

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Otimização da Esterificação da Matéria
Saponificável do Destilado de Desodorização
do Óleo de Soja**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Nara Lúcia Facioli, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de março de 2001.

Campinas, 08 de março de 2001


Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano
Presidente da Banca

Nara Lúcia Facioli
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP – 2001



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	F118e
V. _____	Ex. _____
TOMBO BC/	44479
PROC.	16.392101
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/05/01
N.º CPD	

CM00156270-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F118o Facioli, Nara Lúcia
Otimização da esterificação da matéria saponificável do
destilado de desodorização do óleo de soja / Nara Lúcia
Facioli. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Daniel Barrera Arellano
Dissertação (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

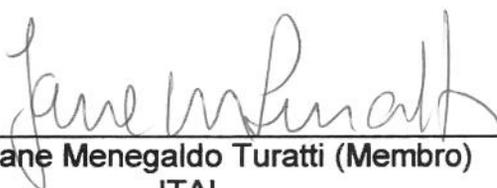
1.Esterificação. 2.Vitamina E. 3.Ésteres. I.Barrera
Arellano, Daniel. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)
FEA - UNICAMP

Profa. Dra. Jane Mara Block (Membro)
CCA - CAL - UFSC



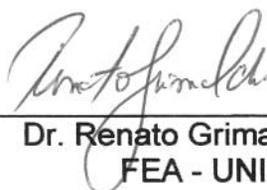
Dra. Jane Menegaldo Turatti (Membro)
ITAL



Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli (Membro)
FCF. - USP



Profa. Dra. Marisa A. B. Regitano D'Arce (Membro)
LAN - ESALQ - USP



Dr. Renato Grimaldi (Membro)
FEA - UNICAMP

Prof. Dr. Walter Esteves (Membro)
FEA - UNICAMP

Dedico este trabalho aos meus pais

Maria de Lourdes Jacob Facioli

e

Luiz Facioli

***Pelo amor que me deram durante sua
existência.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano, de modo especial agradeço pela sugestão do tema e principalmente por ter me aceito para orientação em um momento decisivo no meu curso de pós-graduação.

A minha mãe, Dona Lourdes, que sempre me impulsionou com sua força e coragem.

A minha amiga Cláudia, que me apoiou nos momentos mais difíceis, durante esta jornada.

À empresa COCAMAR, pela gentileza em doar a matéria-prima utilizada neste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pela concessão dos recursos financeiros (auxílio à pesquisa).

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

A AUTORA.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XXXIII
RESUMO	XXVII
ABSTRACT	XLI
INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	5
OBJETIVOS	7
Geral	7
Específicos	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
Importância da Soja no Brasil	9
Composição do Óleo de Soja	9
Refino do Óleo de Soja	12
Destilado de Desodorização do Óleo de Soja (DDOS)	14
Recuperação do DDOS	15
Composição do DDOS	17
Estocagem do DDOS	21

	Página
Compostos de Interesse	21
Tocoferóis	22
Estrutura e Funções Biológicas	22
Fontes de Tocoferóis	24
Efeito do Processamento	26
Ação Antioxidante	28
Implicações Nutricionais	31
Esteróis	32
Estrutura e Funções Biológicas	32
Fontes de Esteróis	33
Efeito do Processamento	34
Implicações Nutricionais	36
Ação Hipocolesterolêmica	37
Concentração de Compostos Minoritários de Óleos e Gorduras	38
Destilação Molecular	39
Descrição Geral do Processo	39
Aplicações da Destilação Molecular	40
Obtenção de Concentrados de Tocoferóis e/ou Esteróis	41
Preparação da Matéria-Prima	46

	Página
Esterificação da Matéria Saponificável do DDOS	47
Interesterificação Enzimática	47
Síntese de Ésteres	50
Interesterificação Química	54
Interesterificação de Triglicerídios	54
Saponificação de Mono-, Di- e Triglicerídios	57
Acidulação de Sabões	58
Esterificação de Ácidos Graxos	59
Planejamento Fatorial, Análise de Variância e Metodologia de Superfície de Resposta	60
MATERIAL E MÉTODOS	67
Material	67
Matéria-Prima	67
Equipamentos e Instrumentos	67
Reagentes	68
Outros Insumos	68
Métodos	68
Métodos Analíticos	68
Procedimento Experimental	71
Caracterização da Matéria-Prima	71

	Página
Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS	71
Ensaio Preliminares	71
Otimização da Reação de Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS	72
Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Enzimática do DDOS	76
Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS	76
Esterificação Química da Matéria Saponificável do DDOS	76
Esterificação Química Direta do DDOS	76
Otimização da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS	76
Esterificação Química do DDOS saponificado e acidulado.....	79
Saponificação do DDOS	80
Acidificação dos Sabões obtidos na Reação de Saponificação .	81
Otimização da Reação de Esterificação Química dos AGT do DDOS	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
Caracterização do DDOS	85
Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS	87
Ensaio Preliminares	87

	Página
Reação de Esterificação Enzimática em Meio Orgânico	87
Otimização da Reação de Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS	88
Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Enzimática do DDOS	109
Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS	109
Esterificação Química da Matéria Saponificável do DDOS	110
Esterificação Química Direta do DDOS	110
Otimização da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS	110
Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS	132
Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS	132
Esterificação Química do DDOS Saponificado e Acidulado	133
Saponificação do DDOS	133
Acidificação dos Sabões obtidos na Reação de Saponificação	147
Otimização da Reação de Esterificação Química dos AGT do DDOS	147
Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Química do DDOS	169

ANÁLISE COMPARATIVA DOS PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DO DDOS	171
CONCLUSÕES	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
ANEXOS	199

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Composição e algumas características do óleo de soja bruto .	11
TABELA 2- Composição do destilado de desodorização de diferentes óleos	18
TABELA 3- Características e composição do DDOS	19
TABELA 4- Componentes principais do DDOS	20
TABELA 5- Consumo mundial de óleos/gorduras	25
TABELA 6- Fontes de vitamina E na dieta americana	25
TABELA 7- Teor de tocoferóis e tocotrienóis em óleos refinados (mg/100g óleo) e atividade vitamínica E	26
TABELA 8- Efeito do processamento no teor de tocoferóis em óleo de soja	28
TABELA 9- Composição da fração esterólica de óleos vegetais	34
TABELA 10- Teor e composição dos 4- desmetilesteróis do óleo de soja após diferentes etapas do processamento	35
TABELA 11- Teores de tocoferóis em DDOS e seus concentrados	44
TABELA 12- Volatilidade relativa dos componentes de óleos vegetais	47
TABELA 13- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação enzimática do DDOS	74
TABELA 14- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo dos níveis codificados das três variáveis do processo de esterificação enzimática do DDOS	75

TABELA 15- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química direta do DDOS	77
TABELA 16- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo dos níveis codificados das três variáveis do processo de esterificação química direta do DDOS	78
TABELA 17- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química completa do DDOS	83
TABELA 18- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo dos níveis codificados das três variáveis do processo de esterificação química completa do DDOS	84
TABELA 19- Composição e características principais do DDOS	85
TABELA 20- Composição da matéria insaponificável do DDOS	86
TABELA 21- Efeito da adição de solvente orgânico na esterificação enzimática do DDOS	88
TABELA 22- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do processo de esterificação enzimática do DDOS	90
TABELA 23- Análise dos efeitos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão de ácidos graxos em ésteres, no processo de esterificação enzimática do DDOS	91
TABELA 24- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS	93

TABELA 25- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS	94
TABELA 26- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS	95
TABELA 27- Variação dos mono-, di- e triglicerídios do DDOS após a reação de esterificação enzimática no ponto ótimo econômico do processo	110
TABELA 28- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do processo de esterificação química direta do DDOS	111
TABELA 29- Análise dos efeitos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto	113
TABELA 30- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto	114
TABELA 31- Análise dos efeitos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial completo	115
TABELA 32- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS,	

	Página
usando um planejamento fatorial completo.....	116
TABELA 33- Variação dos mono-, di- e triglicerídios do DDOS após a reação de esterificação química direta no ponto ótimo econômico do processo	133
TABELA 34- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do processo de esterificação química do DDOS saponificado e acidulado	149
TABELA 35- Análise dos efeitos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão de ácidos graxos em ésteres, no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto	150
TABELA 36- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto	152
TABELA 37- Análise dos efeitos estimados significativos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial completo	153
TABELA 38- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos), no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial completo	154
TABELA 39- Comparação dos três processos de esterificação da matéria saponificável do DDOS	171

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Esquema de um sistema de recuperação de DDOS acoplado ao desodorizador	17
FIGURA 2- Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis	23
FIGURA 3- Estrutura química de alguns esteróis	33
FIGURA 4- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da temperatura e da concentração de Lipozyme sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres do DDOS em ésteres etílicos	101
FIGURA 5- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da temperatura e da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos	103
FIGURA 6- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de Lipozyme e da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos	107
FIGURA 7- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) e da concentração de H_2SO_4 sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos	125
FIGURA 8- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da relação molar etanol/ácidos graxos livres (AGL) e do tempo de reação sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos	127
FIGURA 9- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de H_2SO_4 e do tempo de reação sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres do DDOS	

	Página
em ésteres etílicos	129
FIGURA 10- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de H_2SO_4 e da relação molar etanol: ácidos graxos totais (AGT) sobre a taxa de conversão dos AGT do DDOS em ésteres etílicos	163
FIGURA 11- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito do tempo de reação e da relação molar etanol:ácidos graxos totais (AGT) sobre a taxa de conversão dos AGT do DDOS em ésteres etílicos	165
FIGURA 12- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito do tempo de reação e da concentração de H_2SO_4 sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos totais do DDOS em ésteres etílicos	167

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação enzimática do DDOS	97
GRÁFICO 2- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação química direta do DDOS	119
GRÁFICO 3- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio aquoso, com NaOH:AGT de 1,2:1	135
GRÁFICO 4- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio aquoso, com NaOH:AGT de 2:1	137
GRÁFICO 5- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio aquoso, com NaOH:AGT de 3:1	139
GRÁFICO 6- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio alcoólico, com NaOH:AGT de 1,2:1	141
GRÁFICO 7- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais DDOS, em meio alcoólico, com NaOH:AGT de 1,5:1	143

GRÁFICO 8- Teores de lipídios, em função do tempo de reação, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio alcoólico, com NaOH:AGT de 2:1	145
GRÁFICO 9- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação química dos ácidos graxos totais do DDOS	157

RESUMO

A esterificação (produção de ésteres metílicos e etílicos) da matéria saponificável do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS) é uma etapa importante para utilização deste resíduo, como matéria-prima, na produção de extratos ou concentrados de tocoferóis (Vit. E) e esteróis. Nesta pesquisa, foram otimizados três processos de esterificação da matéria saponificável do DDOS: 1- esterificação enzimática, utilizando álcool etílico comercial (96%) e Lipozyme^{IM} (uma lipase imobilizada *sn*-1,3-específica do *Mucor miehei*) como catalisador; 2- esterificação química ácida direta, usando álcool etílico anidro e ácido sulfúrico concentrado como catalisador e 3- saponificação/acidulação/esterificação com NaOH, H₂SO₄ e álcool etílico. Para otimizar as condições de processo e se obterem as melhores taxas de conversão dos ácidos graxos (AG) em ésteres etílicos, preservando os tocoferóis, foi empregada a Metodologia de Superfície de Resposta, obtida através de um planejamento fatorial de 2^a ordem. As condições ótimas de reação encontradas para a esterificação enzimática dos ácidos graxos livres (AGL) do DDOS foram: temperatura de 44 a 56°C; enzima de 12,6 a 17,4% e etanol/AGL de 1,5 a 2,5:1, com taxas de conversão acima de 90%. As condições ótimas para a esterificação ácida direta dos AGL do DDOS foram: etanol/AGL de 6,5 a 11,2:1, concentração de H₂SO₄ de 0,9 a 1,5% e tempo de reação de 1,3 a 2,6 horas, com taxas de conversão acima de 94%. E para a esterificação dos ácidos graxos totais (AGT) do DDOS, as melhores condições de reação foram: a) saponificação: relação molar NaOH/AGT = 1,5:1, temperatura de 80°C e tempo de reação de 40 minutos; b) a acidulação da mistura foi realizada usando H₂SO₄ com excesso molar de 50% sobre o total de sabões formados e c) as condições ótimas para a esterificação dos AGT foram as mesmas obtidas para a esterificação ácida direta, mas utilizando a variável, relação molar etanol/AGT, obtendo-se taxas de conversão acima de 98%. Todas as variáveis estudadas têm efeito significativo sobre a taxa de conversão dos AG ($p < 0,05$). Os resultados mostraram excelente ajuste entre os modelos matemáticos e os resultados experimentais, nas diferentes condições estudadas, tornando estes modelos preditivos e estatisticamente significativos ($p < 0,05$). O processo 3 foi considerado o melhor, para esterificação do DDOS. Não foram observadas perdas significativas de tocoferóis durante os processos.

Palavras-chave: Destilado de Desodorização, Esterol, Esterificação, Ésteres Eéticos, Lipase, Saponificação, Tocoferol

ABSTRACT

The esterification of the soybean oil deodorizer distillate (SODD) saponifiable material is a very important step for the utilization of this residue from the refining oil industry, used as a raw material in tocopherol (Vit. E) and sterol extracts or concentrated production. In this research work, three esterification processes of the SODD unsaponifiable matter were optimized: 1- enzymatic esterification, using commercial ethyl alcohol (96%) and Lipozyme^{IM} (an immobilized lipase *sn*-1,3 from *Mucor miehei*) as the catalyst; 2- direct acid esterification, using anhydrous ethyl alcohol and concentrated sulfuric acid as the catalyst and 3- saponification/acidulation/esterification with NaOH, H₂SO₄ and ethyl alcohol. In order to determine the optima processes conditions to get the higher conversion rates of fatty acid (FA) to ethylic esters, preserving the tocopherols, the response surface methodology (RSM) in a 2nd order factorial planning was utilized to analyze the results. The optima reaction conditions achieved for the enzymatic esterification of SODD free fatty acid (FFA) were: temperature from 44 to 56°C; enzyme concentration from 12.6 to 17.4% and ethanol:FFA molar ratio from 1.5 to 2.5:1, with conversion rates up to 90%. The optima conditions for the direct acid esterification of SODD FFA were: ethanol:FFA from 6.4 to 11.2:1, H₂SO₄ concentration from 0.9 to 1.5% and reaction time from 1.3 to 2.6 h, with conversion rates up to 94%. And for the esterification of total fatty acid (TFA) in SODD the best reaction conditions were: a) saponification: molar ratio NaOH/TFA = 1.5/1, temperature of 80°C and reaction time of 40 minutes; b) the acidulation was done using 50% of molar excess H₂SO₄ based on total soaps formed and c) the optima conditions for the esterification of TFA formed were the same for the direct acid esterification, but using the variable, molar relation ethanol/TFA, with conversion rates up to 98%. All variables studied had significant effect on the FA conversion ($p < 0.05$). Results showed a good adjustment between mathematical models and experimental results obtained from the different conditions studied, making these models predictive and statistically significant ($p < 0.05$). Process 3 was selected as the best to esterify SODD. No significant tocopherol losses were observed during these processes.

Key words: Deodorizer distillate, Esterol, Esterification, Ethyl Esters, Lipase, Saponification, Tocopherol

1- INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado a importância, tanto econômica quanto científica, dos tocoferóis tanto como fonte de vitamina E (HAUMANN, 1990) como antioxidante natural, prevenindo o desenvolvimento de doenças relacionadas à oxidação tais como câncer, catarata e doenças cardiovasculares (STAMPFER *et al.*, 1993; DIPLOCK, 1994), além de aumentar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e gorduras animais (HAUMANN, 1990). Já os esteróis, têm sua importância ressaltada pelo seu efeito hipocolesterolêmico quando presentes na forma de β -sitostanol (HEINEMANN *et al.*, 1986; 1993; LING & JONES, 1995) e como matéria-prima na preparação de corticóides, hormônios sexuais, contraceptivos e diuréticos (BALAZS, 1987).

Óleo de soja é o óleo vegetal mais importante comercializado mundialmente e, apesar do Brasil ser o segundo maior produtor desta oleaginosa e de óleo vegetal refinado (ANON, 1998), tem sido apenas fornecedor de destilado de desodorização de óleos de soja (DDOS) para a Europa e Japão, para produção de concentrados de tocoferóis e esteróis. O DDOS é um sub-produto valioso gerado no processo de refino, representando de 0,15 a 0,45 % em peso do óleo a ser desodorizado e, tem sido utilizado como matéria-prima na produção de concentrados de compostos de alto valor agregado (PRYDE, 1980), por seu alto conteúdo em tocoferóis totais (10%) e em esteróis totais (20%) (AUGUSTO, 1988); sendo o restante composto por ácidos graxos livres, mono-, di-, e triglicerídios, produtos de oxidação, álcoois triterpênicos, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e outros (SONNTAG, 1979). Este produto tem adquirido uma crescente importância econômica no Brasil, onde é produzido em grande escala e exportado para países desenvolvidos a preços que oscilam entre US\$2800 e US\$3500 por tonelada, dependendo do teor em tocoferóis.

Vários processos têm sido propostos para recuperar e/ou concentrar tocoferóis e/ou esteróis a partir do DDOS: destilação fracionada direta (KIM & RHEE, 1982); extração com solvente (AUGUSTO, 1988); tratamento químico seguido de várias etapas de destilação fracionada (EASTMAN KODAK, 1957; EASTMAN

CHEMICAL, 1996); tratamento químico seguido de cristalização dos esteróis e posterior destilação, tratamento químico seguido de destilação (EASTMAN KODAK, 1957; MAU & TSEN, 1995); extração com fluido supercrítico (LEE *et al.*, 1991); tratamento enzimático seguido por destilação molecular (RAMAMURTHI & McCURDY, 1993), e outros.

Comercialmente, na obtenção de concentrados de esteróis e tocoferóis são empregados vários processos, sendo o mais utilizado o de destilação molecular, onde estes componentes são processados à pressão e temperatura reduzidas (RAMAMURTHI *et al.*, 1991). Existe a necessidade de aperfeiçoamento das transformações químicas e enzimáticas da matéria saponificável do DDOS (60 a 70%), que o tornem mais adequado ao processo de separação (WINTERS, 1989). A transformação básica é a esterificação da matéria saponificável a ésteres (metílicos ou etílicos). No processo de esterificação dos ácidos graxos presentes no DDOS, o objetivo é a redução de seu ponto de ebulição, facilitando a sua separação dos compostos de interesse (KIM & RHEE, 1982). A utilização do etanol, para esterificação, se justifica pelo fato de que, além de ser produzido por fermentação de açúcares, isto é, ser biorenovável, é menos tóxico que o metanol (MITTELBAACH, 1990).

A esterificação dos ácidos graxos totais do DDOS pode ser realizada por via química: saponificação / acidificação / esterificação (MORRISON & BOYD, 1992; EASTMAN KODAK, 1957); alcoólise direta com catalisador ácido (LEE *et al.*, 1991; MORRISON & BOYD, 1992), ou por via enzimática (esterificação direta ou hidrólise + esterificação) (RAMAMURTHI *et al.*, 1991; GHOSH & BHATTACHARYYA, 1996).

A esterificação química, catalisada por bases ou ácidos, apresenta algumas desvantagens, tais como: remoção do catalisador juntamente com o glicerol após a reação, não sendo possível a sua reutilização; grandes quantidades de reagentes e de resíduos industriais; utilização de altas temperaturas e pressões; custo elevado de equipamentos, etc. Devido a estes fatores, os processos enzimáticos têm gerado grande interesse industrial (MACRAE, 1983).

As lipases são enzimas que catalisam tanto a reação de hidrólise dos triglicerídios, como sua reação inversa, a esterificação, dependendo do teor de água presente no meio de reação. As lipases têm sido empregadas na esterificação de ácidos graxos com alcoóis (KNEZ *et al.*, 1990) e mais especificamente, na produção de concentrados de tocoferóis/esteróis, em reações de esterificação dos ácidos graxos de destilados de desodorização com butanol (GHOSH & BHATTACHARYYA, 1996) e com metanol (RAMAMURTHI *et al.*, 1991; RAMAMURTHI & McCURDY, 1993).

É difícil encontrar as condições ótimas para obtenção de um rendimento máximo em ésteres devido aos efeitos individuais e de interação existentes entre os fatores que influenciam o rendimento da reação, tais como: tempo e temperatura de reação, concentração do catalisador, relação entre os substratos, impurezas, e teor de água no meio de reação, etc (RAMAMURTHI *et al.*, 1991). Nestes casos, a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), que tem como base o planejamento fatorial, é altamente recomendada, já que permite a otimização de problemas com multivariáveis (BARROS *et al.*, 1996; BOX *et al.*, 1978).

Nesta pesquisa foram otimizadas as condições do processo de esterificação enzimática e química do DDOS para produção de ésteres etílicos.

2- JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente tendência mundial de utilização de compostos e ingredientes naturais, seja na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos; a inquestionável importância tecnológica, metabólica e nutricional dos tocoferóis e esteróis e a grande disponibilidade de matéria-prima (DDOS) no Brasil para a produção destes produtos, este trabalho visa a otimização de processos de esterificação, química e enzimática, da matéria saponificável do DDOS, etapa importante na obtenção dos concentrados de tocoferóis/esteróis por destilação molecular, pois além da inexistência de desenvolvimento e aplicação destes processos no mercado nacional, faltam informações técnicas completas sobre os mesmos.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Transformação química e enzimática da matéria saponificável do DDOS em ésteres etílicos, adequando assim, esta matéria-prima, ao processo de separação por destilação molecular na obtenção de concentrado de tocoferóis e esteróis.

3.2- Objetivos Específicos

- Caracterização da matéria-prima DDOS
- Estudo dos efeitos da temperatura de reação, concentração de enzima e relação molar etanol/ácidos graxos livres, sobre os teores de tocoferóis e esteróis totais residuais, assim como o rendimento em ésteres etílicos obtidos pelo processo enzimático de esterificação da matéria saponificável do DDOS (processo I).
- Estudo dos efeitos da concentração de etanol e do pH sobre os teores de tocoferóis e esteróis totais residuais, assim como o rendimento em ésteres etílicos obtidos pelo processo de esterificação direta da matéria saponificável do DDOS, utilizando etanol e H₂SO₄ (processo II).
- Estudo dos efeitos da concentração de KOH e etanol, temperatura e pH sobre os teores de tocoferóis e esteróis totais residuais, assim como o rendimento em ésteres etílicos obtidos pelo processo de esterificação da matéria saponificável do DDOS utilizando saponificação/acidulação/esterificação (processo III).
- Otimização dos processos I, II e III, empregando Análise de Variância e a Metodologia de Superfície de Resposta.
- Avaliação comparativa dos três processos de esterificação.

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1- Importância da soja no Brasil

A introdução da soja no Brasil data do século passado. Sua exploração industrial tem se acentuado nos últimos anos, atingindo 26,8 milhões de toneladas de grãos na safra 96/97, o que representou 12,8% a mais que a de 95/96, com aumento de 6,7% na área de plantio, com total de 11,4 milhões de hectares cultivados com a oleaginosa. Segundo a AGRIANUAL (1999), a safra 98/99 rendeu um total de 29,5 milhões de toneladas. Somente a soja, representa 10,5% das exportações brasileiras. O total para exportação em 98 foi de 8,3 milhões de toneladas, sendo o Paraná o estado brasileiro que mais produz soja, respondendo por 25% da safra nacional. O total de esmagamento de grãos para fabricação de óleo de soja comestível em 97/98 foi de 18,8 milhões de toneladas (ANON, 1998).

A soja assumiu um proeminente papel dentre as oleaginosas, não somente como fonte rica em proteínas (30-46%), mas também pelo seu teor em óleo comestível (20-24%); isto se evidenciou a partir da publicação no Relatório das Nações Unidas referente à crise mundial de proteína. Energeticamente a soja contribui com 14,54 kj/g de proteína, 35,97 kj/g de óleo e 7,04 kj/g de carboidrato digestível (LIENER, 1978).

Dentre as maiores fontes comerciais de óleos comestíveis de origem vegetal (soja, algodão, amendoim, milho, girassol, canola, oliva e palmáceas), a soja é a de maior representatividade, sendo que se produzem no Brasil, aproximadamente 3,8 milhões de toneladas anuais de óleo de soja refinado (AGRIANUAL, 1999).

4.2- Composição do óleo de soja

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por triglicerídios, mas estão presentes nos mesmos, em menor quantidade, outros constituintes de grande interesse, chamados de componentes minoritários (PRYDE, 1980). Dentre estes, podem-se destacar : ácidos graxos livres, fosfolipídios, tocoferóis (vitamina E),

carotenos (pró-vitamina A), fitosteróis, álcoois triterpênicos, hidrocarbonetos e outros (SONNTAG, 1979). Cada óleo pode conter diversos teores destes compostos, que têm efeitos importantes nas características sensoriais, estabilidade e propriedades nutricionais dos mesmos (PANDOLFI, 1995; SHAHIDI & SHUKLA, 1996).

Geralmente, óleos brutos contêm menos de 5% de componentes não triglicéridicos, sendo que alguns são considerados impurezas e devem ser retirados do óleo durante processos de refino, atingindo valores entre 0,2 e 2,0 %, constituídos principalmente por (ITOH *et al.*, 1973; SONNTAG, 1979; CARR & MIKLE, 1995):

- Tocoferóis: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis. Principais compostos antioxidantes do óleo vegetal.
- Esteróis, principalmente β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.
- Fosfatídios, como lecitinas e cefalinas. Agem como sinergistas dos tocoferóis.
- Carotenos, principalmente β -caroteno.
- Alcoóis graxos, combinados com ácidos graxos ou ceras.
- Clorofilas.
- Hidrocarbonetos, sendo o esqualeno, o principal.
- Vitaminas lipossolúveis: pró-vitamina-A, D e E.
- Minerais, principalmente fósforo, sódio e cobre (0,1 a 0,3 ppm), manganês (0,1 a 0,7 ppm), ferro (1 a 5 ppm) e níquel (0,1 a 0,2 ppm).

Uma porção importante destes componentes minoritários é formada por compostos não saponificáveis, usualmente denominada matéria insaponificável, que contém principalmente: tocoferóis, fitosteróis e hidrocarbonetos, que se recuperados e concentrados, poderiam tornar-se produtos de alto valor comercial (PRYDE, 1980; PERKINS, 1995).

A composição do óleo de soja varia em função das características genéticas, técnicas culturais e meio ambiente onde o cultivar é explorado (SMITH & CIRCLE, 1978), porém, pode-se estabelecer alguns limites de seus principais componentes, como os reportados na Tabela 1.

Tabela 1- Composição e algumas características do óleo de soja bruto

Composição	Limites
- Peso específico (g/mL à 25°C)	0,17 – 0,921
- Índice de refração (25°C)	1,470 – 1,476
- Índice de iodo	120 – 141
- Índice de saponificação (mg KOH/g amostra)	189 – 195
- Triglicerídios totais (%)	99
- Ácidos graxos principais (%):	
- palmítico	7 – 12
- esteárico	2 – 5,5
- oléico	20 – 50
- linoléico	35 – 60
- linolênico	2 – 13
- Ácidos graxos insaturados totais (%)	80 – 88,1
- Ácidos graxos saturados totais (%)	10 – 19
- Fosfatídios (%)	1,3 – 2,5
- Matéria insaponificável (%):	
- esteróis totais	0,01 – 0,33
- tocoferóis totais	0,15 – 0,21

Fontes: vários autores (apud AUGUSTO, 1988)

4.3- Refino do óleo de soja

Dentre os processos de obtenção de óleos se menciona a desintegração mecânica, prensagem e a extração com solventes. O objetivo final é a obtenção de um óleo puro, com alto rendimento, que seja econômico e que produza um farelo que possa ser utilizado. Em matérias-primas com médio teor de óleo (18-22%), como a soja, o recomendável é usar o processo de extração com solventes (hexano) por apresentar bom rendimento (99%) (NORRIS, 1964).

O processo para a obtenção de óleo de soja comestível consta de extração, degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (ERICKSON, 1983).

Os objetivos da degomagem e da neutralização, também denominada de refino, são: remoção de gomas, mucilagens e proteínas, hidratação dos fosfatídios e a transformação dos ácidos graxos livres em sabões, seguido de centrifugação.

Branqueamento é o tratamento que se dá ao óleo com bentonitas ou terra de diatomácea, seguido de filtração. Nesta etapa do processo eliminam-se, entre outros, as substâncias que conferem cor ao óleo (peróxidos e metais pesados) e também alguns pesticidas (NORRIS, 1964).

Desodorização é o tratamento para remoção de substâncias responsáveis por odores e sabores desagradáveis, que é possível devido à grande diferença de volatilidade entre os triglicerídios e as substâncias odoríferas. É um processo de destilação por arraste com vapor a elevadas temperaturas (> 200°C) e a baixas pressões (<10 mm Hg); sendo que esta última variável serve para prevê

nir a oxidação do óleo pelo oxigênio atmosférico e a hidrólise dos triglicerídios pela ação do vapor na temperatura de trabalho (MATTIL, 1964; DURROW, 1983). Os parâmetros da desodorização são: temperatura, pressão, tempo, vazão de vapor, ar e meio de aquecimento. Em um processo por batelada utiliza-se 210 a 274°C, a 1-6 mm Hg, por 3 a 8 horas e um fluxo de vapor na relação de 5 a 15% com relação ao óleo a ser desodorizado (ERICKSON, 1983). Como substituto do vapor pode ser

utilizado gás inerte, como nitrogênio, como meio de arraste, desde que os voláteis sejam facilmente removidos do desodorizador (MATTIL, 1964).

Os produtos responsáveis pelo sabor e odor indesejáveis do óleo de soja, removidos na desodorização normalmente são: laurilnonilcetona, metilendecilcetona, aldeídos triterpênicos com 5 a 12 átomos de carbono, ácidos graxos livres oxidados com 5 a 8 átomos de carbono e o *n*-deca-2,4-dienal (derivado do ácido linolênico) (MATTIL, 1964). Estas substâncias podem ser próprias do óleo ou contaminantes acidentais do processo de refino ou do armazenamento, sendo que, se não forem eliminadas, poderão ocasionar o fenômeno da reversão do "flavor" no óleo desodorizado (GAVIN, 1981).

Também é na desodorização que se remove parte da matéria insaponificável, menos volátil, como tocoferóis e esteróis, cujos teores, dependendo da temperatura e vácuo empregados nesta etapa do refino do óleo, podem ser reduzidos de 30 a 60% dos valores iniciais. Os triglicerídios são menos voláteis que os outros constituintes do óleo, porém, como são encontrados mono- e diglicerídios no destilado, isso indica que estas substâncias poderiam ser produzidas pela hidrólise dos triglicerídios ou serem próprias do óleo (MATTIL, 1964).

A desodorização aumenta a estabilidade do óleo de soja devido ao fato de eliminar pró-oxidantes e ativar os antioxidantes, como os tocoferóis (MATTIL, 1964; DURROW, 1983).

Nas etapas do refino de óleos são gerados diversos sub-produtos (gomas, borra de neutralização, destilado de desodorização) de reduzido valor econômico (WOERFEL, 1981), mas muito interessantes como matérias-primas para a produção de concentrados de compostos de alto valor agregado (PRYDE, 1980), por seu alto conteúdo em tocoferóis totais (10%) e em esteróis totais (20%), como é o caso do destilado de desodorização (AUGUSTO, 1988).

Porém, a produção de concentrados de compostos com propriedades tecnológicas, nutricionais e/ou terapêuticas exige muito das técnicas de separação,

especialmente a de purificação, devido à rigorosa especificação dos produtos, comuns dos setores alimentícios, farmacêuticos e de cosméticos, obrigando freqüentes evoluções nas técnicas de produção e purificação, visando sempre obter produtos de forma econômica e que satisfaçam às exigências de qualidade (BATISTELLA & WOLF-MACIEL, 1996).

4.4- Destilado de Desodorização do Óleo de Soja (DDOS)

O Destilado de Desodorização (DD) é o material orgânico destilado por vapor e a vácuo na etapa de desodorização de óleos e gorduras. A quantidade do destilado, assim como sua composição, dependem da matéria-prima e das condições de processo, incluindo temperatura, vácuo, tempo e tipo de equipamento. Altas temperaturas e altas vazões de vapor aumentam o rendimento total, assim como a concentração de tocoferóis e esteróis no destilado. Obviamente não se opera um desodorizador em função do destilado, mas sim baseado na qualidade do óleo final, como aroma, sabor, cor e estabilidade. Do ponto de vista da estabilidade, é indesejável que se retire todo o tocoferol do óleo. As quantidades de DD recuperadas estão entre 0,15 e 0,45% do óleo a ser desodorizado (WOERFEL, 1981).

O Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) consiste em uma mistura complexa de ácidos graxos livres, glicerídeos parciais, óleo neutro (triglicerídios), peróxidos, aldeídos insaturados de alto peso molecular, cetonas, hidrocarbonetos parafínicos, oleínas, esqualeno, esteróis, tocoferóis, além de produtos oxidados não identificados (NAUDET, 1969).

Durante os anos 60 e 70, o uso dessa matéria-prima para a produção de vitamina E teve o seu ápice. Entretanto, em 1974 - 1975 com o aumento dos substitutos sintéticos, o valor do destilado sofreu uma queda substancial. Atualmente há crescente interesse na recuperação dos destilados da desodorização, por sua alta concentração em tocoferóis e esteróis, que têm demanda na produção de vitamina E e antioxidantes naturais, hormônios sexuais e outros produtos e também devido à necessidade de controle da poluição nas unidades fabris de refino de óleos vegetais

(GUTFINGER & LETAN, 1974 b; KEHSE, 1976; FEDELI & GASPAROLI, 1977; GAVIN, 1978; GAVIN, 1981).

4.4.1- Recuperação do DDOS

Como a desodorização envolve uma corrente de vapor contendo material orgânico proveniente do óleo sob vácuo, este material comumente chamado "destilado", deve ser separado do vapor e coletado de forma segura, devido aos controles ambientais necessários. Os sistemas de recuperação do destilado utilizam a condensação como forma de separação do vapor, sendo utilizados tanto como meio de controle de poluição, como também com o objetivo de obtenção de uma matéria-prima para a indústria cosmética e farmacêutica (PRYDE, 1980).

A recuperação de destilados de desodorização começou nos anos 60 por duas razões: uma econômica, devido à crescente demanda de esteróis e tocoferóis pela indústria e outra de caráter ambiental, na tentativa de melhorar a qualidade da descarga de efluentes (ZEHNDER, 1995). O destilado é composto principalmente de matéria insaponificável e ácidos graxos livres (WOERFEL, 1981). Estima-se que, por tonelada de óleo de soja produzido, seja possível obter entre 0,1 a 0,3 kg de tocoferóis (BARATA & CONTRERAS, 1984) e entre 0,10 a 0,22 kg de esteróis (GUTFINGER & LETAN, 1974 a), cujo processamento exige técnicas altamente sofisticadas para a separação dos componentes (WOERFEL, 1995).

Os insaponificáveis constituem cerca de 33% do destilado de um desodorizado comercial. Este teor varia consideravelmente dependendo da unidade de desodorização e das condições de sua operação. Os insaponificáveis têm aproximadamente a seguinte composição (WINTERS, 1989):

- Fitosteróis = 60%
- Tocoferóis = 30%
- Hidrocarbonetos = 12%

O preço de mercado do DDOS está baseado no seu conteúdo em tocoferóis. Considerando-se o valor de US\$ 3,00/% de tocoferol, um produto com 12,4% em

tocoferóis renderá US\$0,82/kg, que é muito superior ao preço de venda do óleo refinado. Considerando-se um rendimento em DD de 0,28% do óleo desodorizado, o retorno financeiro obtido com o destilado será de US\$ 2,29/ton de óleo refinado (WOERFEL, 1981). Dependendo do mercado, o valor do destilado também pode estar baseado no seu conteúdo em esteróis.

Economicamente se torna viável implantar um sistema eficiente de recuperação de destilado acoplado ao desodorizador. Vapor e destilado provenientes do desodorizador a uma pressão de 2 - 5 mm Hg são comprimidos a 50 - 60 mm Hg em um ou dois estágios ("booster"). Existem 3 sistemas de recuperação de destilado: torre empacotada, condensador "scrub" e torre barométrica de água. A torre empacotada minimiza a pressão do condensado enquanto promove um bom contato líquido-vapor e utiliza o próprio condensado frio como condensante. Um controlador de nível na parte inferior da torre mantém constante o volume de condensado no sistema. A coluna de condensação ("scrubber") emprega água como condensante e também está localizada após o desodorizador e antes dos injetores. Enquanto um desses sistemas não for implantado, o DD é condensado em torres barométricas de água, como "hot - well skimmings", que não é um sistema de recuperação de destilado satisfatório, pois o produto final contém uma grande quantidade de água que deve ser removida posteriormente. Neste caso, o rendimento em tocoferóis pode ser reduzido devido à oxidação, que ocorre na torre barométrica, ou durante a secagem do DD (WOERFEL, 1981). A eficiência destes sistemas alcança 85 a 95% de separação do material lipídico do vapor, sendo que a coluna empacotada é o mais eficiente deles (ZEHNDER, 1995). A Figura 1 ilustra um esquema de um sistema de recuperação de DDOS, do tipo "scrub", acoplado ao desodorizador (WALSH *et al.*, 1998).

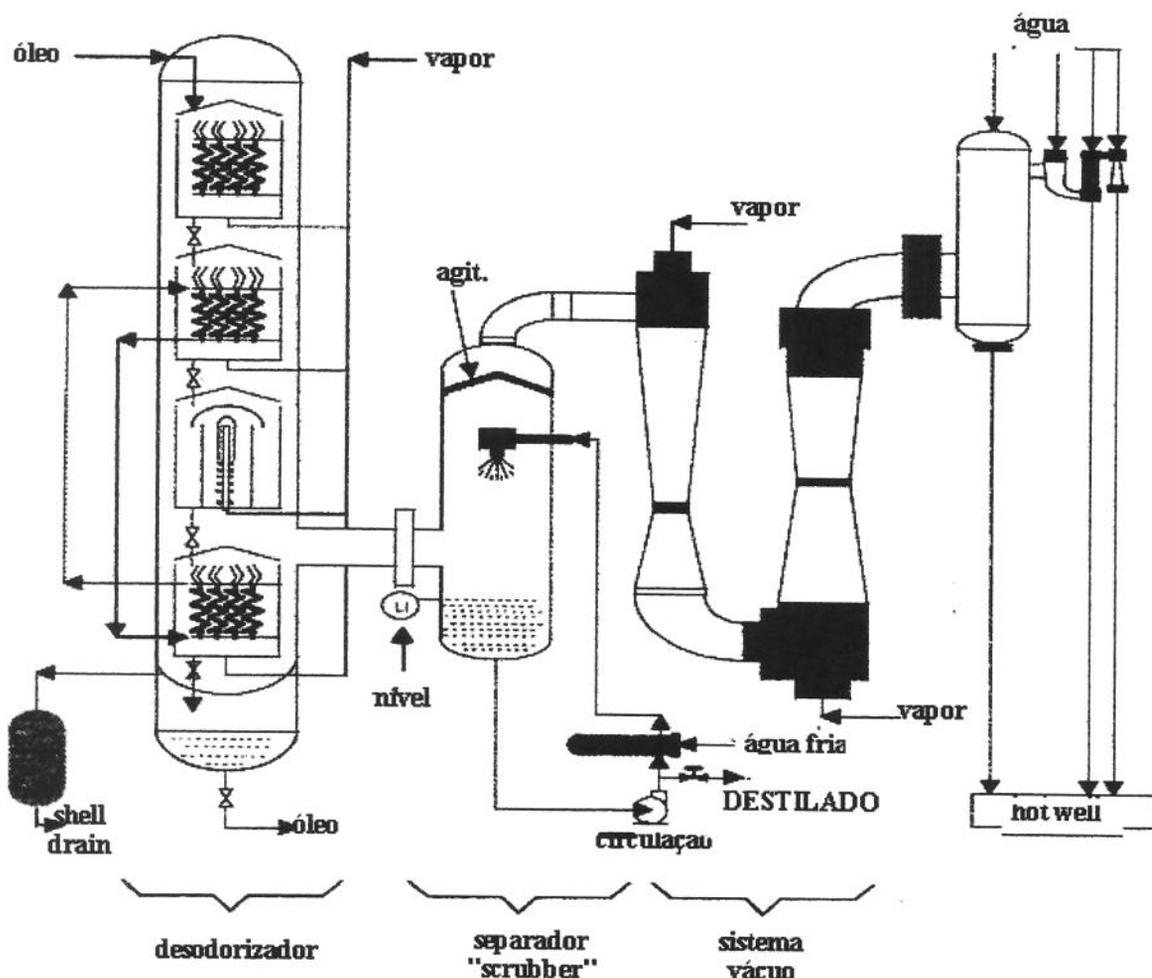


Figura 1- Esquema de um sistema de recuperação de DDOS acoplado ao desodorizador

Fonte: WALSH *et al.*, 1998

4.4.2- Composição do DDOS

Na Tabela 2 pode-se observar a composição típica de destilados originários de diversos óleos vegetais, onde o óleo de soja, devido ao seu alto teor em tocoferóis e grande volume de óleo processado, faz deste destilado uma importante fonte de vitamina E (WOERFEL, 1995; GHOSH & BHATTACHARYYA, 1996).

Nesta mesma tabela, observa-se que o destilado de soja contém um teor elevado de esteróis (18%), sendo sua composição geralmente distribuída em: 20% campesterol, 20% estigmasterol, 53% β -sitosterol, 4% δ -avenasterol e 3% δ -

estigmasterol, portanto, uma excelente fonte de esteróis. O estigmasterol obtido a partir do destilado de soja tem sido utilizado na produção de progesterona e corticóides e o β -sitosterol em anticoncepcionais, diuréticos e hormônios masculinos (SONNTAG, 1985; WOERFEL, 1995; GHOSH & BHATTACHARYYA, 1996).

Tabela 2- Composição do destilado de desodorização de diferentes óleos.

Componentes (%)	Girassol	Algodão	Soja	Canola
Tocoferóis totais	9,3	11,4	11,1	8,2
α-tocoferol	5,7	6,3	0,9	1,4
Mat. Insap.	39	42	33	35
Esteróis totais	18	20	18	14,8
Estigmasterol	2,9	0,3	4,4	1,8

Fonte: WINTERS, 1989.

O destilado de desodorização do óleo de soja é formado por uma mistura complexa de compostos, como pode ser observado na Tabela 3.

