{11}$ )
2º	Hidrólise DAGs ( $k_9$ )	Hidrólise DAGs ( $k_9$ )
3º	Hidrólise MAGs ( $k_{11}$ )	Glicerólise DAGs ( $k_3$ )
4º	Glicerólise DAGs ( $k_3$ )	Glicerólise TAGs ( $k_1$ )
5º	Glicerólise TAGs ( $k_1$ )	Hidrólise TAGs ( $k_7$ )
6º	Transesterificação ( $k_5$ )	Transesterificação ( $k_5$ )

## 5.5 Avaliação da influência da estrutura das moléculas de MAGs, DAGs e TAGs presentes nos óleos nos resultados cinéticos obtidos

### 5.5.1 Otimização das estruturas e perfis $\sigma$

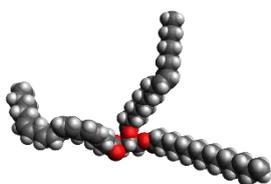
Na busca de suporte estrutural para os resultados discutidos na seção anterior com relação a grandeza relativa das constantes das reações diretas, avaliou-se as estruturas dos lipídeos (MAGs, DAGs ou TAGs) para verificar a contribuição de contribuições estéricas das diferentes espécies envolvidas. Nesta avaliação, moléculas-modelo de TAGs, DAGs e MAGs apresentadas no Capítulo 4 (Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente) tiveram suas

estruturas otimizadas através do *software* Avogadro. As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam, respectivamente, as estruturas otimizadas para TAGs, DAGs e MAGs.

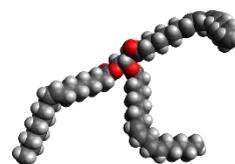
As moléculas dos TAGs da Figura 5.7 mostraram uma conformação similar independente das cadeias de ácidos graxos que as compõem. O impedimento estérico que estas moléculas apresentam com as moléculas de glicerol e de água são similares, com valores de volumes moleculares em torno de  $1200 \text{ \AA}^3$ , não podendo justificar a nível qualitativo maior facilidade para reações de glicerólise ou hidrólise de algum TAG específico com relação aos demais. As Figuras 5.8 e 5.9 apresentaram maiores variações estruturais entre os lipídeos de mesma espécie de acordo com o número de insaturações presentes nas cadeias de ácidos graxos que compõem a molécula. Cadeias saturadas como o C16:0 (palmitoil) apresentam uma conformação linear enquanto cadeias poli-insaturadas como o C18:1 (oleil), C18:2 (linoleil) e C20:4 (araquidonoil) apresentam conformações mais curvas quanto maior o número de ligações duplas presentes na cadeia. Entretanto variações notáveis não foram observadas tanto nas estruturas quanto nas áreas superficiais e volume das moléculas otimizadas, não podendo novamente inferir uma priorização das reações de glicerólise ou hidrólise de certas moléculas específicas de MAGs e DAGs com as demais de mesma espécie.

Figura 5.7 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de TAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo *software* Avogadro utilizando a função de otimização UFF

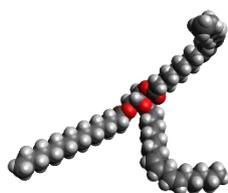
1-Palmitoil-2-Oleil-3-Araquidonoil-Glicerol  
(1267,29  $\text{\AA}^3$ ; 1153,31  $\text{\AA}^2$ )



1-Oleil-2-3-Dilinoleil-Glicerol  
(1271,24  $\text{\AA}^3$ ; 1153,31  $\text{\AA}^2$ )



1-Palmitoil-2-3-Dilinoleil-Glicerol  
(1222,42  $\text{\AA}^3$ ; 1110,50  $\text{\AA}^2$ )



1-Palmitoil-2-Oleil-3-Linoleil-Glicerol  
(1239,00  $\text{\AA}^3$ ; 1124,85  $\text{\AA}^2$ )

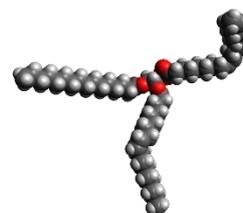


Figura 5.8 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de DAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo software Avogadro utilizando a função de otimização UFF

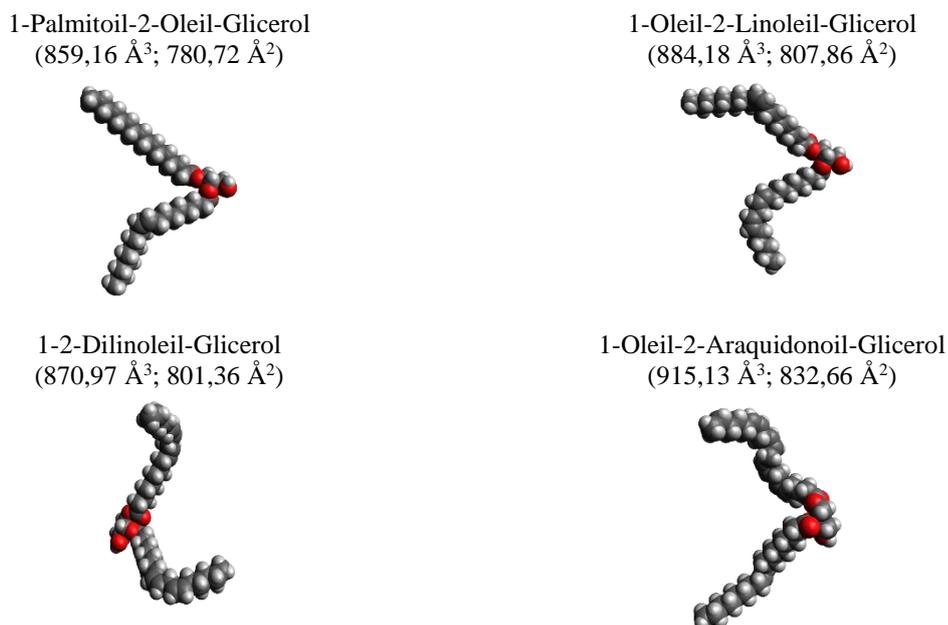
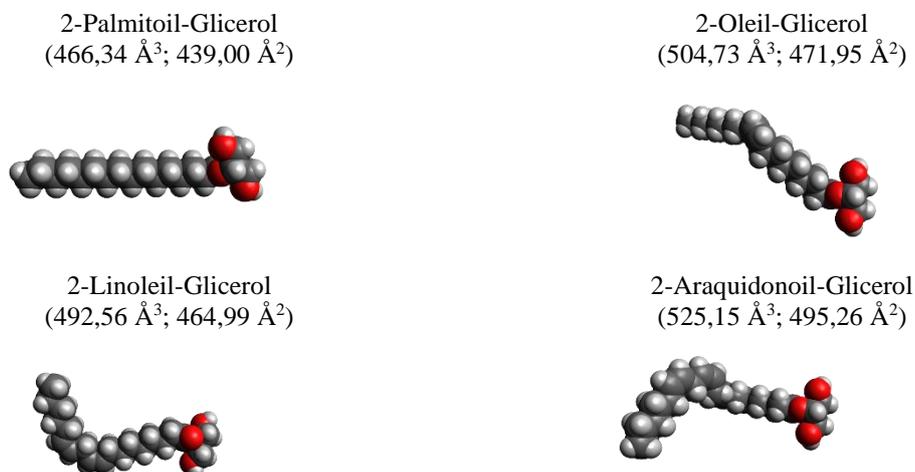


Figura 5.9 – Estruturas de esferas de Van der Waals das moléculas-modelo de MAGs propostas para o óleo de milho e sardinha otimizadas pelo software Avogadro utilizando a função de otimização UFF



Então, para permitir uma avaliação quantitativa destes potenciais diferenças, a partir das moléculas otimizadas por Avogadro utilizou-se modelos termodinâmicos do tipo COSMO-SAC para calcular a distribuição de carga eletrônica nas superfícies das moléculas otimizadas. O programa JCOSMO foi utilizado para gerar os perfis  $\sigma$  das

moléculas-modelo de TAGs, DAGs e MAGs. Estes perfis são apresentados nas Figuras 5.10, 5.11 e 5.12 respectivamente.

