



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

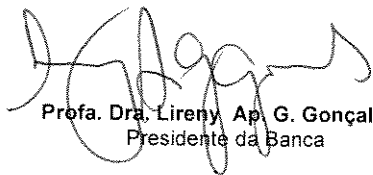
200606068

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS: APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE MEMBRANAS E CO₂SC NA OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Juliana Maria Leite Nóbrega de Moura** aprovado pela Comissão Julgadora em 22 de fevereiro de 2006.

Campinas, 22 de fevereiro de 2006.

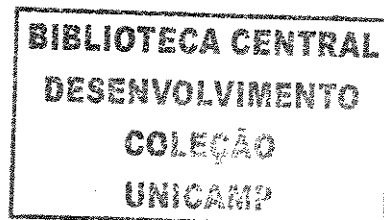


Prof. Dra. Lireny Ap. G. Gonçalves
Presidente da Banca

Juliana Maria Leite Nóbrega de Moura
Engenheira de Alimentos
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Orientadora

Campinas/SP
2006



UNIDADE 19C
CHAMADA TTUNICAMP
M865s
EX
NMBO BC/ 67575
DOC 16-P-00123/06
DX
REÇO 11,00
DATA 22/03/06
CPD

10 ID: 376219

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M865s Moura, Juliana Maria Leite Nóbrega de
Síntese enzimática de lipídios estruturados: aplicação da tecnologia de membranas e CO₂SC na obtenção e purificação / Juliana Maria Leite Nóbrega de Moura. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lipídio estruturado. 2. Membranas. 3. Interesterificação enzimática. 4. Dióxido de carbono supercrítico. 5. Ácidos graxos essenciais. I. Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Enzymatic synthesis of structured lipids: application of membrane and SCCO₂ technology for obtention and purification

Palavras-chave em inglês (Keywords): Structured-lipids, Membranes, Enzymatic interesterification, Supercritical carbon dioxide, Essential fatty acids

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Regina C. A.Lago

Thais Maria F. de Souza Vieira

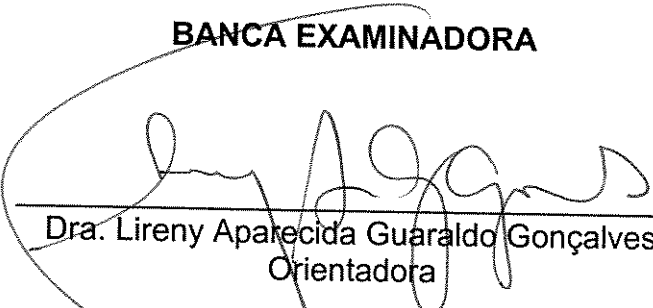
José Carlos C. Petrus

Luiz Antônio Viotto

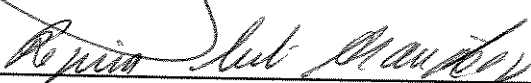
Renato Grimaldi

Data de defesa: 22-02-2006.

BANCA EXAMINADORA



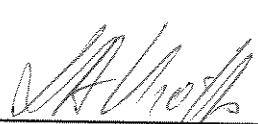
Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Orientadora



Dra. Regina C. A. Lago
Membro



Dra. Thaís Maria F. de S. Vieira
Membro



Dr. Luiz Antonio Viotto
Membro

Dr. José Carlos Cunha Petrus
Membro



Dr. Renato Grimaldi
Membro

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e confiança em todos os momentos da minha vida.

À professora Dra. Lireny Aparecida G. Gonçalves por toda a amizade, carinho e orientações durante este maravilhoso tempo de convivência.

Aos professores Dr. José Carlos Cunha Petrus e Dr. Luiz Antônio Viotto pela constante disponibilidade, apoio e amizade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Renato Grimaldi pela presença e colaboração constantes na minha vida acadêmica, pela amizade e dedicação.

A todos os membros da banca examinadora pelas sugestões e questionamentos.