Dentro do processo de refino do óleo de soja, os condensados voláteis constituem um sub-produto da etapa de desodorização com características muito variáveis. Estas diferenças devem-se a diversos fatores, entre os quais, a qualidade e tipo do óleo a ser refinado, processo de refino (químico ou físico), condições de pressão, temperatura, vácuo e gás de arraste utilizados na desodorização e características do equipamento utilizado (WINTERS, 1990).

Tabela 3- Características e composição do destilado de desodorização do óleo de soja

Características	Teores					
	A	B	C	D	E	F
Peso específico (g/mL)	0,9116	–	–	–	–	–
Sólidos totais (%)	95,26	–	–	–	–	–
Acidez (em ac. oléico) (g / 100g amostra)	37,09	44,8	–	–	–	50,4
Índice de saponificação (mg KOH/g amostra)	159,4	120,2	–	–	–	–
Ácidos graxos totais (%)	58,1-65,5	–	60,0-62,1	–	–	50,8
Ácidos graxos livres (%)	37,09	44,8	36,0	39,7	33,0	–
Matéria insaponificável (%)	26,1-36,4	58,1	–	–	–	23,7
Tocoferóis totais(%)	8,50	12,74	7,6-8,7	12,4	14,5	–
α- tocoferol (%)	1,14	0,68	1,0-1,1	2,4	–	–
β- tocoferol (%)	–	0,18	0,2-0,4	–	–	–
γ- tocoferol (%)	2,75	4,73	2,0-2,4	2,5	–	–
δ- tocoferol (%)	4,62	7,16	4,2-5,0	7,7	–	–
Esteróis totais (%)	17,05	11,39	–	18,6	14,5	8,0_
Campesterol (%)	4,17	2,13	–	–	–	–
Estigmasterol (%)	3,55	3,88	–	–	–	–
β- sitosterol (%)	9,33	5,38	–	–	–	–
Triglicerídios (%)	–	–	4,0	–	16,7	17,2
Diglicerídios (%)	–	–	–	–	16,2	–
Monoglicerídios (%)	–	–	–	–	5,1	–
Hidrocarbonetos (%)	4,4	–	3,5-4,1	–	–	11,6

Fontes: (A) AUGUSTO (1988); (B) RAMAMURTHI & McCURDY (1993); (C) CONTRERAS & BARATA (1984); (D) WOERFEL (1981); (E) SHEEBAR & NEEMAN (1987); (F) RUIZ-MENDES *et al.* (1995)

A Tabela 4 mostra a composição de um destilado de óleo de soja produzido no Brasil.

Tabela 4- Componentes principais do DDOS

COMPOSTOS	TEOR (%)
Tocoferóis totais	2 – 9
α- tocoferol	1,04
β- tocoferol	0,18
γ- tocoferol	5,03
δ- tocoferol	2,40
Triglicerídios	2 – 5
Ácidos graxos totais	60 – 70
Ácidos graxos livres	36
Ácidos graxos esterificados	24
Hidrocarbonetos	3,5
Esteróis	26
Plastoquinonas	< 3
Álcoois alifáticos	< 3
Terpenóides	< 3

Fonte: AUGUSTO, 1988.

Dependendo da composição do DDOS, sua utilização e preço são muito diferentes. Assim, os DDOS resultantes de óleos submetidos ao refino químico, caracterizam-se por um elevado conteúdo da fração insaponificável (15 - 30%), constituindo-se em uma boa matéria-prima para as indústrias farmacêuticas e de alimentos, na produção de compostos de alto valor agregado, como são os tocoferóis e esteróis (FEDELI & GASPAROLI, 1977; RAMAMURTHI *et al.*, 1991; RAMAMURTHI & McCURDY, 1993).

Na fração insaponificável do DDOS encontram-se, entre outros, os álcoois triterpênicos: cicloartenol, euforbol, butiroesporol, ciclolaudenol; os terpenos α - e β -amirina; os esteróis: β -sitosterol (50 a 72 mg/100g de óleo), estigmasterol (10 a 24 mg/100g), campesterol (15 a 25 mg/100g) e colesterol, em traços (FEDELI *et al.*, 1966; ITOH *et al.*, 1973; FEDELI & GASPAROLI, 1977).

4.4.3- Estocagem do DDOS

Dependendo das condições de estocagem do DDOS, os tocoferóis, coletados sob as melhores condições de desodorização, podem sofrer grandes perdas, o que não ocorre com tal intensidade com os esteróis, pois são compostos mais estáveis. Como os tocoferóis são antioxidantes, podem ser destruídos pela exposição ao O₂, calor, luz e sub-produtos da corrosão de metais. A estocagem adequada do DDOS em tanques pode ser justificada pelo valor de venda deste produto, que é baseado no seu teor em tocoferóis. As melhores condições de estocagem incluem estocagem à temperatura ambiente, sob atmosfera de N₂, aquecimentos brandos quando a sua manipulação é necessária e o uso de um material não corrosivo para a construção do tanque de estocagem, tal como aço inoxidável. O período de estocagem do DDOS não deve ser superior a 3 meses e seu teor de umidade não deve exceder a 3%. O monitoramento da razão tocoferóis / esteróis totais (após saponificação) é uma forma de determinar se estão ocorrendo perdas durante a estocagem, pois os tocoferóis podem se degradar sob determinadas condições nas quais os esteróis são estáveis (WALSH *et al.*, 1998).

4.5- Compostos de Interesse

A produção de concentrados naturais de tocoferóis e/ou esteróis é de interesse devido: (1) às funções e características que estes compostos possuem, sejam estas de caráter metabólico, nutricional ou técnico e (2) ao fato de todos os processos de fabricação estarem patenteados, como salientado anteriormente.

4.5.1- Tocoferóis

4.5.1.1- Estrutura e Funções biológicas

O termo "tocoferol" é atualmente um termo genérico incluindo vários compostos que apresentam atividade vitamínica E. São homólogos derivados da estrutura 6-hidroxicromanol e são classificados em 2 grupos: Tocoferóis e Tocotrienóis, todos com diferentes atividades biológicas e estereoquímica própria. Os tocoferóis caracterizam-se pela saturação da sua cadeia lateral, que consiste em 3 unidades isoprenóides, enquanto os tocotrienóis possuem duplas ligações nas posições 3', 7' e 11' da cadeia isoprenóide lateral (BOURGEOIS, 1992) (Figura 2). A atividade biológica dos 8 homólogos varia de acordo com o número e posição dos grupos metila no anel cromanol e com a configuração nos carbonos assimétricos da cadeia lateral (EITENMILLER, 1997). A estrutura correta do α -tocoferol foi estabelecida por FERNHOLZ (1938) (citado por KASPAREK, 1980), sendo essa uma importante descoberta para a elucidação das demais estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis. Os tocoferóis são importantes, não somente pela sua ação vitamínica E *in vivo*, mas também pela sua ação antioxidante. A principal função fisiológica da vitamina E é como antioxidante, protegendo os lipídios insaturados das membranas celulares da oxidação pelo O₂ atmosférico.

Os tocoferóis apresentam atividade biológica em humanos, pelo que a U.S. Food Board recomenda o consumo entre 8 e 10 mg de α -tocoferol por dia para manter um estado saudável em adultos; essa quantidade é bem suprida na ingestão diária de óleos comestíveis (VITALI, 1972; HUNTER, 1981). A vitamina E, que é opticamente pura, possui maior atividade biológica que a vitamina E sintética, que é uma mistura de estereoisômeros (ANON, 1998).

Os tocoferóis e tocotrienóis são reconhecidos por sua efetiva inibição da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos (OSKI, 1980; BURTON *et al.*, 1983; BURTON & TRABER, 1990; SIES & MURPHY, 1991; VanACKER *et al.*, 1993).

Apesar de ser universalmente aceito que α -tocoferol é o mais eficiente antioxidante e homólogo da vitamina E *in vivo*, existem sempre divergências sobre sua eficiência absoluta ou relativa *in vitro*, principalmente quando comparado com γ -tocoferol (KAMAL-ELDIN & APPELQVIST, 1996). Pode-se considerar que a capacidade antioxidante segue a seguinte ordem decrescente: γ - > δ - > β - > α -tocoferol (CHOW & DRAPER, 1974; BAUERNFIELD, 1980), enquanto a atividade vitamínica decresce de α - > β - > γ - > δ tocoferol (YUKI, 1978; BOURGEOIS, 1992). Assumindo a atividade do α - tocoferol como 100, as atividades biológicas dos outros tocoferóis são: β - tocoferol, 15-40; γ - tocoferol, 1-20 e δ - tocoferol, 1 (SHAHIDI & SHUKLA, 1996).

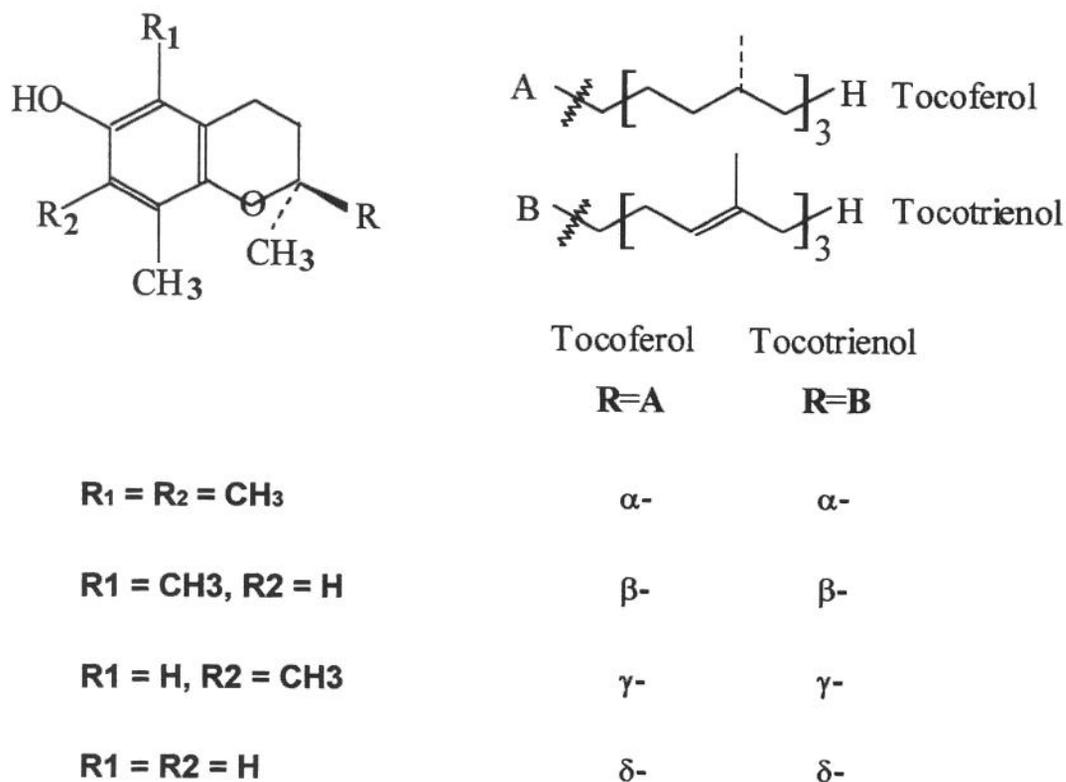


Figura 2- Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis

Fonte: KASPAREK, 1980.

4.5.1.2- Fontes de Tocoferóis

Os tocoferóis encontram-se nos alimentos principalmente sob a forma não esterificada (BAUERNFIELD, 1980). Suas principais fontes são: germe de trigo, óleos de milho, algodão, girassol, soja, oliva, coco e amendoim (HERTING & DRURY, 1969; SLOVER, 1971; BAUERNFEIND, 1980; LANDERS & RATHMANN, 1981).

Os tocoferóis estão presentes em óleos de sementes, folhas e outras partes verdes de plantas superiores. O α - tocoferol é encontrado principalmente dentro dos cloroplastos, enquanto os demais homólogos estão fora deles (HESS, 1993). Os tocotrienóis, ao contrário, não se encontram nas partes verdes, e sim no germe e farelo de sementes de cereais (COMBS, 1992). O óleo de palma (dendê) é o único óleo comestível produzido industrialmente, que fornece quantidades apreciáveis de tocotrienóis (ONG, 1993).

O teor de vitamina E total e sua distribuição nos alimentos são variados, dependendo da espécie, variedade, estado de maturação, meio ambiente onde se cultiva a espécie, forma de colheita, processamento e armazenamento. Alimentos de origem animal geralmente são pobres em tocoferóis, pois nesses organismos sua concentração depende da alimentação do animal (BAUERNFEIND, 1980).

A Tabela 5 apresenta as maiores fontes de óleos/gorduras de consumo mundial, donde se conclui que os óleos de soja e de palma respondem por 50% do consumo da população mundial (USDA, 1995).

Nos Estados Unidos, óleos e seus derivados (margarinas, maionese, molhos para saladas e gorduras especiais) fornecem até 26,9 % da vitamina E da dieta dos americanos, sendo que os principais produtos consumidos respondem por 46,3% do total de vitamina E ingerida na dieta americana (Tabela 6) (EITENMILLER, 1997).

Os tocoferóis são concentrados no destilado de desodorização durante a etapa de desodorização de óleos vegetais. Como resultado, o destilado de

desodorização é uma boa fonte de tocoferóis, sendo utilizados na produção de vitamina E e de antioxidantes naturais (PRYDE, 1980; EITENMILLER, 1997).

Tabela 5- Consumo mundial de óleos/gorduras

Fonte Óleo/gordura	Consumo (%)
soja	29
palma	21
canola	15
milho	1
amendoim	6
algodão	6
coco	4
oliva	3
palmiste	3
peixe	2

Fonte: USDA, 1995

Tabela 6- Fontes de vitamina E na dieta americana

Produto	Vitamina E (% na dieta)
óleo salada/fritura	8,2
margarinas	6,8
cereais	4,9
molhos p/ salada	4,4
produtos de tomate	4,3
maionese	3,8
gorduras especiais	3,7
manteiga amendoim	2,3
batata frita	2,3
ovos	1,9
leite integral	1,6

Fonte: EITENMILLER, 1997

A Tabela 7 mostra os teores de tocoferóis e tocotrienóis presentes em alguns óleos refinados, incluindo suas atividades vitamínicas E.

Tabela 7- Teor de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em óleos refinados (mg/100g óleo) e atividade vitamínica E

Óleos	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	Atividade Vit.E
Coco	0,4	0	0,2	0,3	1,3	0,1	1,3	0,8
Milho	14,3	0,4	65,0	2,8	0,6	0	0	21,1
Algodão	35,3	0	30,0	0	0	0	0	38,3
Oliva	11,9	0	0,7	0	0	0	0	12,0
Palma	18,3	0	0	0	11,5	0	5,8	21,8
Amendoim	11,6	0	13,0	0,3	0	0	0	12,9
Canola	17,7	0	27,0	0,04	0	0	0	20,4
Açafrão	34,1	0	3,5	0,5	0	0	0	34,4
Soja	10,9	0	62,4	20,4	0	0	0	17,4
Girassol	59,5	0	3,5	0	0	0	0	59,9
Germe de trigo	149,4	81,2	0	0	0	0	0	183,0

Atividade vitamínica total = α -T + 0,4 (β -T) + 0,1 (γ -T) + 0,01 (δ -T) + 0,3 (α -T3) + 0,05 (β -T3) + 0,01 (γ -T3).

Fonte: (ZHANG, 1997)

4.5.1.3-Efeito do Processamento

Devido à atividade antioxidante natural dos homólogos da vitamina E, o processamento e/ou as condições de estocagem levam à sua oxidação e conseqüentemente a grandes perdas. Essas perdas são aceleradas pela luz, calor,

pH alcalino e pela presença de metais, principalmente, cobre e ferro (LARS & NILSSON, 1977; EITENMILLER, 1997; ANON, 1998).

NORRIS (1964) afirma que, durante o processo de refino do óleo de soja, a etapa que causa a maior perda de tocoferóis é o tratamento com soda (neutralização) e que essas perdas podem ser causadas por adsorção no sabão formado, produzindo um resíduo rico nesses componentes. Algumas perdas de tocoferóis são dadas pela formação de dímeros durante a desodorização e esses ficam retidos no óleo (GUTFINGER & LETAN, 1974 b); porém, durante todo o processo se perdem aproximadamente entre 20 e 45 % do total de tocoferóis; sendo que de 5 a 35% são perdidos na desodorização (SWERN, 1964; GUTFINGER & LETAN, 1974 b; HUNTER, 1981). Estes limites amplos são decorrentes dos processos em batelada, onde as perdas dos tocoferóis, em cada etapa, pode ficar em torno de 30% na degomagem e neutralização, 14 a 18% no branqueamento, 14 a 35% na desodorização e de 5 a 70% na hidrogenação (BAUERNFIELD, 1980).

Outros pesquisadores discordam dos anteriores e relatam que as maiores perdas são observadas na etapa de desodorização e que na hidrogenação não existe destruição da vitamina E (McLAUGHLIN & WEIHRAUCH, 1979). Estudos posteriores realizados por JUNG *et al.* (1989) mostraram que a perda mais substancial da vitamina E (20%) ocorreu durante a desodorização, e que, até esta etapa, 88% dos tocoferóis ficaram retidos no óleo. A retenção total de tocoferóis foi de 68,3%, após o término do processo de refino. Também ficou evidenciado que a desodorização foi efetiva na remoção de compostos considerados pró-oxidantes. A Tabela 8 mostra o efeito de cada etapa do refino na perda de tocoferóis em óleo de soja.

Tabela 8- Efeito do processamento no teor de tocoferóis em óleo de soja

Óleo	mg/100g	% retenção
Bruto	167	100
Degomado	158	94,6
Neutralizado	155	92,8
Clarificado	147	88,0
Desodorizado	114	68,3

Fonte: JUNG *et al.*, 1989.

Determinações realizadas no Laboratório de Óleos e Gorduras/UNICAMP reportam perdas entre 20 e 30% de tocoferol durante a desodorização de óleo de soja no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 1998). Porém, durante esta etapa, os tocoferóis retirados do óleo são concentrados no destilado, o que o torna uma matéria-prima das mais adequadas para a obtenção e purificação de vitamina E (EITENMILLER, 1997).

4.5.1.4- Ação antioxidante

Em geral, os antioxidantes são empregados nos alimentos com o objetivo de proteger os óleos e gorduras da oxidação, que resulta no desenvolvimento de odor e sabor de ranço, também conhecida como rancidez. A oxidação das gorduras é acelerada pela exposição à luz, altas temperaturas e oxigênio. Certos metais e enzimas também podem contribuir para o desenvolvimento da reação (HAUMANN, 1990).

A crescente utilização dos tocoferóis como antioxidantes se deve ao fato do aumento contínuo do consumo de produtos naturais por parte da população mundial. A aplicação desses compostos nos alimentos, como forma de manter a sua estabilidade oxidativa, economicamente é desvantajosa quando comparada ao

emprego de antioxidantes sintéticos. Além dos níveis de dosagem necessários serem mais elevados (cerca de 3 vezes mais), os tocoferóis também são mais caros (US\$ 14,64/lb) quando comparados ao mais caro dos antioxidantes sintéticos (BHT - US\$ 1,80/lb). Apesar destes fatores, as indústrias de óleos/gorduras têm sido pressionadas pelos consumidores a buscar fontes naturais alternativas aos antioxidantes sintéticos, principalmente após o ano de 1990 quando o BHA foi identificado como sendo um composto carcinogênico, em testes realizados com animais em laboratório pela IARC (International Agency for Research in Cancer). O consumo mundial de tocoferóis, como antioxidante, foi estimado em 150 toneladas anuais (HAUMANN, 1990).

Os tocoferóis foram descritos como antioxidantes pela primeira vez por OLCOTT & EMERSON (1937). Foram identificados três tocoferóis (α -, β - e γ -). O δ -tocoferol foi isolado do óleo de soja dez anos mais tarde por STERN *et al.* (1947).

A alta estabilidade dos óleos vegetais, frente à rancidez oxidativa, é atribuída ao elevado conteúdo de antioxidantes presentes naturalmente. Já nas gorduras animais, a estabilidade deve-se ao alto teor em gorduras saturadas, uma vez que têm baixas concentrações de antioxidantes naturais, pois não podem sintetizá-los, mas sim derivatizá-los a partir da alimentação (KAUFMANN & GARLOFF, 1961).

Nos animais predomina o α - tocoferol, sendo que os demais compostos representam apenas de 1 a 5% da atividade biológica deste. Nos óleos vegetais predominam os γ - e δ - tocoferóis (DESAI, 1980). A função principal dos tocoferóis na célula é a de antioxidante, protetora das membranas e sistemas lipídicos (SWERN, 1964; KOMODA *et al.*, 1968). Sua função de antioxidante natural se deve à sua capacidade de doar elétrons e que está relacionada com sua estrutura (CORT, 1974; ANON, 1981). Esta capacidade demonstra a seguinte ordem decrescente de atividade antioxidante: γ - > δ - > β - > α - tocoferol (CHOW & DRAPER, 1974; BAUERNFIELD, 1980; FUKUZAWA *et al.*, 1982).

Os tocoferóis são mais efetivos na estabilização de gorduras animais. Naturalmente os teores de tocoferóis nos óleos vegetais são bem mais elevados que

nas gorduras animais. A eficiência da sua adição nestes produtos dependerá da composição do óleo, pois uma incorporação adicional de tocoferol em óleos vegetais que já os contenham em quantidade suficiente, não prolongará significativamente o seu período de indução. Entretanto, foi demonstrado que níveis de tocoferóis acima de 50 mg/100 kg de óleo (500 ppm) não têm efeito antioxidante adicional significativo (YOSHIDA *et al.*, 1993) e que altas concentrações de tocoferóis em óleos vegetais (>1.000 ppm) têm efeito prooxidante, ficando demonstrado que 400 - 600 ppm é a dosagem recomendável para estabilizar o óleo de soja (HAUMANN, 1990).

O γ - tocoferol foi descrito como antioxidante mais efetivo que o β - tocoferol e este mais que o α - tocoferol (OLCOTT & MATTIL, 1936), e sob as mesmas condições, o α - tocoferol se mostrou mais efetivo que todos (KAUFMANN & GARLOFF, 1961). A atividade do δ - tocoferol excede a do γ - tocoferol em vários substratos (STERN *et al.*, 1947). GRIEWAHN & DAUBERT (1948) também usando banha e 0,02% de tocoferol e método AOM, concluíram que a atividade antioxidante diminui na ordem: δ - > γ - > β - > α - tocoferol. Estes resultados se aplicam à ação antioxidante em gorduras ou ésteres metílicos submetidos ao calor para acelerar a oxidação. HOVE & HOVE (1944) concluíram que a atividade antioxidante dos tocoferóis varia enormemente de acordo com a temperatura em que são comparados e que, em temperatura ambiente, os quatro tocoferóis têm praticamente a mesma atividade antioxidante. LEA & WARD (1959) verificaram que os tocoferóis têm maior atividade antioxidante no escuro do que na presença de luz. Estudos da NRRC (Northern Regional Research Center) concluíram que os 4 tocoferóis podem agir como antioxidantes, sendo que alguns tocoferóis protegem os óleos da fotoxidação enquanto outros são mais efetivos na prevenção da autoxidação. Misturas de tocoferóis sintéticos, com diversas composições, estão disponíveis no mercado norte-americano, fabricadas pelas companhias UOP, Henkel Corp.'s e Hoffman - La Roche. Os produtos naturais do mercado são concentrados com 50 a 60% de tocoferóis (HAUMANN, 1990).

4.5.1.5- Implicações Nutricionais

Nenhuma outra vitamina tem recebido tanta atenção nos últimos tempos, como a vitamina E. No passado, a vitamina E foi considerada essencialmente como fator antiesterilidade, porém atualmente a vitamina E é considerada também como um antioxidante biológico que protege as membranas celulares e inibe a oxidação dos ácidos graxos insaturados (BURTON et al., 1983; MACHLIN, 1984). Na ausência de vitamina E, os ácidos graxos insaturados dos fosfolípidios das membranas são oxidados, gerando hidroperóxidos instáveis que iniciam as reações de autooxidação (BURGEOIS, 1992).

BLOCK & LANGSETH (1994) relacionaram o efeito da oxidação sobre vários estágios de doenças. Entre elas incluem-se: (1) câncer- através do início da carcinogênese, promoção do desenvolvimento de tumores, mutagênese e transformação da divisão celular; (2) doenças cardiovasculares- através da oxidação das lipoproteínas do sangue e o desenvolvimento de aterosclerose e efeitos danosos sobre os tecidos durante os ataques cardíacos, e (3) catarata- pelos danos oxidativos nas membranas oculares. A solução está na suplementação alimentar com vitamina E, pois há uma diferença razoável entre as quantidades ingeridas na dieta e os altos níveis necessários para proteção de doenças crônicas.

Há uma forte evidência de que os nutrientes com propriedades antioxidantes, não somente os tocoferóis, têm um efeito preventivo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O colesterol LDL oxidado é tido como um iniciador da aterosclerose. A vitamina E foi indicada como sendo o antioxidante mais efetivo para o LDL, mas o efeito antioxidante total é um efeito combinado de todos os antioxidantes disponíveis (DIPLOCK, 1994). Portanto, a ingestão de antioxidantes naturais tem efeitos benéficos nos processos metabólicos ou clínicos nos quais está envolvida a oxidação, tais como câncer, doenças cardiovasculares e cataratas (STAMPFER *et al.*, 1993; DIPLOCK, 1994), além de minimizar a destruição oxidativa de certas vitaminas e aminoácidos essenciais (HAUMANN, 1990).

No caso específico de tocotrienóis, existem evidências que mostram atividade hipercolesterolêmica (TAN *et al.*, 1991; ELSON, 1992; PEARCE *et al.*, 1992) e anticarcinogênica (GOULD *et al.*, 1991; NGAH *et al.*, 1991).

4.5.2- Esteróis

4.5.2.1- Estrutura e Funções biológicas

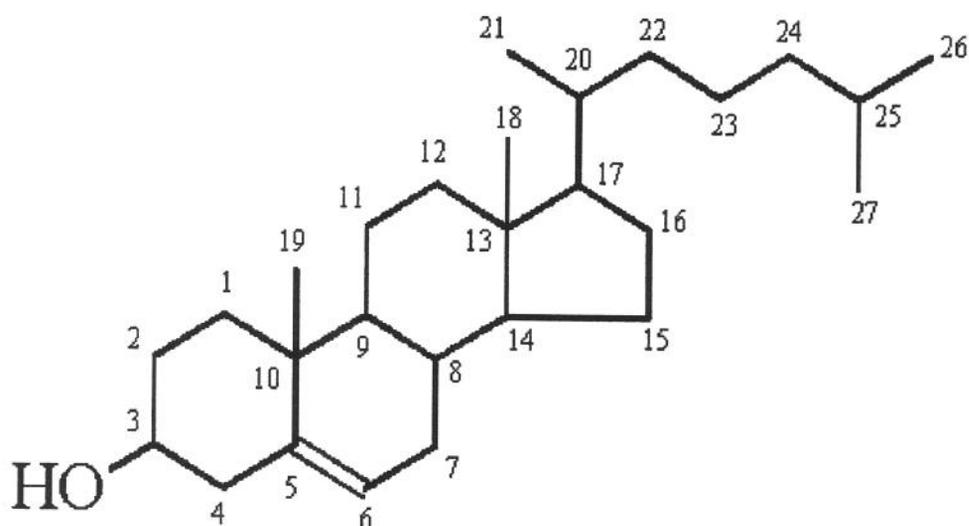
Os esteróis são a maior fração da matéria insaponificável dos óleos vegetais e têm pouco ou nenhum efeito sobre a qualidade destes. Podem ser considerados praticamente inertes e parecem não afetar suas propriedades organolépticas (SONNTAG, 1979). São álcoois policíclicos derivados do per-hidrofenantreno (PATTERSON, 1992) e se apresentam principalmente como esteróis livres e como ésteres de esteróis com ácidos graxos, mas também podem estar sob a forma de esteróis glicosídios e esteróis glicosídios acilados. São classificados em 3 grupos: (1) 4-desmetilesteróis (série colestano), isto é, fitosteróis normais; (2) 4-monetilesteróis (série 4 α -metilcolestano) e (3) 4, 4'-dimetilesteróis (série lanostano, também conhecidos como álcoois triterpenos) (KAUFMANN & HAMZA, 1970).

A composição em esteróis é específica para cada óleo vegetal, sendo utilizada para identificar adulterações ou contaminações, pois esta proporciona uma "impressão digital" do material lipídico (LOGNAY *et al.*, 1992). Os esteróis mais importantes encontrados em óleos vegetais são: β - sitosterol (C₂₉ H₅₀ O; P.F.= 140°C); estigmasterol (C₂₉ H₄₈ O; P.F.= 170°C) e campesterol (C₂₈ H₄₆ O; P.F.= 158°C) (KOCHHAR, 1983), e o mais comum em gorduras animais é o colesterol, o qual funciona como precursor na biossíntese de outros esteróis, tais como hormônios sexuais e ácidos biliares (BELITZ & GROSCH, 1987).

A Figura 3 ilustra a estrutura química dos esteróis mais importantes encontrados em óleos vegetais e do colesterol.

A recuperação de esteróis do óleo é interessante devido ao fato de estar associada à síntese de hormônios sexuais, contraceptivos, diuréticos e na

preparação de vitamina D sintética (SONNTAG, 1979; BALAZS, 1987). Atualmente há um crescente interesse nos fitosteróis devido à sua capacidade hipocolesterolêmica (LING & JONES, 1995) e sua efetiva prevenção de câncer de cólon de útero e de pulmão, principalmente adenocarcinoma de pulmão (MENDILAHARSU *et al.*, 1998).



Colesterol : \Rightarrow C24 = H

Campesterol : \Rightarrow C24 = CH₃

β -sitosterol : \Rightarrow C24 = CH₂-CH₃

Estigmasterol : \Rightarrow C24 = CH₂-CH₂ (dupla C22 = C23)

Figura 3- Estrutura química de alguns esteróis

Fonte: WARNER & MOUNTS, 1990

4.5.2.2- Fontes de Esteróis

Os óleos vegetais contém entre 100 e 500 mg de esteróis por 100g, sendo os componentes mais comuns: β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (GUTFINGER & LETAN, 1974 b; PRYDE, 1980). A Tabela 9 mostra a composição em fitosteróis de alguns óleos vegetais.

Tabela 9- Composição da fração (%) esterólica de óleos vegetais

Óleo	Fração Esterólica(%)	Colesterol	Campes-terol	Estigma-s-terol	β -sitoste-rol	Δ 5-Avenas-terol.
Algodão	0,35	Traços	9,2	2,5	88,2	Traços
Amendoim	0,25	-	12,8	10,8	74,6	-
Milho	0,90	-	22,1	7,2	62,2	3,5
Colza	0,84	0,8	29,4	-	54,9	5,7
Oliva	0,16	Traços	3,9	2,1	85,4	8,6
Soja	0,37	Traços	21,3	19,1	53,5	2,4

Fonte: BELITZ & GROSCH, 1987

Durante o processo de refino dos óleos vegetais, na etapa de desodorização, os fitosteróis são destilados juntamente com os tocoferóis, fazendo com que os destilados de desodorização também sejam uma boa fonte de fitosteróis (PRYDE, 1980; EITENMILLER, 1997).

4.5.2.3- Efeito do Processamento

Nas etapas do refino de óleos vegetais, os teores dos esteróis totais e individuais decrescem gradualmente durante os vários estágios do processamento, como mostra a Tabela 10. A razão de redução dos esteróis pelo processamento depende do tipo do óleo e das condições empregadas no refino e em geral, está entre 10 e 70%. (GUTFINGER & LETAN, 1974 b).

Nas etapas do processamento existe uma redução apreciável durante a neutralização, quando os esteróis são retirados com a borra; mas é durante a etapa

de desodorização que ocorre arraste destes componentes, os quais se acumulam no destilado (SONNTAG, 1979; PATTERSON, 1992).

Outros pesquisadores relataram dados complementares sobre o assunto. PRYDE (1980), após estudos com vários tipos de óleos vegetais, concluiu que até 32% dos esteróis são retirados no processo de refino e que, até 27% dos esteróis residuais, são retirados durante a hidrogenação.

Tabela 10- Teor e composição (%) dos 4- desmetilesteróis do óleo de soja, após diferentes etapas do processamento

Óleo Esterol	C	N		B		D		C	D
		(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)		
Total (mg/100g)									
Teor (%)	451	397	374	384	363	360	337	387	262
Colesterol									
Campesterol	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-	-
Estigmasterol	21,0	20,4	22,1	22,1	21,6	21,5	21,2	23,3	22,0
β-sitosterol	23,0	24,3	23,0	22,9	23,8	23,1	23,7	23,5	22,2
	55,1	55,0	54,6	54,7	54,3	55,1	54,8	53,2	55,8

C= bruto ; N= neutralizado ; B= branqueado ; D= desodorizado

Colunas (1) e (2) relatam dados de diferentes condições de processamento

Esteróis totais nos óleos degomados, neutralizados e branqueados são 373 , 301 e 305 mg/100 g respectivamente

Fonte: GUTFINGER & LETAN (1974 b)

JOHANSSON & HOFFMANN (1979) verificaram que, 42 a 53% dos esteróis livres e 0 a 17% dos esteróis esterificados, são removidos durante o refino de óleos e que a maior remoção ocorre durante a etapa de clarificação com terra clarificante.

O refino comercial de óleos vegetais não tem efeito significativo nas proporções relativas dos principais esteróis (NAUDET *et al.*, 1973).

4.5.2.4- Implicações Nutricionais

A cada dia é mais evidente que os constituintes lipossolúveis de plantas, incluindo os fitosteróis, têm um papel importante na redução do colesterol (LING & JONES, 1995). Os fitosteróis mais comuns em vegetais (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol) são consumidos em níveis de 250 a 500 mg/dia (NAIR *et al.*, 1984). Estes compostos têm sido utilizados para tratar casos de hipercolesterolemia, com sucesso moderado (LEES *et al.*, 1977, HEINEMANN *et al.*, 1986). Altas doses de fitosteróis (3-20 g/dia) são necessárias para conseguir uma pequena redução no colesterol plasmático (misturas de β -sitosterol e campesterol) (MATTSON *et al.*, 1982; BECKER *et al.*, 1993).

Os mecanismos pelos quais o β -sitosterol e outros fitosteróis agem como compostos redutores de colesterol não são completamente conhecidos. Sugere-se que os fitosteróis atuem como inibidores da absorção intestinal do colesterol (KUDGHODKAR *et al.*, 1976).

Por outro lado, os fitosteróis cíclicos saturados parecem não ser absorvidos no intestino (HASSAN & RAMPONE, 1979; VanHANEN & MITTINEN, 1992), tendo sido observado que o β -sitostanol é mais eficiente na redução do colesterol total e LDL-colesterol que o β -sitosterol (HEINEMANN *et al.*, 1988; 1993).

Os fitosteróis também são úteis em estudos clínicos, por não serem endógenos, sendo indicadores da absorção e síntese de colesterol (GLUECK *et al.*, 1991).

4.5.2.5- Ação Hipocolesterolêmica

O β -sitostanol é o derivado 5- α -saturado do β -sitosterol, o qual pode ser obtido pela hidrogenação deste composto, ou em forma natural extraído e concentrado a partir de breu (LING & JONES, 1995).

Estudos realizados comparando o efeito de β -sitostanol sintético e o natural na redução de colesterol indicam uma maior eficiência da mistura natural, possivelmente associada à presença de outros compostos esteróides insaturados (HEINEMANN *et al.*, 1993; LING & JONES, 1995).

A empresa RAISIO, na Finlândia, produz atualmente uma margarina (BENECOL), formulada com 9% de fitosteróis, que além do efeito benéfico da redução entre 15 e 60% na absorção do colesterol, apresenta um nível de energia reduzido em cerca de 15% (ANON-RAISIO, 1996). A Benecol, além do creme vegetal, lançou nos Estados Unidos, em agosto de 1999, a linha de molhos para saladas, seguida pela Unilever's Lipton com a linha "Take Control", cujos produtos contém a mesma quantidade de redutores de colesterol (1120 mg de esteróis a cada 62,2 g) que o creme vegetal, lançado em maio do mesmo ano, só que com um apelo: é mais fácil ingerir a quantidade recomendada do redutor de colesterol como molho para saladas do que como creme vegetal. A Nutrition for Life International Inc. (NFLI) optou pelo lançamento de tabletes contendo 400mg de esteróis, que devem ser ingeridos 30 minutos antes das refeições ricas em colesterol (ANON, 1999).

Apesar do sucesso comercial dos produtos denominados "redutores de colesterol", a demanda de esteróis não pode ser totalmente atendida devido à necessidade de 33 toneladas de subproduto da indústria de papel para obter 680 g do extrato de fitosteróis (ANON-RAISIO, 1996; ANON-NOVOS ALIADOS, 1996). Portanto, alternativas tecnológicas para a produção de extratos contendo β -sitostanol são de grande interesse científico e comercial.

4.6- Concentração de Compostos Minoritários de Óleos e Gorduras

Nas etapas de purificação e/ou concentração de compostos, os processos mais comumente utilizados são: extração líquido-líquido, cristalização, adsorção, extração sólido-líquido, destilação, fracionamento com uréia (GUNSTONE *et al.*, 1986). A destilação convencional, entretanto, em muitos casos, não pode ser utilizada devido à instabilidade térmica dos compostos envolvidos, ou pela necessidade de elevadas temperaturas para a operação. Tem-se como exemplos de processos, com produtos sensíveis ao calor, a produção das vitaminas A, E, K e inúmeros intermediários farmacêuticos como, por exemplo, a ranitidina, plastificadores, diversos cosméticos, óleos de origem vegetal, filtros solares, como por exemplo, o óleo de apiezon, etc (BATISTELLA & WOLF-MACIEL, 1996; BATISTELLA, 1995). Assim, a aplicação do processo de destilação molecular, processo que utiliza alto vácuo e temperaturas reduzidas, tem encontrado utilidade na separação e purificação de materiais com moléculas de alto peso molecular, bem como para aqueles termicamente sensíveis (ERCIYES *et al.*, 1987). Existem diversos tipos de equipamentos, entre eles, o destilador de filme descendente, o destilador com raspadores deslizantes, o destilador multicompartimentado e o destilador centrífugo, o mais comumente utilizado (devido à sua construção simples e à sua alta taxa de destilação). Normalmente, estes equipamentos têm caráter multipropósito, designação comum na indústria de química fina, ou seja, têm a capacidade de operar os mais diversos processos de produção que exijam a destilação molecular. Nesse sentido, torna-se importante a simulação de cada processo que venha a utilizar o destilador molecular, para que se possam estabelecer condições de operação, condições de otimização, e para se conhecer o processo em termos das variáveis mais significativas, como por exemplo, rendimento e pureza do produto final (BATISTELLA, 1995).

A produção de concentrados de compostos minoritários de óleos, por destilação molecular, tem sido citada na literatura nos casos de obtenção de vitamina E (tocoferóis), a partir do DDOS e de carotenos de óleo de palma; porém esta

técnica não tem sido aplicada para outros compostos ou matérias-primas, como por exemplo, para os fitosteróis de DDOS (EASTMAN KODAK, 1957; OOI *et al.*, 1994).

4.6.1- Destilação Molecular

4.6.1.1- Descrição Geral do Processo

A destilação molecular é um caso particular de evaporação, que ocorre sob pressões extremamente baixas, de modo que o efeito do vapor gerado sobre o líquido praticamente não influencia a taxa e o fator de separação entre si a uma distância da ordem de grandeza do percurso livre médio das moléculas evaporadas, ou seja, as moléculas evaporadas atingirão a condensação facilmente, uma vez que encontrarão um percurso relativamente desobstruído. Por esse motivo, a destilação molecular é considerada um processo de não equilíbrio (HICKMAN, 1943). Este processo pode ser melhor caracterizado através da comparação com os dois tipos mais convencionais de separação líquido-vapor (BURROWS, 1960):

1- Destilação Convencional: o vapor é geralmente formado no seio do líquido em forma de bolhas, pelo calor cedido através do ebulidor. A pressão total ativa no sistema é a pressão de vapor termodinâmica da fase líquida.

2- Evaporação: o vapor é gerado na superfície do líquido, cuja condição termodinâmica se encontra abaixo do seu ponto de ebulição, a uma velocidade, que é função da temperatura, da superfície do líquido e da condição do vapor acima da superfície, como ocorre na umidificação, secagem de sólidos, etc.

A destilação molecular é uma forma de evaporação governada somente pela quantidade de moléculas que escapam da superfície do líquido, cujo princípio difere dos dois casos anteriores, por não existir praticamente retorno das moléculas evaporadas para a fase líquida (não há equilíbrio líquido-vapor). A temperatura e a velocidade de evaporação são determinadas pela quantidade de calor fornecido ao líquido (pela superfície aquecida do vapor) e não são influenciadas pela condição do vapor. Isso difere da destilação convencional, porque nem o ponto de ebulição, nem a formação de bolhas são fatores determinantes; e da evaporação, pelo fato de que

ela ocorre quando existe uma diferença de temperatura entre as superfícies de evaporação e condensação, sendo independente da condição de fase de vapor (GREENBERG, 1972).

Assim, a destilação molecular representa um tipo especial de vaporização a baixas pressões e correspondentes baixas temperaturas, encontrando assim, utilidade na separação e purificação de materiais com moléculas de alto peso molecular, bem como para aqueles termicamente sensíveis (ERCIYES *et al.*, 1987).

4.6.1.2- Aplicações da Destilação Molecular

Aplicações comerciais de destilação molecular tiveram início na década de 30 quando foi utilizado um destilador de filme descendente para produzir vitaminas a partir de óleo de peixe. Na década de 40, novos equipamentos industriais foram desenvolvidos: o destilador molecular de filme descendente com sistema de raspagem e o destilador molecular centrífugo (HICKMAN, 1936).

Algumas aplicações atuais do processo são:

- Produção de vitamina K (HICKMAN, 1943).
- Término de destilação de produtos sintéticos com pontos de ebulição elevados como plastificantes, dímeros de ácidos graxos, separação de mono e diglicerídios (HOLLÓ *et al.*, 1971; PERRY & CHILTON, 1980).
- Preparação de insumos para cosméticos como, por exemplo, a lanolina e frações de álcoois de lanolina (CHEMY UNION, 1995).
- Separação de produtos de alto peso molecular derivados do petróleo, como por exemplo, os óleos de apiezon (BURCH, 1928; HOLLÓ *et al.*; 1971; REES, 1975).
- Purificação e fracionamento de óleos essenciais (HOLLÓ *et al.*, 1971).
- Aplicações em análise química para identificação de compostos em uma mistura (MYHER *et al.*, 1993).