Figura 5.10 – Perfil  $\sigma$  das moléculas-modelo de TAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO

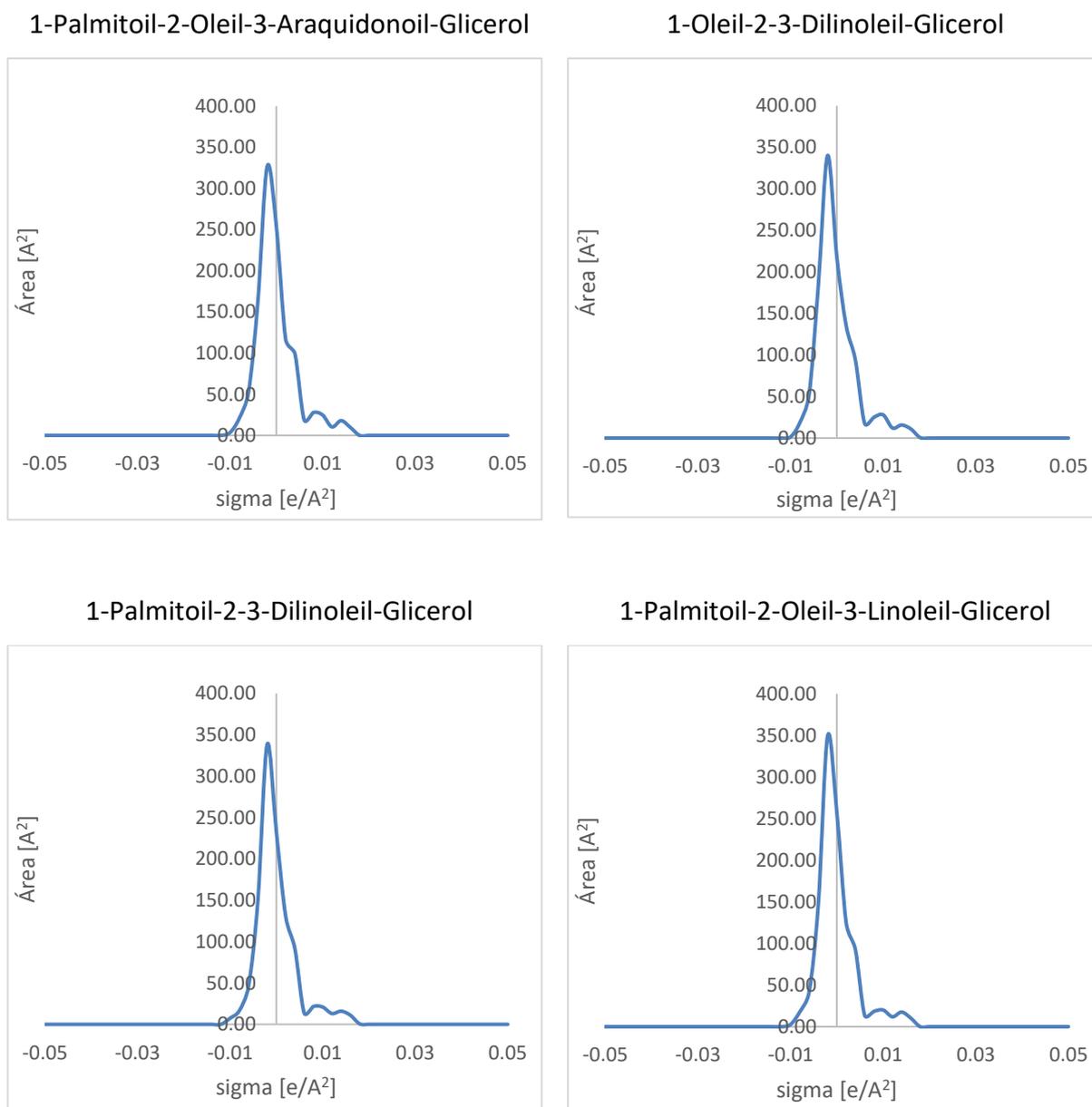


Figura 5.11 – Perfil  $\sigma$  das moléculas-modelo de DAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO

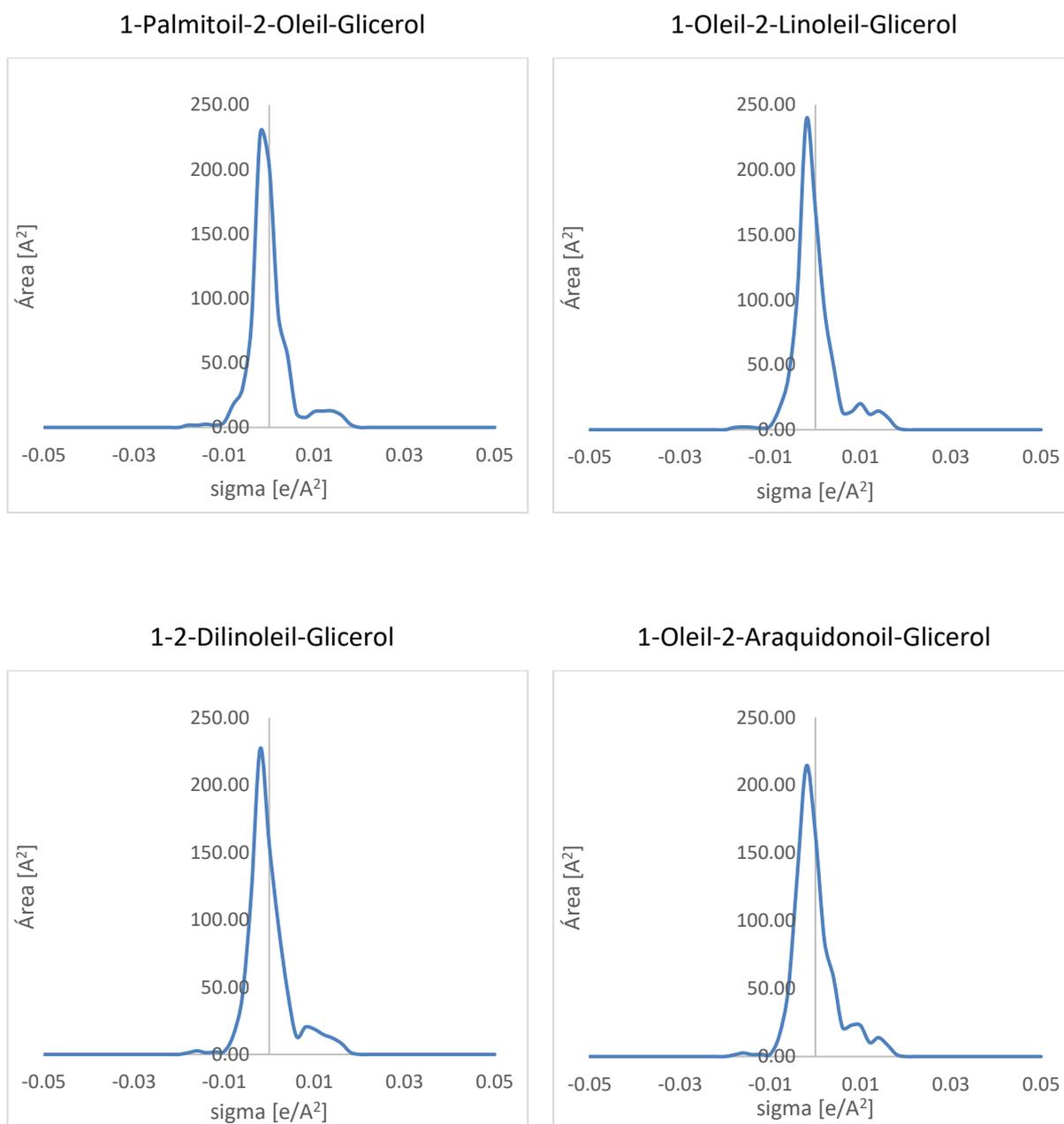
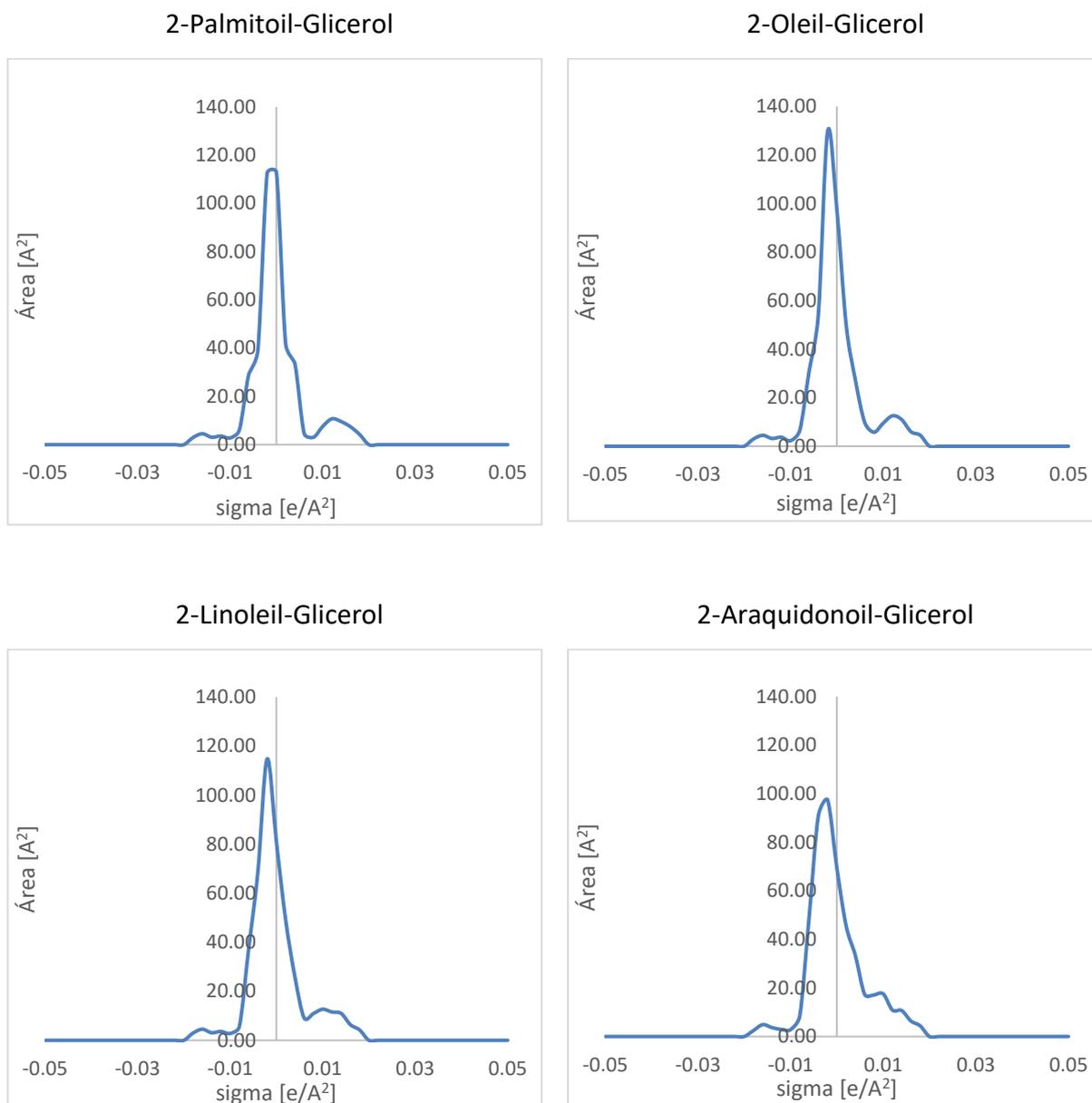