À “Dona Regis” pelos bons momentos compartilhados, pela amizade, aprendizado e por toda a energia e jovialidade transmitida.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Óleos e Gorduras que sempre fizeram do Laboratório um ambiente agradável e acolhedor. Um agradecimento especial as minhas “assistentes de formatação” Ana Paula e Márcia.

À Paulo Roesse por todos os momentos compartilhados, pelo eterno apoio e incentivo.

As empresas Novozymes e Millipore pelas enzimas e membranas disponibilizadas para a realização de parte deste trabalho.

À Fapesp pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos e à CAPES pela bolsa de estudo PDEE , permitindo a realização de parte deste trabalho na França.

Sumário

Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras	xiii
Resumo Geral.....	xvi
Summary	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	xx
CAPITULO I - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS: OBTENÇÃO E APLICAÇÕES NUTRICIONAIS	1
Resumo.....	2
1 Considerações gerais.....	2
2 Importância dos ácidos graxos ω -3 (EPA e DHA) e ω -6	3
3 Definição.....	4
4 Desenvolvimento dos lipídios estruturados	6
5 Produção de lipídios estruturados.....	8
5.1 Fontes de ácidos graxos para síntese de lipídios estruturados	8
5.2 Síntese de lipídios estruturados	12
5.2.1 Síntese química.....	13
5.2.2 Síntese enzimática	13
5.2.3 Síntese enzimática em reator de membrana	19
5.3 Parâmetros de processo.....	20
5.3.1 Tempo de reação	20
5.3.2 Temperatura do reator.....	21
5.3.3 Conteúdo de água.....	21
5.3.4 Razão molar entre substratos	22
5.3.5 Quantidade de enzima	23
5.3.6 Avaliação da estabilidade oxidativa.....	23
6 Purificação dos LE	24
7 Absorção, transporte e metabolismo dos lipídios estruturados.....	24
8 Aplicações nutricionais.....	25
9 Referências Bibliográficas.....	26

CAPÍTULO II - APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NO PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS	30
Resumo.....	31
1 Introdução	31
2 Processamento convencional de óleos vegetais comestíveis	32
3 Tecnologia de membranas.....	34
3.1 Membranas.....	36
3.1.1 <i>Características das membranas</i>	36
3.1.2 <i>Tipos de membranas</i>	37
3.2 Fenômenos envolvidos no processo	38
3.3 Parâmetros operacionais.....	39
3.3.1 <i>Parâmetros importantes para a análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração</i>	40
4 Aplicação de membranas em tecnologia de óleos vegetais.....	40
4.1 Degomagem	42
4.2 Separação de ácidos graxos	44
4.3 Remoção de pigmentos.....	46
4.4 Estudo de componentes minoritários: tocoferóis	47
5 Conclusões	49
6 Referências bibliográficas	49

CAPÍTULO III - REATOR DE MEMBRANA ENZIMÁTICO E FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: ASSOCIAÇÃO DE PROCESSOS	54
Resumo.....	55
1 Introdução	55
2 Bioconversão enzimática.....	57
3 Reator de membrana	59
3.1 Imobilização enzimática.....	62
4 Fluidos supercríticos	65
5 Associação de extração por FSC e tecnologia de membranas	66

6	Conclusão	69
7	Bibliografia	69

CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE COM ELEVADOR TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS ω -3.....73

	Resumo.....	74
1	Introdução	74
2	Material e Métodos	76
2.1	Óleo de peixe	76
2.2	Caracterização da matéria-prima	76
2.3	Reação de alcoólise	77
2.4	Planejamento experimental	77
2.5	Controle da reação	78
3	Resultados e Discussão.....	79
3.1	Caracterização da matéria-prima	79
3.2	Otimização dos parâmetros reacionais.....	80
4	Conclusão	87
5	Bibliografia	87

CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS NA SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS.....89

	Resumo.....	90
1	Introdução	90
2	Material e métodos	92
2.1	Substratos	92
2.2	Interesterificação enzimática	93
2.3	Condicionamento da atividade de água da enzima	93
2.4	Separação dos lipídios estruturados obtidos do meio reacional.....	93
2.5	Composição do lipídio estruturado	94
2.6	Métodos analíticos.....	94