- Purificação de óleos de silicone de alto peso molecular para uso em bombas de difusão (REES, 1980).

4.7- Obtenção de Concentrados de Tocoferóis e/ou Esteróis

A obtenção de concentrados de tocoferóis/esteróis envolve algumas técnicas de preparação e separação específicas. Existem poucos estudos sobre a recuperação desses compostos a partir de destilados de desodorização. Todos os processos comerciais foram patenteados e outros, citados em literatura, não trazem dados suficientes que elucidem o efeito das variáveis de reação sobre o rendimento de recuperação. Até o momento, não foram realizados trabalhos de pesquisa que estudem simultaneamente a otimização das reações de conversão dos ácidos graxos a ésteres etílicos e a recuperação dos esteróis/tocoferóis, a partir do DDOS.

EMBREE & KUHRT (DISTILLATION PRODUCTS, 1946) patentearam processos de obtenção de concentrado de tocoferóis baseados na separação desses compostos a partir de destilados de desodorização de óleos ou a partir destes parcialmente concentrados por destilação molecular. Os processos baseiam-se na solubilização do destilado de desodorização em um hidrocarboneto liquefeito (por exemplo o propano), seguido de uma ou mais etapas como: (1) neutralização, (2) congelamento e (3) extração próxima ao ponto crítico do hidrocarboneto. Neste processo, a concentração ocorre por separação de fases, onde os tocoferóis se concentram na fase do hidrocarboneto.

BROKAW (EASTMAN KODAK, 1957) patenteou processos de obtenção de concentrados de tocoferóis a partir de DDOS, obtendo um produto final contendo aproximadamente 20% (em peso) de tocoferóis, empregando várias etapas químicas e físicas, tais como:

- (a) saponificação/acidificação/esterificação/destilação,
- (b) saponificação/acidificação/esterificação/precipitação dos esteróis/destilação,

- (c) saponificação/acidificação/esterificação/precipitação dos esteróis/extração líquido-líquido.

Outro processo de obtenção de tocoferóis/esteróis a partir de DDOS foi patenteado por BROWN & SMITH (EASTMAN KODAK, 1964) e compreende: (1) tratamento do destilado de desodorização (DD), sob condição fortemente ácida, pH de 0,3 a 1,5, ou proporção ácido:DD = 1:20 (p/p); com um álcool monohídrico de baixo peso molecular e tempo de reação de 1 a 2 horas, sob refluxo, para conversão dos ácidos graxos de alto peso molecular em ésteres. Foi utilizado como catalisador ácido o HCl e um álcool monohídrico de 1 a 4 átomos de carbono, com um excesso em relação ao teor de ácidos graxos livres (AGL) presentes no DD, cerca de 30 a 60 partes de álcool por 100 partes, em peso, de DD a ser tratado; e (2) fracionamento por extração líquido-líquido, do destilado de desodorização tratado, com um solvente líquido polar e outro apolar.

SMITH (EASTMAN KODAK, 1967) patenteou o processo de separação de tocoferóis e esteróis a partir de destilados de desodorização de óleos, baseado na reação de esterificação dos saponificáveis da matéria-prima para obter (a) um concentrado puro de tocoferóis e (b) um alto rendimento em esteróis. Neste processo, após a reação de esterificação (EASTMAN KODAK, 1957), e anterior à remoção do excesso do álcool monohídrico, há adição de água, sob determinada temperatura, para a remoção dos esteróis por cristalização seguida de centrifugação e/ou filtração. A mistura restante obtida é constituída por duas fases, sendo uma composta por água, álcool, catalisador de esterificação e glicerol e outra sendo a fase oleosa composta principalmente por tocoferóis e ésteres de ácidos graxos com álcool monohídrico. Após a separação das fases, a fase oleosa é submetida à destilação molecular para separação dos ésteres, obtendo-se assim um concentrado de tocoferóis de alta pureza. O percentual de recuperação de tocoferóis e esteróis foi de aproximadamente 79,5% e 95% respectivamente.

Outro processo de preparação de concentrado de tocoferol foi patenteado por KEISHO *et al.* (NISSHIN OIL MILLS, 1982), em que ácidos graxos livres do destilado

de desodorização foram esterificados com álcool polihídrico e os ésteres resultantes foram extraídos com álcool hidratado.

Em 1982, KIM & RHEE empregaram uma série de etapas, como a extração com solvente, tratamento químico e destilação molecular, com o objetivo de obter concentrados de tocoferóis e esteróis a partir do DDOS, mas os rendimentos alcançados não foram satisfatórios. Devido à similaridade de volatilidade entre os tocoferóis, esteróis e ácidos graxos, a separação desses compostos torna-se difícil quando se empregam diretamente processos tais como: destilação fracionada, destilação a vapor com alto vácuo ou destilação molecular.

SHEABAR & NEEMAN (1987) prepararam um concentrado de tocoferóis a partir de DDOS empregando uma combinação de tratamento químico e/ou cristalização em solventes. O resultado obtido com cristalização em hexano seguida de cristalização em acetona foi um produto final com 35% em tocoferóis. Em outro processo que consistiu dessas mesmas duas etapas de cristalização mais tratamento com carbonato de sódio, foi obtido um produto com 45% em tocoferóis.

A tecnologia de extração com fluido supercrítico, considerada muito promissora, foi utilizada por LEE *et al.* (1991) com o objetivo de preparação de concentrado de tocoferol a partir de DDOS esterificado, obtendo um produto final com uma concentração de tocoferol superior em 40% da inicial, portanto, um baixo rendimento de concentração.

MOTTA & ARAÚJO (1991) estudaram a preparação de concentrados de tocoferóis empregando métodos químicos de saponificação e acidulação de dois DDOS, seguido de extração da matéria insaponificável com água destilada. Os teores de tocoferóis originais nos DDOS e nos concentrados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Teores de tocoferóis (%) em DDOS e seus concentrados

Amostra	Tocoferóis totais (%)
DDOS - 1	10,7
Concentrado - 1	34,3
DDOS - 2	10,0
Concentrado - 2	39,6

Fonte: MOTTA & ARAÚJO (1991)

Foi demonstrado que os ácidos graxos do destilado de desodorização do óleo de canola (DDOC) podem ser convertidos a ésteres metílicos utilizando uma lipase como catalisador. A taxa de conversão obtida foi maior que 96,5% dos ácidos graxos originais, sem o emprego de vácuo ou necessidade de remoção de água do meio de reação. A concentração de enzima (de 2,7 a 4,3%, sobre o peso dos substratos) não teve efeito significativo sobre a porcentagem de conversão dos ácidos graxos a ésteres metílicos. A temperatura ótima de reação encontrada foi de 50°C e a razão dos substratos (metanol / DDOC) mais adequada foi de 1,8 a 2,0:1 (RAMAMURTHI *et al.*, 1991).

RAMAMURTHI & McCURDY (1993) estudaram a obtenção de concentrado de tocoferóis/esteróis a partir de (1) DD de óleo de canola (DDOC), contendo inicialmente 1,0% de tocoferóis e 1,58% de esteróis e (2) DD de óleo de soja (DDOS), contendo inicialmente 12,74% de tocoferóis e 11,39% de esteróis, empregando um processo enzimático onde os ácidos graxos livres foram convertidos a ésteres metílicos pela ação da lipase SP-382, com 96,5 e 89,4% de conversão, respectivamente. Em seguida, os tocoferóis e esteróis foram concentrados na fração resíduo, por destilação molecular dos ésteres metílicos e de outras frações voláteis. A taxa de conversão em ésteres metílicos foi de 96%. A partir do DDOS foi possível

concentrar os esteróis em 1,5 vezes (17,56%) e os tocoferóis em 1,7 vezes (21,48%) da concentração inicial.

MAU & TSEN (1995) obtiveram concentrados com 76-79% de tocoferóis a partir de DDOS, empregando metilação-extração na recuperação da vitamina E, pois concentrados com 26,46% de tocoferóis podem ser obtidos por destilação direta, mas não são produtos comerciais. Todos os ésteres metílicos puderam ser destilados a 180°C e à pressão de 0,001 Torr, embora 37,6% do conteúdo original de vitamina E tenha sido perdido.

BARNICKI *et al.* (EASTMAN CHEMICAL, 1996) patentearam um novo processo de produção de concentrados de tocoferóis a partir de destilados de desodorização de óleos vegetais, contendo 20 a 80% de tocoferóis em peso e com uma taxa de recuperação de 72 a 97%. O processo é composto inicialmente por uma reação de esterificação, em que os ácidos graxos são convertidos a ésteres de álcool e a ésteres de esteróis, seguido por uma série de etapas de destilação nas quais os compostos com maior e menor ponto de ebulição que os tocoferóis são separados.

GHOSH & BHATTACHARYYA (1996) isolaram tocoferóis e esteróis como um concentrado a partir do DD de óleo de girassol (DDOG). A tecnologia empregada envolvia biohidrólise, bioesterificação e destilação fracionada convencional. Os glicerídeos neutros do DDOG (46,3%) foram hidrolisados pela lipase da *Candida cylindracea* e, em seguida, os ácidos graxos livres totais foram esterificados e convertidos a ésteres butílicos, em reação catalisada pela lipase do *Mucor miehei*. O produto esterificado foi então fracionado por destilação simples a vácuo. O concentrado final resultante era composto por 30% de tocoferóis (inicialmente com 4,8%) e por 36% de esteróis (inicialmente com 9,7%) e foi obtida uma taxa de recuperação dos tocoferóis e esteróis de aproximadamente 70% e 42%, respectivamente.

Nenhuma das técnicas estudadas de separação/concentração de tocoferóis/esteróis a partir dos destilados de desodorização de óleos vegetais é totalmente satisfatória e, os processos empregados comercialmente parecem utilizar

tratamento químico e destilação molecular. A complexidade dos procedimentos resulta em baixas taxas de recuperação e isto, aliado aos altos custos dos equipamentos, fazem com que o produto final tenha elevado custo.

4.8- Preparação da Matéria-prima (DDOS)

A obtenção de concentrados de tocoferóis/esteróis a partir do DDOS envolve uma série de tratamentos físicos e químicos, com a finalidade de separação dos ácidos graxos do meio, pois estes são os maiores “contaminantes” do DDOS. Comercialmente, são empregados vários métodos com esta finalidade. Alguns desses processos envolvem a formação de aductos de uréia, extração líquido-líquido com pares de solventes polares e apolares, extração com fluido supercrítico, destilação dupla, saponificação básica e destilação molecular, esterificação enzimática, cristalização em solventes, etc. Mas nenhum desses processos tem sido satisfatórios (RAMAMURTHI *et al.*, 1991).

Devido à pequena diferença de volatilidade existente entre os esteróis/tocoferóis e os ácidos graxos (Tabela 12), sua separação é difícil quando se emprega destilação molecular direta, obtendo-se baixos rendimentos (KIM & RHEE, 1982).

O ponto de ebulição dos ácidos graxos pode ser reduzido (aumento da volatilidade relativa) pela produção de seus ésteres, empregando esterificação química ou enzimática, tornando assim mais brandas as condições de temperatura e pressão empregadas na destilação molecular, preservando melhor os compostos de interesse, além de facilitar a sua separação dos tocoferóis/esteróis. Os ésteres serão produzidos a partir de reações de esterificação dos ácidos graxos com etanol. A utilização deste álcool se justifica pelo fato de que, além de ser produzido por fermentação de açúcares, é menos tóxico que o metanol (MITTELBACH, 1990).

Tabela 12- Volatilidade relativa dos componentes de óleos vegetais

Componente	Peso Molecular	Volatilidade Relativa
Ácidos graxos	280	2,5
Esqualeno	411	5,0
Tocoferóis	415	1,0
Esteróis	410	0,6
Esteróis esterificados	675	0,04
Triglicerídios	885	--

Fonte: WINTERS, 1986

4.9- Esterificação da Matéria Saponificável do DDOS

Como o objetivo do trabalho é a transformação da matéria saponificável do DDOS em ésteres etílicos, serão estudados dois métodos químicos e um enzimático de transformação e seus efeitos sobre o teor dos esteróis/tocoferóis iniciais.

O termo interesterificação refere-se à classe de reações em que um óleo/gordura ou outros materiais compostos de ésteres de ácidos graxos reagem com ácidos graxos (acidólise), álcoois (alcoólise) ou com outros ésteres (transesterificação), com troca dos grupos ácidos graxos, para produzir um novo éster. Do ponto de vista prático, a alcoólise é a mais importante reação de interesterificação, em cujo meio de reação há um excesso de grupos hidroxilas e os grupos carboxílicos são rearranjados (STIRTON, 1964).

A reação de interesterificação a ser estudada será a etanólise. Os ésteres etílicos podem ser preparados por via enzimática ou por via química.

4.9.1- Interesterificação Enzimática

A interesterificação enzimática é um processo alternativo utilizado pelas indústrias para modificar propriedades de materiais graxos, particularmente na

clivagem de óleos/gorduras, síntese pela reversão da reação de hidrólise e interesterificação química. A utilização de reações catalisadas por enzimas oferece vantagens para os processos industriais, tais como (POSORSKE, 1984):

- especificidade, que permite controlar os produtos produzidos e também aumentar o rendimento pela redução da quantidade de produtos utilizados inicialmente;
- condições brandas de reação, que podem reduzir o consumo de energia e os custos de investimento em equipamentos;
- reutilização do catalisador, e
- baixos custos de tratamentos dos resíduos industriais.

Algumas desvantagens da interesterificação química, tanto catalisada por bases como por ácidos, são: remoção do catalisador juntamente com o glicerol após a reação, não sendo possível a sua reutilização; grandes quantidades de reagentes e de resíduos industriais; altas temperaturas e pressões; custo elevado de equipamentos, etc. Devido a estes fatores, os processos enzimáticos geraram grande interesse por parte das indústrias (MACRAE, 1983). O desenvolvimento comercial da clivagem enzimática de óleos/gorduras iniciou no Japão, na década de 70, sendo que o fator determinante para este desenvolvimento tecnológico foi a alta demanda de energia (340 BTU/lb de gordura) empregada na clivagem térmica (SONNTAG, 1989).

Há dois tipos principais de reações catalisadas por lipases, a hidrólise e a síntese de glicerídios (GANDHI, 1997):

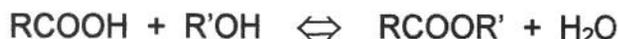
(i) HIDRÓLISE:



(ii) SÍNTESE:

As reações deste tipo são classificadas em:

(a) **Esterificação:**



(b) **Alcoólise:**



(c) **Acidólise:**



(d) **Transesterificação:**



Sendo que as três últimas reações são freqüentemente denominadas de interesterificação.

Muitas lipases têm certa especificidade *sn*-1,3, portanto, nas reações de hidrólise de triglicerídios os produtos finais de reação são ácidos graxos livres, 1,2 (2,3)-diglicerídios e 2-monoglicerídio. Devido à sua instabilidade química, estes dois últimos compostos sofrem uma migração acílica, formando 1,3-diglicerídio e 1 (3)-monoglicerídio, respectivamente. Com o aumento do tempo de incubação, ocorrerá a hidrólise completa, com a formação de ácidos graxos livres e glicerol. Este fenômeno pode ser explicado através do impedimento estérico (MACRAE, 1983). É também conhecido que em baixo pH (4,0), há uma maior concentração de 1-isômeros, no ponto de equilíbrio. Portanto, é desejável que a enzima 1,3-específica seja ativa em pH baixo (HARTMAN, 1962). Os triglicerídios de cadeia longa são insolúveis em água, mas as lipases são caracterizadas por sua habilidade em catalisar a reação de hidrólise das ligações éster na interface água-óleo. A hidrólise das ligações éster de ácidos graxos hidrossolúveis é muito lenta (BROCKERHOFF & JENSEN, 1974).

As reações de hidrólise catalisadas por enzimas são reversíveis, com ressíntese (esterificação). O fator determinante do deslocamento do equilíbrio da reação é o teor de água no meio de reação. Reações em que a umidade é restrita, a

hidrólise é minimizada, sendo a esterificação a reação dominante. Devido à insolubilidade e alta estabilidade das enzimas em meio orgânico, é possível a separação e a reutilização deste catalisador (EIGTVED *et al.*, 1986). As lipases têm sido amplamente utilizadas para esterificação de ácidos graxos com álcool (RAMAMURTHI *et al.*, 1991; RAMAMURTHI & McCURDY, 1993).

Para reações de transesterificação em batelada, o catalisador é inicialmente ativado pela adição de pequena quantidade de água ao meio de reação e agitado com os substratos, dissolvidos em éter de petróleo. Ao término da reação, as partículas de catalisador são removidas por filtração ou centrifugação e o material interesterificado é isolado por técnicas de separação. O mesmo catalisador pode ser reutilizado em reações subseqüentes (MACRAE, 1983).

4.9.1.1- Síntese de Ésteres

A reação de síntese de ésteres é o inverso da hidrólise. Enquanto a esterificação produz água e éster, os processos de transesterificação, tais como alcoólise, acidólise e interesterificação, dão origem a um álcool, ácido ou éster, respectivamente. As enzimas podem ser empregadas em reações de síntese na produção de:

a) Ésteres de baixo e médio peso molecular

Ésteres de baixo peso molecular tais como acetato geranílico, butirato isoamílico, propionato benzílico, laurato butílico, butirato etílico, etc.; são utilizados principalmente pelas suas características de “flavor” e aroma. Alguns ésteres voláteis são empregados como bases para perfumes e aromas alimentícios. Outras utilizações para estes tipos de ésteres são em plastificantes, lubrificantes, substitutos do óleo diesel (ésteres metílicos e etílicos), cosméticos, sabões, etc. Sendo que todos podem ser eficientemente preparados com lipases do *Mucor miehei*, *R. delemar*, *Penicillium cyclopium*, *G. candidum*, etc. (IWAI & TSUJISAKA, 1980; WELSH *et al.*, 1990).

b) Poliésteres

São polímeros de tereftalato dimetílico, acetato vinílico, acrilato butírico, etc, utilizados em plásticos, adesivos, laminados, lubrificantes, etc. Tais ésteres/monômeros de poliésteres podem ser sintetizados com lipases (GANDHI, 1997).

c) Em Alimentos

Reações catalisadas por lipases são utilizadas na síntese de monoglicerídios, tais como monolaurina, ésteres de açúcares, aminoésteres, etc., utilizados como emulsificantes (bio-surfactantes) na estabilização de emulsões (molhos para saladas, maionese, sorvetes, salsicharia, queijos, etc.). Os amino-ésteres derivados dos ácidos octanóico e decanóico são também empregados como matéria-prima para produção de filmes e lubrificantes comestíveis utilizados no processamento de alimentos (NAGAO & KITO, 1989; ADELHORST *et al.*, 1990).

As reações de esterificação e de acidólise têm sido utilizadas na produção de gorduras especiais ("shortenings") (MUKHERJEE, 1990). As gorduras obtidas por transesterificação de óleo de peixe hidrogenado com óleos contendo alto teor em ácidos graxos insaturados, tais como o óleo de girassol (oléico), têm uma textura excelente (NAKAI *et al.*, 1991).

Atualmente, há um crescente interesse no desenvolvimento e produção de substitutos sintéticos para a gordura, que não são absorvidos pelo organismo humano, sendo portanto, um produto hipocalórico e isento dos efeitos colaterais causados pelos óleos/gorduras naturais (doenças cardiovasculares). Outro benefício que oferecem, é a sua alta termoestabilidade. Estes substitutos são sintetizados enzimaticamente por reações de transesterificação entre açúcar e ácido graxo (GANDHI, 1997).

d) Em Fármacos e Cosméticos

Mono-, di- e triglicerídios dos ácidos octanóico e decanóico são utilizados como bases para tintura de cabelos e perfumes, em cosméticos; artigos para toalete e fármacos. Também são conhecidos pela sua ação na dissolução de cálculos renais em humanos. O salicilato metílico é um agente protetor dos raios solares. Os monoésteres de sorbitol e de açúcares dos ácidos esteárico e láurico possuem atividades antitumor e inibidora do crescimento de plantas. O monooleato de oleína é usado em óleos de banho, cremes, loções, preparações para o cabelo e pele, fármacos, etc. (SERVAT *et al.*, 1990). Todos estes compostos específicos podem ser preparados por reações enzimáticas.

e) No fracionamento/extração e isolamento seletivo de ácidos graxos

As propriedades de seletividade de algumas lipases (*M. miehei* e *B. napus*) podem ser usadas em reações visando o enriquecimento seletivo do meio com um ácido graxo específico, tal como o γ -linolênico e o ácido docosahexanóico, que não são atacados por estas lipases (HILLS *et al.*, 1990).

f) Laticínios e Confeitaria

A maior importância da utilização das lipases em reações de síntese, nos setores de laticínios e de confeitaria, está na interesterificação de gorduras com o objetivo de obtenção de triglicerídios sintéticos com características desejadas, tal como na produção de substitutos (equivalentes) de manteiga de cacau a partir de óleo de palma (BLOOMER *et al.*, 1992). A modificação nas propriedades de um triglicerídio é possível devido à especificidade quanto ao substrato e regioseletividade das lipases, tais como da *C. viscosum*, *M. miehei* e *P. fluorescens* (MACRAE, 1984).

g) Peptídeos

As lipases têm habilidade em atuar nas ligações amino/peptídeo (C-N). Entretanto, diferentemente das proteases, podem agir sobre os ácidos *D*-amino,

sintetizando peptídeos precursores da penicilina G e outros análogos da penicilina, partindo de matérias-primas tanto com configuração *D* como *L* (GANDHI, 1997).

Outra vantagem do uso de lipases na síntese de proteína está no fato de que estas não possuem atividade amidase, preservando assim, as ligações peptídicas (MATOS *et al.*, 1987).

h) Ésteres a partir de óleos vegetais

Em 1990, MITTELBACH estudou a reação de alcoólise de óleo de girassol com metanol e etanol, catalisada por diferentes lipases, usando éter de petróleo como solvente e meio de reação com baixo teor de umidade. As lipases da *Pseudomonas fluorescens*, duas enzimas imobilizadas do *Mucor miehei* e uma da *Candida sp* apresentaram boas taxas de conversão dos triglicerídios em ésteres, sendo a primeira enzima mais eficiente. Foram testados 5 álcoois homólogos e verificado que a velocidade de conversão aumentava quanto maior a cadeia do álcool utilizado. Embora as melhores taxas de conversão de ácidos graxos a ésteres tenham sido obtidas com metanol, sem adição de água; a maior taxa de esterificação foi encontrada utilizando etanol 96% (82% em éster etílico), sem solvente, empregando a razão molar álcool/óleo de 3,6 e tendo como catalisador enzimático a lipase da *Pseudomonas* (10% em peso sobre o óleo).

A cinética da reação de esterificação enzimática do ácido oléico com metanol, em hexano, foi estudada por RAMAMURTHI & McCURDY (1994). A reação segue a cinética de Michaelis-Menten, em função da concentração de enzima (Randozyme SP-435) e dos substratos. A razão ótima de concentração do ácido oléico para metanol foi de cinco. Acima desse valor, observaram uma inibição da atividade enzimática. Os autores verificaram também que a velocidade de reação aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração da lipase, em função do tempo de reação.

Em 1998, SELMI & THOMAS estudaram a etanólise do óleo de girassol, em meio sem solvente, utilizando Lipozyme (lipase do *M. miehei*) como catalisador.

Foram investigados o efeito da razão molar óleo/etanol, temperatura, adição de água e quantidade de enzima sobre a produção de ésteres etílicos. Os valores ótimos encontrados foram, respectivamente: 1 : 3 ; 50°C ; 0% (v/v) e 0,4g de Lipozyme / 5,7 mmol de óleo de girassol. Foi verificado que o emprego de sílica gel, durante a terceira reação consecutiva de reutilização da enzima, restaurou sua atividade inicial, explicado talvez, por ser a sílica um “coletor” de glicerol, protegendo o suporte da Lipozyme contra a adsorção do mesmo.

4.9.2- Interesterificação Química

4.9.2.1- Interesterificação de Triglicerídios

O mecanismo da alcoólise de glicerídios com álcoois monohídricos foi muito estudado e demonstrado que a reação é catalisada tanto por bases como por ácidos. A reação é muito mais rápida em sistemas homogêneos na presença de catalisador básico. Em 1911, REID (*apud* FORMO, 1954) concluiu que a alcoólise usando óxidos de metal sódico é aproximadamente 4.000 vezes mais rápida que a alcoólise com quantidade equivalente de HCl. Em 1918, ANDERSON & PIERCE (*apud* FORMO, 1954), verificaram que a alcoólise em meio básico é cerca de 1.500 vezes mais rápida que a saponificação e que, a base reage preferencialmente com os ésteres etílicos, quando comparados aos triglicerídios.

A reação de alcoólise de óleos/gorduras com etanol/metanol, tem importância na produção de glicerol, ácidos graxos, ésteres, mono- e diglicerídios de ácidos graxos insaturados e sabões, especialmente sabões anidros (FEUGE & GROS, 1949).

Os ésteres metílicos/etílicos são produtos da interesterificação de óleos/gorduras com álcoois, na presença de um catalisador ácido ou básico. Acredita-se que ocorram três reações reversíveis e que mono- e diglicerídios sejam os produtos intermediários formados nessas reações (FREEDMAN *et al.*, 1986). As variáveis que afetam o processo de alcoólise têm sido muito estudadas devido à sua utilização industrial na produção de ésteres. A razão molar dos substratos

(álcool/óleo vegetal), tipo de catalisador, temperatura e presença de impurezas tais como ácidos graxos livres e umidade, estão entre as variáveis estudadas (TANAKA *et al.*, 1981).

WRIGHT *et al.* (1944) estudaram a etanólise do óleo de algodão e de coco para estabelecer o efeito das variáveis: etanol, água e base sobre o rendimento em glicerol. Seus principais objetivos foram verificar como o rendimento era influenciado por estas variáveis de reação e como o excesso de álcool e/ou base compensava a presença da água e de acidez. Concluíram que para óleos com um valor ácido superior à unidade, deve-se aumentar a quantidade de catalisador básico para compensar este efeito. Mas, devido à formação de sabões, a viscosidade aumenta, dificultando a separação da fase glicerol. A presença de água (umidade superior a 0,3%) causa a formação de sabão, com conseqüente redução da alcalinidade. Excesso de catalisador e/ou álcool pode ser usado para compensar este efeito negativo da umidade sobre a reação de alcoólise. Em ambos os casos, a mistura deve ser acidificada para promover a separação das fases. A etanólise ácida também foi estudada e verificaram que além da reação ser muito mais lenta, os rendimentos obtidos foram baixos.

FEUGE & GROS (1949) estudaram o efeito do tempo e temperatura de reação, concentração de catalisador (NaOH) e de etanol na reação de esterificação do óleo de amendoim. Foi verificado que a maior parte da reação se completou dentro de 1 - 2 horas, que a temperatura ótima de reação foi de 50°C, utilizando álcool básico contendo 2 equivalentes de álcool etílico e 0,2% de NaOH, sobre o peso do óleo.

STIRTON (1964), após estudos sobre a interesterificação de gorduras com metanol, concluiu que a gordura deve ser clara, seca e neutra; o NaOH ou KOH (0,1 - 0,5%) devem estar dissolvidos no álcool metílico anidro comercial (99,7%) e que a quantidade de álcool recomendada é cerca de 1,6 vezes a necessidade teórica. Observou também que quantidades de álcool acima de 1,7 vezes o valor teórico, interfere na separação gravimétrica do glicerol, além de não acelerar a reação. A conversão do óleo a éster metílico (98%) se completou ao final de 1 hora de reação.

Na reação de alcoólise de óleo/gordura catalisada por sódio metálico em meio alcoólico (etanol), o sistema não pode conter umidade e ácidos graxos livres (AGL) acima de 0,5%, pois estes componentes são considerados “venenos” do catalisador (STIRTON, 1964). Nas reações catalisadas por bases, se o teor de AGL for superior a 0,5% e o teor de água superior a 0,3%, devem-se compensar os efeitos negativos desses dois componentes utilizando-se uma quantidade adicional de álcali ou de álcool. A quantidade de álcool geralmente utilizada é de 6:1 (álcool:óleo) e a de catalisador básico de 1%, dependendo da qualidade inicial do óleo/gordura (SONNTAG, 1982). A reação de metanólise de óleos ácidos, para se obter rendimentos maiores de 90%, deve ser realizada em duas etapas: (a) os ácidos graxos são primeiramente esterificados, sem catalisador, com glicerol, à temperatura de 210 - 230°C e pressões de 5 - 10 mm Hg e (b) esterificados com metanol e catalisador alcalino (SOCIÉTÉ ANON, 1965).

FREEDMAN *et al.* (1984), estudando as variáveis que afetam o rendimento e a pureza dos ésteres obtidos a partir de óleos de algodão, amendoim, soja e girassol, incluindo a razão molar álcool/óleo, tipo de catalisador (ácido ou básico), temperatura e grau de refinamento do óleo vegetal, concluíram que: (1) com catalisador alcalino (hidróxido ou metóxido de sódio, 0,5% sobre o peso do óleo), temperatura igual ou superior a 60°C, razão molar álcool : óleo de pelo menos 6 : 1 e utilizando óleos finamente refinados, a conversão a ésteres metílicos, etílicos e butílicos foi completa em 1 hora de reação e (2) com catalisador ácido a reação de interesterificação foi muito mais lenta. A reação, com óleos brutos, teve um menor rendimento em ésteres devido à presença de gomas e de materiais estranhos, e que os mesmos resultados foram obtidos com 0,5% de metóxido de sódio, comparativamente a 1% de NaOH. Verificou também que o óleo deve estar bem seco (umidade < 0,3%) e com baixa acidez (< 0,5%).

A alcoólise em meio alcoólico básico é o método mais satisfatório para a preparação de ácidos graxos a partir de óleos neutros. A reação é conduzida sob refluxo (condensador) e com um pequeno excesso de base. O álcool é então evaporado e os sabões acidulados com ácidos minerais, seguido de lavagem e

secagem. A velocidade de saponificação é duas vezes maior em pentanol e etanol e cerca de 10 vezes maior em metanol. O KOH é preferido ao NaOH devido à alta solubilidade dos sabões de potássio. Uma pequena quantidade de água aumenta a velocidade de saponificação (SONNTAG, 1989).

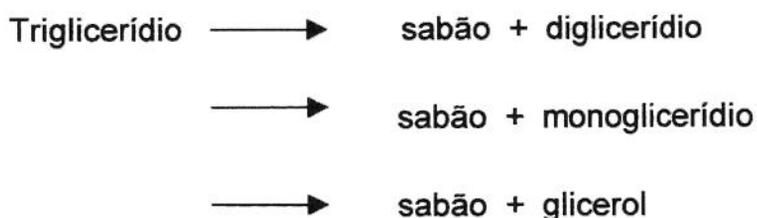
A alcoólise também pode ser usada para converter diretamente lipídios em ésteres etílicos, sem a transformação inicial em ácidos graxos. Óleo bruto, com mais de 30% de ácidos graxos livres, pode ser convertido em ésteres metílicos por um processo composto por duas etapas: (a) esterificação dos AGL a $80 \pm 5^\circ\text{C}$ usando catalisador sólido, como uma resina de troca iônica sulfonada e (b) etanólise dos ésteres de glicerol usando catalisador alcalino (NaOH) a $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Na etanólise, o óleo ou gordura é dissolvido em etanol, em excesso, e utiliza-se um co-solvente no meio de reação. O catalisador pode ser ácido (H_2SO_4 , HCl, trifluoreto de boro, etc) ou básico (MeO^-Na^+), sendo que este último fornece uma maior velocidade de reação (EISENHARD, 1988).

Em 1997, NOUREDDINI e ZHU estudaram a cinética da interesterificação do óleo de soja com metanol. Verificaram o efeito da intensidade de mistura (n° de Reynolds de 3.100 a 12.400) e da temperatura (30 a 70°C) sobre a velocidade de reação, mantendo-se constantes a razão molar dos substratos (metanol:óleo = 6:1) e a concentração do catalisador (0,2% NaOH, em peso sobre o óleo). Concluíram que a variação da intensidade de mistura afeta a reação paralelamente à variação da temperatura. Assim, a 70°C e com n° de Reynolds = 10.000, foi obtida uma velocidade maior na formação de ésteres metílicos (88% de conversão), com um tempo de reação de 90 minutos.

4.9.2.2- Saponificação de Mono-, Di- e Triglicerídios

Com o objetivo de aumentar o rendimento em tocoferóis/esteróis, há necessidade de transformar os mono-, di- e triglicerídios, presentes no DDOS, em ácidos graxos livres, antes da etapa de esterificação, pois esta reação é mais rápida e menos drástica para os ácidos graxos quando comparados aos outros compostos. O processo baseia-se em uma etapa inicial de saponificação seguida de acidulação.

A reação de saponificação entre triglicerídios e KOH processa-se em etapas, tendo a seguinte seqüência de reações (Young *et al.*, 1994):



Na prática, os mono- e diglicerídios não são detectados, pois suas reações de saponificação são muito mais rápidas do que a dos triglicerídios, provavelmente devido à sua alta solubilidade em meio aquoso.

4.9.2.3- Acidulação de Sabões

Dois métodos de acidulação de sabões são comumente empregados, batelada e contínuo. Em cada um dos processos o produto é tratado com um ácido inorgânico, normalmente sulfúrico ou clorídrico e mantido por 2-4 horas sob aquecimento (90-130°C) para conversão dos sabões em ácidos graxos (WATSON & HOEFER, 1976; WOERFEL, 1983). A reação pode ser representada de acordo com SONNTAG (1989):



Para obtenção do óleo ácido (fase com os ácidos graxos), após a acidulação, o componente óleo é separado da fase aquosa por centrifugação (processo contínuo), ou por decantação pela gravidade (processo por batelada) (WATSON & HOEFER, 1976). A fase aquosa, que contém ácido inorgânico livre, sais de sódio e impurezas solúveis em água é descartada, enquanto que a fase óleo obtida é lavada com 25-50% de água quente (SWERN, 1982).

Estudos da curva de titulação de vários sabões têm demonstrado que a acidulação é completada a um pH de 4,0, o que pode ser evidenciado pela queda da viscosidade da solução. Por outro lado, quando o pH da mistura cai abaixo de 3,0, o óleo ácido produzido pode degradar, ocasionando um aumento no teor de ácidos

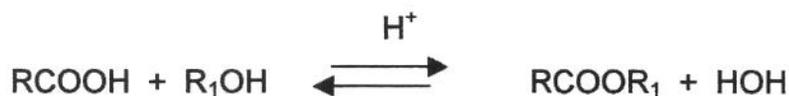
graxos oxidados, ácido mineral, cinzas, cor mais escura, além do maior custo para neutralização da água de descarte (CRAUER, 1965).

Os problemas associados à acidulação são principalmente devido à natureza corrosiva do processo e à dificuldade de separação da fase óleo da fase água, podendo ocasionar redução no rendimento do processo, além de contaminar a água de descarte por matéria graxa. Normalmente, esta água pode conter no máximo 150 ppm de óleo. O processo de acidulação por batelada cumpre esta especificação, porém requer um tempo de decantação de 8 a 12 horas (MAG *et al.*, 1983).

4.9.2.4- Esterificação de Ácidos Graxos

Atualmente, a conversão de ácidos graxos em ésteres tem tido grande importância devido a uma série de fatores que incluem: maior facilidade de produção e maior economia nos processos de destilação fracionada, além de serem mais reativos, termicamente mais estáveis e menos corrosivos (WOERFEL, 1995).

Os ácidos carboxílicos transformam-se diretamente em ésteres quando aquecidos com um álcool em presença de pequena quantidade de ácido mineral, normalmente ácido sulfúrico concentrado ou ácido clorídrico anidro. O mecanismo de reação é o reverso da reação de hidrólise e ocorre através da eliminação do grupo hidroxil do ácido com o hidrogênio do álcool, formando-se água, conforme reação abaixo (SONNTAG, 1982):



A velocidade da reação de esterificação de ácidos carboxílicos é proporcional à concentração de íons H^+ adicionado em baixas concentrações. Outros ácidos fortes também utilizados como catalisadores de reação são: ácido toluenosulfônico, ácidos de Twitchell, etc (FORMO, 1954). Esta reação é reversível e geralmente quando se atinge o equilíbrio, estão presentes quantidades apreciáveis tanto dos reagentes quanto dos produtos. Porém, o equilíbrio pode ser deslocado no sentido dos produtos, utilizando um excesso dos reagentes. Para obtenção de um alto

rendimento em ésteres, tem sido utilizado um grande excesso de álcool (MORRISON & BOYD, 1992).

A reação de esterificação de ácidos graxos com álcoois monohídricos de baixo peso molecular (etílico e metílico) é normalmente realizada utilizando álcool em excesso, 15 a 35 mol/mol ácido graxo, ou de 2 a 4 vezes do peso do ácido graxo, na presença de 1-3% de H_2SO_4 ou HCl anidro, usando aquecimento sob refluxo. Dessa forma o rendimento obtido é maior que 95% (FORMO, 1954). Os álcoois terciários e fenólicos apresentam dificuldade de reação (OGLIARUSO & WOLFE, 1991).

Outro método de esterificação de ácidos graxos é a etanólise realizada sob pressão (110 psi), com excesso de etanol e catalisador ácido. O catalisador ácido de TWITCHELL foi considerado a maneira mais eficiente de converter ácidos graxos a ésteres etílicos. Também é utilizado para a etanólise direta de gorduras, em que menor quantidade de mono- e diglicerídios são formados. A reação de clivagem de gorduras por este processo se completa somente após 3 a 48 horas de reação, com elevado consumo de energia (vapor) (TWITCHELL, 1898).

A esterificação direta de ácidos graxos é realizada com excesso de metanol, à pressão de 150 psig, usando H_2SO_4 como catalisador. Dessa forma, obtém-se 88 - 89% de conversão a ésteres metílicos, sem a necessidade de remoção da água formada pela reação. O metanol deve estar presente com um excesso molar de 5 a 6:1 (álcool:óleo) (SONNTAG, 1982).

4.10- Planejamento Fatorial, Análise de Variância e Método de Superfície de Resposta

BARROS *et al.* (1996) descrevem e exemplificam todo o processo de otimização de problemas multivariáveis e iniciam dizendo que para todo processo a ser estudado, devem ser inicialmente definidas as suas variáveis dependentes e os seus níveis de variação. A importância das variáveis em um processo, pode ser determinada através da utilização de métodos de planejamento experimental, os quais possibilitam o planejamento e execução de forma organizada e racional de um

número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Através de programas estatísticos de regressão, é possível a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre as respostas; a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, e conseqüentemente, a definição das faixas ótimas de operação do processo, respeitando restrições quando houver.

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são:

- Simplex
- Planejamento Fatorial
- Método de análise por Superfície de Resposta

Os métodos de planejamento experimental e análise de superfície de resposta têm como base o planejamento fatorial. Consistem de um grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento, produtividade, etc) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como temperatura, concentração, etc.). Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões (BARROS *et al.*, 1996):

- Como uma resposta (variável dependente) é afetada, em uma região de interesse, por um dado conjunto de variáveis de entrada (variáveis independentes);
- Quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão em um produto dentro das especificações desejadas, e
- Quais valores das variáveis de entrada levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto.

Para delineamento e análise estatística dos dados foi utilizado um planejamento experimental do tipo composto rotacional central de 2 níveis, com os ensaios divididos em:

- Pontos fatoriais: em número igual a 2^n (sendo n o número de variáveis independentes) e níveis codificados denominados +1 e -1.
- Pontos axiais ou estrela: em número igual a $2n$, situados a uma distância de $(2^n)^{1/4}$ do ponto central (nível α codificado), com valores nos níveis mínimos e máximos ($-\alpha$ e $+\alpha$) e os outros no nível zero.
- Pontos centrais: pontos no centro do modelo (nível zero).

O tratamento estatístico das respostas dos ensaios através da metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) é feito através da análise de regressão múltipla, ajustando modelos matemáticos contendo termos lineares e de interação (para modelos de primeira ordem) ou, incluindo os termos quadráticos, para modelos de segunda ordem. Para tal, é necessário inicialmente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as combinações possíveis. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (+1 e -1) para cada variável é especificamente eficiente. Se “n” variáveis estiverem envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é, portanto 2^n . Acrescentam-se ainda ensaios, no mínimo em triplicata, realizados nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos dois níveis atribuídos a cada variável (o nível “zero” ou ponto central do planejamento), com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios (erro puro). Neste ponto, pode-se considerar encerrado o método de planejamento fatorial. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos principais de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, e até ajustar um modelo de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas (BARROS *et al.*, 1996).

Caso se queira explorar outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial, ou se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais, pode-se completar o planejamento realizando ensaios nos pontos axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$) (KHURI & CORNELL, 1987) para um modelo de 2ª ordem.

Segundo BARROS *et al.* (1996), a metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais. É constituída por duas etapas: modelagem e deslocamento. Estas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. Inicia-se com um planejamento fatorial incompleto, sem os pontos centrais, para verificação dos efeitos das variáveis independentes sobre as repostas e sua significância estatística, seguido de outro planejamento fatorial incompleto, com os pontos centrais, para obtenção do erro puro e análise de um modelo estatístico de 1ª ordem. Após a análise de variância, caso este modelo não se ajuste bem aos dados experimentais, ou se não for preditivo ou se não tiver significância estatística, passa-se a um planejamento fatorial completo, incluindo os pontos axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$) (KHURI & CORNELL, 1987), seguido da análise de variância para verificar a significância, ajuste e validação de um modelo de 2ª ordem.

Para avaliar se os modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, BOX *et al.* (1978) sugerem que seja realizada uma análise estatística, utilizando alguns parâmetros descritos a seguir:

O coeficiente de correlação (R) é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais.

Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo

modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. As análises dos valores intermediários não podem ser expressas de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos pontos experimentais.

As somas dos quadrados dos desvios são denominadas somas quadráticas (SQ), onde:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r$$

$$SQ_r = SQ_{faj} + SQ_{ep}$$

onde: T = Total

R = Regressão

r = resíduo

faj = falta de ajuste e,

ep = erro puro

O percentual de variação explicada em torno da média (R^2) está relacionado com os resíduos do modelo. Se não houver resíduo, o R^2 será igual à unidade. Este parâmetro é descrito como:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo experimental.

As médias quadráticas (MQ_T , MQ_R e MQ_r) são obtidas dividindo-se as somas quadráticas pelo respectivo grau de liberdade. As MQ são uma estimativa, com n-2 graus de liberdade, da variância dos pontos em torno da equação de regressão, isto é, em torno do modelo ajustado.

A significância estatística da equação de regressão (modelo) é verificada através do Teste “ F ”, ou seja, comparando o valor estimado para “ F ” a partir dos dados experimentais com o valor de “ F ” tabelado, para uma distribuição de referência, assim é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas.