Figura 5.12 – Perfil  $\sigma$  das moléculas-modelo de MAGs propostas para o óleo de milho e sardinha obtidas através do JCOSMO

Os perfis  $\sigma$  da Figura 5.10 apresentaram maior parte de sua densidade eletrônica distribuída nas proximidades de zero, representando um comportamento amplamente apolar para as moléculas de TAGs. Esta característica é reforçada pela baixa miscibilidade que estas moléculas possuem com a água (polar). Moléculas de DAGs (Figura 5.11) e MAGs (Figura 5.12) apresentaram um comportamento mais polar que as moléculas de TAGs, apresentando um maior percentual de sua densidade eletrônica distribuída em regiões positivas do perfil  $\sigma$  quando comparadas com os perfis da Figura 5.10. Novamente

estes perfis são reforçados pela maior miscibilidade que estas moléculas possuem com o glicerol (polar).

Moléculas de DAGs como o 1-2-Dilinoil-Glicerol e o 1-Oleil-2-Araquidonoil-Glicerol apresentaram áreas de densidade eletrônica positivas maiores que os demais DAGs. Assim como moléculas de MAGs como o 2-Linoil-Glicerol e 2-Araquidonoil-Glicerol também.

### 5.5.2 Coeficientes de atividade

Para quantificar estas diferenças foram avaliados, a partir dos respectivos perfis  $\sigma$  obtidos por JCOSMO, os coeficientes de atividade ( $\gamma$ ) para cada lipídeo presente nas Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5. Utilizou-se as composições molares do meio reacional (glicerol, água e t-butanol) no tempo zero de reação para o cálculo dos  $\gamma$ , considerando cada lipídeo isolado dos demais para cada cálculo de coeficiente de atividade. A miscibilidade destas moléculas no meio reacional foi mensurada através destes coeficientes visando determinar espécies que apresentem menores resistências de transferência de massa que as demais.

Na avaliação do efeito estrutural na cinética, partiu-se da ideia de que a constante cinética ( $k_{reação}$ ) observada (ou aparente), Equação 55, incorpora a influência das resistências por transferência de massa que foram discutidas previamente. O coeficiente de atividade ( $\gamma_i$ ) é definido como a razão entre o valor da fugacidade de uma substância em uma mistura real ( $f_i$ ) pela fugacidade de uma substância em uma solução ideal ( $f_i^{ideal}$ ). A Equação 56 apresenta esta definição, enquanto a Equação 57 substitui o valor da fugacidade ideal pela fração molar do componente  $i$  ( $x_i$ ) e pela fugacidade da substância pura ( $f_i^0$ ). A razão da fugacidade de uma substância no estado atual pela fugacidade da substância no seu estado padrão é definida como atividade. Aplicando este conceito na Equação 57, obtemos a Equação 58 onde a atividade ( $a_i$ ) é definida como o produto da fração molar do componente  $i$  com o coeficiente de atividade (KORETSKY, 2012). Foley et al. (2020) incorporaram a atividade no cálculo das constantes cinéticas aparentes envolvidas em reações com estado de transição e definiu a taxa dessas reações como o produto da constante cinética com a atividade. Desta forma, a partir da Equação 55, obtivemos a Equação 59, adequando o efeito dos coeficientes de atividade sobre a taxa de reação.

$$r_{\text{reação}} = k_{\text{reação}} * \prod[\text{Reagentes}] \quad (55)$$

$$\gamma_i = \frac{f_i}{f_i^{\text{ideal}}} \quad (56)$$

$$\gamma_i = \frac{f_i}{x_i * f_i^0} \quad (57)$$

$$a_i = \gamma_i * x_i \quad (58)$$

$$r_{\text{reação}} = k_{\text{reação}}^* * \prod (\gamma_{\text{Reagentes}} * [\text{Reagentes}]) \quad (59)$$

onde  $k_{\text{reação}}^*$  seria a constante cinética verdadeira, livre dos efeitos de transferência de massa sobre a cinética de reação. Ressaltamos que geralmente a não idealidade do líquido não é considerada, considerando valores de  $\gamma_i$  iguais a 1. Optou-se por sua consideração pois este sistema naturalmente é imiscível e, mesmo com o uso de solvente, é possível observar uma pequena separação de fases com o andamento da reação.

Através das Equações 55 e 59 é possível inferir que uma correlação entre as constantes cinéticas estimadas e os coeficientes de atividade pode ser esperada quando correlacionadas. Comparou-se as constantes  $k_1$  (glicerólise de TAGs) e  $k_7$  (hidrólise de TAGs) com os coeficientes de atividade de TAGs ( $\gamma_{\text{TAG}}$ ),  $k_3$  (glicerólise de DAGs) e  $k_9$  (hidrólise de DAGs) com os coeficientes de atividade de DAGs ( $\gamma_{\text{DAG}}$ ) e  $k_{11}$  (hidrólise de MAGs) com os coeficientes de atividade de MAGs ( $\gamma_{\text{MAG}}$ ). As Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam os valores dos coeficientes de atividade e as constantes cinéticas respectivas para cada reação envolvendo MAGs, DAGs e TAGs respectivamente.

Tabela 5.6 – Coeficientes de atividade para moléculas de monoglicerídeos (MAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e constantes cinéticas de hidrólise de monoglicerídeos ( $k_{11}$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K)

Monoglicerídeos (MAG)	Coeficientes de atividade ( $\gamma$ )			Constante cinética ( $k_{11}$ )		
	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K
Glicerólise do óleo de sardinha						
2-Araquidonoil-Glicerol	0,438	0,433	0,428	1,42*10 <sup>-2</sup>	1,42*10 <sup>-2</sup>	1,42*10 <sup>-2</sup>
2-Oleil-Glicerol	0,456	0,454	0,452			
2-Palmitoil-Glicerol	0,476	0,476	0,475			
Glicerólise padrão do óleo de milho						
2-Linoleil-Glicerol	0,636	0,628	0,620	3,05*10 <sup>-2</sup>	3,05*10 <sup>-2</sup>	3,05*10 <sup>-2</sup>
2-Oleil-Glicerol	0,656	0,648	0,639			
2-Palmitoil-Glicerol	0,668	0,663	0,657			

Tabela 5.7 – Coeficientes de atividade para moléculas de diglicerídeos (DAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e constantes cinéticas de glicerólise ( $k_3$ ) e hidrólise de diglicerídeos ( $k_9$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K)

Diglicerídeos (DAG)	Coeficientes de atividade ( $\gamma$ )			Constante cinética ( $k_3$ )			Constante cinética ( $k_9$ )		
	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K
Glicerólise do óleo de sardinha									
<b>1-Oleil-2-Araquidonoil-Glicerol</b>	1,683	1,547	1,423	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$
<b>1-Palmitoil-2-Oleil-Glicerol</b>	1,694	1,572	1,460						
Glicerólise padrão do óleo de milho									
<b>1-2-Dilinoil-Glicerol</b>	4,877	4,401	3,974	$3,22 \cdot 10^{-3}$	$3,23 \cdot 10^{-3}$	$3,24 \cdot 10^{-3}$	$2,82 \cdot 10^{-2}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$
<b>1-Oleil-2-Linoleil-Glicerol</b>	3,955	3,581	3,244						
<b>1-Palmitoil-2-Oleil-Glicerol</b>	4,264	3,878	3,527						

Tabela 5.8 – Coeficientes de atividade para moléculas de triglicerídeos (TAGs) nas condições iniciais de mistura reacional nas glicerólise dos óleos de sardinha e milho e constantes cinéticas de glicerólise ( $k_1$ ) e hidrólise de triglicerídeos ( $k_7$ ) para as temperaturas estudadas neste trabalho (313, 323 e 333 K)

Triglicerídeos (TAG)	Coeficientes de atividade ( $\gamma$ )			Constante cinética ( $k_1$ )			Constante cinética ( $k_7$ )		
	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K
Glicerólise do óleo de sardinha									
<b>1-Palmitoil-2-Oleil-3-Araquidonoil-Glicerol</b>	10,952	9,073	7,548	$2,74 \cdot 10^{-4}$	$4,11 \cdot 10^{-4}$	$6,02 \cdot 10^{-4}$	$9,99 \cdot 10^{-2}$	$9,99 \cdot 10^{-2}$	$1,00 \cdot 10^{-1}$
Glicerólise padrão do óleo de milho									
<b>1-Oleil-2-3-Dilinoil-Glicerol</b>	50,960	40,649	32,559	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$2,63 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-3}$	$6,22 \cdot 10^{-4}$	$6,22 \cdot 10^{-4}$	$6,22 \cdot 10^{-4}$
<b>1-Palmitoil-2-3-Dilinoil-Glicerol</b>	48,068	38,722	31,309						
<b>1-Palmitoil-2-Oleil-3-Linoleil-Glicerol</b>	65,663	52,433	42,028						

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 observou-se que um aumento das temperaturas de reação impacta na diminuição dos coeficientes de atividades ( $\gamma$ ) para os lipídeos, assim como no aumento das constantes cinéticas de reação. Este comportamento é esperado devido à dependência destes parâmetros com a temperatura, entretanto os resultados acima também permitem identificar o efeito da resistência à transferência de massa sobre as constantes cinéticas aparentes de reação.