3	Resultados	95
3.1	Testes com diferentes enzimas	95
3.2	Influência da atividade de água na cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM.....	97
3.3	Influência da utilização de peneira molecular e de diferentes razões molares de substratos	100
4	Conclusão	102
5	Bibliografia	103

CAPÍTULO VI - PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS EM REATOR PILOTO

	Resumo.....	106
1	Introdução	107
2	Material e Métodos	108
2.1	Substratos	108
2.2	Reator de interesterificação.....	109
2.3	Condicionamento da enzima	109
2.4	Separação dos lipídios estruturados específicos.....	109
2.5	Análises	110
3	Resultados	110
3.1	Efeito do condicionamento enzimático na cinética de interesterificação.....	110
3.2	Influência da razão molar de substratos na cinética de interesterificação	113
4	Conclusão	114
5	Bibliografia	115

CAPÍTULO VII - SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIO ESTRUTURADO ESPECÍFICO EM REATOR DE MEMBRANA PLANA

	Resumo.....	118
1	Introdução	119
2	Material e métodos	120

2.1	Substratos	120
2.2	Membranas.....	121
2.3	Reação de interesterificação e reator de membrana plana	121
2.4	Procedimento experimental para testes seletivos das membranas.....	122
2.5	Influência do comprimento da cadeia carbônica no fluxo permeado de ácidos graxos	123
2.6	Separação do lipídio estruturado do meio reacional.....	124
2.7	Controle da interesterificação	124
3	Resultados	124
3.1	Testes seletivos das membranas	124
3.2	Intesterificação entre TCM e EEAGCL	127
3.2.1	<i>Caracterização da matéria-prima</i>	<i>127</i>
3.2.2	<i>Incorporação de EEAGCL nos TCM.....</i>	<i>129</i>
4	Conclusão	134
5	Bibliografia	135

CAPÍTULO VIII - REATOR DE MEMBRANA E CO₂SC: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS.....136

Resumo.....	137
--------------------	------------

1 Introdução	137
---------------------------	------------

2 Material e Métodos	140
-----------------------------------	------------

2.1 Substratos e enzimas	140
--------------------------------	-----

2.2 Membrana	140
--------------------	-----

2.3 Imobilização enzimática.....	140
----------------------------------	-----

2.4 Reação de interesterificação entre TCM e EEAGCL.....	142
--	-----

2.5 Separação dos lipídios estruturados obtidos do meio reacional.....	144
--	-----

2.6 Composição do lipídio estruturado	145
---	-----

3 Resultados	145
---------------------------	------------

3.1 Caracterização da matéria-prima utilizada como substrato para a produção dos lipídios estruturados.....	145
---	-----

3.2 Interesterificação enzimática em meio fluidificado por CO ₂ SC.....	147
--	-----

3.3 Composição do LE obtido na interesterificação.....	152
--	-----

4	Conclusão	153
5	Bibliografia	153

CAPÍTULO IX - USO DE CO₂SC E MEMBRANA PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPÍDIO ESTRUTURADO.....155

	Resumo.....	156
1	Introdução	157
2	Material e métodos	160
2.1	Obtenção do lipídio estruturado.....	160
2.1.1	<i>Substratos</i>	<i>160</i>
2.1.2	<i>Reator de interesterificação.....</i>	<i>161</i>
2.1.3	<i>Separação do lipídio estruturado.....</i>	<i>161</i>
2.1.4	<i>Avaliação química</i>	<i>161</i>
2.2	Membranas.....	161
2.2.1	<i>Condicionamento de membranas.....</i>	<i>162</i>
2.3	Equipamento de extração e separação por FSC/membrana.....	162
2.4	Procedimentos experimentais	164
2.5	Análise dos permeados obtidos.....	165
2.6	Retenção de triacilgliceróis.....	166
3	Resultados	166
3.1	Testes seletivos de membranas	166
3.2	Composição da fração lipídica.....	167
3.3	Caracterização da membrana através do fluxo de CO ₂	169
3.4	Testes de retenção de triacilgliceróis.....	170
3.4.1	<i>Diferentes pressões transmembranas.....</i>	<i>170</i>
3.4.2	<i>Diferentes pressões de CO₂.....</i>	<i>171</i>
3.4.3	<i>Condições fixas de PCO₂ e ΔP</i>	<i>174</i>
4	Conclusão	176
5	Bibliografia	177
	Conclusão Geral	179