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$

O fundamento do Teste “ F ” consiste em verificar se existe correlação entre as variáveis e as respostas. Segundo BARROS *et al.* (1996), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQR/MQ_r) segue uma distribuição “ F ” (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devido exclusivamente a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada usando o valor efetivamente calculado para MQR/MQ_r . Para isso basta compará-lo com o valor de “ F ” tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula. Então, pode-se afirmar, que a equação de regressão não é significativa. Por outro lado, se o “ F ” calculado for maior que o “ F ” tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e que os dados experimentais são representados pelo modelo proposto.

Pode acontecer, porém, que uma regressão, embora significativa do ponto de vista do Teste “ F ”, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. BARROS *et al.* (1996) sugerem que para que isso não ocorra, isto é, para que uma regressão também seja útil para fins preditivos, além de ser estatisticamente significativa, o valor do “ F ” calculado deve ser no mínimo 4 a 5 vezes o valor do “ F ” tabelado. É necessário também a realização do Teste “ F ” da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , que servirá para avaliar o ajuste do modelo. Este valor deverá ser comparado com “ $F_{faj; ep}$ ” (tabelado) a um determinado nível de confiança. Valores altos de MQ_{faj}/MQ_{ep} significarão muita falta de ajuste do modelo.

Portanto, a análise dos resultados de variância, obtidos através da elaboração da Tabela ANOVA (BARROS *et al.*, 1996) permite a verificação da significância tanto dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas, como dos resultados e também do ajuste e validação do modelo estatístico obtido através do planejamento fatorial.

Após a seleção do modelo, os termos não significativos são retirados e realizado um novo ajuste, em que foram colocados os termos significativos a um nível de 95% de probabilidade ou significância, levando a um modelo final ajustado mais adequado para descrever as características da região analisada.

Um modelo ideal deve ter boa significância ($p < 0,05$), alta confiabilidade (dados dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, resíduo irrelevante) e baixa variabilidade ($R^2 \geq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996).

A fórmula geral deste modelo preditivo é representada pela equação:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + \epsilon$$

Onde: Y = função resposta genérica ou variável dependente

X_1, X_2 = níveis codificados das variáveis independentes

B_0 = ponto central do sistema ou ponto estacionário

B_1 = coeficiente estimado pelo método dos mínimos quadrados

ϵ = resíduo que mede o erro experimental, apresentando uma distribuição normal com média zero e variância igual a S^2 .

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- MATERIAL

5.1.1- Matéria-prima

O destilado de desodorização de óleo de soja (DDOS), gentilmente cedido por COCAMAR - Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda - Maringá, PR, foi obtido pelo processo de destilação do óleo, com vapor (T = 240 a 250°C e P= 4 Kg/t vapor), sob vácuo (0,3 a 0,4 mm Hg). Apresenta uma coloração marrom, com aparência semi-sólida a 25°C. O DDOS foi estocado a -18°C e liquefeito a 40°C, em estufa, para utilização.

5.1.2- Equipamentos e Instrumentos

- Rotavapor, BRINKMANN, modelo Büchi R 110.
- Centrífuga SIGMA, modelo sigma 2 D.
- Estufa FANEM, modelo S.E. Retilínea.
- Estufa MEMMERT, modelo UL 40 com ventilação.
- Estufa a vácuo HERAEUS, modelo VEV 18/17.
- Banho termostatizado IKA-HEIZBAD, modelo HBR 250.
- Banho termostatizado com agitação LAUDA, modelo RC 20.
- Agitador elétrico, JANKE & KUNKEL Iika Werk.
- Termostato DRUCKGEFÜLLT Normschliff Gerätebau.
- Titulador SCHOTT, modelo Tritoline Alpha TM 125.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência PERKIN ELMER, modelo Isocratic LC Pump 250.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência PERKIN ELMER, modelo Isocratic Series 10.
- Detector de Índice de Refração Sicon Analytic, modelo LCD 201.
- Detector Espectrofotométrico UV/VIS PERKIN ELMER, modelo LC 290.
- Detector de Fluorescência Shimadzu, MERCK-HITACHI, modelo F-1050.
- Sistema de Integração PeakSimple Chromatography Data System, SRI INSTRUMENTS, INC., modelo 202.

5.1.3- Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados foram de pureza e grau exigidos pelos métodos analíticos.

5.1.4- Outros Insumos

- Lipase do *Mucor miehei* (Lipozyme [™]), imobilizada em resina macroporosa aniônica, com atividade de interesterificação de 6,2 BAUN/g (Batch Acidolysis Units Novo), adquirida da Novo Industri, Copenhagen, Dinamarca.
- Hidróxido de Potássio - grau industrial.
- Ácido Clorídrico e Sulfúrico - grau industrial.
- Álcool Etilico p.a. - absoluto e hidratado.
- Padrões de lipídios, tocoferóis e esteróis para determinações cromatográficas, foram adquiridos da Nu-Chek, Sigma Chemie, Merck e Fluka AG.

5.2- MÉTODOS

5.2.1- Métodos Analíticos

- Ácidos Graxos Livres (AGL) - método AOCS Ca 5a-40, 1993.

- Teor de Matéria Insaponificável - método AOCS Ca 6b-53, 1993.
- Índice de Saponificação - método AOCS Cd 3-25, 1993.
- Teor de Água do DDOS - método AOCS Tb 2-64, 1995.
- Teor de Água da enzima - método IAL, 1985.
- Valor Ácido (VA) - AOCS Te 1a-64, 1993.
- *Classes de Lipídios* - determinadas por HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography), segundo DOBARGANES & MÁRQUEZ-RUIZ (1993), em cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer Series 10, com válvula injetora de 20 μL , equipado com detector de Índice de Refração Sicon Analytic LCD 201 e duas colunas HP PL gel 5 μ (30cm x 7,5mm), com 100 Å e 500 Å, em série. Fase móvel tetrahydrofurano, com fluxo de 1 mL/min. A quantificação dos ácidos graxos livres, mono-, di- e triglicerídios foi realizada por normalização interna de áreas. A concentração das amostras injetadas foram de 5%, baseado na concentração de DDOS, que era variável para cada ensaio. O valor de cada medição refere-se à média de três injeções.
- *Composição em Ácidos Graxos* - método AOCS Ce 1-62 (1993), por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando-se um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Sigma 3B, equipado com detector de Ionização de Chama Perkin Elmer e coluna de aço inoxidável, HP Silar 10 C (4m x 1/8"), empacotada em chromosorb W-HP. Temperaturas empregadas: coluna a 175°C, injetor e detector a 225°C. Fluxo de nitrogênio de 25 mL/min. Os ésteres metílicos foram preparados segundo HARTMAN & LAGO (1973). Injetou-se no cromatógrafo 1 μL dos ésteres em hexano. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos. A quantificação foi efetuada por normalização interna de áreas. O valor da medição refere-se à média de três injeções.

- *Ácidos Graxos Totais* - determinados pela soma dos ácidos graxos livres (AOCS Ca 5a-40,1993) com os ácidos graxos provenientes dos mono- di- e triglicerídios, determinados por HPSEC, presentes na amostra. O peso molecular médio dos ácidos graxos (275,1g/mol) foi obtido a partir do teor e composição em ácidos graxos do DDOS. Esta determinação quantifica a matéria saponificável da amostra.

- *Composição em Tocoferóis* - método AOCS Ce 8-89 (1993), utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer LC 250, com válvula injetora de 20 μ L, equipado com detector de fluorescência Shimadzu, Merck-Hitachi F-1050, com excitação de 290nm e emissão de 330nm e coluna Merck, LiChrosorb Si 60 (25 cm x 4,0 mm). Fase móvel hexano:isopropanol (99:1, v/v), com fluxo de 1,1 mL/min. Os tocoferóis foram quantificados pela relação da área do pico versus a concentração do respectivo tocoferol, através de curva padrão com faixa de concentração de α -, β -, γ - e δ - tocoferóis de 4 a 80 μ g/mL e empregando-se as mesmas condições. As diluições das amostras foram feitas baseadas na concentração do DDOS no meio de reação (1700 - 2000 μ g/mL), que variava para cada ensaio. O valor de cada medição refere-se à média de três injeções.

- *Composição em Esteróis*- determinada segundo método de HOLEN (1985), utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer LC 250, equipado com válvula injetora de 20 μ L, detector espectrofotométrico UV/VIS Perkin Elmer LC 290 em comprimento de onda (λ) de 206 nm e coluna Perkin Elmer C8-SIL-X-10 (25cm x 4,6mm). Fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v), com fluxo de 1,6 mL/min. Os esteróis foram quantificados pela relação da área do pico versus a concentração do respectivo esterol, através de curva padrão com faixa de concentração de β -sitosterol, campesterol e estigmasterol de 0,4 a 1,6 mg/mL e empregando-se as mesmas condições. As diluições das amostras foram feitas baseadas na concentração do DDOS no meio de reação (400 - 500 μ g/mL), que variava para cada ensaio. O valor de cada medição refere-se à média de três injeções.

- *Delineamento experimental, Análise Estatística dos dados e Otimização das reações de esterificação (química e enzimática)*: Planejamento Experimental Fatorial

do tipo composto rotacional central de 2 níveis, Análise de Variância e método de análise por Superfície de Resposta (BOX *et al.*, 1978; KHURI & CORNELL, 1987; BARROS *et al.*, 1996). As análises estatísticas, para estudo da otimização da reação de esterificação da matéria saponificável do DDOS com etanol, foram realizadas utilizando-se o software "STATISTICA" 5.0 [StatSoft, Inc, Tulsa, OK (1995)].

5.2.2- Procedimento Experimental

5.2.2.1- Caracterização da Matéria-Prima

Foram realizadas as seguintes determinações para caracterizar o DDOS: valor ácido (acidez), ácidos graxos livres, matéria insaponificável, índice de saponificação, umidade, classe de lipídios (ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídios), ácidos graxos totais, teor e composição em: ácidos graxos, tocoferóis e esteróis. O valor de cada medição refere-se à média de análises.

5.2.2.2- - Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS

5.2.2.2.1- Ensaio Preliminares

Com o objetivo de adequar o DDOS como matéria-prima para obtenção de concentrado/extrato de esteróis e tocoferóis por destilação molecular é necessário transformar seus compostos saponificáveis em ésteres, tornando assim o processo de separação menos drástico e mais eficiente. Portanto, os ensaios visam estudar os efeitos das variáveis de reação e definir as condições mais adequadas para otimizar o processo de esterificação da matéria saponificável do DDOS. A reação de esterificação foi realizada empregando-se o álcool etílico (96%), por ser um produto, comparativamente com metanol, mais barato, oriundo de fermentação da cana de açúcar e não de petróleo, de fácil abastecimento e menos tóxico. A enzima utilizada como catalisador foi uma lipase acilhidrolase do *Mucor miehei* (Lipozyme IM).

Como estudo preliminar, foi verificada a necessidade de utilização de um solvente orgânico (por exemplo, o éter de petróleo) no meio de reação, técnica amplamente citada na literatura (MITTELBACH, 1990; RAMAMURTHY & McCURDY,

1993), como forma de obtenção de maiores taxas de conversão dos AGL a ésteres etílicos, de acordo com recomendação do fabricante da enzima (NOVO, 1989). Foram testadas três relações éter de petróleo:DDOS (% v/p): 0,5; 1,0 e 1,5:1, utilizando-se 12% de Lipozyme, relação molar etanol/AGL de 5:1 e temperatura de 60°C. Os resultados foram comparados com a reação realizada sem utilização de solvente.

5.2.2.2.2- Otimização da Reação de Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS

Reação de esterificação: Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, foram colocadas 100 g de DDOS e as quantidades selecionadas de etanol comercial (96%) e de Lipozyme[™]. A quantidade de etanol foi estipulada baseada na sua relação molar com o teor de AGL do DDOS, e a quantidade de enzima, em relação ao peso dos substratos (etanol + AGL).

Monitoramento da reação: O curso da reação foi monitorado pela determinação do valor ácido do produto, em função do tempo. Após atingir o equilíbrio, que em todos os casos foi obtido em menos de 2 horas de reação, 1 mL da mistura de reação foi separado da enzima por centrifugação. A umidade e o excesso de etanol foram eliminados em estufa a vácuo (100 mbar de pressão, temperatura de 60°C e tempo de 1,5 horas).

Determinações de tocoferóis foram realizadas em todos os ensaios, para verificar as perdas destes compostos durante as reações de esterificação. Os esteróis foram determinados somente nas reações otimizadas.

Taxa de conversão: O grau de conversão dos AGL em ésteres etílicos foi determinado medindo-se o valor ácido (VA) inicial e final.

$$\% \text{ Conversão} = \frac{(\text{VA inicial DDOS} - \text{VA mistura reação no tempo } t) \times 100}{\text{VA inicial DDOS}} \quad [1]$$

Desenho estatístico: As etapas seguidas para otimização do sistema foram:

- 1- Determinação das variáveis independentes e respostas adequadas ao processo
- 2- Elaboração do planejamento experimental
- 3- Realização dos experimentos e obtenção das respostas
- 4- Elaboração do modelo das respostas em função das variáveis independentes
- 5- Validação do modelo (testes estatísticos) e verificação das respostas (análise de variância). As equações propostas para os modelos operam unicamente com valores codificados das variáveis independentes, portanto, os valores reais devem ser previamente convertidos.
- 6- Elaboração dos gráficos de superfície de resposta para análise
- 7- Definição das faixas operacionais ótimas de cada variável de processo

Foi adotado um desenho estatístico para otimizar as condições de reação para conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos. Inicialmente, utilizou-se um planejamento fatorial incompleto para definir a região de estudo e verificar a significância das variáveis independentes na resposta, seguido da verificação do ajuste de um modelo de 1ª ordem aos resultados experimentais. Caso este modelo não tenha significância estatística para $p < 0,05$ (" F " calculado $<$ " F " tabelado) ou não seja preditivo (" F " calculado $<$ $3 \times$ " F " tabelado), verifica-se, o ajuste de um modelo de 2ª ordem. Para estudo dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes [temperatura de reação (X_1), concentração de enzima (X_2) e relação molar etanol/AGL (X_3)] (Tabela 13) sobre a resposta Y (% conversão de AGL a ésteres etílicos) e otimização dos resultados, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), obtida através de um planejamento fatorial completo, usando um "central composite rotational design" (CCRD) (Tabela 14) com as três variáveis independentes, o que incluem: 8 pontos fatoriais, 3 pontos centrais (replicatas) e 6 pontos axiais (BARROS *et al.*, 1996; KHURI & CORNELL, 1987).

Tabela 13- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação enzimática do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Variável Independente	Nível de Variação				
	-1,68*	-1	0	+1	+1,68*
Temperatura (X ₁)	30,0	38,0	50,0	62,0	70,0
Enzima (X ₂)	7,0	10,2	15,0	19,8	23,0
Etanol:AGL (X ₃)	0,3	1,0	2,0	3,0	3,7

(*) $\pm \alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1,68$ (KHURI & CORNELL, 1987)

X₁: temperatura, (°C); X₂: concentração de enzima {% peso [ácidos graxos livres (AGL) + etanol]}; X₃: relação molar do substrato (etanol:AGL no DDOS)

Tabela 14- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo (CCRD) dos níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação enzimática do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Ensaio ^a	Variável			Nível Codificado da Variável		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	38	10,2	0,3	-1	-1	-1
2	62	10,2	0,3	+1	-1	-1
3	38	19,8	0,3	-1	+1	-1
4	62	19,8	0,3	+1	+1	-1
5	38	10,2	3,0	-1	-1	+1
6	62	10,2	3,0	+1	-1	+1
7	38	19,8	3,0	-1	+1	+1
8	62	19,8	3,0	+1	+1	+1
9	50	15	2,0	0	0	0
10	50	15	2,0	0	0	0
11	50	15	2,0	0	0	0
12	30	15	2,0	-1,68	0	0
13	70	15	2,0	+1,68	0	0
14	50	7	2,0	0	-1,68	0
15 (C)	50	23	2,0	0	+1,68	0
16 (C)	50	15	0,3	0	0	-1,68
17 (C)	50	15	3,7	0	0	+1,68

(^a) ensaios realizados em ordem aleatória

X₁: temperatura, (°C); X₂: concentração de enzima [% peso [ácidos graxos livres (AGL) + etanol]]; X₃: relação molar do substrato (etanol:AGL no DDOS)

5.2.2.2.3- Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Enzimática do DDOS

Os ensaios experimentais foram realizados nas condições selecionadas, nos extremos da faixa ótima de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos, indicadas pela metodologia de superfície de resposta e comparados com os valores obtidos através do modelo matemático proposto.

5.2.2.2.4- Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS

O grau de esterificação dos mono- di- e triglicerídios presentes no DDOS foi determinado por cromatografia líquida de partição (HPSEC) [DOBARGANES & MÁRQUEZ-RUIZ (1993)], nas condições ótimas encontradas, baseado na metodologia de superfície de resposta. Neste procedimento, além de se poder verificar a contribuição desses compostos na formação de ésteres, pode-se observar como a enzima atua na cadeia dos lipídios, nestas condições, pois, sendo um lipase *sn*-1,3 específica, espera-se que hidrolise também os mono-, di- e triglicerídios.

5.2.2.3- Esterificação Química da Matéria Saponificável do DDOS

5.2.2.3.1- Esterificação Química Direta do DDOS

A reação de esterificação do DDOS foi realizada empregando-se álcool etílico anidro em excesso, ácido sulfúrico concentrado como catalisador e aquecimento sob refluxo (FORMO, 1954).

5.2.2.3.1.1- Otimização da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS

Reação de Esterificação: Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, foram colocadas 100 g de DDOS e as quantidades selecionadas de etanol anidro e de catalisador ácido (ácido sulfúrico concentrado). A temperatura do banho de glicerol, termostatizado, foi mantida a 80°C. As quantidades de etanol e de ácido sulfúrico foram estipuladas de acordo com a relação molar do teor de AGL do DDOS e em relação ao peso do substrato (etanol + AGL), respectivamente.

- O procedimento experimental adotado para o monitoramento do curso das reações, as etapas da otimização do processo, a validação experimental do modelo estatístico obtido e a determinação do grau de esterificação dos mono-, di- e triglicerídios presentes no DDOS, foram idênticos aos realizados nas reações de esterificação enzimática do DDOS, descrito no Item 5.2.2.2.2.

Desenho Estatístico: Foi adotado um planejamento experimental semelhante ao utilizado na otimização da reação de esterificação enzimática do DDOS (Item 5.2.2.2.2), somente com alteração das variáveis independentes, que passam a ser: tempo de reação (h) (X_1); concentração de H_2SO_4 (%) (X_2) e relação molar etanol/AGL (X_3) (Tabela 15). O planejamento fatorial completo está apresentado na Tabela 16.

Tabela 15- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química direta do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Variável Independente	Nível de Variação				
	-1,68*	-1	0	+1	+1,68*
Tempo (X_1)	0,2	0,7	1,5	2,3	2,8
% H_2SO_4 (X_2)	0,4	0,6	1,0	1,4	1,6
Etanol:AGL (X_3)	2	4	7	10	12

(*) $\pm \alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1,68$ (KHURI & CORNELL, 1987)

X_1 : tempo de reação (h); X_2 : concentração de H_2SO_4 [% peso (AGL + etanol)]; X_3 : relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos livres (AGL) no DDOS]

Tabela 16- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo (CCRD) dos níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química direta do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Ensaio a	Variável			Nível Codificado da Variável		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	0,7	0,6	4	-1	-1	-1
2	2,3	0,6	4	+1	-1	-1
3	0,7	1,4	4	-1	+1	-1
4	2,3	1,4	4	+1	+1	-1
5	0,7	0,6	10	-1	-1	+1
6	2,3	0,6	10	+1	-1	+1
7	0,7	1,4	10	-1	+1	+1
8	2,3	1,4	10	+1	+1	+1
9	1,5	1,0	7	0	0	0
10	1,5	1,0	7	0	0	0
11	1,5	1,0	7	0	0	0
12	0,2	1,0	7	-1,68	0	0
13	2,8	1,0	7	+1,68	0	0
14	1,5	0,4	7	0	-1,68	0
15 (C)	1,5	1,6	7	0	+1,68	0
16 (C)	1,5	1,0	2	0	0	-1,68
17 (C)	1,5	1,0	12	0	0	+1,68

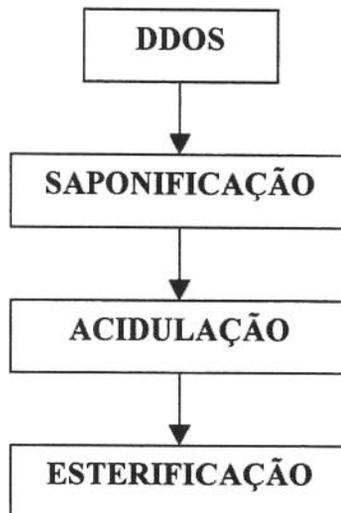
(^a) ensaios realizados em ordem aleatória

X₁: tempo de reação (h); X₂: concentração de H₂SO₄ [% peso (AGL + etanol)]; X₃: relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos livres (AGL) no DDOS]

5.2.2.3.2- Esterificação Química do DDOS após Saponificação e Acidulação

A esterificação química da matéria saponificável do DDOS visa a esterificação dos ácidos graxos totais (AGT) e não somente dos AGL presentes no DDOS, após saponificação dos lipídios e acidulação dos sabões formados.

O processo completo está ilustrado no esquema a seguir:



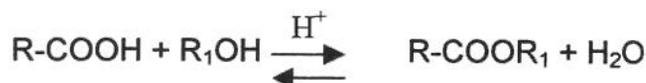
Onde a saponificação tem como objetivo hidrolisar os mono-, di- e triglicerídios e transformar todos os ácidos graxos em sabões, como exemplificado na reação abaixo:



A etapa seguinte de acidulação transformará os sabões formados em AGL. O ácido mineral selecionado foi o sulfúrico, por ser mais barato e menos volátil que o clorídrico. A reação pode ser expressa como:



Finalmente, foi realizada a esterificação dos AGL totais, utilizando etanol em meio ácido, como segue:



O álcool utilizado foi o etanol anidro, devido ao meio de reação já conter água proveniente das etapas anteriores, e por não se ter optado por um processo de secagem anterior à esterificação. Observando a reação acima, o emprego de etanol comercial (96%) teria como consequência a necessidade de aumento da sua quantidade para compensar o deslocamento do equilíbrio para a esquerda, em função da água presente no meio de reação.

5.2.2.3.2.1- Saponificação do DDOS

Para a reação de saponificação do DDOS, foram estudados dois meios de reação, aquoso e alcoólico.

A- Saponificação do DDOS em Meio Aquoso

Em um beacker de 500mL, foram colocadas 100 g de DDOS, 200 mL de água e as quantidades selecionadas de NaOH sólido (g). A quantidade de soda foi estipulada baseada na sua relação molar com o teor de AGT do DDOS. A quantidade de água foi a suficiente para se obter uma boa homogeneização do meio. A reação foi realizada à pressão atmosférica, com agitação mecânica, devido à borra formada ser muito espessa e a temperatura de reação foi de 80°C, devido à instabilidade térmica dos tocoferóis, principalmente em meio alcalino.

Monitoramento da reação: O curso da reação foi monitorado pela determinação das classes de lipídios (mono-, di-, triglicerídios e AGL) do produto, em função do tempo. 1 mL da mistura foi dissolvido em tetrahydrofurano para se obter uma concentração aproximada em DDOS de 5%.

As determinações de tocoferóis foram realizadas em todos os ensaios, para verificar se ocorreram perdas destes compostos durante a reação de saponificação.

Foram testadas quatro relações molares NaOH:AGT: 1,2; 2; 3 e 4:1, sendo que para esta última, os dados não foram apresentados devido à formação de uma borra extremamente espessa, sem possibilidade de homogeneização.

B- Saponificação do DDOS em Meio Alcoólico

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética e temperatura de 80°C, foram colocadas 100 g de DDOS e as quantidades selecionadas de NaOH (50% em água) e etanol comercial (96%). A quantidade de soda foi estipulada baseada na sua relação molar com o teor de AGT do DDOS. Foram testadas três relações: 1,2; 1,5 e 2:1. O volume de etanol foi fixado em 100 mL (para 100 g de DDOS), baseado em experiências realizadas anteriormente (EASTMAN KODAK Co., 1957, 1967).

Monitoramento da reação: O curso da reação foi monitorado pela determinação da classe de lipídios, em função do tempo. Para esta determinação, 1 mL da mistura foi dissolvido em hexano para se obter uma concentração aproximada em DDOS de 5%.

As determinação de tocoferóis foram realizadas em todos os ensaios, para verificar se ocorreram perdas destes compostos durante a reação de saponificação.

A melhor condição para a reação de saponificação, baseado no grau de saponificação dos mono-, di- e triglicerídios, foi utilizada como primeiro passo para a etapa seguinte, de acidificação.

5.2.2.3.2.2- Acidificação dos Sabões obtidos na Reação de Saponificação

Como o objetivo do trabalho foi a esterificação dos AGT presentes no DDOS, após a reação de saponificação, procedeu-se à acidificação, ou seja, transformação dos sabões formados em AGL. A quantidade de ácido sulfúrico (23%) utilizada foi baseada na relação molar estequiométrica da reação ($\frac{1}{2}$ mol H_2SO_4 para 1 mol sabão), com excesso molar de 50% sobre o total de sabões formados, considerando-se a saponificação completa do DDOS mais uma quantidade de ácido suficiente para neutralizar o excesso molar de soda presente no meio de reação. O peso molecular médio do ácido graxo é de 275,1 g/mol, obtido a partir da composição em ácidos graxos do DDOS e o do sabão formado é de 297,1 g/mol. A reação foi realizada no mesmo balão da saponificação: Em um balão com agitação magnética, foram

aquecidos sob refluxo por 40 minutos: 100g de DDOS, 100mL de etanol anidro, 19,6g de NaOH temperatura e (80°C). Em seguida, foram adicionados 85 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 23% (19,6 mL H₂SO₄ + 65,4 mL de água) e continuou-se o aquecimento com agitação, sob refluxo, por mais 30 minutos.

Após a acidificação, a mistura foi colocada em um funil de separação de 500 mL, onde foi descartada a fase inferior, mais pesada, composta principalmente por água, etanol, ácido sulfúrico e glicerol. A separação de fases foi imediata ao término da acidificação.

5.2.2.3.2.3- Otimização da Reação de Esterificação Química do DDOS Saponificado e Acidulado

Reação de Esterificação: A mistura oriunda da etapa de acidificação foi colocada em um balão de fundo redondo de 500 mL, com agitação magnética e adicionadas as quantidades selecionadas de etanol anidro e de catalisador ácido (ácido sulfúrico concentrado). A temperatura do banho de glicerol foi mantida a 80°C. A quantidade de etanol e de ácido sulfúrico foram baseadas na relação molar com o teor de AGT do DDOS e em relação ao peso do substrato (etanol + AGT), respectivamente.

- O procedimento experimental adotado para o monitoramento do curso das reações, as etapas da otimização do processo, a validação experimental do modelo estatístico obtido e a determinação do grau de esterificação dos mono-, di- e triglicerídios presentes no DDOS, foram idênticos aos realizados nas reações de esterificação enzimática do DDOS, descrito no tem 5.2.2.2.2.

Desenho Estatístico: Foi adotado um planejamento experimental semelhante ao utilizado na otimização da reação de esterificação enzimática do DDOS (Item 5.2.2.2.2), somente com alteração das variáveis independentes, que passam a ser: relação molar etanol:AGT (X_1); concentração de H₂SO₄ (%) (X_2) e tempo de reação (h) (X_3) (Tabela 17). O planejamento fatorial completo está apresentado na Tabela 18.

Tabela 17- Níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química dos ácidos graxos totais do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Variável Independente	Nível de Variação				
	-1,68*	-1	0	+1	+1,68*
Etanol:AGT (X ₁)	2	4	7	10	12
% H ₂ SO ₄ (X ₂)	0,4	0,6	1,0	1,4	1,6
Tempo (X ₃)	0,2	0,7	1,5	2,3	2,8

(*) $\pm \alpha = \pm (2^n)^{1/4} = \pm 1,68$ (KHURI & CORNELL, 1987)

X₁: relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos totais (AGT) no DDOS]; X₂: concentração de H₂SO₄ [% peso (AGT + etanol)]; X₃: tempo de reação (h)

Tabela 18- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo (CCRD) dos níveis de variação codificados das três variáveis independentes do processo de esterificação química dos ácidos graxos totais do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Ensaio ^a	Variável			Nível Codificado da Variável		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	4	0,6	0,7	-1	-1	-1
2	10	0,6	0,7	+1	-1	-1
3	4	1,4	0,7	-1	+1	-1
4	10	1,4	0,7	+1	+1	-1
5	4	0,6	2,3	-1	-1	+1
6	10	0,6	2,3	+1	-1	+1
7	4	1,4	2,3	-1	+1	+1
8	10	1,4	2,3	+1	+1	+1
9	7	1,0	1,5	0	0	0
10	7	1,0	1,5	0	0	0
11	7	1,0	1,5	0	0	0
12	2	1,0	1,5	-1,68	0	0
13	12	1,0	1,5	+1,68	0	0
14	7	0,4	1,5	0	-1,68	0
15 (C)	7	1,6	1,5	0	+1,68	0
16 (C)	7	1,0	0,2	0	0	-1,68
17 (C)	7	1,0	2,8	0	0	+1,68

(^a) ensaios realizados em ordem aleatória

X₁: relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos totais (AGT) no DDOS]; X₂: concentração de H₂SO₄ [% peso (AGT + etanol)]; X₃: tempo de reação (h)

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Caracterização do DDOS

As características químicas e de composição do DDOS e sua matéria insaponificável estão apresentadas nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19- Composição e características principais do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Composição	DDOS (% p/p)
Umidade	0,24 ± 0,02
Ácidos graxos livres (como oléico)	47,55 ± 0,03
Triglicerídios	5,61 ± 0,10
Diglicerídios	6,43 ± 0,15
Monoglicerídios	14,18 ± 0,09
Índice de saponificação (mg KOH/g amostra)	156,07 ± 0,21
Matéria insaponificável	26,23 ± 0,30
Ácidos graxos totais	67,32 ± 0,08
<i>Composição em ácidos graxos:</i>	
< C14	2,04 ± 0,10
C14:0	0,25 ± 0,12
C16:0	18,48 ± 0,05
C18:0	3,71 ± 0,03
C18:1	23,38 ± 0,09
C18:2	46,20 ± 0,10
C18:3	5,22 ± 0,13
C20:0	0,30 ± 0,05
C22:0	0,42 ± 0,07

Tabela 20- Composição da matéria insaponificável do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Composição	DDOS
Tocoferóis totais (%p/p)	8,55 ± 0,19
<i>Composição em tocoferóis: (%)</i>	
α-	18,83 ± 0,05
β-	2,57 ± 0,07
γ-	55,56 ± 0,03
δ-	23,04 ± 0,04
Esteróis principais totais (%p/p)	17,02 ± 0,15
<i>Composição em esteróis: (%)</i>	
campesterol	27,09 ± 0,05
estigmasterol	22,62 ± 0,08
β-sitosterol	50,29 ± 0,02

A análise da matéria insaponificável mostra a ocorrência de 8,55% de tocoferóis totais e 17,02% de esteróis, aqui considerados somente o β-sitosterol, campesterol e o estigmasterol, que são os encontrados em maiores concentrações. O teor dos tocoferóis totais encontrado (Tabela 20) (ANEXO 3), estão de acordo com resultados encontrados na literatura (AUGUSTO, 1988; CONTRERAS & BARATA, 1984). Observa-se que o γ-tocoferol representa mais de 55% do total, sendo o DDOS, mais importante como antioxidante do que como fonte de vitamina E (CHOW & DRAPER, 1974; BAUERNFIELD, 1980; YUKI, 1978; BOURGEOIS, 1992). Este resultado discorda com o encontrado pelos mesmos autores, que obtiveram maior concentração de δ-, em relação ao γ- tocoferol.

Em relação aos esteróis, o β-sitosterol, com atividade hipocolesterolêmica, representa mais de 50% do total, sendo este o composto mais importante utilizado (HEINEMANN *et al.*, 1993; LING & JONES, 1995; ANON, 1999). Os teores dos

esteróis totais e individuais obtidos são similares aos resultados encontrados por AUGUSTO (1988) (ANEXO 4).

Não foram encontrados dados relativos, aos teores de mono-, di- e triglicerídios, em literatura para efeito de comparação. Mas, a partir dos resultados encontrados (Tabela 19) (ANEXO 2), pode-se dizer que o processo de desodorização, que gerou a amostra analisada, poderia ser otimizado, pois o teor de triglicerídios encontrado (5,61%) está muito alto, indicando perdas elevadas no processo de refino do óleo. Analisando-se os teores de mono- (14,18%) e de diglicerídios (6,43%), pode-se concluir o mesmo que anteriormente, pois estes compostos foram originados da hidrólise dos triglicerídios, causada pela umidade (vapor) aliada às altas temperaturas utilizadas no processo.

O valor de acidez encontrado (47,55%) e a composição em ácidos graxos (ANEXO 1) estão de acordo com dados de literatura (WINTERS, 1990).

As características químicas e de composição indicam que o DDOS utilizado tem características adequadas, como matéria-prima na produção de extratos e concentrados de esteróis e/ou tocoferóis.

6.2- - Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS

6.2.1- Ensaio Preliminares

6.2.1.1- Reação de Esterificação Enzimática em Meio Orgânico

A Tabela 21 mostra os resultados comparativos entre reações de esterificação de DDOS por Lipozyme com e sem adição de éter de petróleo como solvente. Em todos os casos, o equilíbrio foi atingido em menos de 2 horas de reação. A partir dos resultados, conclui-se que não é necessária a utilização de solvente, pois o pequeno aumento da taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos (< 5%), ocasionado pelo uso de solvente no meio de reação, não justifica o aumento nos custos do processo. Não foram observadas perdas significativas de tocoferóis durante o curso das reações (< 2,6%). Não há estudos disponíveis na literatura sobre a utilização de

solventes orgânicos em reações de esterificação enzimática de destilados de desodorização, para efeito de comparação; porém, existem inúmeros trabalhos que mostram o aumento na eficiência das reações enzimáticas quando realizadas em meio orgânico (ISON, *et al.*, 1988; BLOOMER *et al.*, 1990; MITTELBAACH, 1990; RAMAMURTHI & McCURDY, 1994; ANON, 1995). Na continuidade deste trabalho, não será utilizado solvente orgânico no meio de reação.

Tabela 21- Efeito da adição de solvente orgânico na esterificação enzimática do DDOS (*)

Éter de Petróleo : DDOS (% v/p)	Taxa de conversão (%)
Sem solvente	77,8 ± 0,35
0,5 / 1	79,9 ± 0,46
1,0 / 1	81,2 ± 0,28
1,5 / 1	82,0 ± 0.32

(*) 100g DDOS + 47,1mL etanol (96%) + 10g Lipozyme + éter de petróleo, T = 60°C / 2h

6.2.2- Otimização da Reação de Esterificação Enzimática da Matéria Saponificável do DDOS

RAMAMURTHI *et al.* (1991) verificaram, no estudo da metanólise do destilado de desodorização de óleo de canola, que a umidade inicial da lipase (SP-382) é uma variável que não interfere significativamente na resposta (% de esterificação dos AGL). Resultado semelhante foi obtido por FACIOLI & GONÇALVES (1996) no estudo da interesterificação enzimática, com Lipozyme, do óleo de piqui com ácido esteárico. Neste trabalho, a enzima, como fornecida pelo fabricante, apresentou umidade de 2,61%, portanto, considerada adequada para os propósitos a que se destinou.

Como o teor de água do meio de reação é relativamente baixo, supõe-se que a reação predominante deva ser a esterificação dos AGL com etanol e não a hidrólise dos mono-, di- e triglicerídios. Portanto, a quantidade de etanol a ser utilizada nas reações de esterificação foi relacionada diretamente com o teor dos AGL, e não, com a dos ácidos graxos totais presentes no DDOS.

O delineamento experimental do planejamento fatorial completo da reação de esterificação enzimática da matéria saponificável do DDOS, incluindo a resposta Y (% conversão dos AGL em ésteres etílicos), para cada ensaio realizado, é apresentado na Tabela 22.

Na Tabela 22 também estão relacionadas as perdas de tocoferóis totais durante a reação de esterificação enzimática do DDOS nas diferentes condições. Durante as reações de esterificação, essas perdas ocorrem principalmente devido à oxidação, que alteram a estrutura molecular, tornando inviável a sua utilização como antioxidante. RAMAMURTHI & McCURDY (1993) verificaram que as perdas de tocoferóis durante a esterificação enzimática de vários destilados de desodorização com metanol foram inferiores a 7%. Nas condições testadas neste trabalho, estas perdas foram sempre inferiores a 4%. Também pode ser verificado que as perdas dos tocoferóis estão relacionadas com a temperatura do processo (X_1), ou seja, quanto maior a temperatura, maior foi a perda de tocoferóis.

A análise estatística dos ensaios foi realizada em três etapas:

No primeiro passo, verificou-se a significância estatística e o efeito das variáveis independentes estudadas, sobre a resposta Y (% conversão) e delineou-se a região (faixa) de trabalho para cada variável. Nesta análise, verificou-se se, tanto as variáveis selecionadas para estudo, como sua faixa de variação, foram adequadas. Para tal, empregou-se um planejamento fatorial incompleto (2^n), utilizando a faixa de variação para as variáveis independentes de -1 a +1, constante da Tabela 13, sem utilização dos pontos centrais (0, 0, 0) e dos pontos axiais (-1,68 e +1,68), correspondendo aos ensaios de 1 a 8 da Tabela 22. Os efeitos estimados das variáveis estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 22- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo (CCRD) dos níveis codificados das três variáveis do processo de esterificação enzimática do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Ensaio ^a	Nível Codificado da Variável			Conversão (Y) (%) ^b	Perda Tocoferol Total (%)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	65,6 ± 0,41	0,70 ± 0,15
2	+1	-1	-1	65,1 ± 0,50	3,60 ± 0,09
3	-1	+1	-1	65,0 ± 0,47	1,95 ± 0,10
4	+1	+1	-1	68,2 ± 0,34	3,45 ± 0,05
5	-1	-1	+1	83,3 ± 0,60	1,15 ± 0,23
6	+1	-1	+1	62,5 ± 0,25	3,10 ± 0,18
7	-1	+1	+1	85,9 ± 0,04	1,12 ± 0,16
8	+1	+1	+1	69,3 ± 0,07	3,50 ± 0,31
9	0	0	0	93,4 ± 0,38	2,40 ± 0,17
10	0	0	0	93,6 ± 0,46	2,70 ± 0,04
11	0	0	0	93,1 ± 0,56	2,85 ± 0,11
12	-1,68	0	0	88,4 ± 0,09	0,70 ± 0,16
13	+1,68	0	0	69,0 ± 0,14	3,98 ± 0,20
14	0	-1,68	0	82,3 ± 0,45	2,08 ± 0,18
15 (C)	0	+1,68	0	91,6 ± 0,73	2,20 ± 0,09
16 (C)	0	0	-1,68	41,7 ± 0,88	2,47 ± 0,13
17 (C)	0	0	+1,68	64,8 ± 0,09	2,35 ± 0,17

(^a) ensaios realizados em ordem aleatória.

(^b) % conversão (média de três determinações ± desvio padrão) = (valor ácido inicial DDOS – valor ácido da mistura de reação no tempo t) x 100 / valor ácido inicial DDOS

X₁: temperatura, (°C); X₂: concentração de enzima {% peso [ácidos graxos livres (AGL) + etanol]}; X₃: relação molar do substrato (etanol:AGL no DDOS)

Tabela 23- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão de ácidos graxos a ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto ($p < 0,05$)

Variável	Efeito	Erro padrão	Nível descritivo (p)
Média	70,6	0,062	0,0005
(1) Temperatura (X_1)	-8,68	0,125	0,0092
(2) Enzima (X_2)	2,98	0,125	0,0267
(3) Etanol/AGL (X_3)	9,28	0,125	0,0086
1 by 2	1,98	0,125	0,0402
1 by 3	-10,0	0,125	0,0079
2 by 3	1,72	0,125	0,0460

X_1 : temperatura, ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : concentração de enzima [% peso [ácidos graxos livres (AGL) + etanol]]; X_3 : relação molar do substrato (etanol:AGL no DDOS)

Na Tabela 23, verifica-se que as variáveis escolhidas, temperatura de reação, concentração de enzima e relação molar dos substratos, são estatisticamente significativas ($p < 0,05$), ou seja, têm efeito significativo sobre a resposta Y em um nível de significância de 95%. Podemos observar também que, aumentando-se a temperatura de 38 para 62°C (em níveis codificados, de -1 para +1,) houve redução (efeito negativo) na taxa de conversão de 8,68%, podendo indicar uma inativação térmica parcial da enzima. O aumento da concentração de Lipozyme de 10,2 para 19,8% e da relação molar etanol:AGL de 1 para 3:1 (em níveis codificados, de -1 para +1), resultaram em um aumento (efeitos positivos) na taxa de conversão, de 2,98% e de 9,28%, respectivamente. Observamos que a variável que exerce o menor efeito, mas estatisticamente significativa, sobre a resposta Y é a concentração de Lipozyme. Estes resultados são válidos para a faixa de variação de cada variável independente estudada.

O segundo passo foi verificar se um modelo de 1ª ordem, em função das variáveis independentes, se ajustava às respostas experimentais obtidas. Para tal, incluíram-se os três pontos centrais no planejamento fatorial anterior, representados pelos ensaios de 9 a 11 constantes da Tabela 22. A Tabela 24 mostra os resultados da análise dos efeitos estimados das variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos para um modelo de 1ª ordem. Foi obtido um percentual de variação explicada em torno da média (R^2) de 32,9%, indicando alta variabilidade ($R^2 \leq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996), significando que 67,1% da variação total em torno da média foi devido aos resíduos deixados pelo modelo, valor muito alto. Conseqüentemente, o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e as previstas pelo modelo foi extremamente baixo ($R = 0,57$), indicando que somente 57% das respostas experimentais se ajustam ao modelo de 1ª ordem. Podemos verificar também que, todas as variáveis não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Portanto, um modelo de 1ª ordem não se ajustou bem aos resultados experimentais obtidos, ou seja, não temvesignificância estatística.