Moléculas que apresentam coeficientes de atividade ( $\gamma$ ) com valores menores ou iguais a 1.0 normalmente se encontram idealmente misturadas no meio reacional. Estas misturas possuem baixa resistência à transferência de massa, resultando em valores de constantes cinéticas estimadas mais precisas. Já moléculas que apresentam  $\gamma$  acima de 1.0 tendem a ser menos miscíveis com o meio reacional, resultando numa maior resistência à transferência de massa no sistema. Este segundo comportamento pode acarretar subestimação do valor das constantes cinéticas.

Com base na discussão anterior, espera-se observar um maior incremento das constantes cinéticas com o aumento de temperatura para aquelas que envolvem lipídeos com elevados valores de  $\gamma$  em sua reação, pois nestes casos o aumento da temperatura melhorará a miscibilidade do meio reacional, favorecendo mais as reações menos miscíveis em comparação com as que já possuem boa miscibilidade. As moléculas da Tabela 5.6 apresentam este comportamento, com valores de  $\gamma$  em torno de 0.5 e um aumento de apenas 2.5% dos valores das constantes cinéticas com o aumento da temperatura. Já as moléculas das Tabelas 5.7 e 5.8 apresentam variações de até 83.6% e 117.7% nos valores das constantes cinéticas respectivamente, além de possuir valores elevados de  $\gamma$ . A diferença entre os aumentos dos valores das constantes cinéticas observado entre as Tabelas 5.7 e 5.8 pode ser explicada pelos maiores valores de  $\gamma$  das moléculas de TAGs (Tabela 5.8) que as de DAGs (Tabela 5.7).

Os  $\gamma$  presentes nas Tabelas 5.6 a 5.8 mostraram uma variação considerável de valores entre lipídeos de mesma natureza de um óleo para o outro, em especial para as moléculas de DAGs e TAGs. Esta diferença associada com as barreiras de transferência de massa pode explicar as variações das ordens de grandeza das reações levantadas na Tabela 5.5. Para reforçar esta proposta, maiores correlações entre as constantes cinéticas e os coeficientes de atividade foram estudados.

A relação entre as reações de glicerólise e hidrólise dos lipídeos foi analisada através da aplicação da Equação 55 para as moléculas de DAGs e TAGs. Manipulações algébricas

foram realizadas para estas moléculas e são apresentadas abaixo nas Equações 60 a 63 utilizando as moléculas de DAGs como exemplo.

$$r_{Glic.DAG} = k_3 * [DAG] * [G] \quad (60)$$

$$r_{Hidrol.DAG} = k_9 * [DAG] * [W] \quad (61)$$

Dividindo a Equação 60 pela Equação 61:

$$\frac{r_{Glic.DAG}}{r_{Hidrol.DAG}} = \frac{k_3}{k_9} * \frac{[DAG][G]}{[DAG][W]} \quad (62)$$

Simplificando:

$$\frac{r_{Glic.DAG}}{r_{Hidrol.DAG}} = \frac{k_3}{k_9} * \frac{[G]}{[W]} \quad (63)$$

A Equação 63 mostra que a relação das taxas de reações de glicerólise e hidrólise de um mesmo lipídeo dependem das razões de suas constantes cinéticas específicas e da razão das concentrações de glicerol e água referentes ao mesmo tempo onde as taxas são calculadas (no caso das moléculas de TAGs o mesmo procedimento pode ser adotado ao substituir  $k_3$  por  $k_1$  e  $k_9$  por  $k_7$ ). No caso da avaliação do efeito da temperatura sobre as taxas de reação pode-se desconsiderar a razão entre concentrações de glicerol e água pois esta não possui uma dependência direta com a temperatura. Plotou-se, portanto, um gráfico com o comportamento das razões de constantes cinéticas  $k_3$  e  $k_9$  para as moléculas de DAGs e  $k_1$  e  $k_7$  para as de TAGs com o aumento da temperatura. No mesmo gráfico também foram adicionadas as razões de  $\gamma_G$  e  $\gamma_W$  com a temperatura, uma vez que, de acordo com a Equação 56, espera-se que as constantes referentes as reações de glicerólise e hidrólise possuam uma dependência com estes coeficientes de atividade. A Figura 5.13 apresenta o comportamento destas razões com a temperatura para os lipídeos presentes no óleo de sardinha e a Figura 5.14 e 5.15 apresenta estes comportamentos para os TAGs e DAGs presentes no óleo de milho, respectivamente.

Figura 5.13 – Relação de razões de coeficientes de atividade entre glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos lipídeos envolvidos em reação para a glicerólise do óleo de sardinha (TAGs e DAGs)

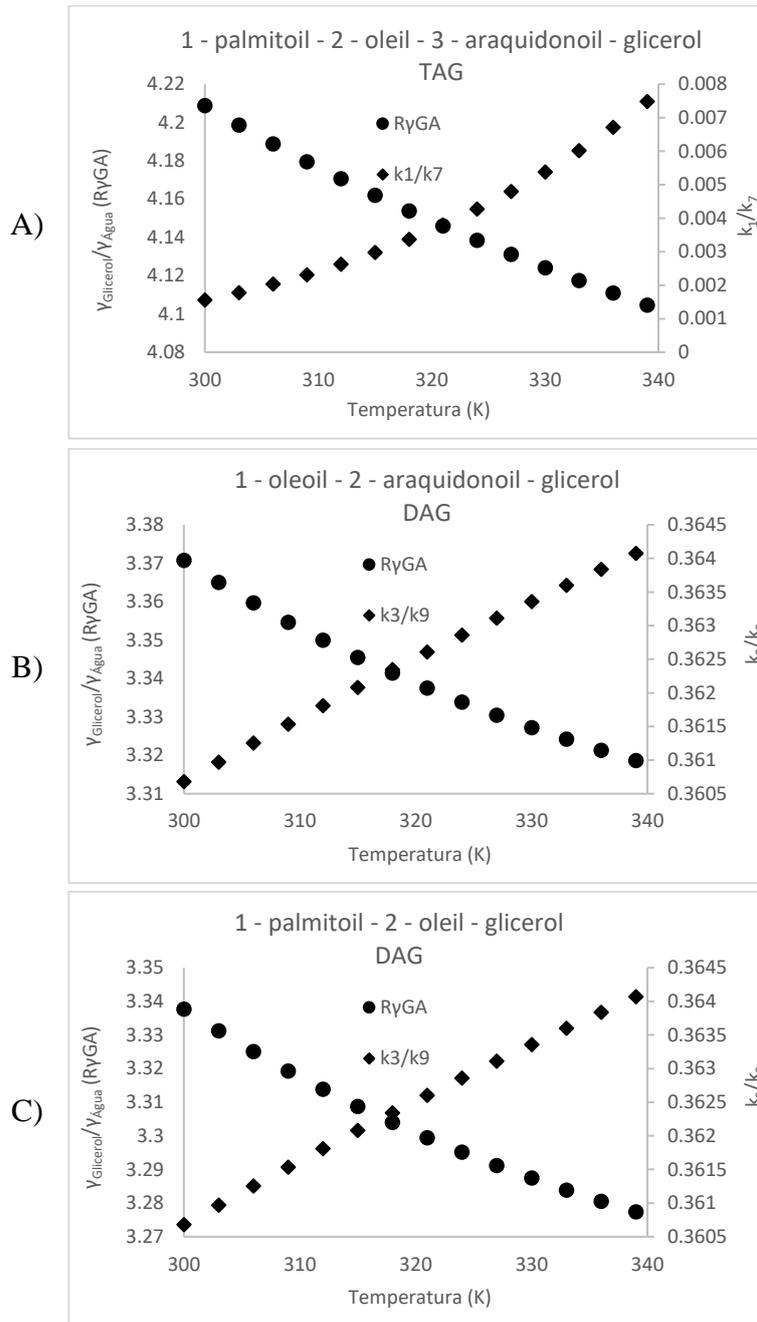


Figura 5.14 – Relação de razões de coeficientes de atividade de glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos TAGs envolvidos em reação para a glicerólise do óleo de milho padrão