Índice de Tabelas

CAPÍTULO I - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS: OBTENÇÃO E APLICAÇÕES NUTRICIONAIS	1
Tabela 1. Níveis sugeridos de ácidos graxos para LE em nutrição clínica	9
 CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE COM ELEVADOR TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS ω-3.....	73
Tabela 1. Níveis e variáveis avaliados no planejamento experimental.	78
Tabela 2. Composição em ácidos graxos do óleo de peixe	80
Tabela 3. Planejamento experimental para otimização das variáveis avaliadas para a produção de ésteres etílicos de óleo de peixe	81
Tabela 4. Condições preliminares utilizadas na produção de ésteres	82
Tabela 5. Efeitos das variáveis avaliadas no rendimento dos ésteres etílicos.....	84
 CAPÍTULO VII - SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIO ESTRUTURADO ESPECÍFICO EM REATOR DE MEMBRANA PLANA	117
Tabela 1. Testes seletivos das membranas.....	125
Tabela 2. Composição em ácidos graxos dos TCM.....	127
Tabela 3. Composição em ácidos graxos dos EEAGCL.....	128
Tabela 4. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado final	132
 CAPÍTULO VIII - REATOR DE MEMBRANA E CO₂SC: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS.....	136
Tabela 1. Composição em ácidos graxos dos TCM.....	145
Tabela 2. Composição em ácidos graxos dos ésteres etílicos.....	146
 CAPÍTULO IX - USO DE CO₂SC E MEMBRANA PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPÍDIO ESTRUTURADO.....	155

Tabela 1. Retenção de triacilgliceróis para os testes seletivos de membranas em meio a CO ₂ denso.....	166
Tabela 2. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado.....	168

Índice de Figuras

CAPÍTULO I - LIPÍDIOS ESTRUTURADOS: OBTENÇÃO E APLICAÇÕES NUTRICIONAIS	1
Figura 1. Estrutura geral dos triacilgliceróis estruturados	5
Figura 2. Estrutura de uma mistura física de TCL e TCM e espécies de lipídios estruturados.	8
Figura 3. Síntese de LE do tipo MLM.....	16
 CAPÍTULO II - APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NO PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS	 30
Figura 1. Diferença entre a filtração perpendicular (convencional) e a filtração tangencial.	35
Figura 2. Comparação entre os processos convencional e baseado na tecnologia de membranas.	42
 CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE COM ELEVADOR TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS ω-3.....	 73
Figura 1. Perfil cromatográfico para avaliação do rendimento dos ésteres	82
Figura 2. Efeito da concentração de etanol e de NaOH sobre a conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos.....	85
Figura 3. Efeito da concentração de etanol e da temperatura sobre a conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos.....	86
 CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS NA SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS.....	 89
Figura 1. Cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM quando catalisada pela enzima Lipozyme TL IM.....	96
Figura 2. Cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM quando catalisada pela enzima Lipozyme RM IM.	97

Figura 3. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM (54 horas)	98
Figura 4. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM (10 horas)	99
Figura 5. Influência da utilização de peneira molecular na reação de interesterificação.....	100
Figura 6. Influência da razão molar sobre a incorporação de EEAGCL nos TCM	101
Figura 7. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM	102

CAPÍTULO VI - PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS EM REATOR PILOTO105