O terceiro passo foi verificar o ajuste de um modelo estatístico de 2ª ordem aos resultados experimentais. Para tal, foram incluídos os pontos axiais no planejamento realizado para o modelo de 1ª ordem, obtendo-se um planejamento fatorial completo (Tabela 22). Para estudo dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes [temperatura de reação (X_1), concentração de enzima (X_2) e relação molar etanol:AGL (X_3)] na resposta Y (% conversão de AGL a ésteres etílicos) e otimização dos resultados foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (RSM), obtida através do planejamento fatorial completo, usando um CCRD com as três variáveis independentes, o que incluiu 8 pontos fatoriais, 3 pontos centrais (replicatas) e 6 pontos axiais (BARROS *et al.*, 1996; KHURI & CORNELL, 1987).

Tabela 24- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres a ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto (*)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)
Média	76,8	5,067	0,0001
(1) Temperatura (X_1)	-8,68	11,88	0,5058
(2) Enzima (X_2)	2,98	11,88	0,8146
(3) Etanol/AGL (X_3)	9,28	11,88	0,4787
1 by 2	1,98	11,88	0,8760
1 by 3	-10,0	11,88	0,4464
2 by 3	1,72	11,88	0,8916

(*) modelo de 1ª ordem, $p < 0,05$, $R^2 = 32,9\%$

X_1 : temperatura, (°C); X_2 : concentração de enzima [% peso [ácidos graxos livres (AGL) + etanol]]; X_3 : relação molar do substrato (etanol:AGL no DDOS)

Na Tabela 25, encontra-se a análise dos efeitos estimados significativos das variáveis independentes (temperatura, concentração de enzima e razão molar etanol/AGL) sobre a resposta Y (rendimento em ésteres etílicos), para um modelo de 2ª ordem.

Verifica-se que todas as variáveis, como termos lineares, quadráticos e de interação, foram estatisticamente significativas nas faixas estudadas, ou seja, tiveram efeito significativo sobre a resposta Y. As variáveis que tiveram efeito linear positivo sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos foram: concentração de Lipozyme e relação molar etanol/AGL. Somente a temperatura exerceu um efeito linear negativo sobre a resposta Y, em um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Apesar de estatisticamente significativa ($p < 0,05$), a variável que exerceu menor

efeito sobre a resposta (4,03) foi a concentração de Lipozyme, na faixa de concentração de 7 a 23%. Isso significa que, para um mesmo aumento ou redução desta variável, comparativamente às outras, obtém-se uma menor variação (efeito) na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos.

Tabela 25- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres a ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)	Coefficiente Regressão
Média	93,4	0,145	0,0	93,4
(1) Temperatura (L)	-9,86	0,136	0,0002	-4,93
(2) Enzima (L)	4,03	0,150	0,0011	2,02
(3) Etanol/AGL (L)	11,1	0,136	0,0002	5,56
Temperatura (Q)	-10,9	0,150	0,0002	-5,43
Enzima (Q)	-5,03	0,138	0,0009	-2,52
Etanol/AGL (Q)	-28,9	0,150	0,0	-14,4
1L com 2L	1,98	0,178	0,0080	0,98
1L com 3L	-10,0	0,178	0,0003	-5,01
2L com 3L	1,72	0,178	0,0104	0,86

(*) modelo de 2ª ordem, $p < 0,05$, $R^2 = 99,0\%$ e erro puro = 0,06

Com os resultados dos coeficientes de regressão (Tabela 25), chegou-se à equação polinomial de segunda ordem codificada (modelo codificado), dada por:

$$Y = 93,4 - 4,93X_1 + 2,02X_2 + 5,56X_3 - 5,43X_1^2 - 2,52X_2^2 - 14,4X_3^2 + 0,98X_1X_2 - 5,01X_1X_3 + 0,86 X_2X_3 + 0,06 \quad [2]$$

As análises estatísticas, ou validação teórica do modelo matemático proposto, foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) para a resposta Y (Tabela 26).

Tabela 26- Análise de variância (ANOVA) da resposta taxa de conversão dos ácidos graxos livres a ésteres etílicos, no processo de esterificação enzimática do DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste "F"
Regressão	3.441	9	382,3	81,58
Residual	32,80	7	4,686	0,718
Falta Ajuste	32,67	5	6,534	
Erro Puro	0,127	2	0,064	
TOTAL	3.474	16	217,1	

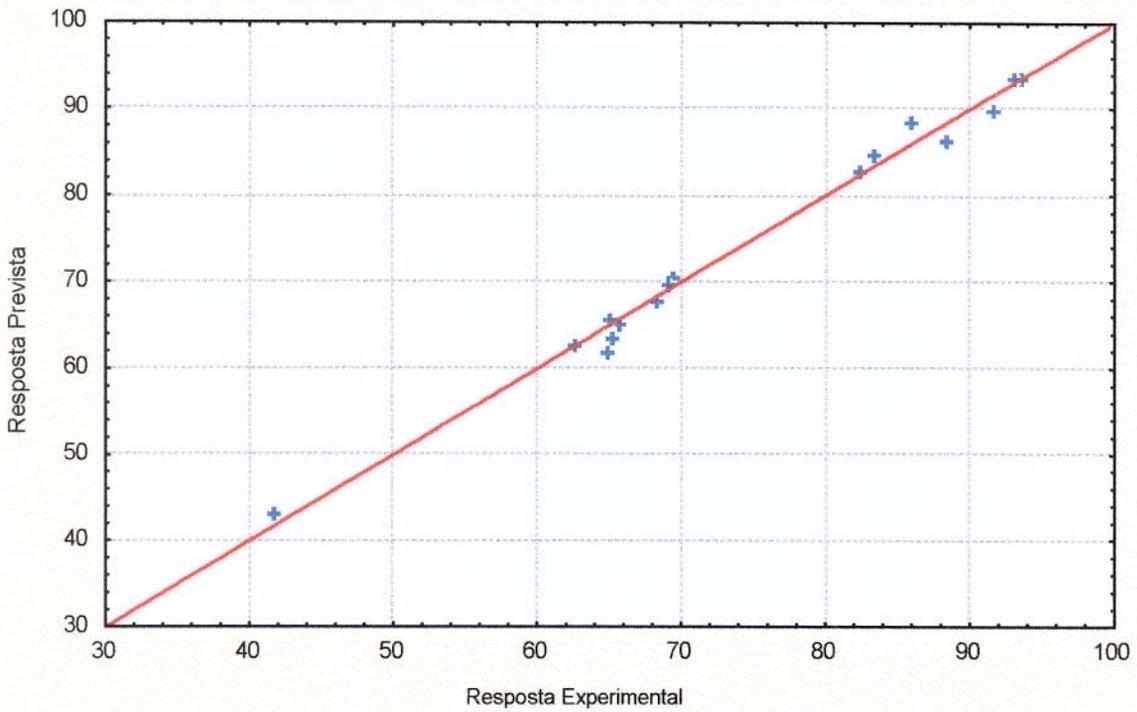
(*) modelo de 2ª ordem, $p < 0,05$ e $R^2 = 99\%$

Na Tabela 26, observa-se uma excelente reprodutibilidade dos resultados, uma vez que o erro puro (experimental) foi muito baixo (0,127), representando aproximadamente 0,004% do total da fonte de variação. A porcentagem de variação explicada em torno da média ($R^2 = 99$) foi alta, indicando uma baixa variabilidade ($R^2 \geq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996) e fornecendo um coeficiente de correlação de 0,99 entre as respostas obtidas experimentalmente e os valores previstos pelo modelo de 2ª ordem, indicando uma excelente correlação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo, dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A significância do modelo foi estudada através do Teste "F", a partir do qual, verificou-se que a equação de regressão foi estatisticamente significativa e preditiva, pois o "F" calculado (MQ_R / MQ_f (81,58) foi 22 vezes maior que o valor de "F" tabelado ($F_{0,95; 9; 7} = 3,68$), ou seja, os dados experimentais são representados pelo modelo matemático proposto. Os resíduos (falta de ajuste + erro puro) (32,8) são explicados

quase que exclusivamente pela falta de ajuste do modelo, já que o erro puro é extremamente baixo, e que representa aproximadamente 0,94% do total da fonte de variação. Fato que pode ser constatado através do teste "F", pois o "F" calculado (MQ_r / MQ_{raj}) (0,718) é menor que o "F" tabelado ($F_{0.95; 7; 5} = 4,88$). No gráfico 1, pode-se verificar o quanto o modelo de 2ª ordem é preditivo, pois tem-se representado os valores das respostas obtidas experimentalmente e os valores correspondentes às previstas pelo modelo determinado. Pela distribuição dos pontos, pode-se ratificar o teste "F", ou seja, o modelo é realmente preditivo e poderá ser utilizado para prever taxas de conversão de AGL presentes no DDOS em ésteres etílicos, através da reação de esterificação enzimática, com outros valores para as variáveis independentes, mas dentro das faixas aqui estudadas e também para matérias-primas (DDOS) com diferentes teores em AGL.

A otimização das condições de reação foi obtida através da análise das superfícies ajustadas do modelo (RSM). Os efeitos da temperatura de reação, concentração de Lipozyme e relação molar etanol:AGL sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos podem ser visualizados nas Figuras 4-6. As superfícies ajustadas e seus respectivos gráficos de contornos (superfície rebatida) foram construídos fixando-se uma das variáveis no ponto central e variando-se as outras duas, ratificando os resultados estatísticos apresentados na Tabela 25.

Gráfico 1- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação enzimática do DDOS



Temperatura. Considera-se que a Lipozyme utilizada neste estudo teve um bom desempenho na faixa de temperatura entre 30 e 70°C, sendo influenciada por outros fatores, tais como concentração da enzima, viscosidade e umidade do meio de reação, tipo e quantidades relativas do substrato (EIGTVED *et al.*, 1986). Na Tabela 25, pode-se observar o efeito linear significativo ($p < 0,05$) negativo que a temperatura exerce sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos (-9,86), mostrando que um aumento na temperatura de reação causou um decréscimo na taxa de conversão. Seu efeito de interação com a concentração de enzima pode ser evidenciado na Figura 4. Mantendo-se fixa a relação molar etanol:AGL em 2:1, encontra-se três regiões em que houve um decréscimo na taxa de conversão: a) em temperaturas baixas (30 – 34,5°C), o que, na prática, pode ser explicado, devido ao aumento excessivo da viscosidade do meio de reação dificultando o contato do

substrato com a lipase, b) em temperaturas altas (56 – 70°C), provavelmente devido ao processo de inativação enzimática causado por temperaturas elevadas e c) em concentrações de Lipozyme inferiores a 10,2%. Portanto, conclui-se que taxas de conversão acima de 90,1% foram obtidas para concentrações de Lipozyme de 10,2 a 23%, relação molar etanol:AGL de 2:1, e temperatura de 34,5 a 56,0°C.

Na Figura 5, observa-se o efeito de interação da temperatura com o substrato. Fixada a concentração de Lipozyme em 15%, observa-se um decréscimo da taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos em três regiões: a) em temperaturas altas, na faixa de 58 a 70°C, devido à inativação enzimática, b) em altas concentrações de etanol, de 3,1 a 3,7:1, devido à desidratação parcial da enzima causado pelo efeito hidrofílico do álcool em excesso no meio de reação e c) com baixa relação molar etanol:AGL, na faixa de 0,3 a 1,5:1, influenciando a reação de duas formas distintas: a) não tendo substrato suficiente no meio de reação para completar a conversão (0,3:1) e b) para redução da viscosidade do meio, facilitando o contato da lipase com o substrato. Portanto, as melhores taxas de conversão (acima de 86,3%) foram obtidas com temperatura na faixa de 30 a 58°C, concentração de Lipozyme de 15% e relação molar etanol:AGL de 1,5 a 3,1:1. Os efeitos significativos de interação da temperatura com a concentração de enzima (1 com 2) (1,98) e com os substratos (1 com 3) (-10,0) observados na Tabela 25, foram confirmados pelas superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, onde também pode ser evidenciado o maior efeito de interação da temperatura com os substratos através da maior amplitude de variação encontrada para a taxa de conversão, de 2,04 a 86,3% (Figura 5), em comparação com a faixa de variação observada em relação à concentração de enzima, de 48,4 a 90,1% (Figura 4) (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

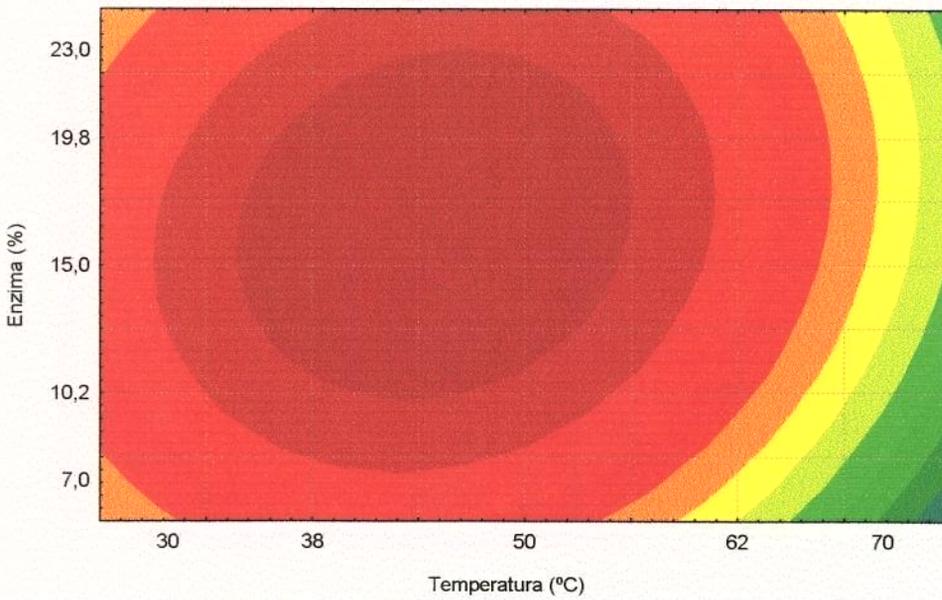
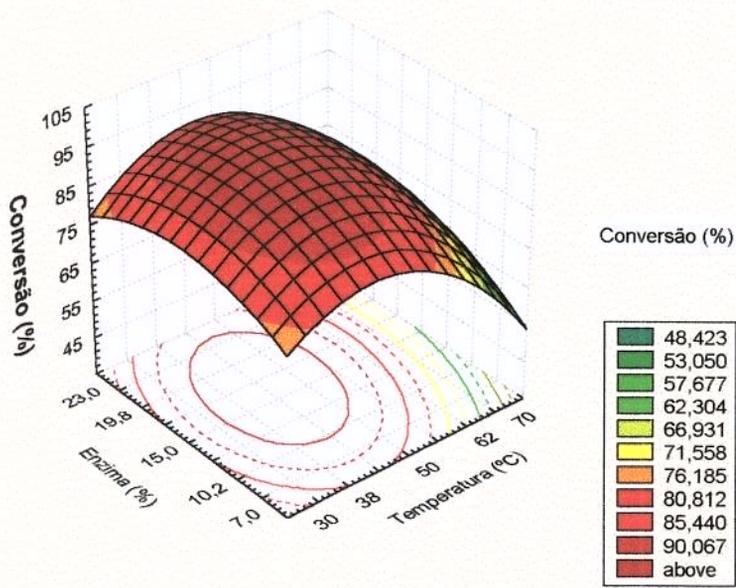


Figura 4- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da temperatura e da concentração de Lipozyme sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres do DDOS em ésteres etílicos

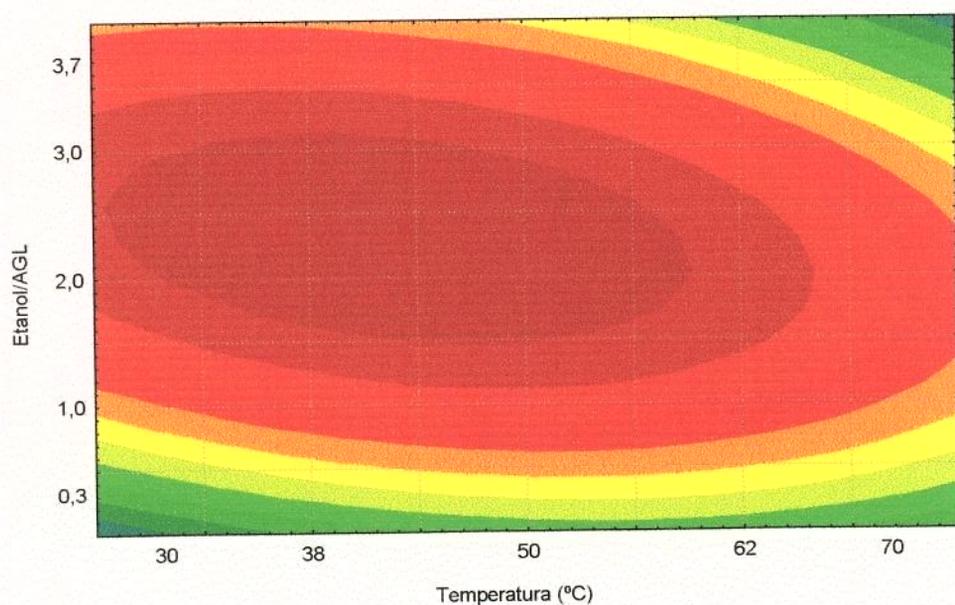
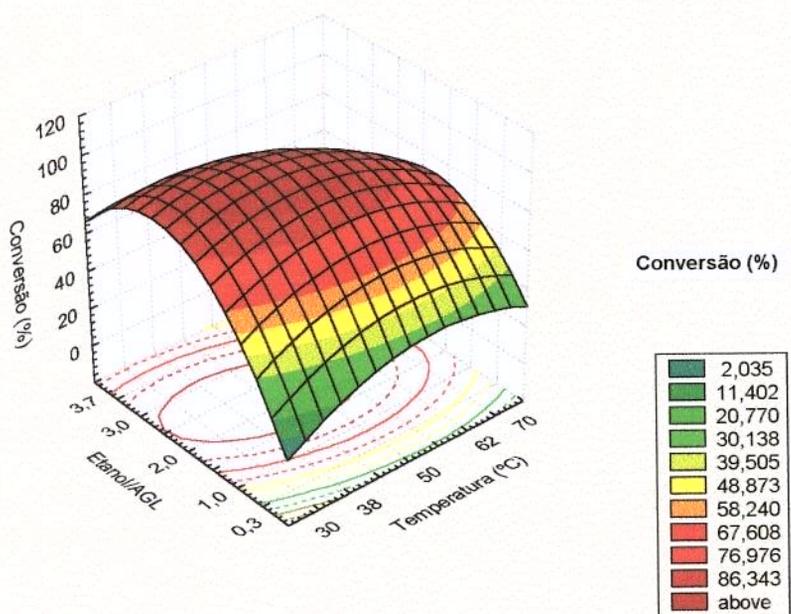


Figura 5- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da temperatura e da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos

Concentração de enzima. Para reações de esterificação, um melhor desempenho da Lipozyme é obtido em concentrações na faixa de 5 a 10% em relação ao peso dos substratos (EIGTVED, *et al.*, 1986). Na Figura 6, observa-se que, para uma temperatura de reação fixada em 50°C, encontrou-se menores taxas de conversão em três regiões: a) com baixas concentrações de Lipozyme, de 7,0 a 9,3%, b) para relações molares etanol:AGL nas faixas de 0,3 a 1,5 e 2,9 a 3,7:1, mesmo efeito encontrado na interação da temperatura com a relação dos substratos (Figura 4). Portanto, as melhores taxas de conversão dos AGL a ésteres etílicos (acima de 87%) foram obtidas com relações molares etanol:AGL entre 1,5 e 2,9:1, temperatura de 50°C e concentração de Lipozyme de 9,3 a 23%. Na Tabela 25, pode ser observado um menor efeito de interação da concentração de enzima com os substratos (2 com 3) (1,73), comparado com a temperatura (1 com 2) (1,98), comprovado através das superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, onde uma menor faixa de variação da taxa de conversão em relação aos substratos, de 21,2 a 87,0% (Figura 6), em comparação com a faixa de variação observada em relação à temperatura, de 48,4 a 90,1 (Figura 4), (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Relação dos substratos. Um excesso molar de álcool em relação aos AGL do DDOS foi necessário para se obterem taxas de conversão (esterificação) adequadas. Em estudos preliminares verificou-se que um aumento na razão molar etanol:AGL de 1 para 3:1, resultou em um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de 9,28% (Tabela 23) na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos. Na Figura 6, comprovou-se a inativação parcial enzimática causada pelo efeito hidrofílico do solvente (etanol), por desidratação parcial da enzima, para concentrações de etanol:AGL acima de 2,9:1. O mesmo efeito foi relatado por RAMAMURTHI *et al.* (1991), quando estudou a metilação enzimática de um destilado de canola. As interações com a concentração de Lipozyme e com a temperatura já foram relatadas anteriormente. A faixa da relação molar etanol:AGL onde encontra-se as melhores taxas de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos foi de 1,5 a 2,9:1. Na Tabela 25, pode-se observar um maior efeito de interação (negativo) entre os

substratos e a temperatura (1 com 3) (-10,0), quando comparado com a sua interação com a lipase (2 com 3) (1,72). Fato comprovado através das superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, onde encontramos uma faixa mais ampla de variação da taxa de conversão em relação à temperatura, de 2,04 a 86,3% (Figura 5), comparado à faixa de variação observada em relação à enzima, de 21,2 a 87,0% (Figura 6), (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Pode-se afirmar que os efeitos combinados da temperatura e da relação molar etanol/AGL são vitais para estabelecer tanto a cinética, como para determinar o equilíbrio da reação de esterificação enzimática de conversão dos AGL em ésteres etílicos (Tabela 23).

A determinação da região ótima da reação de esterificação enzimática do DDOS com etanol (96%) é feita através da intersecção dos três mapas de contorno, donde se conclui que a região ótima da reação de esterificação estudada, em valores codificados, é: temperatura de 44 a 56°C; concentração de Lipozyme de 12,6 a 17,4% e etanol:AGL de 1,5 a 2,5:1, obtendo-se taxas de conversão de 85,7% e 88,4%, respectivamente, através da equação [2]. As perdas de esteróis nas condições otimizadas foram inferiores a 5,4%. RAMAMURTHI & McCURDY (1993) esterificaram os AGL de destilados de desodorização dos óleos de soja e canola com metanol, obtendo taxas de conversão de 89,4% e 96,5% respectivamente.

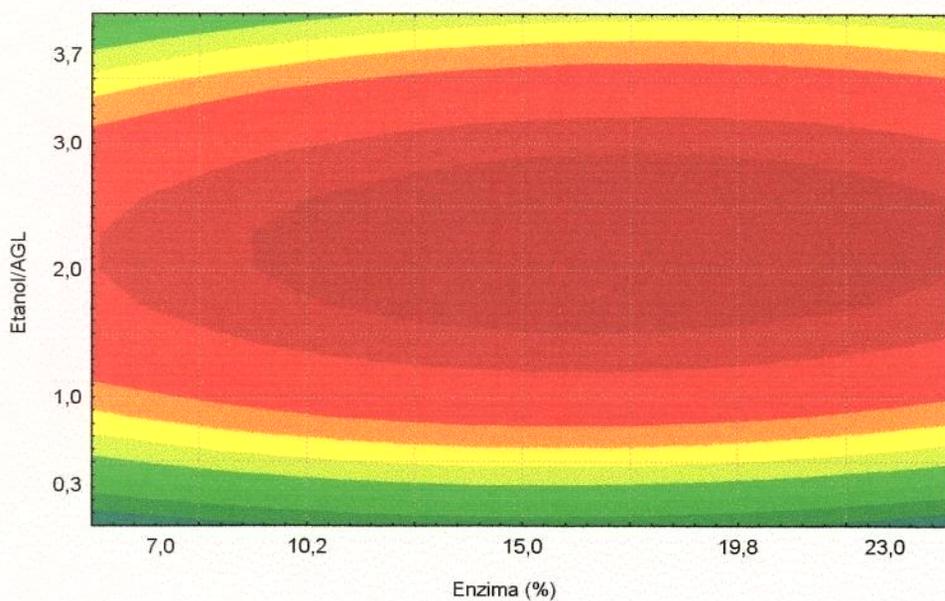
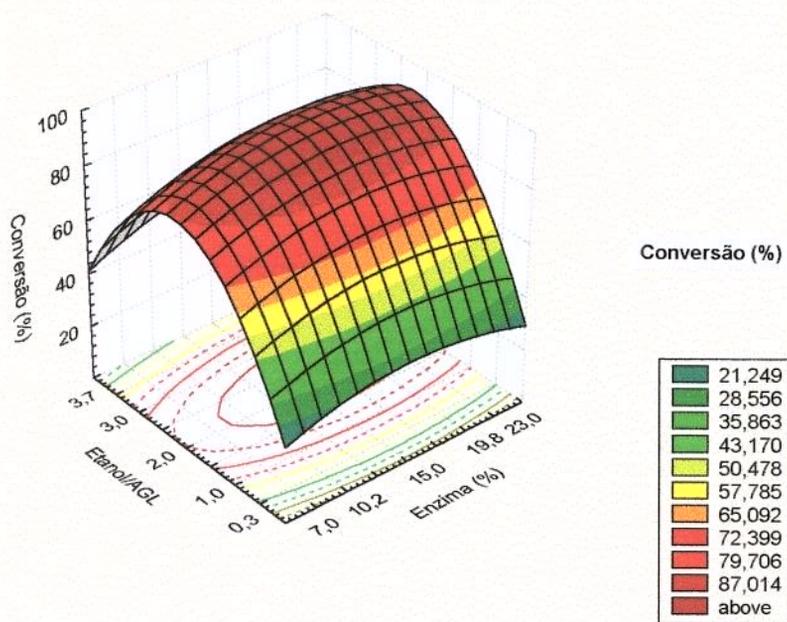


Figura 6- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de Lipozyme e da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos

6.2.3- Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Enzimática do DDOS

A validação prática do modelo experimental obtido foi realizada utilizando-se as condições ótimas extremas da faixa encontrada (-0,5 e +0,5). Com os valores de: temperatura = 44°C; Lipozyme = 12,6% e etanol:AGL = 1,5:1, obteve-se uma taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos de 88,2%; já para o outro extremo, com os valores de : temperatura=56°C; Lipozyme=17,4% e etanol/AGL=2,5/1, obteve-se uma taxa de conversão de 90,1%. Comparando-se os resultados das taxas de conversão obtidas através do modelo matemático codificado (85,8 e 88,4%), com os valores obtidos experimentalmente (88,2 e 90,1%), ratifica-se a conclusão teórica, mencionada anteriormente, de que o modelo proposto realmente é preditivo.

6.2.4- Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS

Após a determinação das faixas ótimas do processo de esterificação enzimática do DDOS, foi verificado o aporte de ésteres etílicos resultantes dos mono-di- e triglicerídios. Foram observadas pequenas mudanças nos teores destes componentes durante o processo, como mostrado na Tabela 27. Apesar dos triglicerídios terem sofrido uma redução de aproximadamente 41%, não representam um aporte significativo de ácidos graxos para formação de ésteres.

Tabela 27- Variação dos mono-, di- e triglicerídios do DDOS, após a reação de esterificação enzimática no ponto ótimo econômico do processo(*)

Componentes	DDOS (% p/p)	Após esterificação (% p/p)
Monoglicerídios	14,18 ± 0,09	14,01 ± 0,13
Diglicerídios	6,43 ± 0,15	6,04 ± 0,16
Triglicerídios	5,61 ± 0,10	3,26 ± 0,18

(*) temperatura de 44°C, relação molar etanol:AGL de 1,5:1, concentração de Lipozyme de 12,6% e tempo de reação de 2h

6.3- Esterificação Química da Matéria Saponificável do DDOS

6.3.1- Esterificação Química Direta do DDOS

6.3.1.1- Otimização da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS

O delineamento experimental do planejamento fatorial completo da reação de esterificação química direta da matéria saponificável do DDOS, incluindo a resposta Y (% conversão dos AGL a ésteres etílicos) para cada ensaio realizado, estão apresentados na Tabela 28.

Também neste processo, supõe-se que a reação predominante deva ser a esterificação dos AGL com etanol, pois a temperatura utilizada foi de 80°C e à pressão ambiente. Para ocorrer a clivagem dos mono-, di- e triglicerídios, seriam necessárias condições mais drásticas de reação. Portanto, a quantidade de etanol utilizada nas reações foi relacionada com o teor dos AGL e não com a dos ácidos graxos totais presentes no DDOS.

Tabela 28- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do processo de esterificação química direta DDOS

Ensaio ^a	Nível codificado da variável			Conversão (Y) (%) ^b	Perda Tocoferol total (%)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	63,6 ± 0,87	0,53 ± 0,04
2	+1	-1	-1	65,1 ± 0,46	2,74 ± 0,09
3	-1	+1	-1	69,9 ± 0,10	1,04 ± 0,10
4	+1	+1	-1	64,7 ± 0,47	2,38 ± 0,17
5	-1	-1	+1	78,8 ± 0,08	0,95 ± 0,24
6	+1	-1	+1	83,4 ± 0,27	2,53 ± 0,19
7	-1	+1	+1	87,8 ± 0,35	1,05 ± 0,20
8	+1	+1	+1	91,9 ± 0,51	3,02 ± 0,18
9	0	0	0	93,9 ± 0,09	2,05 ± 0,08
10	0	0	0	92,5 ± 0,72	1,91 ± 0,11
11	0	0	0	94,2 ± 0,15	1,87 ± 0,23
12	-1,68	0	0	81,4 ± 0,57	0,73 ± 0,15
13	+1,68	0	0	93,3 ± 0,39	3,45 ± 0,18
14	0	-1,68	0	75,0 ± 0,06	2,03 ± 0,14
15 (C)	0	+1,68	0	92,8 ± 0,61	1,68 ± 0,20
16 (C)	0	0	-1,68	45,6 ± 0,48	1,82 ± 0,13
17 (C)	0	0	+1,68	94,1 ± 0,42	1,77 ± 0,12

(^a) ensaios realizados em ordem aleatória

(^b) % conversão (média de três determinações ± desvio padrão) = (valor ácido inicial DDOS – valor ácido da mistura de reação no tempo t) x 100 / valor ácido inicial DDOS.

X₁: tempo de reação (h); X₂: concentração de H₂SO₄ [% peso (AGL + etanol)]; X₃: relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos livres (AGL) no DDOS]

Na Tabela 28 também estão relacionadas as perdas de tocoferóis totais durante a reação de esterificação química direta do DDOS nas diferentes condições. Nas condições testadas neste trabalho, estas perdas foram sempre inferiores a 3,5%. Podemos também verificar que as perdas ocorreram em função do tempo de reação, ou seja, quanto maior foi o tempo de exposição dos tocoferóis a 80°C (temperatura do processo), maiores foram as perdas obtidas.

A análise estatística dos ensaios foi realizada em três etapas:

No primeiro passo, verificou-se a significância estatística e o efeito das variáveis independentes a serem estudadas, sobre a resposta Y (% conversão) e foi encontrada a região (faixa) de trabalho adequada para cada variável. Para tal, empregou-se um planejamento fatorial incompleto (2^n), utilizando a faixa de variação para as variáveis independentes de -1 a +1, constante da Tabela 15, sem utilização dos pontos centrais e dos pontos axiais (-1,68 e +1,68), correspondendo aos ensaios de 1 a 8 da Tabela 28. Os efeitos estimados das variáveis estão apresentados na Tabela 29.

Na Tabela 29, verifica-se que as variáveis independentes selecionadas: tempo de reação, concentração de H_2SO_4 e relação molar etanol:AGL, foram estatisticamente significativas para $p < 0,05$, ou seja, tiveram efeito significativo sobre a resposta Y (taxa de conversão dos AGL presentes no DDOS em ésteres etílicos), a um nível de significância de 95%. Quando os níveis (codificados) das variáveis independentes foram alterados de -1 para +1, observou-se que, em todos os casos, houve um aumento na taxa de conversão (efeitos positivos), ou seja, aumentando-se o tempo de reação de 0,7 para 2,3 horas, a concentração de H_2SO_4 de 0,6 para 1,4% e a relação molar etanol:AGL de 4 para 10:1, resultaram em aumentos na taxa de conversão de 1,25%, 5,85% e de 19,6%, respectivamente. Apesar do tempo de reação ter sido a variável que teve o menor efeito sobre a resposta, este efeito é estatisticamente significativo. A relação molar etanol:AGL foi a variável que exerceu maior efeito sobre a conversão dos AGL em ésteres etílicos. Estes resultados são válidos para a faixa de variação de cada variável independente estudada.

Tabela 29- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão de ácidos graxos a ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto ($p < 0,05$)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)
Média	75,6	0,78	0,0065
(1) Tempo (X_1)	1,25	1,55	0,0468
(2) % H_2SO_4 (X_2)	5,85	1,55	0,0164
(3) Etanol/AGL (X_3)	19,6	1,55	0,0045
1 by 2	-1,80	1,55	0,0045
1 by 3	3,10	1,55	0,0295
2 by 3	2,90	1,55	0,0312

X_1 : tempo de reação (h); X_2 : concentração de H_2SO_4 [% peso (AGL + etanol)]; X_3 : relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos livres (AGL) no DDOS]

O segundo passo foi verificar se um modelo de 1ª ordem, em função das variáveis independentes, se ajustava às respostas experimentais obtidas. Para tal, incluíram-se os três pontos centrais no planejamento fatorial anterior, representados pelos ensaios de 9 a 11 constantes da Tabela 28. Foi obtido um percentual de variação explicada em torno da média (R^2) de 55,7%, indicando alta variabilidade ($R^2 \leq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996), significando que 44,3% da variação total em torno da média foi devido aos resíduos deixados pelo modelo, valor muito alto. Conseqüentemente, o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e as previstas pelo modelo foi extremamente baixo ($R = 0,75$), indicando que somente 75% das respostas experimentais se ajustaram ao modelo de 1ª ordem (Tabela 30). Portanto, um modelo de 1ª ordem não se ajustou bem aos resultados experimentais obtidos, ou seja, não tem significância estatística.

Tabela 30- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto (*)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)
Média	80,5	0,27	0,0
(1) Tempo (X_1)	1,25	0,64	0,0190
(2) % H_2SO_4 (X_2)	5,85	0,64	0,0118
(3) Etanol/AGL (X_3)	19,6	0,64	0,0010
1 by 2	-1,8	0,64	0,0107
1 by 3	3,10	0,64	0,0402
2 by 3	2,90	0,64	0,0456

(*) modelo de 1ª ordem, $p < 0,05$ e $R^2 = 55,7\%$

X_1 : tempo de reação (h); X_2 : concentração de H_2SO_4 [% peso (AGL + etanol)]; X_3 : relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos livres (AGL) no DDOS]

O terceiro passo foi verificar o ajuste dos resultados experimentais em um modelo estatístico de 2ª ordem. Para tal, foram incluídos os pontos axiais no planejamento realizado para o modelo de 1ª ordem, obtendo-se um planejamento fatorial completo (Tabela 28). Para estudo dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes [tempo de reação (X_1), concentração de H_2SO_4 (X_2) e relação molar etanol:AGL (X_3)] na resposta Y (% conversão dos AGL em ésteres etílicos) e otimização dos resultados, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (RSM), obtida através do planejamento fatorial completo, usando um CCRD com as três variáveis independentes, o que inclui 8 pontos fatoriais, 3 pontos centrais (replicatas) e 6 pontos axiais (BARROS *et al.*, 1996; KHURI & CORNELL, 1987).

Na Tabela 31, encontra-se a análise dos efeitos estimados significativos das

variáveis independentes (tempo de reação, concentração de H_2SO_4 e relação molar etanol:AGL) sobre a resposta Y (taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos), para um modelo de 2ª ordem.

Tabela 31- Análise dos efeitos estimados significativos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

Variável	Efeito	Nível descritivo (p)	Coefficiente Regressão
Média	93,8	0,0	93,8
(1) Tempo (L)	3,66	0,0174	1,83
(2) H_2SO_4 (L)	7,81	0,0039	3,90
(3) Etanol/AGL (L)	23,4	0,0004	11,7
Tempo (Q)	-6,11	0,0077	-3,06
H_2SO_4 (Q)	-8,55	0,0040	-4,28
Etanol/AGL (Q)	-18,4	0,0008	-9,24
1L com 3L	3,10	0,0402	1,55
2L com 3L	2,90	0,0456	1,45

(*) modelo de 2ª ordem, $p < 0,05$, $R^2 = 94,6\%$ e erro puro = 0,82

Após a seleção do modelo (2ª ordem), foi excluído da análise o único termo não significativo ($p > 0,05$), o efeito de interação do tempo de reação com a concentração de H_2SO_4 . Como consequência, a variação explicada em torno da média sofreu uma pequena redução, de 94,8 para 94,6%, restando somente os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Verifica-se que todos os termos lineares tiveram efeito significativo positivo sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos: tempo de reação (3,66), concentração de H_2SO_4 (7,81) e relação molar etanol:AGL (23,4). Apesar de significativa, a variável que exerceu menor efeito

sobre a resposta continuou sendo o tempo de reação, na faixa testada (0,2 – 2,8), ou seja, o seu aumento ou redução foi o que exerce uma menor variação (efeito) na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos, comparativamente às outras variáveis independentes.

Com os resultados dos coeficientes de regressão (Tabela 31), chegou-se à equação polinomial de segunda ordem codificada (modelo codificado), dada pela equação 3:

$$Y = 93,8 + 1,83X_1 + 3,90X_2 + 11,7X_3 - 3,06 X_1^2 - 4,28X_2^2 - 9,24X_3^2 + 1,55X_1X_3 + 1,45X_2X_3 + 0,82 \quad [3]$$

A validação teórica do modelo encontrado foi realizada através da análise de variância (ANOVA) para a resposta Y (Tabela 32).

Tabela 32- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos, no processo de esterificação química direta do DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

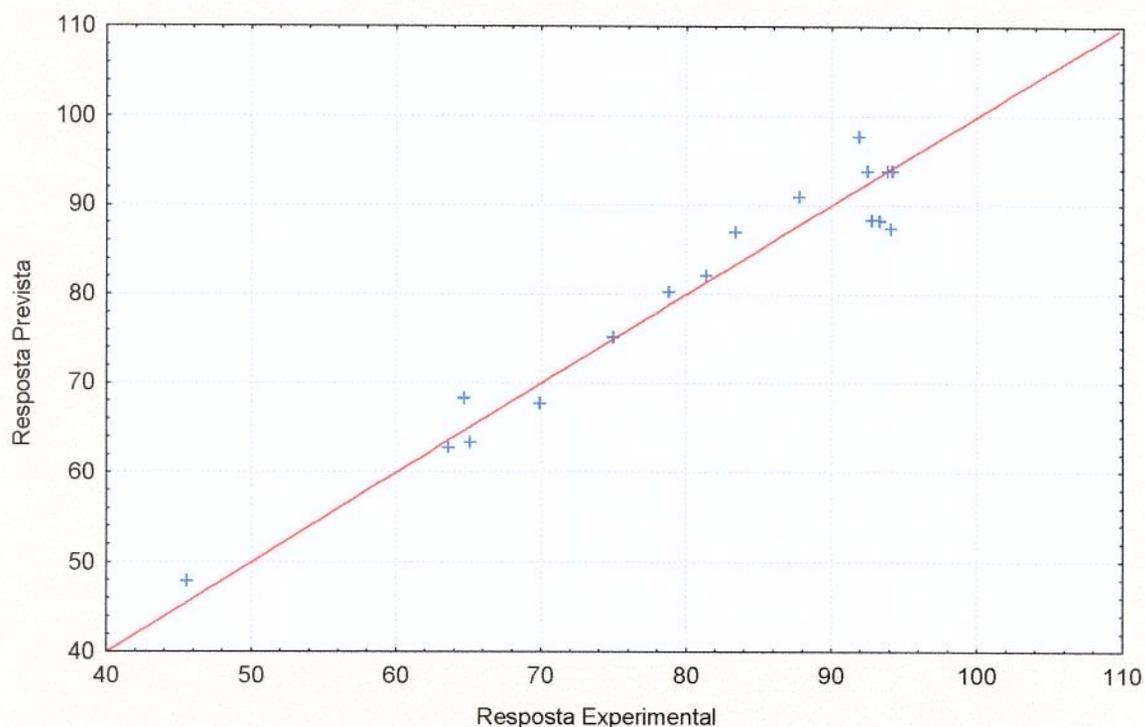
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste "F"
Regressão	3.162	9	351,3	13,8
Residual	178,5	7	25,50	
Falta Ajuste	176,9	5	35,38	
Erro Puro	1,647	2	0,824	
TOTAL	3.340	16	208,8	

(*) modelo de 2ª ordem, $p < 0,05$ e $R^2 = 94,6\%$

Na Tabela 32, observa-se uma excelente reprodutibilidade dos resultados, uma vez que o erro puro (experimental) foi muito baixo (1,647), representando aproximadamente 0,05% do total da fonte de variação. A porcentagem de variação explicada em torno da média ($R^2 = 94,6\%$) foi alta, indicando uma baixa variabilidade ($R^2 \geq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996) e fornecendo um coeficiente de correlação de 0,97 entre as respostas obtidas experimentalmente e os valores previstos pelo modelo de 2ª ordem, indicando uma excelente correlação entre os dos resultados experimentais e os previstos pelo modelo, dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A significância do modelo foi estudada através do Teste “F”, a partir do qual, verificou-se que a equação de regressão é estatisticamente significativa e preditiva, pois o “F” calculado (MQ_R / MQ_r (13,8) é 3,8 vezes maior que o valor de “F” tabelado ($F_{0,95; 9; 7} = 3,68$), ou seja, os dados experimentais são representados pelo modelo matemático proposto. Os resíduos (falta de ajuste + erro puro) (178,5) são explicados quase que exclusivamente pela falta de ajuste do modelo, já que o erro puro foi extremamente baixo, e que representou aproximadamente 5,3% do total da fonte de variação. Fato que pode ser constatado através do teste “F”, pois o “F” calculado (MQ_r / MQ_{faj}) (0,72) é menor que o “F” tabelado ($F_{0,95; 7; 5} = 4,88$). No gráfico 2 pode-se verificar o quanto o modelo de 2ª ordem foi preditivo, pois tem-se representado os valores das respostas obtidas experimentalmente e os valores correspondentes às previstas pelo modelo determinado. Pela distribuição dos pontos, pode-se ratificar o teste “F”, assegurar que o modelo foi realmente preditivo, ou seja, que pode ser utilizado para prever taxas de conversão dos AGL presentes no DDOS em ésteres etílicos, através da reação de esterificação química direta, com outros valores para as variáveis independentes, mas dentro das faixas aqui estudadas e também para matérias-primas (DDOS) com diferentes teores em AGL.