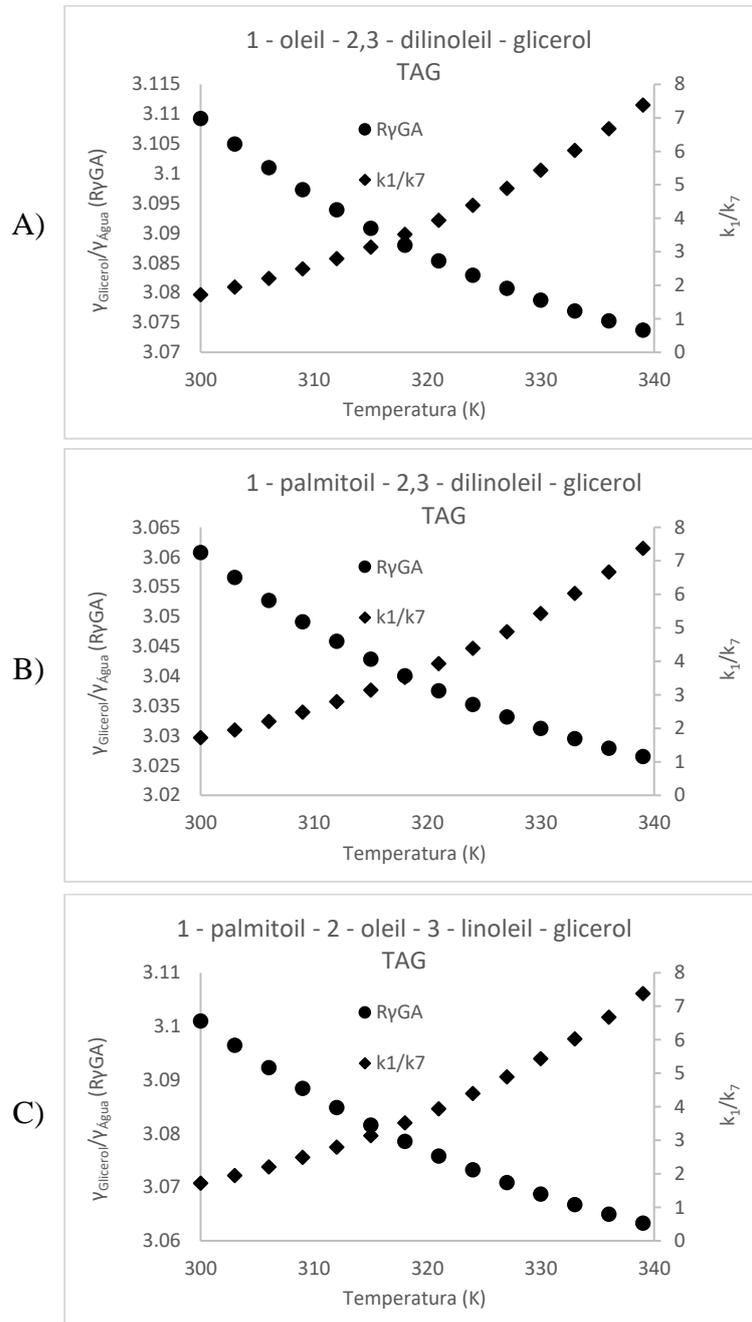
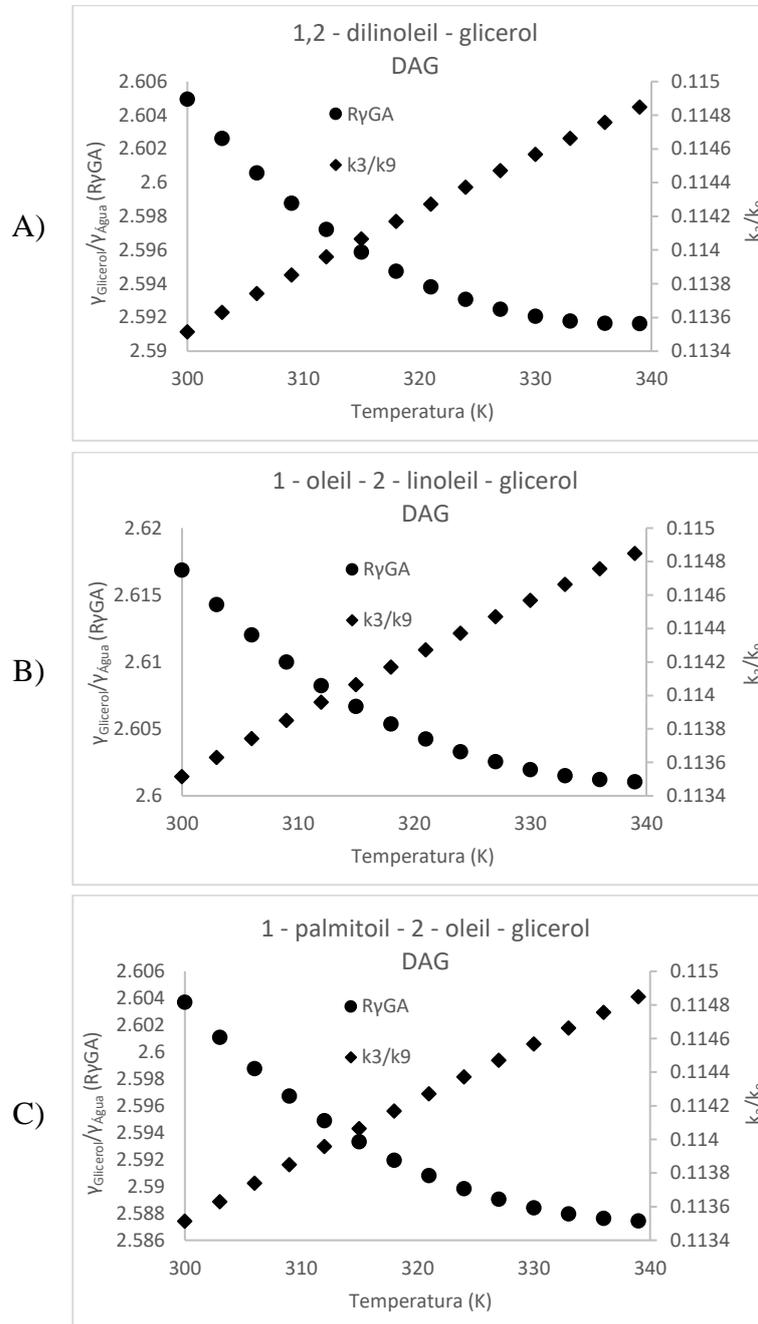


Figura 5.15 – Relação de razões de coeficientes de atividade de glicerol e água e constantes cinéticas referentes aos DAGs envolvidos em reação para a glicérolise do óleo de milho padrão



Observou-se nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15 que a razão  $\gamma_G/\gamma_W$  possui uma tendência decrescente com o aumento de temperatura em todos os casos. Uma vez que ambos os  $\gamma$  tendem a diminuir com o aumento de temperatura, o comportamento decrescente das razões de  $\gamma$  mostra que os  $\gamma_G$  são mais afetados com o aumento de temperatura que os  $\gamma_W$ . Além disso notou-se um comportamento ascendente da razão entre as constantes cinéticas de glicerólise sobre as de hidrólise. Desta forma pode-se inferir que as taxas de reação de glicerólise são mais favorecidas que as de hidrólise com a manipulação da temperatura. Este comportamento pode ser explicado principalmente pela maior diminuição da resistência a transferência de massa que ocorre com o aumento da temperatura para as moléculas de glicerol ( $\gamma$  elevados) em comparação com as moléculas de água ( $\gamma$  próximos a 1.0).

Por fim comparou-se diretamente os valores das constantes cinéticas de hidrólise e glicerólise de lipídeos com os coeficientes de atividade dos lipídeos presentes nestas reações para ambos os óleos. As Tabelas 5.9, 5.10 e 5.11 apresentam os valores obtidos nesta comparação.

De acordo com as Tabelas 5.10 e 5.11 as moléculas de MAGs e DAGs do óleo de sardinha apresentaram menores valores de coeficientes de atividade que as moléculas do óleo de milho. Além disso, as constantes de glicerólise e hidrólise para os diglicerídeos foi maior que as respectivas constantes no óleo de milho. Este comportamento pode ser explicado pela maior miscibilidade destas moléculas, conforme indicado pelos seus menores valores de  $\gamma$ , favorecendo suas taxas de reação e impactando em um maior valor absoluto de seus parâmetros cinéticos. Já a Tabela 5.9 apresentou um comportamento inverso das Tabelas 5.10 e 5.11. Neste caso os menores valores de  $\gamma_{TAG}$  para as moléculas do óleo de sardinha apresentaram menores valores de constantes cinéticas de glicerólise e hidrólise de TAGs que o óleo de milho. Supôs-se que devido a menor viscosidade do óleo de milho com relação ao óleo de sardinha nas condições experimentais analisadas (NOUREDDINI et al. 1992; SOLAESA et al. 2016), as constantes cinéticas de glicerólise e hidrólise de TAGs estimadas para o óleo de sardinha podem estar sendo subestimadas.

Tabela 5.9– Constantes cinéticas de glicerólise ( $k_1$ ) e hidrólise ( $k_7$ ) de TAGs e coeficientes de atividade para o 1-palmitoil-2-oleil-3-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{TAG1}$ ), 1-oleil-2-3-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG2}$ ), 1-palmitoil-2-3-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG3}$ ) e 1-palmitoil-2-oleil-3-linoleil-glicerol ( $\gamma_{TAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho.