Gráfico 2- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação química direta do DDOS



A otimização das condições de reação foi obtida através de análise das superfícies ajustadas do modelo (RSM). Os efeitos do tempo de reação, concentração de H_2SO_4 e relação molar etanol:AGL sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos podem ser visualizados nas Figuras 7-9. As superfícies ajustadas e seus respectivos gráficos de contornos (superfície rebatida) foram construídos, fixando-se uma das variáveis no ponto central e variando-se as outras duas, ratificando os resultados estatísticos apresentados na Tabela 31.

Relação dos substratos. Um excesso molar de etanol em relação aos AGL presentes no DDOS foi necessário para se obterem taxas de conversão (esterificação) superiores a 94%, sendo o mesmo observado em reações de esterificação de ácidos graxos com alcoóis monohídricos de baixo peso molecular, em que, para se obterem rendimentos em ésteres superiores a 95%, foi necessária a utilização de um excesso de álcool de 15 a 35 vezes mol/mol do ácido graxo (FORMO, 1954). Na Tabela 31, pode-se observar o efeito linear significativo ($p < 0,05$) positivo, que a relação molar etanol:AGL exerce sobre a taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos (23,4), significando que um aumento da relação dos substratos implicou em um acréscimo na taxa de conversão, sendo também a variável que maior efeito exerceu sobre a resposta, dentro da faixa estudada. Seu efeito de interação com a concentração de H_2SO_4 pode ser evidenciado na Figura 7. Mantendo-se fixo o tempo de reação em 1,5 horas, encontra-se regiões onde houve um decréscimo na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos: a) em relações molares dos substratos abaixo de 6,4:1, provavelmente devido ao tempo de reação ser insuficiente para se obterem maiores taxas de conversão, por ser a velocidade de reação reduzida nestes níveis de substrato, b) em relações molares etanol:AGL acima de 11,2:1, possivelmente pelo fato do catalisador ficar muito diluído no meio da reação e c) em concentrações de H_2SO_4 abaixo de 0,7%, por serem insuficientes. Portanto, conclui-se que taxas de conversão acima de 91,1% são obtidas para relações molares etanol:AGL de 6,4 a 11,2:1 e concentrações de H_2SO_4 de 0,7 a 1,6% e tempo de reação de 1,5 horas.

Na Figura 8, pode-se verificar o efeito de interação dos substratos com o tempo de reação. Fixada a concentração do catalisador em 1%, observa-se um decréscimo na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos em três regiões: a) em relações molares etanol:AGL acima de 11,2:1, devido à diluição do catalisador, b) em relações molares abaixo de 6,4:1, por ser reduzida a velocidade de reação devido ao baixo teor de álcool e c) com tempo de reação abaixo de 0,6 horas (36 minutos). Portanto, as melhores taxas de conversão (acima de 90,8%) foram obtidas

com relação molar etanol:AGL de 6,4 a 11,2:1, concentração de H_2SO_4 de 1% e tempo de reação de 0,6 a 2,8 horas.

Os efeitos significativos de interação da relação molar dos substratos com o tempo de reação (1 com 3) (3,1) e com a concentração de H_2SO_4 (2 com 3) (2,9) observados na Tabela 31, foram confirmados pelas superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, onde também pode ser evidenciado que estes dois efeitos de interação são praticamente iguais através das amplitudes das taxas de conversão. Para interação dos substratos com a concentração de H_2SO_4 , a faixa de variação observada foi de 21,9 a 91,1% (Figura 7), em comparação com a faixa de variação observada em relação ao tempo de reação, de 25,8 a 90,8% (Figura 8) (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Concentração do catalisador. A velocidade da reação de esterificação de ácidos carboxílicos é proporcional à concentração de íons H^+ , adicionados em baixas concentrações, geralmente de 1 a 3% sobre o peso do substrato, para se obter rendimentos em ésteres superiores a 95% (MORRISON & BOYD, 1992; FORMO, 1954). Outros autores citam que, nas reações de esterificação química direta dos ácidos graxos de DDOS com alcoóis monohídricos, devem ser usadas concentrações de ácido mineral que variem de 5 a 14 partes, em peso, do DDOS, ou pH do meio de reação variando de 0,3 a 1,5 (EASTMAN KODAK Co, 1964).

Na Figura 9, observa-se que, para uma relação molar etanol:AGL fixada em 7:1, foram encontradas menores taxas de conversão dos AGL do DDOS em ésteres etílicos em quatro regiões: a) com baixas concentrações de H_2SO_4 , de 0,4 a 0,8%, mesmo efeito encontrado na interação desta variável com a relação dos substratos (Figura 7), b) para altas concentrações do catalisador, acima de 1,5%, c) tempos de reação inferiores a 0,9 horas e d) e superiores a 2,6 horas. Portanto, taxas de conversão dos AGL em ésteres etílicos superiores a 91,1% foram obtidas com relação molar etanol:AGL de 7:1, tempo de reação entre 0,9 e 2,6 horas e concentração de H_2SO_4 entre 0,8 e 1,5. Na Tabela 31, observa-se o seu efeito linear significativo ($p < 0,05$) positivo (7,81) sobre a resposta Y, indicando que o seu aumento implica em acréscimo na taxa de conversão. Também pode ser verificado,

que o efeito de interação da concentração do catalisador com o tempo de reação (1 com 2) foi retirado da análise, por não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$), fato que pode ser constatado na Figura 9, pois, para taxas de conversão acima de 83,4% podemos usar quaisquer valores (dentro das faixas estudadas) tanto para o catalisador, como para o tempo de reação. Comparando-se as superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contornos, encontra-se uma maior faixa de variação da taxa de conversão para a interação do catalisador com a relação molar dos substratos (21,9 a 91,1) (Figura 7), comparado à interação com o tempo de reação (56,8 a 91,1%) (Figura 9), ambas variando de 21,9 a 91,1% (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Tempo de reação. Pode-se obter uma completa esterificação dos AGL de DDOS com álcoois monohídricos, em meio ácido, com aquecimento, deve-se refluxar a mistura por cerca de 1-2 horas (EASTMAN KODAK Co., 1964). Em estudos preliminares verificou-se que um aumento no tempo de reação de 0,7 para 2,3 horas, resultou em um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de 1,25% (Tabela 29) na taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos. Verificamos também que esta é a variável que menor efeito exerce sobre a resposta Y, quando comparada à concentração do catalisador e relação molar dos substratos. Como já foi citado, o seu efeito de interação com a concentração de H_2SO_4 não é significativo ($p > 0,05$) e, portanto, foi retirado da análise estatística (Tabela 31). Nas Figuras 8 e 9 estão representados graficamente os efeitos de interação do tempo de reação com a relação molar etanol:AGL e com a concentração de H_2SO_4 , respectivamente.

Pode-se dizer que os efeitos combinados da concentração do catalisador (H_2SO_4) e da relação molar etanol/AGL são vitais para estabelecer tanto a cinética, como determinar o equilíbrio da reação de conversão dos AGL em ésteres etílicos (Tabela 31).

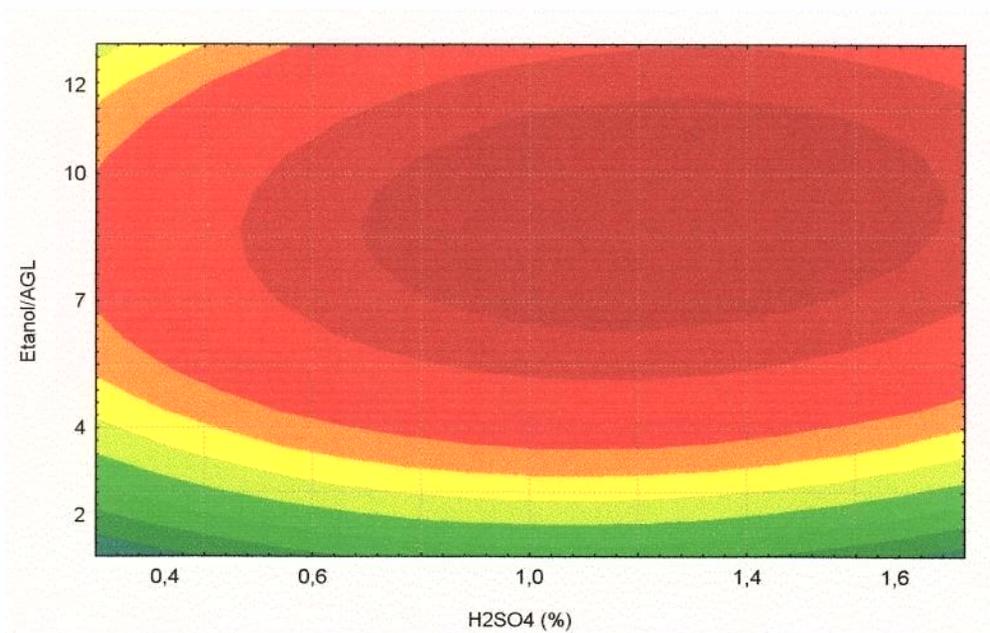
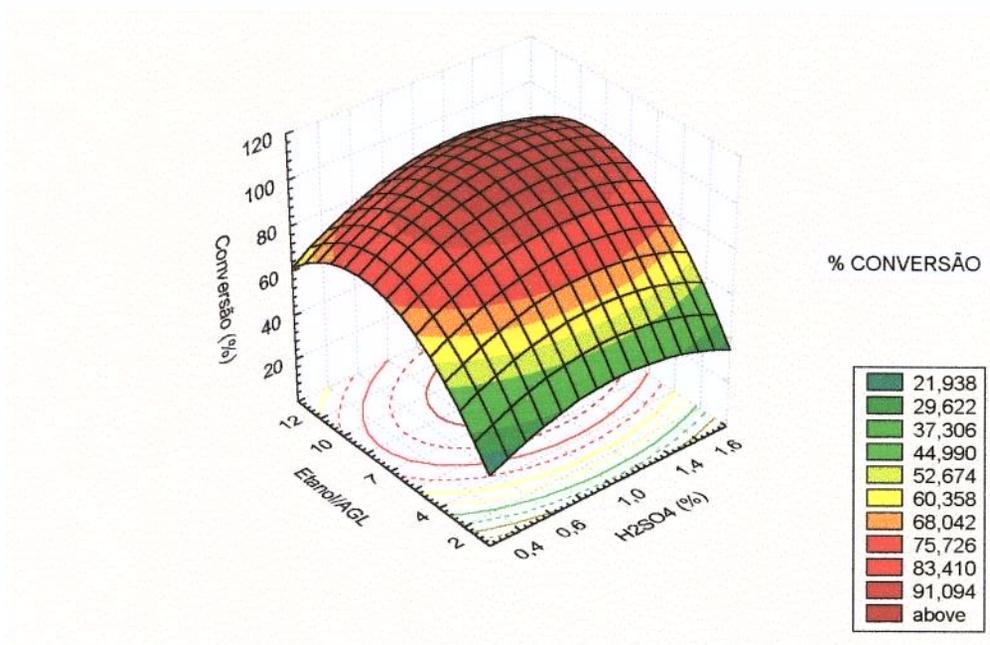


Figura 7- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) e da concentração de H₂SO₄ sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS

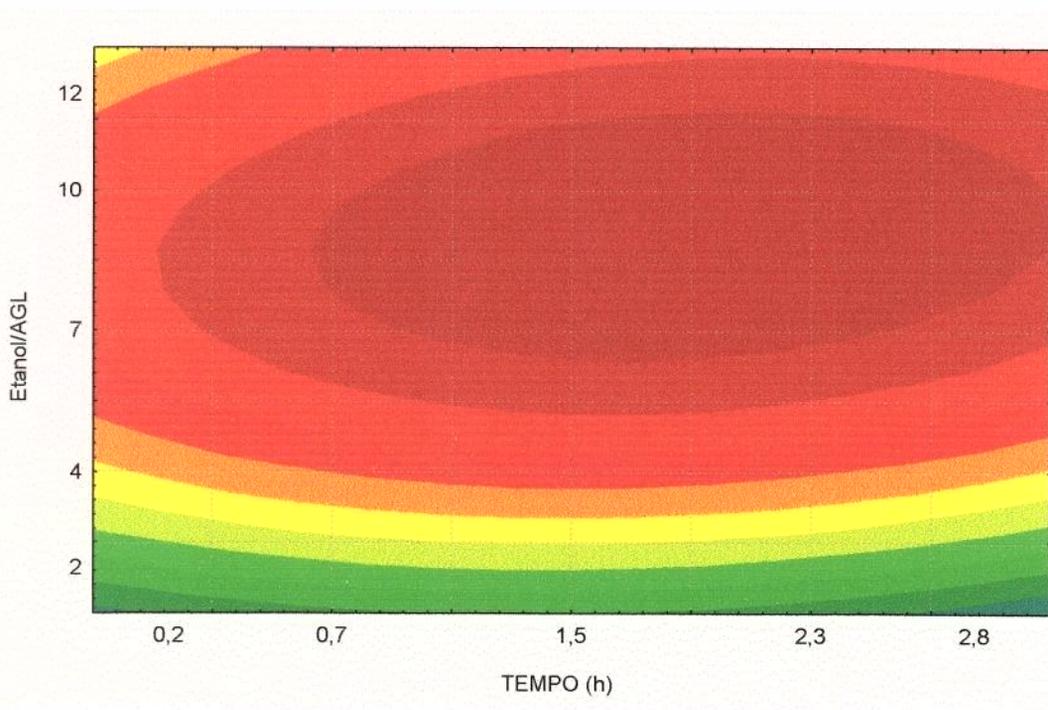
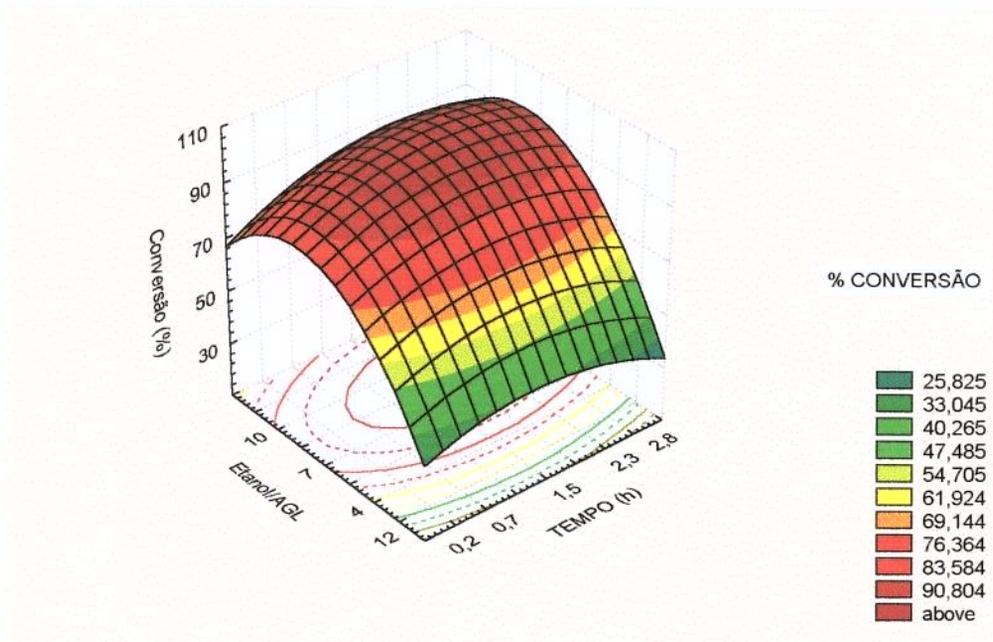


Figura 8- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da relação molar etanol:ácidos graxos livres (AGL) e do tempo de reação sobre a taxa de conversão dos AGL do DDOS

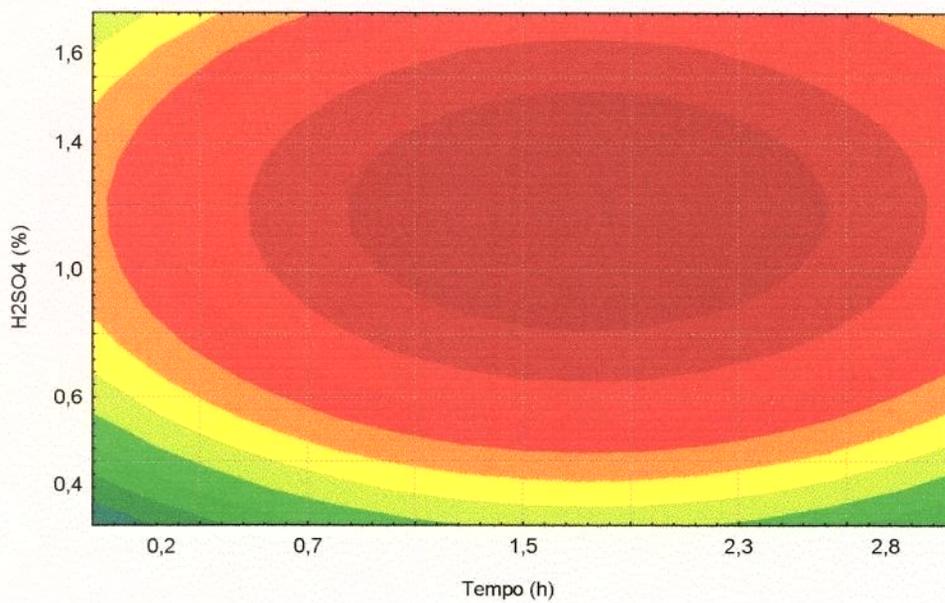
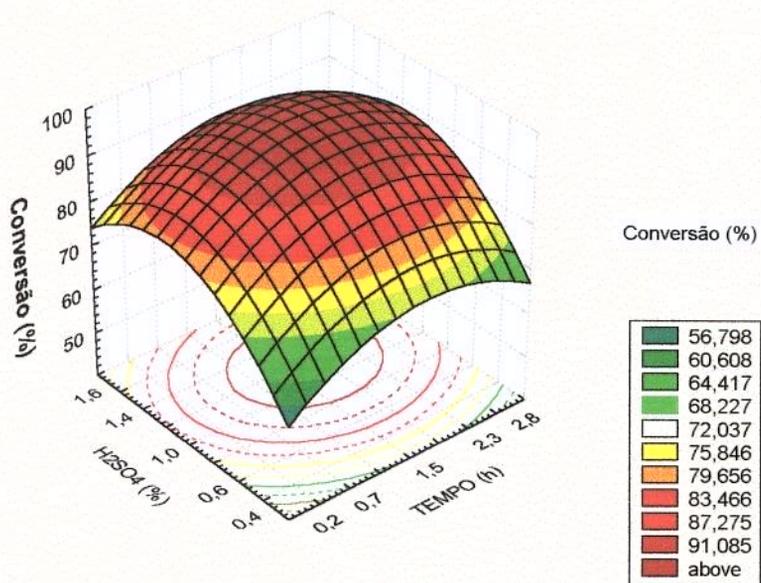


Figura 9- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de H_2SO_4 e do tempo de reação sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos livres do DDOS

A determinação da região ótima da reação de esterificação química direta do DDOS com etanol anidro foi feita através da intersecção dos três mapas de contorno, donde conclui-se que a região ótima da reação de esterificação estudada foi: relação molar etanol:AGL de 6,4 a 11,2:1; concentração de H_2SO_4 de 0,9 a 1,5% e tempo de reação de 1,3 a 2,6 horas, obtendo-se taxas de conversão de 90,6% e 92,4%, respectivamente, através da equação [3]. As perdas de esteróis, nas condições otimizadas foram inferiores a 5,7%. Não foram encontrados em literatura, dados referentes a rendimentos em ésteres obtidos a partir da reação de esterificação química direta de DDOS. Em um único estudo, para obtenção de concentrados de tocoferóis e esteróis, BROWN & SMITH (EASTMAN KODAK, 1964) esterificaram destilados de desodorização com alcoóis de 1 a 4 átomos de carbono, em pH de 0,3 a 1,5, ou 1:20 HCl:DDOS (em peso) e cerca de 30 a 60 partes de álcool por 100 partes de destilado, em peso e tempo de reação de 1-2 horas, mas sem mencionar a taxa de esterificação.

6.3.1.2- Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Química Direta do DDOS

A validação prática do modelo experimental obtido (Equação 3) foi realizada utilizando-se as condições ótimas extremas da faixa encontrada. Com os valores de: relação molar etanol/AGL = 6,4/1; concentração H_2SO_4 = 0,9% e tempo reação = 1,3 horas, obteve-se uma taxa de conversão dos AGL em ésteres etílicos de 92,7%; já para o outro extremo, com os valores de : relação molar etanol/AGL = 11,2/1; concentração H_2SO_4 = 1,5% e tempo de reação = 2,6 horas, obteve-se uma taxa de conversão de 94,1%. Comparando-se os resultados das taxas de conversão obtidas através do modelo matemático codificado (90,6 e 92,4%), com os valores obtidos experimentalmente (92,7 e 94,1%), ratifica-se a conclusão teórica, mencionada anteriormente, de que o modelo encontrado realmente é preditivo.

6.3.1.3- Determinação do grau de Esterificação dos Mono-, Di- e Triglicerídios presentes no DDOS

Após a determinação das faixas ótimas do processo de esterificação química direta dos AGL do DDOS, foi verificado o aporte de ésteres etílicos resultantes dos mono-, di- e triglicerídios. Foram observadas pequenas mudanças nos teores destes componentes durante o processo, como mostrado na Tabela 33. Apesar dos triglicerídios terem sofrido uma redução de aproximadamente 30%, não representam um aporte significativo de ácidos graxos para formação de ésteres. Portanto, confirmando a hipótese inicial (vide item 5.3.1.1), que justificou a utilização da relação etanol/AGL durante todo o experimento, ou seja, do teor de etanol ser baseado nos AGL e não nos AGT.

Tabela 33- Variação dos mono-, di- e triglicerídios do DDOS, após a reação de esterificação química direta no ponto ótimo econômico do processo (*)

Componentes	DDOS (% p/p)	Após esterificação (% p/p)
Monoglicerídios	14,18 ± 0,09	12,85 ± 0,20
Diglicerídios	6,43 ± 0,15	5,97 ± 0,11
Triglicerídios	5,61 ± 0,10	3,93 ± 0,09

(*) tempo de reação de 1,3 horas, concentração de H₂SO₄ de 0,9%, relação molar etanol:AGL de 6,4:1 e temperatura de 80°C

6.3.2- Esterificação Química do DDOS Saponificado e Acidulado

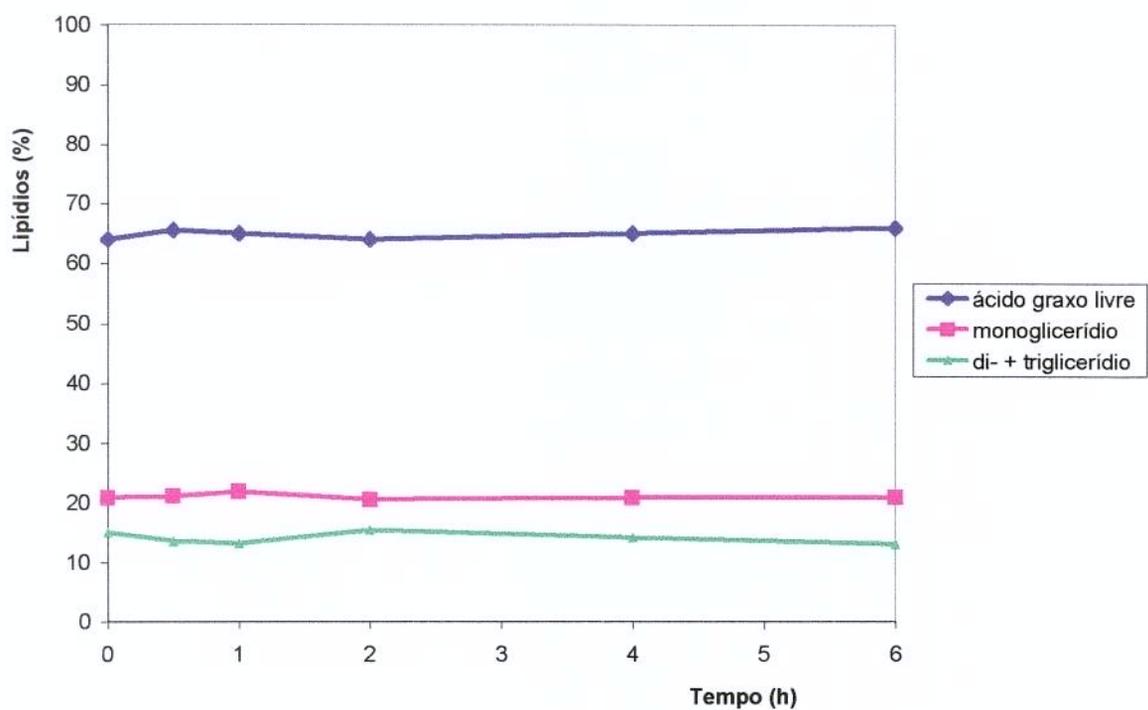
6.3.2.1- Saponificação do DDOS

A- Saponificação em Meio Aquoso

Com o objetivo de redução dos custos de matérias-primas, estudou-se inicialmente a reação de saponificação dos lipídios presentes no DDOS, em meio aquoso. Foram testadas quatro relações molares NaOH:AGT: 1,2; 2, 3 e 4:1, sendo que para esta última, mantendo-se o volume de água adicionada em 200mL/100g DDOS, não se conseguiu homogeneizar o meio de reação, pois a borra formada era extremamente espessa.

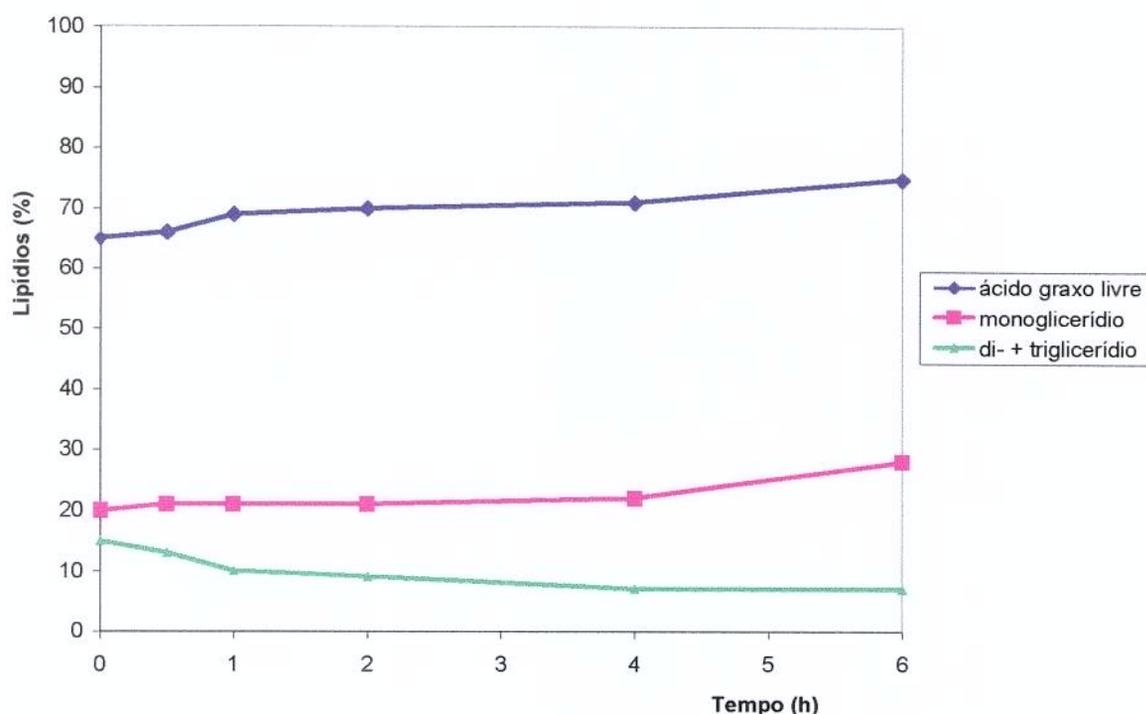
Os gráficos 3-5 ilustram os resultados de composição lipídica das misturas de reação da saponificação dos AGT presentes no DDOS, em função do tempo de reação.

Gráfico 3- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio aquoso (*)



(*) relação NaOH:AGT de 1,2:1 e temperatura de 80°C

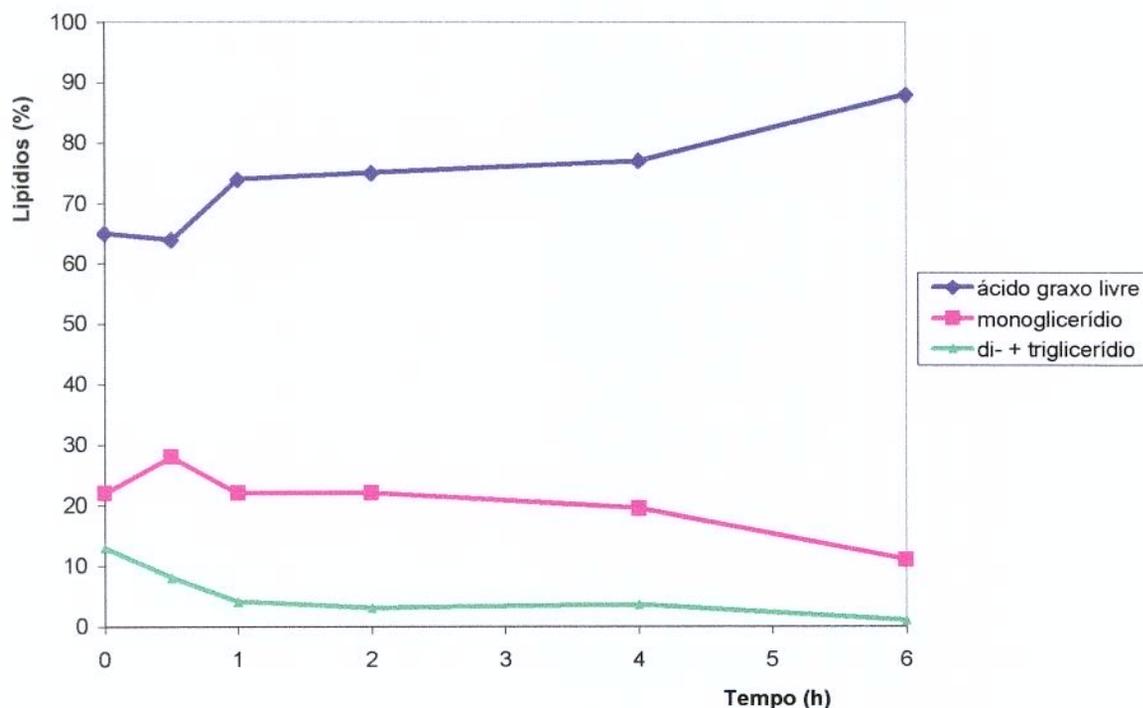
Gráfico 4- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio aquoso (*)



(*) relação molar NaOH:AGT de 2:1 e temperatura de 80°C

Pode-se verificar, a partir dos Gráficos 3 e 4, que a reação de saponificação não foi eficiente, ou seja, os mono- di- e triglicerídios não foram transformados em AGL, como era o objetivo. Portanto, as relações molares NaOH/AGT de 1,2 e 2/1, com tempo de reação de até 6 horas e temperatura de 80°C, não foram suficientes para que a saponificação dos AGT se completasse. As perdas de tocoferóis para as relações molares de 1,2/1 e de 2/1 foram de 7% e 15%, respectivamente. BROKAW (EASTMAN KODAK, 1957) saponificou DDOS usando uma relação molar NaOH de 1,1/1, a mesma proporção em água (2/1, p/v de DDOS) e aquecimento, com refluxo, por 30 minutos. Após a acidificação, esterificação com metanol e purificação, o autor obteve aumento na concentração de tocoferóis de 5 para 20%, mas não mencionou a taxa de conversão dos AGT em sabões.

Gráfico 5- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais DDOS, em meio aquoso (*)



(*) relação molar NaOH:AGT de 3:1 e temperatura de 80°C

No gráfico 5, pode-se observar que a saponificação dos AGT presentes no DDOS, com 6 horas de reação, teve um resultado satisfatório, transformando 92,3% dos di- + triglicerídios e 50% dos monoglicerídios, em sabões. No entanto, a perda de tocoferóis foi elevada (26,7%).

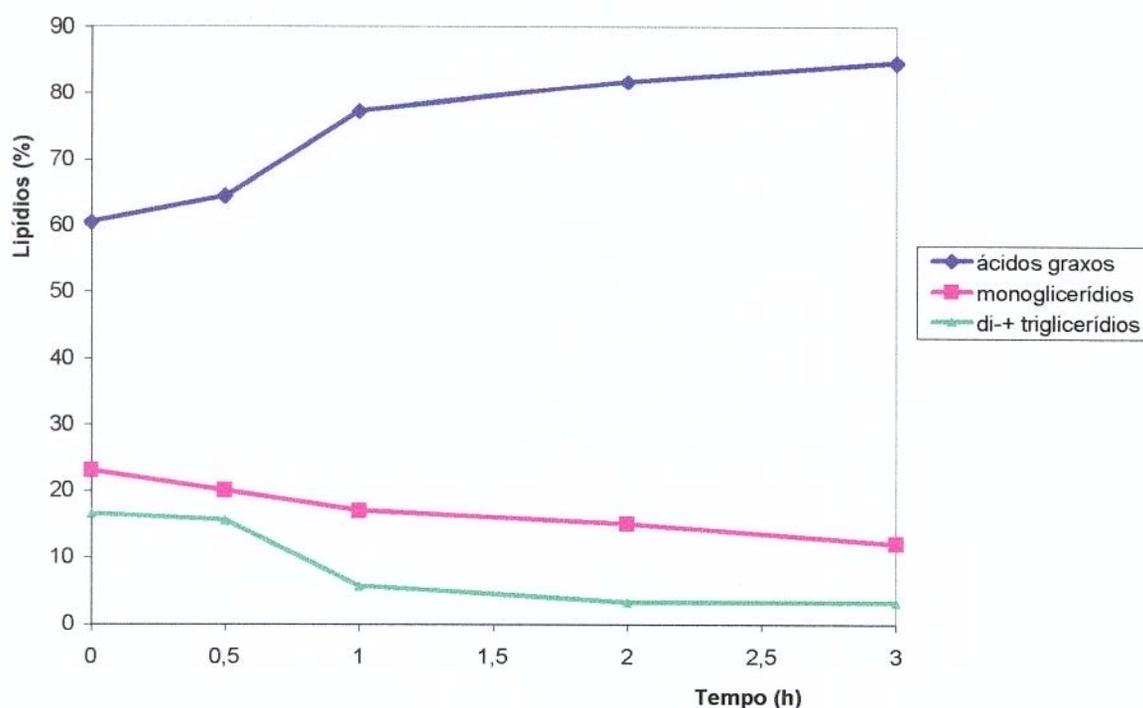
Te-se a observar que, experimentalmente, a homogeneização do meio de reação foi dificultada devido à borra formada ser muito espessa, necessitando de um agitador mecânico com desenho especial (hélice com 4 pás) e maior velocidade de agitação. A quantidade de água adicionada ao meio de reação (200 mL/100g DDOS) foi considerada como sendo a mínima necessária para diluição dos sabões e

conseqüentemente se obter uma boa homogeneização, durante as etapas de saponificação e acidulação.

B- Saponificação do DDOS em Meio Alcoólico

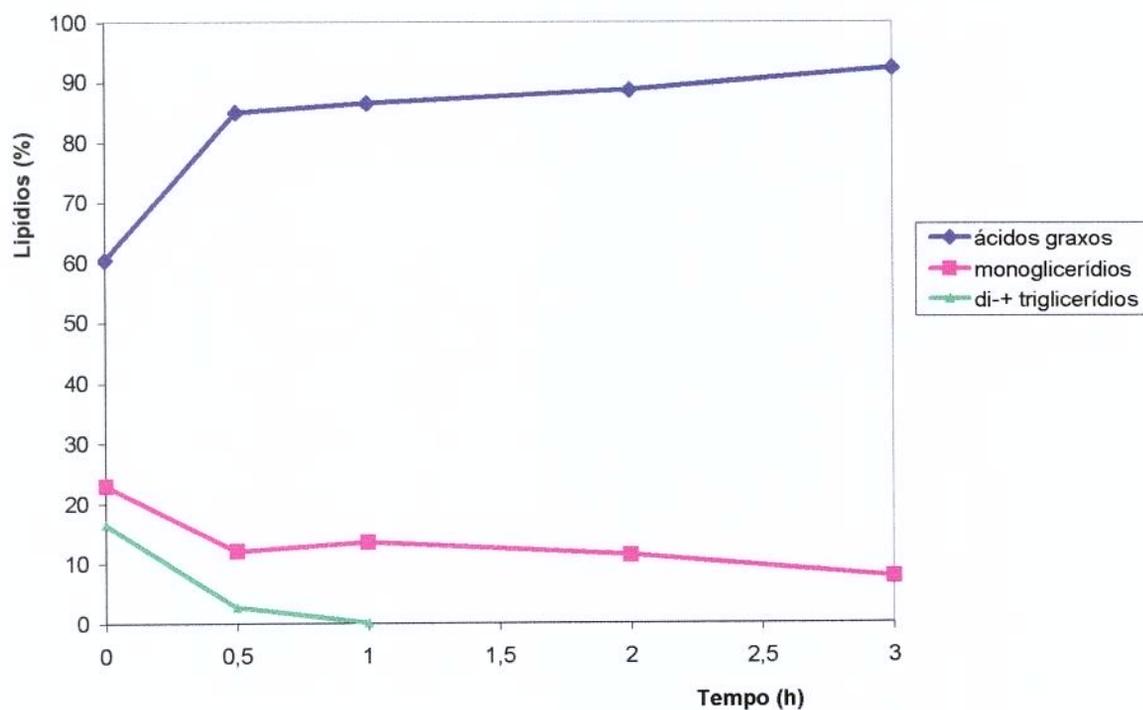
Como a quantidade de reagente empregada [29,4% de NaOH sólido sobre o peso em DDOS (relação molar NaOH/AGT = 3/1)] e o tempo da reação de saponificação, em meio aquoso, foram considerados muito elevados para se obter resultados satisfatórios, optou-se por estudar a mesma reação, mas em meio alcoólico. Os Gráficos 6-8 ilustram os resultados das reações de saponificação dos lipídios presentes no DDOS, em função do tempo, em temperatura de 80 °C e utilizando-se as relações molares NaOH:AGT de 1,2; 1,5 e 2:1, respectivamente.

Gráfico 6- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais DDOS, em meio alcoólico (*)



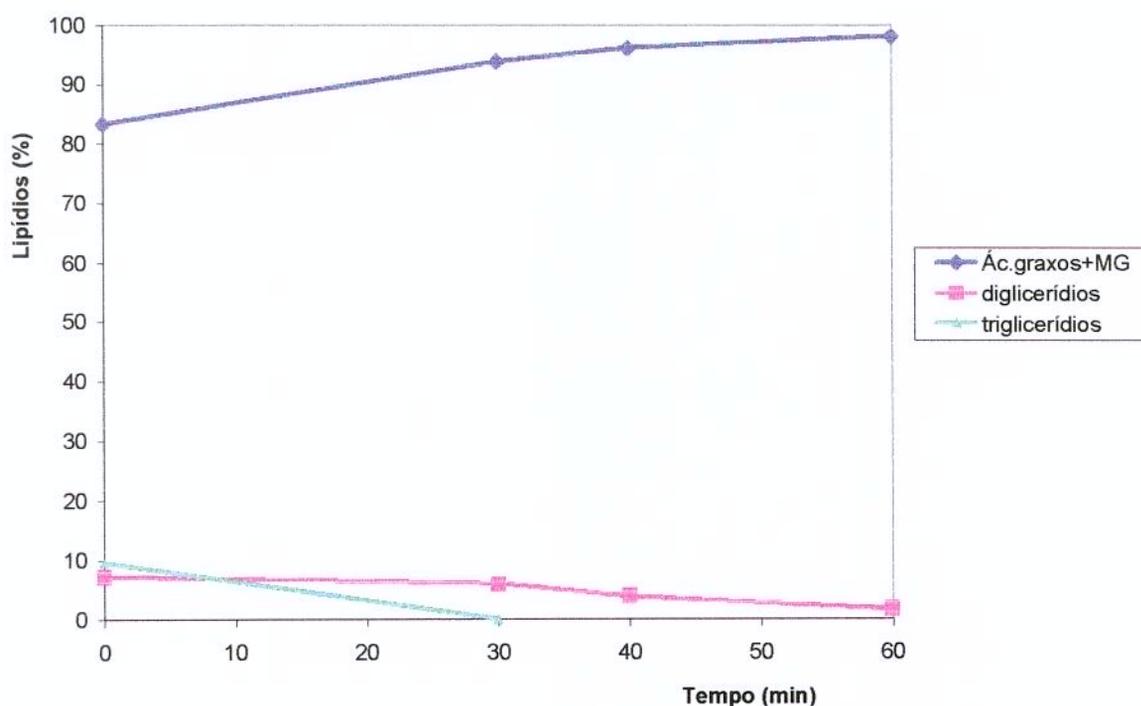
(*) relação molar NaOH:AGT de 1,2:1 e temperatura de 80°C

Gráfico 7- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais DDOS, em meio alcoólico (*)



(*) relação molar NaOH:AGT de 1,5:1 e temperatura de 80°C

Gráfico 8- Teores de lipídios, em função do tempo, na reação de saponificação dos ácidos graxos totais do DDOS, em meio alcoólico (*)



(*) relação molar NaOH:AGT de 2:1 e temperatura de 80°C

A partir da análise dos resultados, pode-se concluir que a taxa de saponificação dos lipídios presentes no DDOS é diretamente proporcional à concentração de soda. As perdas de tocoferóis foram de 5 e 7% para as reações com as relações molares NaOH/AGT de 1,2 e 2/1, respectivamente e tempo de 3 horas. Já para a reação com a relação molar de 2/1, as perdas de tocoferóis foram de 5%, para o tempo 40 minutos. Sendo esta última, a condição de reação selecionada para dar seqüência ao processo de esterificação química da matéria saponificável do DDOS (ANEXO 5). Na saponificação realizada nesta condição, as perdas são mínimas e o tempo de reação é reduzido.

6.3.2.2- Acidificação dos Sabões obtidos na Reação de Saponificação

Nas condições do processo em que a acidulação foi realizada, verificou-se visualmente quando a reação foi completada, fato comprovado através da determinação do valor ácido. Após a separação de fases, o produto desejado seguiu para a etapa de esterificação.

6.3.2.3- Otimização da Reação de Esterificação Química dos AGT do DDOS

O delineamento experimental do planejamento fatorial completo da reação de esterificação química dos AGT do DDOS, incluindo a resposta Y (% conversão dos AGT a ésteres etílicos) para cada ensaio realizado, estão apresentados na Tabela 34. O valor ácido inicial do DDOS foi considerado como sendo 134,0 mg KOH/g amostra ($1,99 \times \text{AGT} = 1,99 \times 67,32$).

Na Tabela 34 também estão relacionadas as perdas de tocoferóis totais durante todo o processo de transformação química (saponificação/acidificação/esterificação) da matéria saponificável do DDOS nas diferentes condições. Nas condições testadas neste trabalho, estas perdas foram sempre inferiores a 5,5%. Podemos também verificar que as perdas ocorreram em função do tempo de reação, ou seja, quanto maior foi o tempo de exposição dos tocoferóis a 80°C (temperatura do processo), maiores foram as perdas obtidas. Resultados semelhantes foram encontrados no processo de esterificação química direta dos AGL do DDOS.

A análise estatística dos ensaios foi realizada em três etapas:

No primeiro passo, verificou-se a significância estatística e o efeito das variáveis independentes a serem estudadas, sobre a resposta Y (% conversão) e foi encontrada a região (faixa) de trabalho adequada para cada variável. Para tal, empregou-se um planejamento fatorial incompleto (2^n), utilizando a faixa de variação para as variáveis independentes de -1 a +1, constante da Tabela 17, sem utilização

dos pontos centrais e dos pontos axiais (-1,68 e +1,68), correspondendo aos ensaios de 1 a 8 da Tabela 34. Os efeitos estimados das variáveis estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 34- Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do processo de esterificação química do DDOS saponificado e acidulado

Ensaio ^a	Nível codificado da variável			Conversão (Y) (%) ^b	Perda Tocoferol total (%)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	75,1 ± 0,47	0,53 ± 0,10
2	+1	-1	-1	81,8 ± 0,75	0,74 ± 0,06
3	-1	+1	-1	76,5 ± 0,30	0,93 ± 0,08
4	+1	+1	-1	94,2 ± 0,44	1,01 ± 0,15
5	-1	-1	+1	84,0 ± 0,08	3,95 ± 0,43
6	+1	-1	+1	92,6 ± 0,27	4,53 ± 0,38
7	-1	+1	+1	85,1 ± 0,55	5,25 ± 0,23
8	+1	+1	+1	98,7 ± 0,61	4,72 ± 0,37
9	0	0	0	97,9 ± 0,29	3,16 ± 0,41
10	0	0	0	99,0 ± 0,32	3,91 ± 0,38
11	0	0	0	98,3 ± 0,43	3,63 ± 0,30
12	-1,68	0	0	65,4 ± 0,28	3,82 ± 0,26
13	+1,68	0	0	99,5 ± 0,69	3,75 ± 0,22
14	0	-1,68	0	90,7 ± 0,16	3,23 ± 0,38
15 (C)	0	+1,68	0	93,8 ± 0,52	3,94 ± 0,41
16 (C)	0	0	-1,68	89,3 ± 0,67	0,82 ± 0,06
17 (C)	0	0	+1,68	96,8 ± 0,51	5,42 ± 0,45

(^a) ensaios realizados em ordem aleatória

(^b) % conversão (média de três determinações ± desvio padrão) = (valor ácido inicial DDOS – valor ácido da mistura de reação no tempo t) x 100 / valor ácido inicial DDOS.

X₁: relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos totais (AGT) no DDOS]; X₂: concentração de H₂SO₄ [% peso (AGT + etanol)]; X₃: tempo de reação (h).

Tabela 35- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto ($p < 0,05$)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)
Média	86,0	0,75	0,0055
(1) Etanol/AGT (X_1)	11,6	1,55	0,0415
(2) % H_2SO_4 (X_2)	5,25	1,55	0,0177
(3) Tempo (X_3)	8,20	1,55	0,0115
1 by 2	4,00	1,55	0,0228
1 by 3	-0,55	1,55	0,0476
2 by 3	-1,65	1,55	0,0469

X_1 : relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos totais (AGT) no DDOS]; X_2 : concentração de H_2SO_4 [% peso (AGT + etanol)]; X_3 : tempo de reação (h)

Na Tabela 35, verifica-se que as variáveis independentes selecionadas: relação molar etanol/AGT, concentração de H_2SO_4 e tempo de reação, são estatisticamente significativas para $p < 0,05$, ou seja, têm efeito significativo sobre a resposta Y (taxa de conversão dos AGT presentes no DDOS em ésteres etílicos), em um nível de significância de 95%. Quando os níveis (codificados) das variáveis independentes foram alterados de -1 para +1, observa-se que, em todos os casos, houve aumento na taxa de conversão (efeitos positivos), ou seja, aumentando-se a relação molar etanol:AGT de 4 para 10:1, a concentração de H_2SO_4 de 0,6 para 1,4% e o tempo de reação de 0,7 para 2,3 horas, resultaram em aumentos na taxa de conversão de 11,6%, 5,25% e de 8,2% respectivamente. Apesar da concentração de H_2SO_4 ser a variável que tem o menor efeito sobre a resposta, este efeito é estatisticamente significativo. A relação molar etanol:AGT foi a variável que exerceu

maior efeito sobre a conversão dos AGT em ésteres etílicos. Estes resultados são válidos para a faixa de variação de cada variável independente estudada.

O segundo passo foi verificar se um modelo de 1ª ordem, em função das variáveis independentes, se ajusta às respostas experimentais obtidas. Para tal, foram incluídos os três pontos centrais no planejamento fatorial anterior, representados pelos ensaios de 9 a 11 constantes da Tabela 34. Foi obtido um percentual de variação explicada em torno da média (R^2) de 58,7%, já excluídos os termos de interação não significativos (1 com 2 e 1 com 3), indicando alta variabilidade ($R^2 \leq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996), significando que 41,3% da variação total em torno da média é devido aos resíduos deixados pelo modelo, valor muito alto. Conseqüentemente, o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e as previstas pelo modelo foi extremamente baixo ($R = 0,76$), indicando que somente 76% das respostas experimentais se ajustam ao modelo de 1ª ordem (Tabela 36). Portanto, um modelo de 1ª ordem não se ajustou bem aos resultados experimentais obtidos, ou seja, não teve significância estatística.

O terceiro passo foi verificar o ajuste dos resultados experimentais em um modelo estatístico de 2ª ordem, para tal, foram incluídos os pontos axiais no planejamento realizado para o modelo de 1ª ordem, obtendo-se um planejamento fatorial completo (Tabela 34). Para estudo dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes [relação molar etanol/AGT (X_1), concentração de H_2SO_4 (X_2) e tempo de reação (X_3)] na resposta Y (% conversão dos AGT em ésteres etílicos) e otimização dos resultados, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (RSM), obtida através do planejamento fatorial completo, usando um CCRD com as três variáveis independentes, o que inclui 8 pontos fatoriais, 3 pontos centrais (replicatas) e 6 pontos axiais (BARROS *et al.*, 1996; KHURI & CORNELL, 1987).

Tabela 36- Análise dos efeitos estimados das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química DDOS, usando um planejamento fatorial incompleto (*)

Variável	Efeito	Erro Padrão	Nível descritivo (p)
Média	89,4	0,16	0,0
(1) Etanol/AGT (X_1)	11,6	0,39	0,0011
(2) % H_2SO_4 (X_2)	5,25	0,39	0,0056
(3) Tempo (X_3)	8,20	0,39	0,0023
1 by 2	4,00	0,39	0,0095

(*) modelo de 1ª ordem, $p < 0,05$ e $R^2 = 58,7\%$

X_1 : relação molar do substrato [etanol:ácidos graxos totais (AGT) no DDOS]; X_2 : concentração de H_2SO_4 [% peso (AGT + etanol)]; X_3 : tempo de reação (h)

Na Tabela 37, encontra-se a análise dos efeitos estimados significativos das variáveis independentes (relação molar etanol/AGT, concentração de H_2SO_4 e tempo de reação) sobre a resposta Y (taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos), para um modelo de 2ª ordem.

Tabela 37- Análise dos efeitos estimados significativos das três variáveis independentes sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química do DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

Variável	Efeito	Nível descritivo p	Coefficiente Regressão
Média	98,6	0,0	98,6
(1) Etanol/AGT (L)	15,2	0,0004	7,61
(2) H ₂ SO ₄ (L)	3,84	0,0061	1,92
(3) Tempo (L)	6,65	0,0020	3,32
Etanol/AGT (Q)	-12,5	0,0007	-6,24
H ₂ SO ₄ (Q)	-5,54	0,0036	-2,77
Tempo (Q)	-4,98	0,0044	-2,48
1L com 2L	4,00	0,0095	2,00

(*) modelo de 2^a ordem, $p < 0,05$, $R^2 = 92,6\%$ e erro puro = 0,31

Após a seleção do modelo (2^a ordem), foram excluídos da análise os termos de interação não significativos ($p > 0,05$), os efeitos de interação da relação molar etanol:AGT e da concentração de H₂SO₄ com o tempo de reação. Como consequência, a variação explicada em torno da média teve pequena redução, de 93,0 para 92,6%. Portanto, foram considerados somente os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Verificou-se que todos os termos lineares têm efeito significativo positivo sobre a taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos: relação molar etanol:AGT (15,2), concentração de H₂SO₄ (3,84) e tempo de reação (6,65). Apesar de significativa, a variável que exerceu menor efeito sobre a resposta continuou sendo a concentração do catalisador (H₂SO₄), na faixa testada (0,4 – 1,6), ou seja, o seu aumento ou redução foi o que exerceu menor variação (efeito) na taxa

de conversão dos AGT em ésteres etílicos, comparativamente às outras variáveis independentes.

Com os resultados dos coeficientes de regressão (Tabela 37), chegou-se à equação polinomial de segunda ordem codificada (modelo codificado), dada pela equação 4:

$$Y = 98,6 + 7,61X_1 + 1,92X_2 + 3,32X_3 - 6,24 X_1^2 - 2,77X_2^2 - 2,48X_3^2 + 2,00X_1X_2 + 0,31 \quad [4]$$

A validação teórica do modelo encontrado foi realizada através da análise de variância (ANOVA) para a resposta Y (Tabela 38).

Tabela 38- Análise de variância (ANOVA) da taxa de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos, no processo de esterificação química DDOS, usando um planejamento fatorial completo (*)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste "F"
Regressão	1.476	7	210,8	16,2
Residual	117,1	9	13,01	0,78
Falta Ajuste	116,5	7	16,64	
Erro Puro	0,620	2	0,310	
TOTAL	1.593	16	99,56	

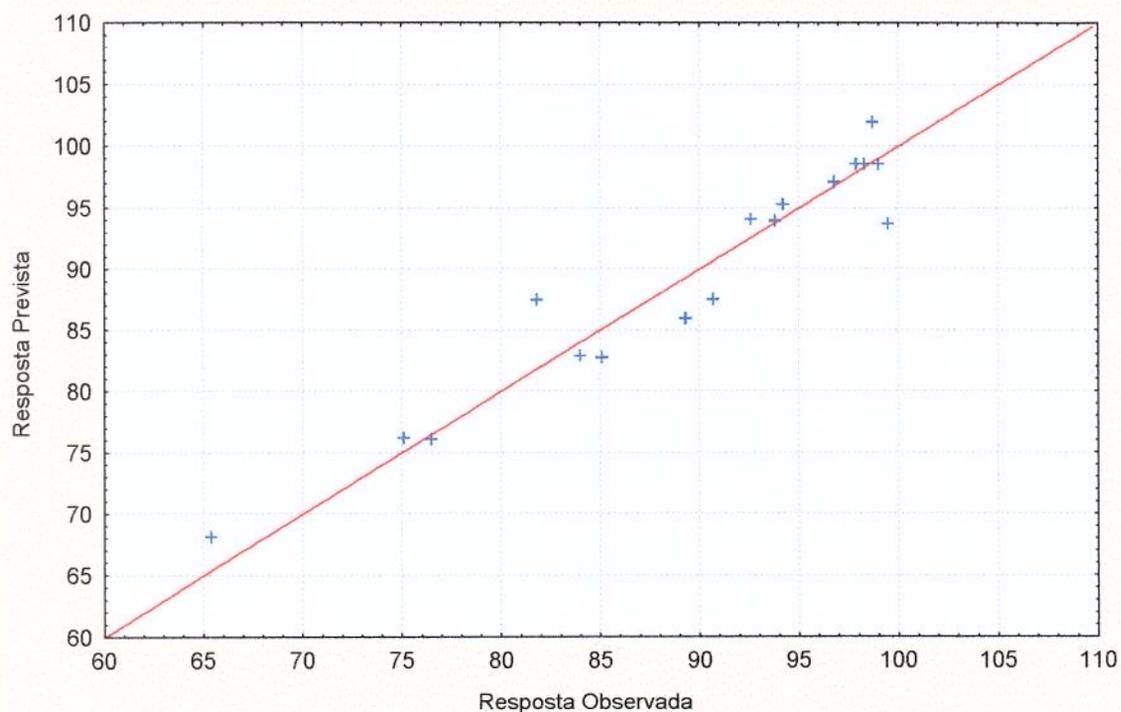
(*) modelo de 2ª ordem, $p < 0,05$ e $R^2 = 92,6\%$

Na Tabela 38, observa-se uma excelente reprodutibilidade dos resultados, uma vez que o erro puro (experimental) foi muito baixo (0,620), representando aproximadamente 0,04% do total da fonte de variação. A porcentagem de variação

explicada em torno da média ($R^2 = 92,6\%$) é alta, indicando baixa variabilidade ($R^2 \geq 70\%$) (BARROS *et al.*, 1996) e fornecendo um coeficiente de correlação de 0,96 entre as respostas obtidas experimentalmente e os valores previstos pelo modelo de 2ª ordem, indicando excelente correlação entre os dos resultados experimentais e os previstos pelo modelo, dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A significância do modelo foi estudada através do Teste “F”, a partir do qual, verificou-se que a equação de regressão é estatisticamente significativa e preditiva, pois o “F” calculado (MQ_R / MQ_f (16,2) é 4,9 vezes maior que o valor de “F” tabelado ($F_{0,95; 7; 9} = 3,29$), ou seja, os dados experimentais são representados pelo modelo matemático proposto. Os resíduos (falta de ajuste + erro puro) (117,1) são explicados quase que exclusivamente pela falta de ajuste do modelo, já que o erro puro é extremamente baixo, e que representa aproximadamente 7,3% do total da fonte de variação. Fato que pode ser constatado através do teste “F”, pois o “F” calculado (MQ_r / MQ_{faj}) (0,78) é menor que o “F” tabelado ($F_{0,95; 9; 7} = 3,68$). No gráfico 9 podemos verificar o quanto o modelo de 2ª ordem é preditivo, pois temos representado os valores das respostas obtidas experimentalmente e os valores correspondentes às previstas pelo modelo determinado. Pela distribuição dos pontos, podemos ratificar o teste “F”, que o modelo é realmente preditivo, ou seja que poderá ser utilizado para prever taxas de conversão dos AGT presentes no DDOS em ésteres etílicos, através da reação de esterificação química dos AGT, com outros valores para as variáveis independentes, mas dentro das faixas aqui estudadas e também para matérias-primas (DDOS) com diferentes teores em AGT.

A otimização das condições de reação foi obtida através de análise das superfícies ajustadas do modelo (RSM). Os efeitos da relação molar etanol/AGT, concentração de H_2SO_4 e do tempo de reação, sobre a taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos podem ser visualizados nas Figuras 10-12. As superfícies ajustadas e seus respectivos gráficos de contornos (superfície rebatida) foram construídos fixando-se uma das variáveis no ponto central e variando-se as outras duas, ratificando os resultados estatísticos apresentados na Tabela 37.

Gráfico 9- Valores das taxas de conversão previstas pelo modelo de 2ª ordem versus os valores obtidos experimentalmente, na reação de esterificação química do DDOS



Relação dos substratos. Um excesso molar de etanol em relação aos AGT presentes no DDOS, foi necessário para se obter taxas de conversão (esterificação) superiores a 96,5%, sendo o mesmo observado em reações de esterificação de ácidos graxos com álcoois monohídricos de baixo peso molecular, onde, para se obter rendimentos em ésteres superiores a 95%, foi necessário a utilização de excesso de álcool de 15 a 35 vezes mol/mol do ácido graxo (FORMO, 1954). Na Tabela 37, pode-se observar o efeito linear significativo ($p < 0,05$) positivo que esta variável exerce sobre a taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos (15,2), significando que um aumento da relação etanol/AGT causará um acréscimo na taxa de conversão, sendo também a variável que maior efeito exerce sobre a resposta, dentro da faixa estudada. Seu efeito de interação com a concentração de H_2SO_4

pode ser evidenciado na Figura 10. Mantendo-se fixo o tempo de reação em 1,5 horas, encontramos três regiões onde houve um decréscimo na taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos: a) em relações molares dos substratos abaixo de 6,4/1, provavelmente devido ao tempo de reação ser insuficiente para se obter maiores taxas de conversões, por ser a velocidade de reação reduzida a estes níveis de substrato, b) em relações molares etanol:AGT acima de 11,8:1, possivelmente pelo catalisador ficar muito diluído no meio de reação e c) em concentrações de H_2SO_4 abaixo de 0,7%. Portanto, concluímos que taxas de conversão acima de 96,4% foram obtidas para relações molares etanol:AGT de 6,4 a 11,8:1 e concentrações de H_2SO_4 de 0,7 a 1,6% e tempo de reação de 1,5 horas. Verificar que as faixas encontradas foram muito semelhantes às do processo de esterificação química direta dos AGL do DDOS, com duas diferenças: a relação molar do álcool e a taxa de conversão estão relacionadas aos AGT e não aos AGL.

Na Figura 11, pode-se verificar o efeito de interação dos substratos com o tempo de reação. Fixada a concentração do catalisador em 1%, observa-se um decréscimo na taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos em três regiões: a) em relações molares etanol:AGT acima de 11,5:1, devido à diluição do catalisador, b) em relações molares abaixo de 6,1:1, por ser reduzida a velocidade de reação, devido ao baixo teor de álcool e tempo de reação insuficiente para a conversão e c) com tempo de reação abaixo de 0,9 horas (54 minutos). Portanto, as melhores taxas de conversão (acima de 96,5%) foram obtidas com relação molar etanol:AGT de 6,1 a 11,5:1, concentração de H_2SO_4 de 1% e tempo de reação de 0,9 a 2,8 horas. Comparando-se aos resultados obtidos no processo de esterificação química direta dos AGL do DDOS, verificamos que o tempo mínimo para a reação aumentou de 36 para 54 minutos.

Os efeitos significativos de interação da relação molar dos substratos com a concentração de H_2SO_4 (1 com 2) e com o tempo de reação (1 com 3) podem ser verificados pelas superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, onde também pode ser evidenciado que estes dois efeitos de interação são praticamente

iguais através das amplitudes das taxas de conversão. Para interação dos substratos com a concentração de H_2SO_4 , a faixa de variação observada foi de 48,4 a 96,4% (Figura 10), em comparação com a faixa de variação observada em relação ao tempo de reação, de 47,2 a 96,5% (Figura 11) (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Concentração do catalisador. A velocidade da reação de esterificação de ácidos carboxílicos é proporcional à concentração de íons H^+ adicionados em baixas concentrações, geralmente de 1 a 3% sobre o peso do substrato, para se obter rendimentos em ésteres superiores a 95% (MORRISON & BOYD, 1992; FORMO, 1954). Outros autores, citam que nas reações de esterificação química dos ácidos graxos totais do DDOS com alcoóis monohídricos, pelo processo de saponificação/acidulação/esterificação, devem ser usadas concentrações de ácido mineral que variem de 44 a 50%, em peso, do DDOS, (EASTMAN KODAK Co, 1957, 1967).

Na Figura 12, observa-se que, para uma relação molar etanol:AGT fixada em 7:1, encontrou-se menores taxas de conversão dos AGT do DDOS em ésteres etílicos em três regiões: a) em baixas concentrações de H_2SO_4 , de 0,4 a 0,7%, mesmo efeito encontrado na interação desta variável com de com a relação dos substratos (Figura 10), b) em altas concentrações do catalisador, acima de 1,5%, e c) em tempos de reação inferiores a 1,2 horas. Portanto, as melhores taxas de conversão dos AGT em ésteres etílicos (acima de 97,0%) foram obtidas com relação molar etanol:AGT de 7:1, tempo de reação entre 1,2 e 2,8 horas e concentração de H_2SO_4 entre 0,7 e 1,5. Na Tabela 37, pode-se observar que o seu efeito linear significativo ($p < 0,05$) positivo (3,84) da concentração de H_2SO_4 sobre a resposta Y, indica que o seu aumento implica em acréscimo na taxa de conversão. Também podemos verificar que o efeito de interação da concentração do catalisador com o tempo de reação (2 com 3) foi retirado da análise por não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$), fato que pode ser constatado na Figura 12, pois, para taxas de conversão acima de 91,0% podemos usar quaisquer valores (dentro das faixas estudadas) tanto para o catalisador, como para o tempo de reação. Comparando-se

as superfícies ajustadas e seus respectivos mapas de contorno, encontramos uma faixa mais ampla de variação da taxa de conversão para a interação do catalisador com a relação molar dos substratos (48,4 a 96,4%) (Figura 10), quando comparado com a interação com o tempo de reação (70,0 a 97,0%) (Figura 12) (dados de % conversão relacionados ao lado de cada Figura).

Tempo de reação. Para se obter uma completa esterificação dos AGT do DDOS com álcoois monohídricos, deve-se refluxar a mistura, sob aquecimento, por aproximadamente 1 hora (EASTMAN KODAK Co., 1957, 1967). Em estudos preliminares, verificou-se que um aumento no tempo de reação de 0,7 para 2,3 horas, resultou em um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de 8,20% (Tabela 35) na taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos. Como já foi citado, os seus efeitos de interação com a relação molar etanol/AGT (1 com 3) e com a concentração de H_2SO_4 (2 com 3) não são significativos ($p > 0,05$) e, portanto, foram retirados da análise estatística (Tabela 37). Nas Figuras 11 e 12 estão representados graficamente os efeitos de interação do tempo de reação com a relação molar etanol:AGT e com a concentração de H_2SO_4 , respectivamente.

Podemos dizer que os efeitos combinados da concentração do catalisador (H_2SO_4) e da relação molar etanol:AGT são vitais para estabelecer tanto a cinética como determinar o equilíbrio da reação de conversão dos AGT em ésteres etílicos (Tabela 37).

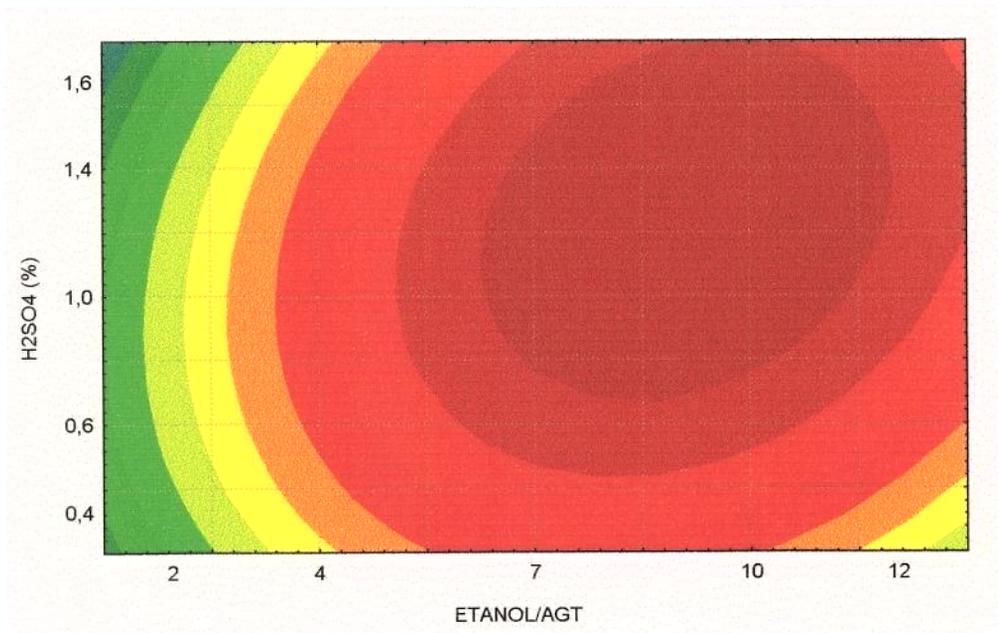
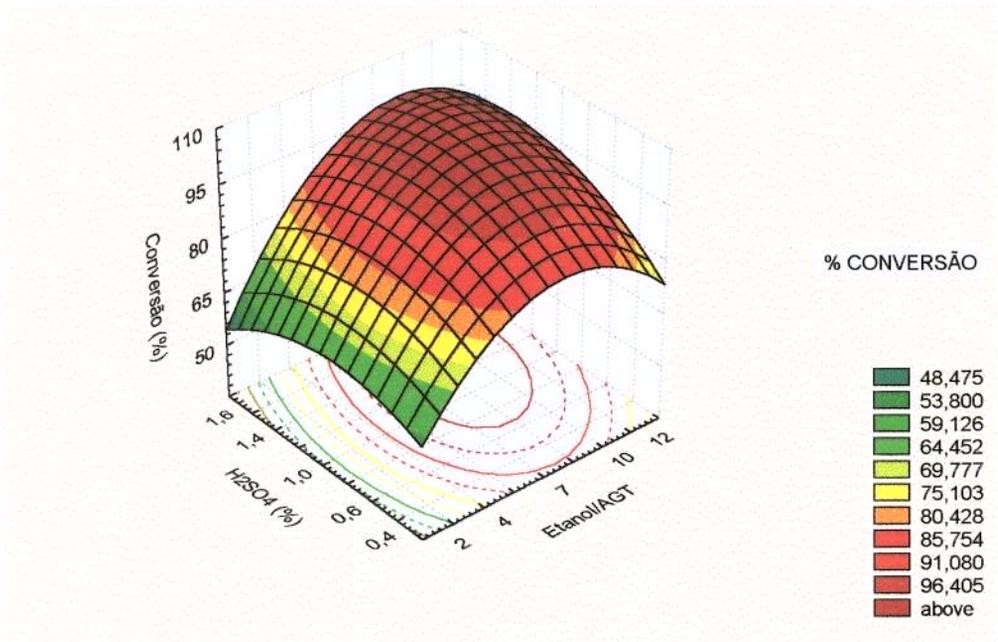


Figura 10- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito da concentração de H₂SO₄ e da relação molar etanol:ácidos graxos totais (AGT) sobre a taxa de conversão dos AGT do DDOS em ésteres etílicos

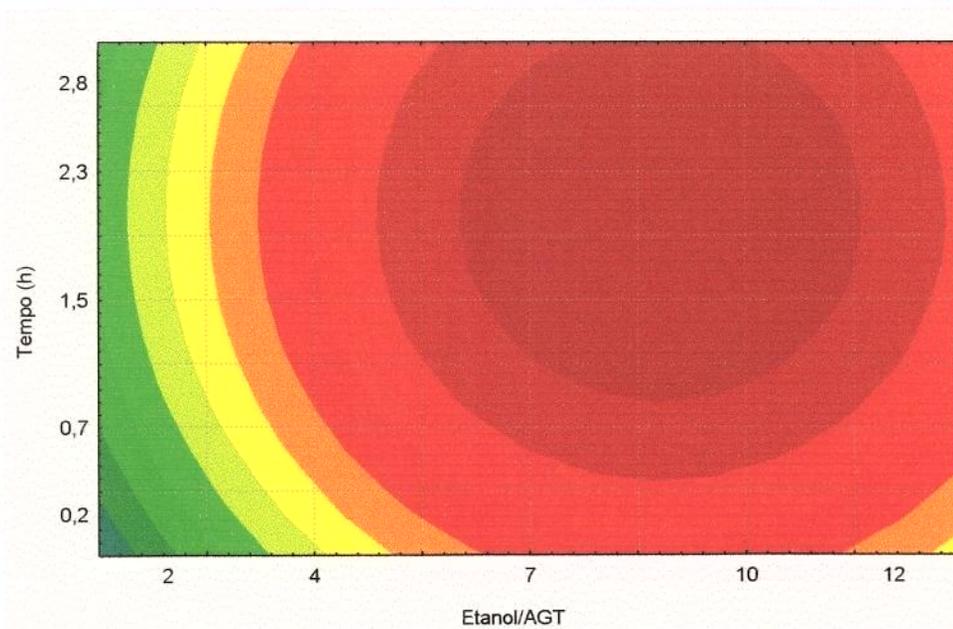
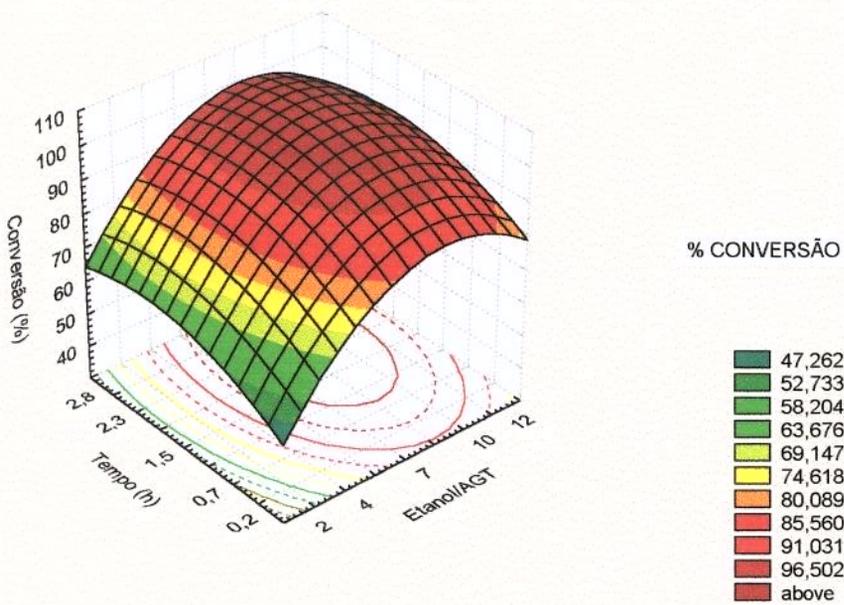


Figura 11- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito do tempo de reação e da relação molar etanol:ácidos graxos totais (AGT) sobre a taxa de conversão dos AGT do DDOS em ésteres etílicos

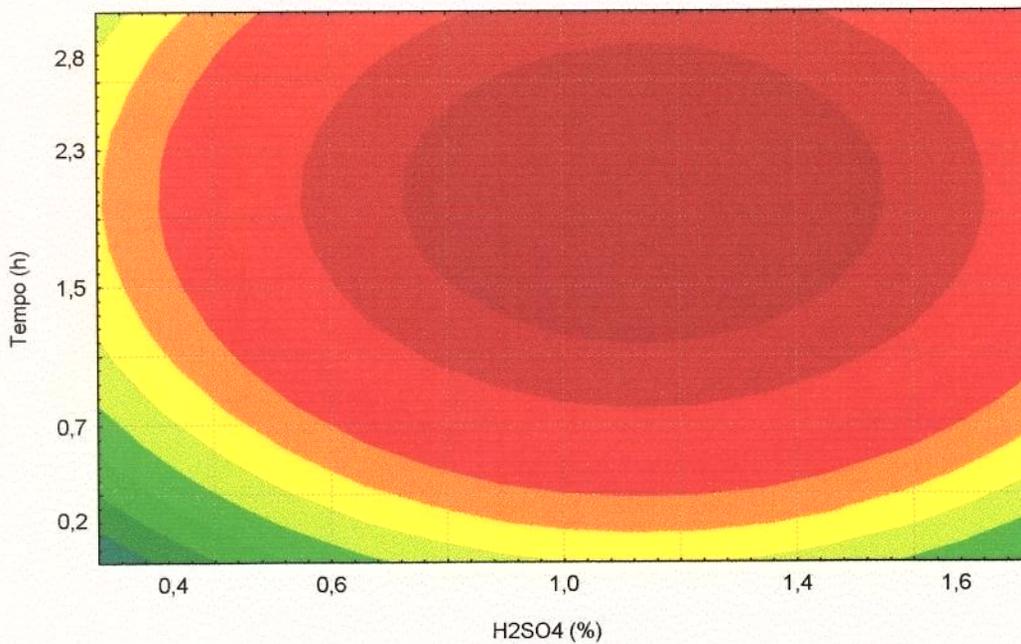
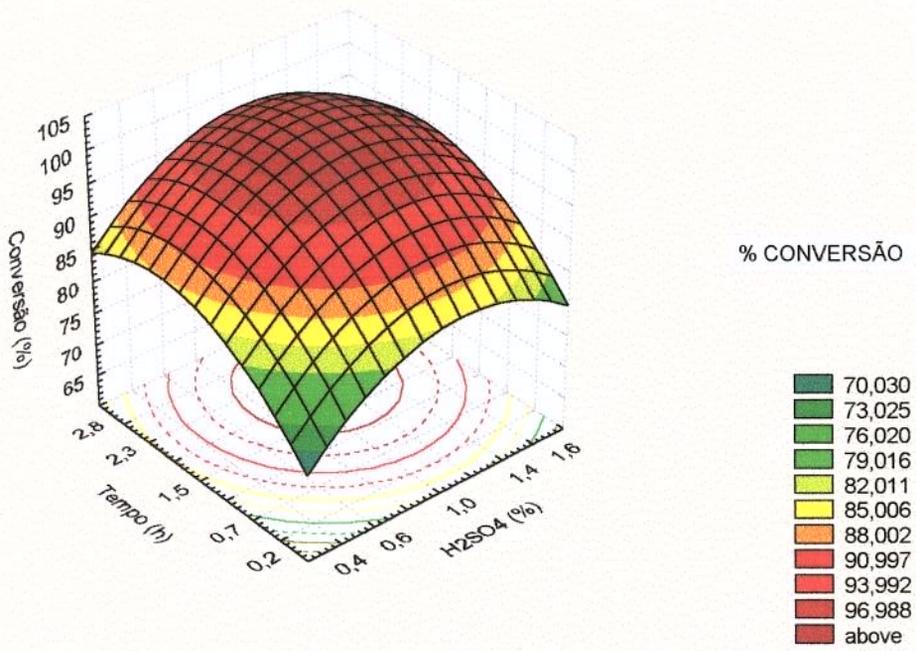


Figura 12- Superfície ajustada e mapa de contorno do efeito do tempo de reação e da concentração de H₂SO₄ sobre a taxa de conversão dos ácidos graxos totais do DDOS em ésteres etílicos

A determinação da região ótima da reação de esterificação química dos AGT do DDOS com etanol anidro é feita através da intersecção dos três mapas de contorno, donde se conclui que a região ótima da reação de esterificação estudada é: relação molar etanol:AGT de 6,4 a 11,2:1; concentração de H_2SO_4 de 0,9 a 1,5% e tempo de reação de 1,3 a 2,6 horas, obtendo-se taxas de conversão de 96,0% e 98,3%, respectivamente, através da equação [4]. As perdas de esteróis, nestas condições otimizadas, foram inferiores a 6,5%. Não foram encontrados em literatura, dados referentes a rendimentos em ésteres obtidos a partir da reação de esterificação química da matéria saponificável do DDOS. Em dois estudos, para obtenção de concentrados de tocoferóis e esteróis: 1) BROKAW (EASTMAN KODAK, 1957), após saponificação e acidificação do DDOS, esterificou a mistura com metanol (5:1 – etanol:AGT), utilizando HCl como catalisador (4,3%, em peso, sobre os AGT) e tempo de 1 hora e 2) FRANK E. SMITH (EASTMAN KODAK, 1967), usando o mesmo processo, esterificou a mistura acidulada com metanol (24,5:1 – etanol:AGT), utilizando HCl como catalisador (2,5%, em peso, sobre os AGT) e tempo de reação de 1 hora. Mas em nenhum dos dois estudos foram mencionadas as taxas de esterificação.

6.3.1.2- Validação Experimental do Modelo Estatístico da Reação de Esterificação Química do DDOS Saponificado e Acidulado

A validação prática do modelo experimental obtido (Equação 4), foi realizada utilizando-se as condições ótimas extremas da faixa encontrada. Com os valores de: relação molar etanol:AGT = 6,4:1; concentração H_2SO_4 = 0,9% e tempo reação = 1,3 horas, obteve-se uma taxa de conversão dos AGT em ésteres etílicos de 96,8%; já para o outro extremo, com os valores de : relação molar etanol:AGT = 11,2:1; concentração H_2SO_4 = 1,5% e tempo de reação = 2,6 horas, obteve-se uma taxa de conversão de 99,0%. Comparando-se os resultados das taxas de conversão obtidas através do modelo matemático codificado (96,0 e 98,3%), com os valores obtidos experimentalmente (95,1 e 98,0%), ratifica-se a conclusão teórica, mencionada anteriormente, de que o modelo encontrado realmente é preditivo.

7- ANÁLISE COMPARATIVA DOS PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DO DDOS

A comparação dos três processos de esterificação da matéria saponificável do DDOS, baseado na sua composição inicial e nas taxas de conversão dos ácidos graxos em ésteres etílicos obtidas, pode ser visualizada na Tabela 39, onde os teores iniciais da matéria-prima eram: AGL = 47,55%; AGT = 67,32%; matéria insaponificável = 26,23%; matéria saponificável = 73,77%; tocoferóis = 8,55% e esteróis = 17,02%.

Tabela 39- Comparação dos três processos de esterificação da matéria saponificável do destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS)

Processo de Esterificação	Após a reação de esterificação					Rendimentos (*)	
	Residual (%)					(%)	
	Conv.	AGL	AGT	M.S.	M.I.	Tocoferóis	Esteróis
Enzimático	90,0 ⁽¹⁾	4,76	24,5	48,3	51,7	16,9	33,6
Químico direto	94,0 ⁽¹⁾	2,85	22,6	46,3	53,7	17,5	34,8
Químico completo ⁽³⁾	98,0 ⁽²⁾	0,0	1,35	4,9	95,1	31,0	61,7

(1) Taxa de conversão dos ácidos graxos livres (AGL) em ésteres etílicos

(2) Taxa de conversão dos ácidos graxos totais (AGT) em ésteres etílicos

(3) Esterificação química do DDOS saponificado e acidulado

(*) Considerando-se a hipótese, de que após o processo de esterificação dos ácidos graxos do DDOS, todos os ésteres formados foram separados da mistura de reação, por exemplo, através da destilação molecular.

Na mesma Tabela, observa-se que os processos, enzimático e químico direto, de esterificação dos AGL presentes no DDOS não tiveram diferença significativa em termos de rendimentos, possibilitando um aumento na concentração inicial dos tocoferóis e esteróis de aproximadamente 100%. O processo químico completo foi o mais eficiente, 260% (3,6 vezes o teor inicial).

Considerando-se as diferenças de processos, os custos que poderiam estar envolvidos (insumos, mão de obra, equipamentos) e os preços que os tocoferóis e esteróis atingem no mercado, estimamos que o melhor processo é o de esterificação da matéria saponificável do DDOS saponificado e acidulado.

Para trabalhos futuros, sugere-se: a) estudo do processo de reutilização da enzima empregada na esterificação enzimática do DOS e b) otimização do processo de separação dos ésteres etílicos formados, por destilação molecular, nos três processos estudados de esterificação do DDOS, obtendo-se dessa forma, os concentrados de tocoferóis e esteróis.

8- CONCLUSÕES

Os três processos de esterificação do DDOS mostraram ser tecnicamente viáveis.

As faixas ótimas para a reação de esterificação enzimática do DDOS foram: temperatura de reação de 44 a 56°C; concentração de Lipozyme de 12,6 a 17,4% e relação molar etanol:AGL de 1,5 a 2,5:1, obtendo-se taxas de conversão dos AGT em ésteres etílicos acima de 63,6%.

As faixas ótimas para a reação de esterificação química direta DDOS foram iguais às da reação de esterificação do DDOS saponificado e acidulado: relação molar etanol:AGT (etanol:AGL, no processo químico direto) de 6,4 a 11,2:1; concentração de H₂SO₄ de 0,9 a 1,5% e tempo de reação de 1,3 a 2,6 horas, obtendo-se taxas de conversão dos AGT em ésteres etílicos de 66,4 e 98%, respectivamente.

Tanto na reação enzimática, como na química, a esterificação ocorreu somente com os AGL, confirmando a hipótese inicial (item 6.2.2) e justificando a utilização da relação molar etanol:AGL nos experimentos.

Comparativamente, estima-se que o processo de esterificação do DDOS saponificado e acidulado foi o que proporcionou melhores condições para a obtenção de concentrados de tocoferóis e esteróis.

Nas condições otimizadas, as perdas de tocoferóis foram inferiores a 10,5% para a esterificação química do DDOS saponificado e acidulado e menores que 4% para os processos de esterificação enzimática e química direta.

As perdas de esteróis, nas condições otimizadas de reação, foram de 6,5% para a esterificação química do DDOS saponificado e acidulado, de 5,7 e 5,4%, para a esterificação química direta e enzimática do DDOS, respectivamente.

Para os três processos de esterificação do DDOS, os modelos matemáticos propostos foram de 2ª ordem, estatisticamente significativos em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) e preditivos.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ADELHORST, K.; BJORKLING, F.; GODTFREDSSEN, S.E.; KIRK, O. Enzyme-catalyzed preparation of 6-O-acylglucopyranosides. **Synthesis**, v.2, n.2, p.112-115, 1990.
- 2- AGRICULTURAL 99: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 1999. p. 452-456.
- 3- ANON. Tocopherols as antioxidants. **Tecnologie Alimentari**, v.4, n.10, p.24-25, 1981.
- 4- ANON. Use of immobilized lipases for interesterification reactions and ester synthesis. **Enzyme Process Division – Application Sheet**, p.1-6, 1995.
- 5- ANON - RAISIO. Can't keep up with margarine demand. **Inform**, v.7, n.9, p.978-980, 1996.
- 6- ANON - NOVOS ALIADOS. Cientistas comprovam que vinho tinto e uma nova margarina ajudam a evitar doenças do coração. **Veja**, v.29, n.36, p.66, 1996.
- 7- ANON. Agricultura brasileira: Um futuro próspero? **Revista Óleos e Grãos**, v.40, n.1/2, p.16-18, 1998.
- 8- ANON. New sterol, stanol goods enter market. **Inform**, v.10, n.12, p.1121, 1999.
- 9- A.O.C.S.- **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, IL.: AOCS, 1993, 1995. v.1/2.
- 10- AUGUSTO, M.M.M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja**. Campinas, SP, 1988. 125 p. Tese de Mestre em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- 11- AUGUSTO-RUIZ, W. **Proteólise do resíduo do extrato hidrossolúvel da soja.** Campinas, SP, 1985. 199 p. Tese de Doutor em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 12- BALAZS, I.L. Refining and use of byproducts from various fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.64, n.8, p.1126-1128, 1987.
- 13- BARATA, L.E.S.; CONTRERAS G., E. Relatório Técnico. **Recuperação de vitamina E dos resíduos da indústria de óleos vegetais.** Campinas: Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP, 1984.
- 14- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2nd ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 1996. cap.3 e 5.
- 15- BATISTELLA, C.B. **Modelagem e simulação de destiladores moleculares: centrífugo e filme descendente.** Campinas, SP, 1995. p.200. Tese de Mestre em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- 16- BATISTELLA, C.B.; WOLF-MACIEL, M.R. Modeling, simulation and analysis of molecular distillators: Centrifugal and falling film. **Computers & Chemical Engineering**, v.20, n.5, p.19-24, 1996.
- 17- BAUERNFIELD, J. The tocopherol content of food and influencing factors. **C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.8, n.4, p.337-382, 1977.
- 18- BAUERNFEIND, J.C. Tocopherols in food. In: MACHLINE, L.J. **Vitamin E.** New York: Marcel Dekker, 1980. p.99-167.
- 19- BECKER, M.; STAAB, D.; VON BERGMANN, K. Treatment of severe familiar hipercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. **Journal of Pediatrics**, v.122, n.3, p.292-294, 1993.