Constantes cinéticas [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	Óleo de sardinha			Constantes cinéticas [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	Óleo de milho padrão		
	313 K	323 K	333 K		313 K	323 K	333 K
<b>Glicerólise de TAGs (<math>k_1</math>)</b>	$2,74 \cdot 10^{-4}$	$4,11 \cdot 10^{-4}$	$6,02 \cdot 10^{-4}$	<b>Glicerólise de TAGs (<math>k_1</math>)</b>	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$2,63 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-3}$
<b>Hidrólise de TAGs (<math>k_7</math>)</b>	$9,99 \cdot 10^{-2}$	$9,99 \cdot 10^{-2}$	$1,00 \cdot 10^{-1}$	<b>Hidrólise de TAGs (<math>k_7</math>)</b>	$6,22 \cdot 10^{-4}$	$6,22 \cdot 10^{-4}$	$6,22 \cdot 10^{-4}$
<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{TAG1}</math>)</b>	10,952	9,073	7,548	<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{TAG2}</math>)</b>	50,960	40,649	32,559
				<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{TAG3}</math>)</b>	48,068	38,722	31,309
				<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{TAG4}</math>)</b>	65,663	52,433	42,028

Tabela 5.10– Constantes cinéticas de glicerólise ( $k_3$ ) e hidrólise ( $k_9$ ) de DAGs e coeficientes de atividade para o 1-oleil-2-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{DAG1}$ ), 1-palmitoil-2-oleil-glicerol ( $\gamma_{DAG2}$ ), 1-2-dilinoleil-glicerol ( $\gamma_{DAG3}$ ) e 1-oleil-2-linoleil-glicerol ( $\gamma_{DAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho.

Constantes cinéticas [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	Óleo de sardinha			Constantes cinéticas [ $L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	Óleo de milho padrão		
	313 K	323 K	333 K		313 K	323 K	333 K
<b>Glicerólise de DAGs (<math>k_3</math>)</b>	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-2}$	<b>Glicerólise de DAGs (<math>k_3</math>)</b>	$3,22 \cdot 10^{-3}$	$3,23 \cdot 10^{-3}$	$3,24 \cdot 10^{-3}$
<b>Hidrólise de DAGs (<math>k_9</math>)</b>	$3,02 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$	<b>Hidrólise de DAGs (<math>k_9</math>)</b>	$2,82 \cdot 10^{-2}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$
<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{DAG1}</math>)</b>	1,683	1,547	1,423	<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{DAG3}</math>)</b>	4,877	4,401	3,974
<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{DAG2}</math>)</b>	1,694	1,572	1,460	<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{DAG4}</math>)</b>	3,955	3,581	3,244
	---	---	---	<b>Coefficiente de atividade (<math>\gamma_{DAG2}</math>)</b>	4,264	3,878	3,527

Tabela 5.11– Constantes cinéticas de hidrólise ( $k_{11}$ ) de MAGs e coeficientes de atividade para o 2-araquidonoil-glicerol ( $\gamma_{MAG1}$ ), 2-oleil-glicerol ( $\gamma_{MAG2}$ ), 2-palmitoil-glicerol ( $\gamma_{MAG3}$ ) e 2-linoleil-glicerol ( $\gamma_{MAG4}$ ) presentes nos óleos de sardinha e milho.

Constantes cinéticas [ $L^*mmol^{-1}*s^{-1}$ ]	Óleo de sardinha			Constantes cinéticas [ $L^*mmol^{-1}*s^{-1}$ ]	Óleo de milho padrão		
	313 K	323 K	333 K		313 K	323 K	333 K
<b>Hidrólise de MAGs (<math>k_{11}</math>)</b>	$1,42*10^{-2}$	$1,42*10^{-2}$	$1,42*10^{-2}$	<b>Hidrólise de MAGs (<math>k_{11}</math>)</b>	$3,05*10^{-2}$	$3,05*10^{-2}$	$3,05*10^{-2}$
<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG1}</math>)</b>	0,438	0,433	0,428	<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG2}</math>)</b>	0,636	0,628	0,620
<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG2}</math>)</b>	0,456	0,454	0,452	<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG3}</math>)</b>	0,656	0,648	0,639
<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG3}</math>)</b>	0,476	0,476	0,475	<b>Coeficiente de atividade (<math>\gamma_{MAG4}</math>)</b>	0,668	0,663	0,657
<b>Coeficiente de atividade médio (<math>\gamma_{Médio}</math>)</b>	0,423	0,420	0,417	<b>Coeficiente de atividade médio (<math>\gamma_{Médio}</math>)</b>	0,624	0,618	0,611

## 5.6 Testes de estabilidade do catalisador enzimático sob as condições de reação

A avaliação da atividade da lipase após a reação de glicerólise assistida por ultrassom sob rota enzimática é necessária para analisar a viabilidade dessa reação como uma alternativa industrial à produção de MAG com relação a rotas catalíticas já estabelecidas. Como o catalisador, Lipozyme 435, pode ser utilizado múltiplas vezes até sua desativação completa, é importante garantir que as condições do meio reacional não induzam a sua desativação prematura e, caso ocorra, procurar condições que minimizem este efeito visando prolongar o tempo de vida útil deste catalisador.

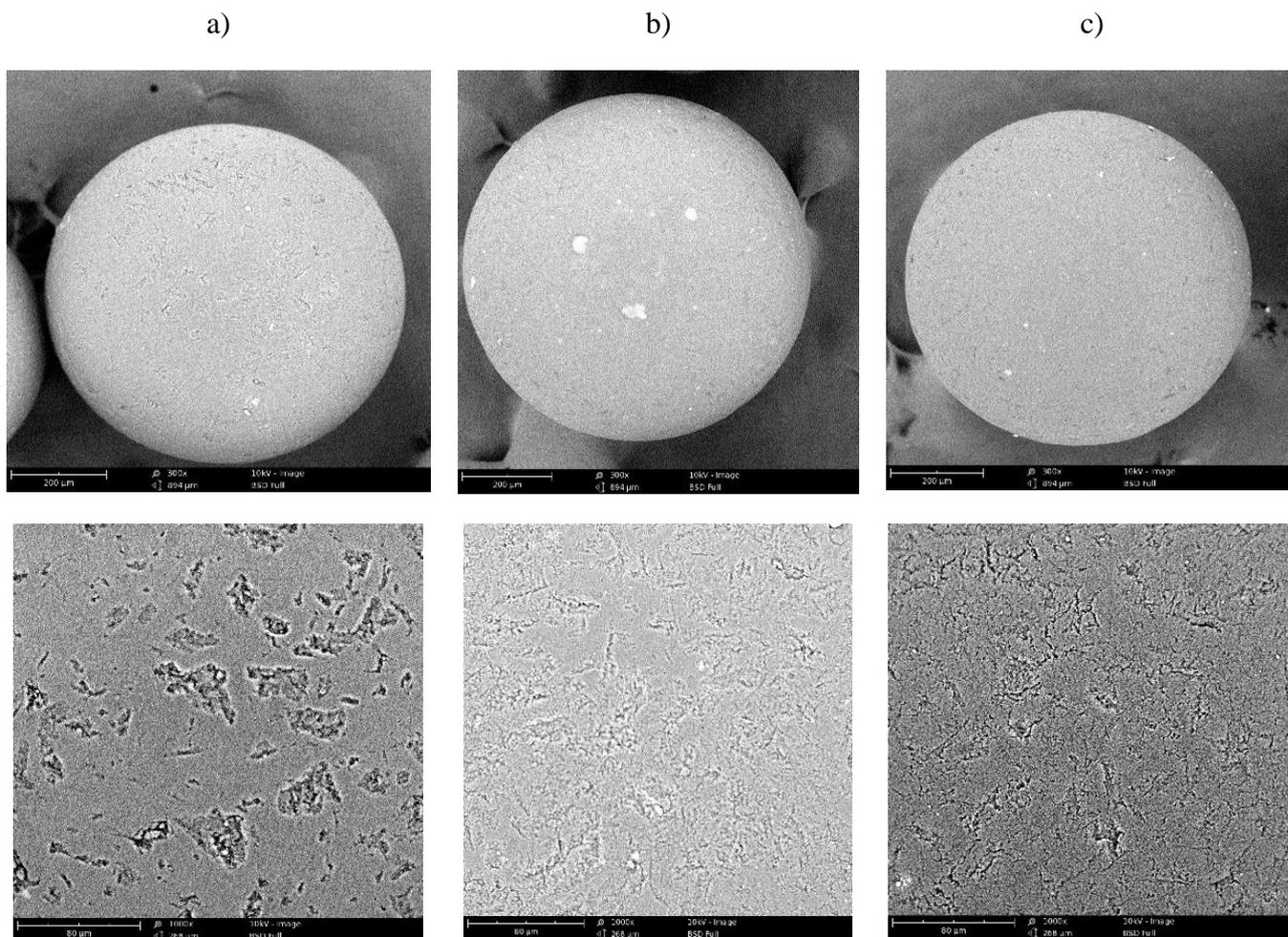
Catalisadores enzimáticos desativam a elevadas temperaturas e, por isso devem ser utilizados em condições brandas de reação (VOLL et al., 2011). Além da temperatura, outros fatores externos a reação de glicerólise podem causar uma aceleração da desativação natural da enzima. A agitação do meio reacional, por exemplo, pode causar a quebra do suporte de catalisadores heterogêneos ao forçar o atrito entre o catalisador e as paredes do reator. Por isso a agitação mecânica é preferível em relação a agitação magnética para reações utilizando catalisadores heterogêneos. Além da agitação, a cavitação proveniente do ultrassom tem o potencial de provocar a desativação do catalisador dependendo das condições aplicadas de ultrassom (DELGADO et al. 2015).

Uma análise superficial da estrutura do catalisador foi realizada para investigar se o efeito da agitação ou da cavitação provocada pelo ultrassom possui um impacto físico que possa estar aumentando a taxa de desativação da lipase. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para confirmar a presença ou não de danos na estrutura do catalisador provocados pelo efeito direto da agitação mecânica utilizada neste trabalho ou pela cavitação proveniente do ultrassom.

A Figura 5.16 mostra os resultados da análise de MEV do catalisador enzimático Lipozyme 435 antes da reação de glicerólise (a), após a glicerólise do óleo de milho sem ultrassom (b) e após a glicerólise do óleo de milho com assistência de ultrassom (c). É possível notar que a superfície do catalisador não apresenta diferenças notáveis entre as reações de glicerólise que aplicaram ou não ultrassom no meio reacional. A comparação da estrutura do catalisador pré-glicerólise com a estrutura após a reação (em ambos os tipos de reação) não mostra sinais de rachaduras ou desintegração. Esses resultados demonstram

que o efeito do ultrassom ou mesmo a agitação mecânica usada durante a reação não estão danificando a estrutura da lipase usada.

Figura 5.16 – Imagens de MEV das partículas de catalisador enzimático Lipozyme 435 com aproximação de 300 (esquerda) e 1000 (direita): a) antes da reação; b) depois da reação sem uso de ultrassom; c) depois da reação com sob ação de ultrassom.



A atividade do catalisador foi mensurada através da titulação com solução de NaOH como descrito na Seção 4.1.4. A diferença entre as atividades no início da reação de glicerólise e ao final da mesma foi utilizada como principal método de avaliar o efeito do ultrassom sobre a longevidade do catalisador. A Tabela 5.12 apresenta a atividade das lipases testadas em termos de PLU/g (Unidades de Lauril de Propil) para as reações de glicerólise na temperatura mais alta estudada neste trabalho (60 °C). O motivo da escolha desta temperatura para a avaliação consistiu no fato desta ser uma temperatura recorrente

em reações de glicerólise catalisadas por lipases dentro da literatura (NAIK et al. 2014; VOLL et al. 2011; WANG et al. 2011), além de ser a maior temperatura estudada neste trabalho. Desta forma é possível observar o impacto do uso contínuo de ultrassom no meio reacional nas condições consideradas mais agressivas de reação abordadas nesta tese.

Tabela 5.12 – Atividade catalítica em PLU (Unidades de Lauril de Propil) para a glicerólise de triglicerídeos proveniente de óleo de milho para reações com e sem o uso de ultrassom a uma temperatura de 60 °C e tempo de reação de 480 min.

<b>Lipozyme 435</b>	<b>Atividade (PLU/g)</b>
Antes da glicerólise	8245
Após a glicerólise sem ultrassom	6255
Após a glicerólise com ultrassom	4986

\* PLU (*propyl laureate unit*) consiste na quantidade de enzima que sintetiza 1  $\mu$ mol de lauril propil por minuto quando ácido láurico e 1-propanol reage a 60°C.

É notável que a atividade da lipase diminui após 8 horas de glicerólise para ambas as reações. A glicerólise padrão apresentou 25% de perda de atividade, enquanto a reação assistida por ultrassom mostrou uma atividade ainda menor em comparação com a glicerólise normal, resultando em 40% de desativação. Desta forma mesmo em reações com taxas de formação similares o ultrassom apresentou um efeito negativo sobre a atividade da enzima, indicando menor viabilidade desta técnica nas condições reacionais aplicadas neste estudo. A desativação da enzima associada com o uso do ultrassom foi observada em outros trabalhos para diferentes sistemas. Delgado et al. apontaram o efeito controverso da cavitação provocada pelo ultrassom como um auxiliador para a remoção de toxinas presentes em efluentes de indústrias têxteis mas, ao mesmo tempo, como causador da desativação da enzima utilizada (2015). Galesio et al. (2012) apontou em seu estudo da cinética de reação de hidrólise de  $\beta$ -glucuronidase sob efeito de ultrassom que a elevação de temperatura do meio reacional que pode ser causada pelo ultrassom é capaz de desnaturar algumas enzimas. Desta forma, torna-se necessário contornar a desnaturação da enzima causada pelo ultrassom para permitir o reaproveitamento deste catalisador, aumentando a sua viabilidade econômica.

A diminuição da temperatura de operação, do tempo reacional e do tempo de uso de ultrassom no meio reacional podem ser apresentados como alternativas para diminuir a

taxa de desativação do catalisador. Além disso, poder-se-ia avaliar a possibilidade de otimizar os parâmetros utilizados no equipamento de ultrassom, como intensidade e frequência de ultrassom, sendo estes os principais causadores de diversas inconsistências de resultados referentes a existência ou não de desativação da lipase dentro da literatura (DELGADO et al. 2015).

## 6 Conclusão

Testes de glicerólise do óleo de milho foram realizados para sistemas com e sem o uso de ultrassom. Observou-se que a aplicação de ultrassom provocou um aumento na taxa de formação de monoglicerídeos para reações que empregaram temperaturas mais baixas (313 K). Em maiores temperaturas estudadas neste trabalho a diferença de rendimentos não apresentou diferenças significativas entre as técnicas, entretanto a taxa de formação dos produtos foi superior para reações que usaram o ultrassom mesmo em temperaturas mais elevadas. Isto implica que o ultrassom apresentou uma maior efetividade para reações onde temperaturas mais baixas são empregadas, apresentando para temperaturas mais elevadas uma conversão similar a reação padrão, mas com uma maior taxa de formação para o início da reação.

O modelo cinético de Valério et al. (2009) foi implementado em Matlab 2012 e mostrou-se adequado para a representação da cinética da glicerólise do óleo de milho. Através da comparação das constantes cinéticas do óleo de milho com os do óleo de sardinha notou-se que os parâmetros estimados do óleo de milho seguiram os comportamentos teóricos preditos para o ordenamento das constantes  $k_{12}$ ,  $k_{10}$  e  $k_8$  levantados para o óleo de sardinha. Adicionalmente, constatou-se que para as reações sem o uso de ultrassom, tanto para o óleo de milho como para o óleo de sardinha, a glicerólise dos TAGs ( $k_1$ ) é a etapa limitante da reação, enquanto a reação de transesterificação de TAGs e MAGs ( $k_5$ ) possui a menor velocidade de reação quando ignoramos as reações de hidrólise dos lipídeos devido ao maior impedimento estérico existente entre as moléculas envolvidas. Por fim, a comparação entre os parâmetros estimados demonstrou que o uso das constantes do óleo de sardinha como um ponto de partida para a estimação dos parâmetros do óleo de milho foi efetivo devido a similaridade das naturezas dos componentes que fazem parte de ambos os óleos. Entretanto ainda é necessário determinar constantes específicas para cada óleo, uma vez que diferenças de ordens de grandezas foram observadas em determinados parâmetros, sendo estas explicadas pelas diferenças dos tamanhos de cadeias de ácidos graxos presentes nas estruturas de TAGs de cada óleo.

Coefficientes de atividade para cada molécula de lipídeo presente no meio reacional durante a glicerólise foram calculados através do JCOSMO. Correlacionou-se estes valores com as constantes cinéticas visando validar os resultados obtidos na estimação. Constatou-

se que pode ser observada uma correlação clara entre os coeficientes de atividade e as constantes cinéticas aparentes estimadas, mostrando a relevância dos efeitos de resistências a transferência de massa no sistema. Além disso, observou-se que com o aumento da temperatura, reações de glicerólise tem suas taxas mais aceleradas do que reações de hidrólise.

Análises de MEV mostraram que o uso de ultrassom não possui impactos negativos na superfície do catalisador após prolongados intervalos de tempo. Entretanto a atividade catalítica mensurada através do grau de esterificação do ácido láurico por álcool n-propílico mostrou um decaimento considerável de atividade após 8 horas de reação com o uso de ultrassom nas temperaturas de 333 K em comparação com a reação padrão nas mesmas condições. Como consequência foram levantadas estratégias para minimizar o grau de desativação da enzima, sendo as principais: diminuição do tempo de reação, otimização de parâmetros operacionais de ultrassom (tempo de incidência, frequência e/ou intensidade) e o uso de menores temperaturas reacionais.

O ultrassom mostrou-se como uma técnica auxiliar com potencial para aumentar a viabilidade econômica da rota enzimática de glicerólise de óleos e gorduras, justificando estudos adicionais para a otimização de seu uso.

## 7 Sugestões para Trabalhos Futuros

Apesar de que o modelo cinético implementado em Matlab 2012 apresentou boa adequação aos dados experimentais obtidos nas reações de bancada, os seguintes esforços adicionais ainda poderiam ser efetuados para melhorar a qualidade dos parâmetros obtidos e a adequação do modelo: (i) avaliar o desempenho na estimação do conjunto de parâmetros cinéticos da função *fminsearch* do Matlab, devido a sua maior flexibilidade e capacidade de lidar com funções de erros não contínuas; (ii) incorporar o termo de desativação enzimática no modelo cinético; (iii) incluir no modelo a intermitência na aplicação do ultrassom no caso da reação assistida por ultrassom; (iv) incorporar no modelo os termos de idealidade da mistura ( $\gamma_i$ ).