- 20- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Unsaponifiable constituents. **Food chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. cap:3, p.182-197.
- 21- BLOCK, G.; LANGSETH, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**, v.48, n.1, p.80-84, 1994.
- 22- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.8, p.519-524, 1990.
- 23- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acids esters in high yields. **Enzyme Microbiological Technology**, v.14, n.5, p.546-552, 1992.
- 24- BOURGEOIS, C. **Determination of vitamina E: tocopherols and tocotrienols**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p.1-7.
- 25- BOX G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments- An introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley & Sons , 1978. 652 p.
- 26- BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R.G. **Lipolytic Enzymes**. New York: Academic Press, 1974. p.25-175.
- 27- BURCH, C.R. Oils, Greases and High Vacua. **Nature**, v.72, n.7, p.729-731, 1928.
- 28- BURROWS, G. **Molecular distillation**. Oxford: Oxford University Press, 1960.
- 29- BURTON, G.W.; JOYCE, A.; INGOLD, K.U. Vitamin E: the only lipid soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes. **Article of Biochemistry and Biophysiology**, v.21, n.2, p.281-290, 1983.

- 30- BURTON, G.W.; TRABER, M.G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**, v.10, n.3, p.357-382, 1990.
- 31- CARR, R.; MIKLE, J. Recent aspects of canola processing. In: BARRERA-ARELLANO, D.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; GONÇALVES, L.A.G. **Proceedings of the Latin American congress and exhibit on fats and oils processing**. Campinas: AOCS / SBOG / UNICAMP, 1995. p. 9-18.
- 32- CHEMY UNION LTDA. **Comunicação pessoal**, 1995.
- 33- CHOW, C.; DRAPER, M. Oxidative stability and antioxidant activity of the tocopherol in corn and soybean oils. **Institute of Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.44, n.3, p.396-398, 1974.
- 34- CILLARD, J.; CILLARD, P.; CORMIER, M.; GIRRE, L. α -Tocopherol prooxidant effect in aqueous media: increased autoxidation rate of linoleic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.57, n.8, p.252-255, 1980.
- 35- COMBS, G.F., Jr. Vitamin E. The Vitamins. **Fundamental Aspects in Nutrition & Health**. San Diego: Academic Press Inc., 1992. p. 179-203.
- 36- CORT, W.M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.51, n.7, p.321-325, 1974.
- 37- CRAUER, L.S. Continuous recovery of acid oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.42, n.6, p.661-663, 1965.
- 38- DESAI, I. Assay methods. In: MACHLIN, L.J. **Vitamin E**. New York: Marcel Dekker, 1980. p.67-98.
- 39- DIPLOCK, A.T. Antioxidant and disease prevention. **Mol Aspects of the Medicine**, v.15, n.2, p.293-376, 1994.

- 40- DISTILLATION PRODUCTS Inc. Norris D. Embree; Noel H. Kuhrt. **Preparation of tocopherol concentrate**. U.S. Patent n. 2.454.692. 23 nov. 1948.
- 41- DOBARGANES, M.C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Size exclusion chromatography in the analysis of lipids. In: CHRISTIE, W.W. **Advances in Lipids Methodology**. Scotland: The Oil Press Ltd, 1993. p.113-137.
- 42- DURROW, F.A. Deodorization of edible oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.2, p.272-274, 1983.
- 43- EASTMAN CHEMICAL Co., Scott D. Barnicki; Charles E. Sumner Jr.; H. Chip Williams. **Process for the production of tocopherol concentrates**. US Patent n. 5.512.691. 30 Apr. 1996.
- 44- EASTMAN KODAK Co., George Young Brokaw. **Improvements in or relating to the recovery of tocopherols from deodorizer sludges**. US Patent n. 774.855. 15 May 1957.
- 45- EASTMAN KODAK Co., Winton Brown; Frank E. Smith. **Process for separating tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like**. U.S. Patent n. 3.153.055. 13 Oct. 1964.
- 46- EASTMAN KODAK Co., Frank E. Smith. **Separation of tocopherols and sterols from deodorizer sludge and the like**. U.S. Patent n. 3.335.154. 8 Aug. 1967.
- 47- EIGTVED, P.; HANSEN, T.T.; SAKAGUCHI, H. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions. **Journal of Oil Chemists' Society Meeting**. Honolulu: American Oil Chemists' Society, 1986. p.1-24.
- 48- EISENHARD, W.C. Esterification. In: JOHNSON, R.W. & FRITZ, E. **Fatty acids in industry**. New York: Marcel Dekker, 1988. cap.:6, p.139-152.

- 49- EITENMILLER, R.R. Vitamin E content of fats and oils nutritional implications. **Food Technology**, v.51, n.5, p.78-81, 1997.
- 50- ELSON, C.E. Tropical oils: Nutritional and Scientific Issues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, n.2, p.79-102, 1992.
- 51-ERCIYES, A.T.; ISHI RAWA, H. INUZUKA, M.; HIRAOKAS.; MORI, H.; YAMADA, I. Vaporization of binary liquid mixtures from surface at reduced pressure. **Journal of Chemistry Energy-Symposium Series**, v. I A, p.359-371, 1987.
- 52- ERICKSON, D.R. Soybean oil: up date on number one. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.2, p.351-356, 1983.
- 53- FACIOLI, N.L.; GONÇALVES, L.Ap.G. **Modificação Via Enzimática da Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui**. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas,SP, 1996, pp. 79.
- 54- FEDELI, E.; LANZANI, A.; CAPELLA, P.; JACINI, G. Triterpene alcohols and sterols of vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.43, n.1/6, p.254-256, 1966.
- 55- FEDELI, E.; GASPAROLI, A. Composition of commercial deodorant distillates. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.54, n.12, p.494-501, 1977.
- 56- FEUGE, R.O.; GROS, A.T. Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalyzed interesterification of peanut oil with ethanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.26, n.3, p.97-102, 1949.
- 57- FORMO, M.W. Ester reactions of fatty materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.31, n.11, p.548-559, 1954.
- 58- FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Variables affecting the yield of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n.10, p.1638-1643, 1984.

- 59- FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.12, p.1375-1380, 1986.
- 60- FUKUZAWA, K.; TOKUMURA, A.; OUCHI, S.; TSUKATANI, H. Antioxidant activities of tocopherols on Fe⁺²- ascorbate induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. **Lipids**, v.17, n.7, p.511-513, 1982.
- 61- GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.6, p.621-633, 1997.
- 62- GAVIN, A.M. Edible oil deodorization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, n.11, p.783-791, 1978.
- 63- GAVIN, A.M. Deodorization and finished oil handling. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.3, p.175-184, 1981.
- 64- GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Isolation of tocopherol and sterol concentrate from sunflower oil deodorizer distillate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, n.10, p.1271-1274, 1996.
- 65- GLUECK, C.J.; SPEIRS, J.; TRACY, T.; STREICHER, P.; ILLIG, E.; VANDERGRIFT, J. Relationships of serum plant sterols (Phytosterols) and cholesterol in 595 Hiperphytosterolemia probands and their first-degree relatives. **Metabolism**, v.40, 8, p.842-848, 1991.
- 66- GOULD, M.N.; HAAG, J.D.; KENNAN, W.S.; TANNER, M.A.; ELSON, C.E. A comparison of Tocopherol and Tocotrienol for the chemo-prevention of chemically induced rat mammary tumors. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, n.12, p.1068-10705, 1991.
- 67- GREENBERG, D.B. A theoretical and experimental study of the centrifugal molecular still. **Aiche Journal**, v.18, n.3, p.269-276, 1972.

- 68- GRIEWAHN, J.; DAUBERT, B.F. Delta-tocoferol as an antioxidant in lard. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.25, n.1, p.26-27, 1948.
- 69- GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; BARRERA-ARELLANO, D. **Relatório Interno - Convênio White Martins**. Campinas: Laboratório de Óleos e Gorduras FEA/UNICAMP, 1998.
- 70- GUNSTONE, F.D.; KATES, M.; HARWOOD, J.L. Separation and isolation procedures. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. **The Lipid Handbook**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1994. p.225-248.
- 71- GUTFINGER, T.; LETAN, A. Studies of unsaponifiables in several vegetable oils **Lipids**, v.9, n.9, p.658-663, 1974 a.
- 72- GUTFINGER, T.; LETAN, A. Quantitative changes in some unsaponifiable components of soyabean oil due to refining. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.25, n.12, p.1143-1147, 1974 b.
- 73- HARTMAN, L. Appraisal of methods of total monoester estimation in commercial monoglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.39, n.(2), p.126-128, 1962.
- 74- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.8, p.475-476, 1973.
- 75- HASSAN, A.S.; RAMPONE, A.J. Intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and β -sitostanol in rats. **Journal of Lipid Research**, v.20, n.7, p.646-648, 1979.
- 76- HAUMANN, B.F. Antioxidants: Firms seeking products they can label as natural. **Inform**, v.1, n. 12, p.1002-1009, 1990.
- 77- HEINEMANN, T.; LEISS, O.; Von BERGMAN, K. Effects of low dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hipercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.61, n.1, p.219-221, 1986.

- 78- HEINEMANN, T.; PIETRUCK, B. KULLAK- UBLICK, G.; Von BERGMAN, K.
Comparison of sitosterol and sitostanol on inhibition of intestinal cholesterol
absorption. **Agents Actions**, v.26, n.2, p.117-119, 1988.
- 79- HEINEMANN, T.; AXTMANN, G.; Von BERGMANN, K. Composition of intestinal
absorption of cholesterol with different plant sterols in man. **European
Journal of Clinical Investments**, v.23, n.8, p.827-830, 1993.
- 80- HERTING, D.C.; DRURY, E.J.E. Alfa-tocopherol content of cereal grains and
processed cereal. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.17, n.4,
p.785-790, 1969.
- 81- HESS, J.L. Vitamin E: α -Tocopherol. In: ALCHER, R.G; HESS J.L. **Antioxidant
in Higher Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.111-134.
- 82- HICKMAN, K.C.D - Identification of vitamins by molecular distillation. **Nature**,
v.88, n.9, p.881-882, 1936.
- 83- HICKMAN, K.C.D. High-vacuum short-path distillation: a review. **Chemical
Review**, v.34, n.2, p.51-106, 1943.
- 84- HILLS, M.J.; KIEWITT, I.; MUKHERJEE, K.D. Enzymatic fractionation of fatty
acids: enrichment of γ -linolenic acid and docosahexaenoic acid. Selective
esterification catalyzed by lipase. **Journal of the American Oil Chemists'
Society**, v.67, n.5, p.561-564, 1990.
- 85- HOFFMAN, R.L.; EVANS, C.D.; COWAN, J.C. Soybean unsaponifiables:
Chromatographic investigation of shell drain condensate from a commercial
deodorizer. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.41, n.(2),
p.116-119, 1964.
- 86- HOLEN, B. Rapid separation of free sterols by reversed-phase high performance
liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**,
v.62, n.9, p.1344-1346, 1985.

- 87- HOLLÓ, J.; KURUCZ, E.; BORÖDI, A. The applications of molecular distillation. **Akademiai Kiadó**, Budapest, 1971.
- 88- HOVE, E.L.; HOVE, Z. The effect of temperature on the relative activity of α -; β - and γ -tocopherols and gossypol. **Journal of Biological Chemistry**, v.156, p. 623-632, 1944.
- 89- HUNTER, J.E. Nutritional consequences of processing soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.3, p.283-287, 1981.
- 90- I.A.L. - **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3rd ed. São Paulo: Rebocho, D.D., 1985. v.1. p.21-22.
- 91- ISON, A.P.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. Effect of solvent concentration on enzyme catalyzed interesterification of fats. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.10, n.1, p.47-51, 1988.
- 92- ITOH, T.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. Sterol composition of 19 vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.50, n.4, p.122-125, 1973.
- 93- I.U.P.A.C.- A.O.A.C. Polar compounds in frying fats. **International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard method of oils, fats and derivates**. 6th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982. part 4, method 2057.
- 94- IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. Studies on lipase. Part XV synthesis of terpene alcohol esters by lipase. **Agriculture Biological Chemistry**, v.44, n.28, p.2731-2732, 1980.
- 95- JOHANSSON, A.; HOFFMANN, I. The effect of processing on the content and composition of free sterols and sterol esters in soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, n.10, p.886-889, 1979.

- 96- JUNG, M.Y.; YOON, S.H.; MIN, D.B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybeans oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, n.2, p.118-120, 1989.
- 97- KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The Chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, v.31, n.7, p.671-701, 1996.
- 98- KASPAREK, S. Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In: MACHLIN, L.J. **Vitamin E - A Comprehensive Treatise**. New York: Marcel Dekker, 1980. p. 7-65.
- 99- KAUFMANN, H.P. Pro- und antioxydantien auf dem fettgebiet I: Problemstellungen. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.63, n.4, p.331-334, 1961.
- 100- KAUFMANN, H.P.; GARLOFF, H.A. Pro- und antioxydantien auf dem fettegebiet II: Über natürlich vorkommende antioxydantien, 1. Mitteilung. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.63, n.4, p.334-344, 1961.
- 101- KAUFMANN, H.P.; HAMZA, Y. Über die veränderung der sterine in fetten und ölen bei der industriellen bearbeitung derselben II. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.72, n.6, p.432-433, 1970.
- 102- KEHSE, M. Lavage des éluates et récupération des distillats in désodorisation. **Revue Française des Corps Gras**, v.23, n.9, p.493-496, 1976.
- 103- KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response surfaces: design and analyses**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1987. 510 p.
- 104- KIM, S.K.; RHEE, J.S. Isolation and purification of tocopherols and sterols from soya oil deodorization. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v.14, n.2, p.174-182, 1982.
- 105- KNEZ, Z.; LEITGEB, M.; ZAVRSNIK, D.; LAVRIC, B. Synthesis of oleic acid esters with immobilized lipase. **Fat Science and Technology**, v.92, n.2, p.169-172, 1990.

- 106- KOCHHAR, S.P. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. **Progress in Lipid Research**. Great Britain: Pergamon Press, 1983. v.22, p.161-188.
- 107- KOMODA, M.; MATSUSHITA, S.; HARADA, I. Intracellular distribution of tocopherol in soybean cotyledons. **Cereal Chemistry**, v.45, n.6, p.581-588, 1968.
- 108- KUDGHODKAR, B.J.; HORLICK, L.; SODHI, H.S. Effect of plant sterols on cholesterol metabolism in man. **Atherosclerosis**, v.21. n.1, p.29-21, 1976.
- 109- KUSY, P.F. Transesterification of vegetable oils for fuels. In: **Proceedings of the international conference on plant and vegetable oils fuels**. Joseph, MI.: ASAE, 1982. p.127-137.
- 110- LANDERS, R.E.; RATHMANN, D.M. Vegetable oils: effects of processing, storage and use on nutritional values. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.3, p.255-259, 1981.
- 111- LARS, J.; NILSSON, G. Oxidation of tocopherols. **Proceedings of the 9th Scandinavian Symposium of Lipids**, 1977. p.352-355.
- 112- LEA, C.H.; WARD, R.J. Relative antioxidant activities of the seven tocopherols. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.10, n.10, p.537-548, 1959.
- 113 LEE, H.; CHUNG, B.H.; PARK, Y.H. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.28, p.571-573, 1991.
- 114- LEES, A.M.; MOK, H.Y.J.; LEES, R.S.; McCLUSKEY, M.A.; GRUNDY, S.M. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: Clinical trial in patients with hipercolesterolemie and studies of sterols balance. **Atherosclerosis**, v.28, n.3, p.325-327, 1977.

- 115- LIENER, I.E. Nutritional value of food protein products. In: SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybean chemistry and technology**. Westport: AVI, 1978. v.1, p.203-277.
- 116- LING, W.H.; JONES, P.J.H. Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. **Atherosclerosis**, v.118, n.3, p.319-331, 1995.
- 117- LOGNAY, G.; SEVERIN, M.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P.J. Edible fats and oils reference materials for sterols analysis with particular attention to cholesterol. Part 1. Investigation of some analytical aspects by experimental laboratories. **Analyst**, v.117, n.12, p.1093-1097, 1992.
- 118- MACHLIN, L.J. Vitamin E. In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical & clinical aspects**. New York and Basel, 1984. p. 99-145.
- 119- MACRAE, A.R. Lipase - catalyzed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.2, p.291-294, 1983.
- 120- MACRAE, A.R. Microbial lipases as catalysts for interesterification of oils. **Biotechnology Oils Fats Industry. AOCS Monography**, v.11, n.2, 1984.
- 121- MAG, T.K.; GREEN, D.H.; KWONG, A.T. Continuous acidulation of soapstock and recovery of acid oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.5, p.1008-1011, 1983.
- 122- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M.C.; DOBARGANES, M.C. Combination of adsorption and size-exclusion chromatography for the determination of fatty acid monomers, dimers and polymers. **Journal of Chromatography**, v.574, n.1, p.37-44, 1990.
- 123- MATTIL, K.F. Deodorization. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 3th ed. New York: Wiley Interscience, 1964. p.898-930.

- 124- MATOS, J.R.; WEST, J.B.; WONG, C.-H. Lipase catalyzed synthesis of peptides: preparation of a *Penicillium G.* precursor and other peptides. **Biotechnology Letters**, v.9, n.3, p.233-236, 1987.
- 125- MATTSON, F.H.; GRUNDY, S.M; CROUSE, J.R. Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.35, n.7, p.697, 1982.
- 126- MAU, J.L; TSEN, H.Y. Investigation on the conditions for the preparation of high-purity vitamin E concentrate from soybean oil deodorizer distillate. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, v.33, n.6, p.686-697, 1995.
- 127- MENDILAHARSU, M.; DE STEFANI, E.; DENEIO-PELLEGRINI, H.; CARZOGLIO, J.; RONCO, A. Phytosterols and risk of lung cancer: A case-control study in Uruguay. **Lung Cancer**, v.21, n.1, p.37-47, 1998.
- 128- McLAUGHLIN, P.J.; WEIHRAUCH, J.C. Vitamin E content of foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.75, n.7, p.647-655, 1979.
- 129- MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.3, p.168-170, 1990.
- 130- MORRISON, R.T.; BOYD, R. Carboxylic acids. In: MORRISON, R.T. & BOYD, R.N. **Organic chemistry**. 6^a ed. London: Prentice Hall International, Inc., 1992. cap.: 19, p.713-752.
- 131- MOTTA, S.; ARAÚJO, J.M.A. Concentração de vitamina E a partir do destilado do óleo de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.34, n.2, p.217-226, 1991.
- 132- MUKHERJEE, K.D. Lipase catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. **Biocatalysis**, v.3, n.3, p.277-293, 1990.

- 133- MYHER, J. J.; KUKSIS, A. ; MARAI, L. Identification of the less common analogous shortchain triacylglycerols in the most volatile 2,5% molecular distillate of butter oil. **Journal of the American Chemists' Society**, v.70, n.12, p.1183-1191, 1993.
- 134- NAGAO, A.; KITO, M. Synthesis of *O*-acyl-*L*-homoserine by lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, n.7, p.710-713, 1989.
- 135- NAIR, P. P.; TURJMAN, N.; KESSIE, G.; CALRINS, B.; GOODMAN, G. Diet, Nutrition and Metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, β -sitosterol, and stigmasterol. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.40, n.9, p.927, 1984.
- 136- NAKAI, E.; NEZU, T.; SUZUKI, K.; MATSUMOTO, W. **Modification of hydrogenated oils with lipase**. Japanese Patent n.3.30.686, 1991.
- 137- NAUDET, M. Sur la nature et la composition des produits éliminés au cours de la désodorisation I. **Revue Française des Corps Gras**, v.16, n.(4), p.259-268, 1969.
- 138- NAUDET, M.; RAKOTOVAO, M.; CECCHI, G. **Revue Française des Corps Gras**, v.20. n.1, p.27-31, 1973.
- 139- NGAH, W.Z.W.; JARIEN, Z. SAN, M.M.; MARZURI, A.; TOP, G.M.; SHAMAAN, N.A. & KADIR, K.A. Effect of tocotrienols on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetyl amino fluorene in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, n.10, p.1076-1081, 1991.
- 140- NISSHIN OIL MILLS Ltd. THE. Yamagami Keisho; Takagi Yoshiaki; Kuwabara Mayumi. **Preparation od tocopherol concentrate**. Japanese Patent n. 57.144.281 A. 06 Sept. 1982.

- 141- NORRIS, F. Extraction of fats and oils. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oils and fats products**. 3th ed. New York: Wiley Interscience, 1964, p.637-792.
- 142- NOUREDDINI, H.; ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.11, p.1457-1463, 1997.
- 143- NOVO LABORATORIES LTD. **Lipozyme IM**. In: Preliminary product information. Novo Industrie A/S, Copenhagen, Denmark, 1989.
- 144- OGLIARUSO, M.A.; WOLFE, J.F. **Synthesis of carboxylic acids, esters and their derivates**. 1st ed. Chichester: JohnWiley & Sons Ltd., 1991. 683p.
- 145- OLCOTT, H.S.; MATTIL, H.A. Antioxidants and the autoxidation of fats. IX. The antioxidant properties of the tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.9, p.1627-1630, 1936.
- 146- OLCOTT, H.S.; EMERSON, O.H. Antioxidants and the autoxidation of fats. VI. Inhibitors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.59, n.6, p.1008-1009, 1937.
- 147- ONG, A.S.H. Natural sources of tocotrienols. In: PACKER., L.; FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1993.
- 148- OOI, C.R.; CHOO, Y.M.; BARISON, Y.; ONG, A.S.H. Recovery of carotenoids from palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.4, p.423-426, 1994.
- 149- OSKI, F.A. Vitamin E-A radical defense. **New England Journal of Medicine**, v.303, n.4, p.454-455, 1980.

- 150- PANDOLFI, A.R. p.p.m. &p.p.b.- Los enemigos de la calidad. In: BARRERA-ARELLANO, D.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; GONÇALVES, L.A.G. **Proceedings of the Latin American congress and exhibit on fats and oils processing**. Campinas: AOCS / SBOG / UNICAMP, 1995. p. 131-134.
- 151- PATTERSON, H.B.W. Bleaching and purifying fats and oils. **Theory and practice**. Champaign, IL: AOCS Press, 1992. p.6-20.
- 152- PEARCE, B.C.; PARKER, R.A.; DEASON, M.E.; QURESHI, A.A.; WRIGHT, J.J.K. Hipercolesterolemia activity of synthetic and natural tocotrienols. **Journal of Medicine Chemistry**, v.35, n.12, p.3595-3606, 1992.
- 153- PERKINS, E.G. Composition of soybeans and soybean products. In: ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybeans processing and utilization**. Champaign, IL.: AOCS Press, 1995. cap.: 3, p.9-28.
- 154- PERRY, R. H.; CHILTON, C.H. **Manual de engenharia química**. Rio de Janeiro, RJ.: Ed. Guanabara, 1980. seção 13.
- 155- POSORSKE, L.H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, n.11, p.1758-1760, 1984.
- 156- PRYDE, E.H. Composition of soybean oil. In: ERICKSON, D.R.; PRYDE, E.H.; BREKKE, O.L.; MOUNTS, T.L.; FALB, R.A. **Handbook of soy oil processing and utilization**. Champaign, IL.: ASA-AOCS, 1980. cap.: 2, p.13-33.
- 157- RAMAMURTHI, S.; BHIRUD, P.R.; McCURDY, A.R. Enzymatic methylation of canola oil deodorizer distillate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.12, p.970-975, 1991.

- 158- RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A.R. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.3, p.287-295, 1993.
- 159- RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A.R. Lipase catalyzed Esterification of oleic acid and methanol in hexane – A kinetic study. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.9, p.927-930, 1994.
- 160- REES, G. J. Medium-vacuum centrifugal molecular distillation in the isolation of high-boiling and heat-sensitive compounds. **Vacuum**, v.25, n.4, p.415-419, 1975.
- 161- REES, G. J. Centrifugal molecular distillation. **Chemical Engineering Science**, v.35, n.8, p.837-845, 1980.
- 162- RUIZ-MÉNDEZ, M.V.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M.C.
Determinación cuantitativa de componentes mayoritarios presentes en los destilados obtenidos en la desodorización de aceites y grasas. **Grasas y Aceites**, v.46, n.1, p.21-25, 1995.
- 163- SELMI, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.6, p.691-695, 1998.
- 164- SERVAT, F.; MONTET, D.; PINA, M.; GALZY, P.; ARNAUD, A.; LEDON, H.; MARCOU, L.; GRAILLE, J. Synthesis of fatty hydroxamic acids catalyzed by the lipase of *Mucor miehei*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.6, p.646-649, 1990.
- 165- SHAHIDI, F.; SHUKLA, V.K.S. Non triacylglycerol constituents of fats, oils. **Inform**, v.7, n.11, p.1227-1232, 1996.

- 166- SHEABAR, F.Z.; NEEMAN, I. Concentration of tocopherols from soy oil deodorization. **La Rivista delle Sostanze Grasse**, v.LXIV, n.6, p.219-222, 1987.
- 167- SIES, H.; MURPHY, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Journal of Photochemistry and Photobiological: Bulletin Biologic**, v.8, n.2, p.211-224, 1991.
- 168- SLOVER, H.T. Tocopherols in foods and fats. **Lipids**, v.6, n.3, p.291-296, 1971.
- 169- SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. Historical background chemical composition of seed. In: SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. **Soybeans chemistry and tecnology**. Westport: AVI, 1978.
- 170- SOCIÉTÉ ANON d'INNOVATIONS CHIMIQUES "SIN-NOVA" ou "SADIC".
French Patent, n. 1.402.133. 11 June 1965
- 171- SONNTAG, N.O.V. Structure and composition of fats and oils. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: Wiley Interscience. 1979. v.1, p. 1-98.
- 172- SONNTAG, N.O.V. Reactions of fats and fatty acids. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: Wiley Interscience. 1979. v.1, P.99-175.
- 173- SONNTAG, N.O.V. Fat splitting, esterification, and interesterification. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: Wiley Interscience, 1982. p.97-173.
- 174- SONNTAG, N.O.V. Growth potential for soybean oil products as industrial materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.5, p.928-933, 1985.

- 175- SONNTAG, N.O.V. **Fat splitting and glycerol recovery**. In: JOHNSON, R.W.; FRITZ, E. New York: Marcel Dekker, 1989. p.23-72.
- 176- STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; WILLETT, W.C. Vitamin E consumption another risk of coronary heart disease in women. **Journal of Medicine**, v.56, n.12, p.1444-1449, 1993.
- 177- STERN, M.H.; ROBESON, C.D.; WEISLER, L.; BAXTER, J.G. The effect of temperature on the relative antioxidant activity of α -; β - and γ -tocopherols and gossypol. **Journal of the American Chemists' Society**, v.69, n.5, p.869-874, 1947.
- 178- STIRTON, A.J. Fat splitting, ester and interesterification. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 3rd ed. New York: Interscience Publ., 1964. p.931-972.
- 179- SWERN, D. Structure and composition of fats and oils, sources, utilization and classification of fats and oils. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 3th. New York: Wiley Interscience, 1964. p. 3-53; 153-247.
- 180- SWERN, D. Refining and bleaching. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 3th. New York: Wiley Interscience, 1982. p. 253-314.
- 181- TAN, D.T.S.; KHOR, H.T.; LOW, W.H.S.; ALI, A.; GAPOR, A. The effect of palm oil vitamin E concentrate on the serum and lipoprotein lipids in humans. **American Scientific Clinical Nutrition**, v.53, n.10, p.1027-1035, 1991.
- 182- TANAKA, Y.; OKABE, A.; ANDO, S. **Method for the preparation of a lower alkyl ester or fatty acid**. U.S. Patent n. 4.303.509, 1981
- 183- TWITCHELL, E. U.S. Patent n. 601.603, 1898.
- 184- USDA - Edible fats and oils update. **Economic research service**. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C. 13 June 1995.

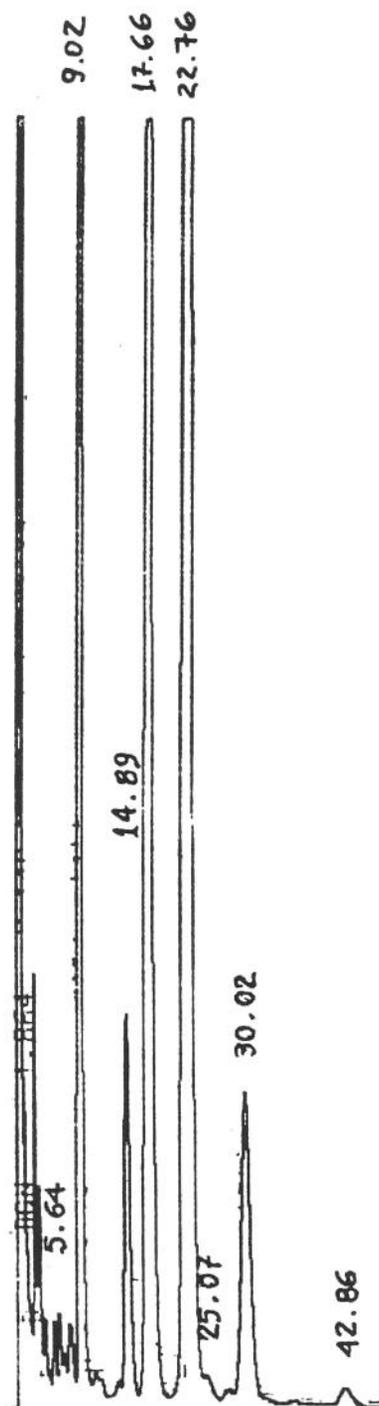
- 185- VanACKER, S.A.B.E., KOYMANS, L.M.H.; BAST, A. Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. **Free Radicals and Biological Medicine**, v.15, n.3, p.311-328, 1993.
- 186- VanHANEN, H.T.; MITTINEN, TA. Effect of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents. **Clinical Chemistry Acta**, v.205, n.1, p.97-100, 1992.
- 187- VITALI, G. Identification and dosage of the tocopherols in the vegetable oils. **Industrie Alimentari**, v.11, n.2, p.69-74, 1972.
- 188- ZEHNDER, C.T. Deodorization. In: ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaign, IL.: AOCS Press, 1995. p.239-257.
- 189- ZHANG, X. **Extraction of tocopherols from deodorizer distillates: Laboratory-scale evaluations**. Texas, 1997. 68 p. Master of Science in Food Science and Technology - Texas A & M University.
- 190- WALSH, L.; WINTERS, R.L.; GONZALEZ, R.G. Optimizing deodorizer distillate tocopherol yields. **Inform**, v.9, n.1, p.78-83, 1998.
- 191- WALKING, A.E.; WESSELS, H. Chromatographic separation of polar and non-polar components of frying fats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists'**, v.64, n.6, p.1329-1330, 1981.
- 192- WARNER, K.; MOUNTS, T.L. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.11, p.827-831, 1990.
- 193- WATSON, K.S.; HOEFER, M. Use or disposal of by-products and spent material from the vegetable oil processing industry in the U.S. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.53, n.5, p.437-442, 1976.

- 194- WELSH, F.W.; WILLIAMS, R.E.; DAWSON, K.H. Lipase-mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. **Journal of Food Science**, v.55, n.17, p.1679-1682, 1990.
- 195- WINTERS, R.L. In: BALDWIN, A.R. **Proceedings world conference on emerging technologies in the fats and oils industry**. Champaign, IL.: AOCS Press, 1986. p.186.
- 196- WINTERS, R.L. Basic principles and modern practices. In: ERICKSON, D.R. **Proceedings world conference edible fats and oils processing**. Champaign, IL.: AOCS Press, 1989. p. 186-238.
- 197- WINTERS, R.L. Deodorizer distillates. In: ERICKSON, D.R. **Edible fats and oils processing: Basic principles and modern practices**. Champaign, IL.: AOCS Press, 1990. p.402-405.
- 198- WOERFEL, J.B. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.3, p.188-191, 1981.
- 199- WOERFEL, J.B. Alternatives for processing of soapstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.2, p.262-265, 1983.
- 200- WOERFEL, J.B. Soybean oil processing byproducts and their utilization. In: ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaign, IL.:AOCS Press, 1995. p.297-313.
- 201- WRIGHT, H.J.; SEGUR, J.B.; CLARK, H.V.; COBURN, S.K.; LAGDON, E.E.; DuPUIS, R.N. A report on ester interchange. **Oil & Soap**, v.21, n.5, p.145-148, 1944.
- 202- YOSHIDA, H. KAJIMOTO, G.; EMURA, S. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentration in oils during microwave heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.10, p.989-995, 1993.

- 203- YOUNG, F.V.K.; POOT, E.; BIERNOTH, E.; KROG, N.; DAVIDSON, N.G.J.;
GUNSTONE, F.D. Soap manufacture. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD,
J.L.; PADLEY, F.B. **The Lipid Handbook**. 2nd ed. London: Chapman & Hall,
1994. p.306-310.
- 204- YUKI, E. Inhibition effect of lecithin on the thermal oxidation of tocopherols.
Journal of the Japanese Oil Chemists' Society, v.27, n.7, p.425-427, 1978.

ANEXOS

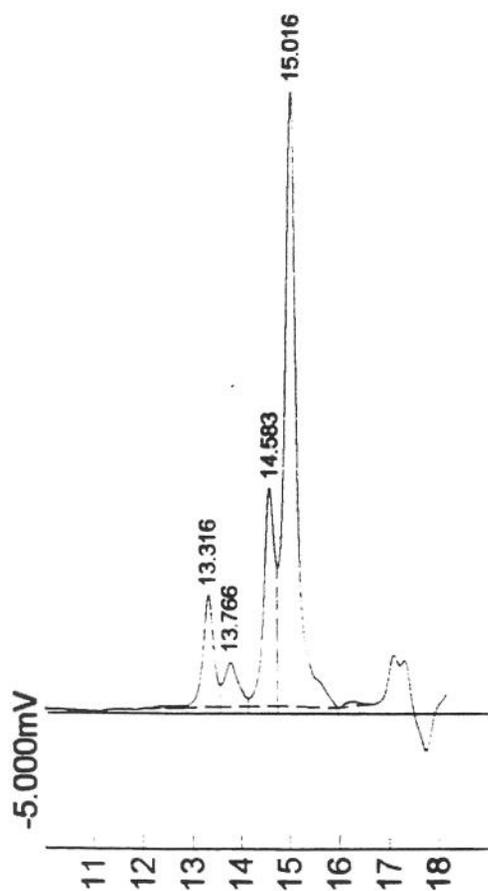
ANEXO 1



Tempo retenção (Min)	Composto
5,64	C 14:0
9,02	C 16:0
14,89	C 18:0
17,66	C 18:1
22,76	C 18:2
25,07	C 20:0
30,02	C 18:3
42,86	C 22:0

Cromatograma da separação dos ácidos graxos do DDOS por Cromatografia Gasosa (Tabela 19)

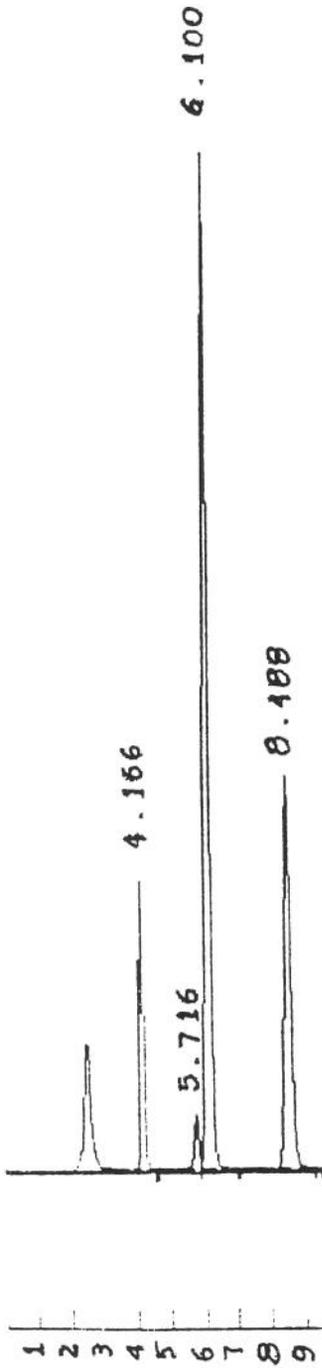
ANEXO 2



Tempo retenção (Min)	Composto
13,316	triglicerídios
13,766	diglicerídios
14,583	monoglicerídios
15,016	ácidos graxos

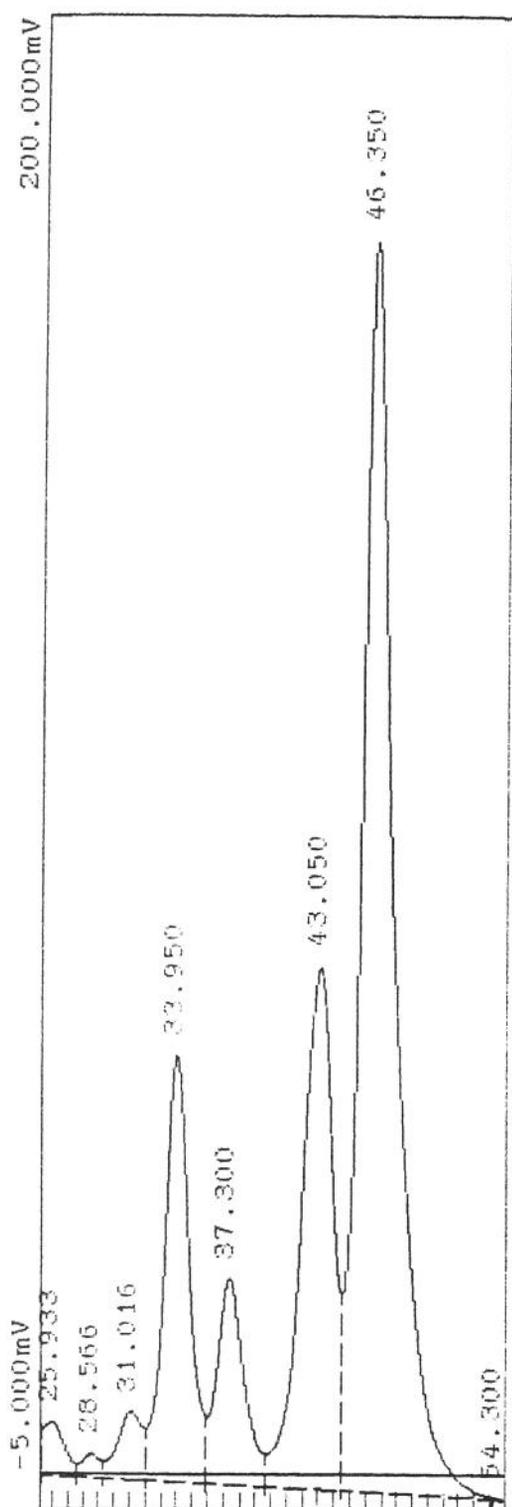
Cromatograma da separação das classes de lipídios do DDOS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPSEC) (Tabela 20)

ANEXO 3



Tempo retenção (Min)	Composto
4,166	α -tocoferol
5,716	β -tocoferol
6,100	γ -tocoferol
8,488	δ -tocoferol

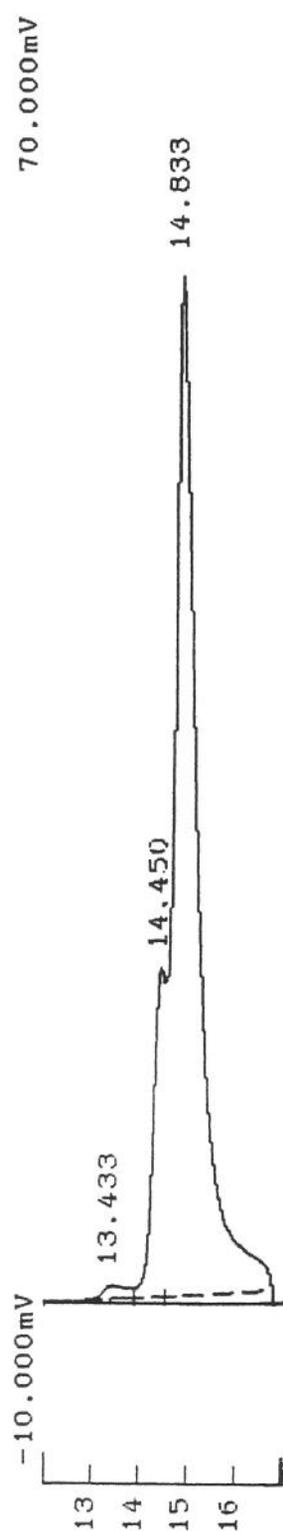
Cromatograma da separação dos tocoferóis do DDOS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Tabela 20)



Tempo retenção (Min)	Composto
33,950	Campesterol
43,050	Estigmasterol
46,350	β -sitosterol

Cromatograma da separação dos esteróis do DDOS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Tabela 20)

ANEXO 5



Tempo retenção (Min)	Composto
13,433	diglicerídios
14,450	monoglicerídios
14,833	ácidos graxos

Cromatograma da separação das classes de lipídios do DDOS saponificado em meio alcoólico, com NaOH:AGT=2:1 e tempo de reação 40 minutos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPSEC) (Gráfico 8)