Outro aspecto a considerar é que no caso de reações enzimáticas existem diversos fatores que podem causar a desativação: o efeito do pH, força iônica, inibições reversíveis ou irreversíveis são exemplos de possíveis causadores de desnaturação da lipase. Desta forma, valeria a pena realizar testes para avaliar qual destes efeitos é o que melhor descreve o termo de desativação que seria adicionado ao modelo, para melhor controlar os parâmetros causadores de desativação. Neste aspecto, testes adicionais de avaliação da desativação catalítica, além dos presentes na Tabela 5.12, deverão ser realizados. Além disso, uma vez que os testes de atividade da enzima foram realizados para a reação com a maior temperatura, é de interesse para trabalhos futuros avaliar o decaimento da atividade nas menores temperaturas estudadas (40 °C), já que foi nelas que o efeito do ultrassom se mostrou mais impactante.

## 8 Referências

- ADEWALE, P.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Enzyme-Catalyzed Synthesis and Kinetics of Ultrasonic-Assisted Methanolysis of Waste Choice White Grease for Fatty Acid Methyl Ester Production. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 10, p. 6412–6421, 2015.
- ALVES, J. S. et al. Combined effects of ultrasound and immobilization protocol on butyl acetate synthesis catalyzed by CALB. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9562–9576, 2014.
- ANDERSEN, M. et al. Michaelis–Menten equation for degradation of insoluble substrate. **Mathematical Biosciences**, v. 296, n. January, p. 93–97, 2018.
- ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 119–130, 2016.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, gás Natural e Biocombustíveis - ANP - Anuário Estatístico 2018. **Anuário estatístico ANP**, p. 264, 2018.
- ATALAH, J. et al. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, n. November 2018, p. 478–488, 2019.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297–1303, 2014.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 503–529, 2017.
- BHUIYA, M. M. K. et al. Optimisation of Oil Extraction Process from Australian Native Beauty Leaf Seed ( *Calophyllum inophyllum* ). **Energy Procedia**, v. 75, p. 56–61, 2015.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. [s.l: s.n.].
- CARRILLO, W. et al. Content of fatty acids in corn (*Zea mays* L.) oil from Ecuador. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 8, p. 150–153, 2017.
- CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 71–80, 2007.
- CHEN, J. P.; WANG, H. Y. Improved properties of bilirubin oxidase by entrapment in alginate-silicate sol-gel matrix. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 11, p. 851–853, 1998.
- CONAB. Análise Mensal Milho - Junho/Julho de 2019. **Companhia Nacional de Abastecimento (Conab)**, n. 61, p. 4, 2019.
- CORZO-MARTÍNEZ, M. et al. Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 311–322, 2016.

DA SILVA, J. A. P.; CARDOZO, N. S. M.; PETZHOLD, C. L. Enzymatic synthesis of andiroba oil based polyol for the production of flexible polyurethane foams. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. May 2017, p. 55–63, 2018.

DE CLERCQ, N.; FOUBERT, I.; DEWETTINCK, K. Separation and analysis of acylglycerols by chromatographic methods. **Lipid Technology**, v. 20, n. 10, p. 232–234, 2008.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1–21, 2015.

DUNN, R. O. Effects of minor constituents on cold flow properties and performance of biodiesel. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 35, n. 6, p. 481–489, 2009.

FALLAVENA, L. P. et al. Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **RSC Advances**, v. 4, n. 17, p. 8675–8681, 2014.

FIAMETTI, K. G. et al. Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 440–451, 2012.

FOLEY, B. L.; BHAN, A. Thermodynamically consistent forward and reverse degrees of rate control in reversible reactions. **Journal of Catalysis**, v. 389, p. 566–577, 2020.

FREITAS, L. et al. Monoglicéridos: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1514–1521, 2008.

GALESIO, M. et al. Unravelling the role of ultrasonic energy in the enhancement of enzymatic kinetics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 1–2, p. 9–15, 2012.

GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Corn history and culture. **Corn: Chemistry and Technology, 3rd Edition**, p. 1–18, 2019.

GARZON-ABURBEH, A. et al. 1,3-Dipalmitoylglycerol Ester of Chlorambucil as a Lymphotropic, Orally Administrable Antineoplastic Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1200–1203, 1983.

GARZON-ABURBEH, A. et al. 3,4-dihydroxyphenyl)propanoyl]propane-1,2,3-. n. 4, p. 687–691, 1986.

GHAMGUI, H. et al. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 717–723, 2006.

GHAZANI, S. M.; MARANGONI, A. G. **Healthy Fats and Oils**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015. v. 2–4

- GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. Intensification of glycerolysis reaction of higher free fatty acid containing sustainable feedstock using microwave irradiation. **Fuel Processing Technology**, v. 118, p. 110–116, 2014.
- GONALVES, K. M. et al. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation - The use of experimental design as a tool for variables evaluation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 2, p. 232–236, 2012.
- GUMUS, M.; KASIFOGLU, S. Performance and emission evaluation of a compression ignition engine using a biodiesel ( apricot seed kernel oil methyl ester ) and its blends with diesel fuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 134–139, 2010.
- KAEWTHONG, W. et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525–1530, 2005.
- KASAMATSU, T. et al. Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 253–260, 2005.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. VAN. **The Biodiesel Handbook Editors**. [s.l: s.n.].
- KORETSKY, M. D. **Engineering and Chemical Thermodynamics**. [s.l: s.n.].
- KRÜGER, R. L. et al. Kinetics of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Glycerolysis of Olive Oil in Surfactant System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8350–8356, 2009.
- LAPUERTA, M. et al. Improvement of cold flow properties of a new biofuel derived from glycerol. **Fuel**, v. 242, n. December 2018, p. 794–803, 2019.
- LERIN, L. A. et al. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2381–2394, 2014.
- LIU, Q. et al. Ultrasonic pretreatment promotes diacylglycerol production from lard by lipase-catalysed glycerolysis and its physicochemical properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, n. March, p. 11–18, 2018.
- MIAO, S. et al. Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1692–1704, 2014.
- NAIK, M. K.; NAIK, S. N.; MOHANTY, S. Enzymatic glycerolysis for conversion of sunflower oil to food based emulsifiers. **Catalysis Today**, v. 237, p. 145–149, 2014.
- NEUZA JORGE. **QUÍMICA E TECNOLOGIA DE ÓLEOS VEGETAIS**. [s.l: s.n.].
- NOUREDDINI, H.; HARKEY, D. W.; GUTSMAN, M. R. A Continuous Process for the Glycerolysis of Soybean Oil. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 203–207, 2004.

NOUREDDINI, H.; TEOH, B. C.; CLEMENTS, L. D. Viscosities of Vegetable Oils and Fatty Acids. **Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications**, v. 69, n. 12, p. 1184–1188, 1992.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. **The Future of Glycerol: New Usages for a Versatile Raw Material**. [s.l.: s.n.].

QI, D. H. et al. Combustion and performance evaluation of a diesel engine fueled with biodiesel produced from soybean crude oil. **Renewable Energy**, v. 34, n. 12, p. 2706–2713, 2009.

RAJKUMAR, S.; THANGARAJA, J. Effect of biodiesel, biodiesel binary blends, hydrogenated biodiesel and injection parameters on NO<sub>x</sub> and soot emissions in a turbocharged diesel engine. **Fuel**, v. 240, n. August 2018, p. 101–118, 2019.

REMONATTO, D. et al. Glicerólise Enzimática De Óleos De Soja Assistida Por Ultrassom Em Meio Livre De Solvente Orgânico Sob Agitação. p. 9875–9882, 2015.

ŘEZANKA, T.; PÁDROVÁ, K.; SIGLER, K. Regioisomeric and enantiomeric analysis of triacylglycerols. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 3–12, 2017.

ROMERO, M. D. et al. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 269–277, 2007.

SANTIN, C. M. T. et al. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using candida antarctica B immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 90–94, 2014.

SARMA, S. et al. Homologous overexpression of Hydrogenase and Glycerol dehydrogenase in. **Bioresource Technology**, 2019.

SHAHABUDDIN, M. et al. Ignition delay, combustion and emission characteristics of diesel engine fueled with biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 623–632, 2013.

SOLAESA, Á. G. et al. Kinetic study and kinetic parameters of lipase-catalyzed glycerolysis of sardine oil in a homogeneous medium. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 4, p. 596–606, 2016.

SUN, S.; WANG, G.; WANG, P. A cleaner approach for biodegradable lubricants production by enzymatic glycerolysis of castor oil and kinetic analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 188, p. 530–535, 2018.

SUSLICK, K. S. et al. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 357, n. 1751, p. 335–353, 1999.

TAKASE, M. et al. An expatiate review of neem, jatropha, rubber and karanja as

multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 495–520, 2015.

TIAN, Z. M. et al. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 399–404, 2004.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. [s.l.: s.n.].

VOLL, F. et al. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 107–115, 2011.

WAGHMARE, G. V.; VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 311–316, 2015.

WANG, W. et al. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 192–196, 2011.

YANG, T. et al. Enzymatic Production of Monoacylglycerols Containing Polyunsaturated Fatty Acids through an Efficient Glycerolysis System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005.

ZHANG, Y. et al. Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaption and substrate binding preference. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 10, p. 948–957, 2016.

ZHANG, Z.; XIN, L.; LI, W. Applied Catalysis B : Environmental Electrocatalytic oxidation of glycerol on Pt / C in anion-exchange membrane fuel cell : Cogeneration of electricity and valuable chemicals. **“Applied Catalysis B, Environmental”**, v. 119–120, p. 40–48, 2012.

ZHONG, N. et al. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 228–232, 2010.

ZHOU, D. et al. Synthesis of structured triacylglycerols containing caproic acid by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5771–5777, 2001.