Figura 1. Incorporação de EEAGCL nos TCM em função do tempo de reação para a enzima condicionada e não condicionada.	111
Figura 2. Incorporação de ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima não condicionada.	112
Figura 3. Incorporação de ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima condicionada.	113
Figura 4. Influência da razão molar de substratos sobre a cinética de interesterificação.....	114

CAPÍTULO VII - SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIO ESTRUTURADO ESPECÍFICO EM REATOR DE MEMBRANA PLANA117

Figura 1. Esquema simplificado do reator de membrana plana utilizado nos experimentos	122
Figura 2. Incorporação de EEAGCL nos TCM em função do tempo.	129
Figura 3. Incorporação de ácidos graxos essenciais nos TCM.....	130
Figura 4. Incorporação de ésteres etílicos no TCM em função da utilização ou não de reator com membrana.....	131
Figura 5. Razão entre AGE ω -6/ ω -3 do LE em função do tempo.....	134

CAPÍTULO VIII - REATOR DE MEMBRANA E CO₂SC: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS.....	136
Figura 1. Representação esquemática da membrana enzimática.....	141
Figura 2. Representação do equipamento utilizado nos ensaios de interesterificação enzimática.....	143
Figura 3. Evolução da viscosidade da mistura reacional em função da PCO ₂	148
Figura 4. Fluxo de permeado em função de diferentes pressões de CO ₂	149
Figura 5. Cinética de interesterificação no permeado e retentado.....	150
Figura 6. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado.....	152
 CAPÍTULO IX - USO DE CO₂SC E MEMBRANA PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPÍDIO ESTRUTURADO.....	 155
Figura 1. Unidade experimental.....	163
Figura 2. Fluxo de CO ₂ SC sob diferentes pressões transmembranas.....	169
(PCO ₂ = 13MPa, T = 40°C) ($y = 27,796x - 10,505$, $R^2 = 0,9994$)	169
Figura 3. Fluxo de CO ₂ SC e de lipídios em função da pressão transmembrana (PCO ₂ = 13MPa e T = 40°C).....	170
Figura 4. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios em função da pressão transmembrana (PCO ₂ = 13MPa e T = 40°C).....	171
Figura 5. Fluxo de CO ₂ e de lipídios sob diferentes pressões de CO ₂ ($\Delta P = 10MPa$).....	172
Figura 6. Composição centesimal dos permeados lipídicos obtidos sob diferentes PCO ₂ ($\Delta P = 1MPa$ e T = 40°C).....	173
Figura 7. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios sob diferentes PCO ₂ ($\Delta P = 1MPa$ e T = 40°C).....	174
Figura 8. Fluxo de CO ₂ e de lipídios sob PCO ₂ de 9MPa e ΔP de 0,7MPa.....	175
Figura 9. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios sob PCO ₂ = 9MPa e $\Delta P = 0,7MPa$	176

Resumo Geral

Lipídios estruturados específicos (LE) constituem uma fonte lipídica de elevado valor nutricional em função das modificações ocorridas em sua composição e distribuição específica de ácidos graxos na molécula do glicerol, visando aplicações médicas, nutricionais e alimentícias. Este trabalho teve como objetivo a obtenção enzimática de LE a partir da interesterificação entre triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL), aplicando a tecnologia de membranas, associada ou não à tecnologia de fluido supercrítico, durante a síntese e/ou purificação dos LE. As condições de obtenção dos EEAGCL, utilizados como substratos na obtenção dos LE, foram otimizadas através de planejamento experimental ²³. Obteve-se taxa de conversão máxima de 95%, a 40°C, 1% de NaOH, 36% de etanol anidro, tempo de reação de 5 minutos e agitação de 600 rpm. Parâmetros reacionais como, diferentes valores de atividade de água (aw), uso de peneira molecular (10%p/p), razão molar de substratos de 1:2 e 1:4 (TCM/EEAGCL) e diferentes enzimas (Lipozyme TL IM e RM IM) foram avaliados na cinética de interesterificação do LE em reator por batelada, a 60°C. Verificou-se maior cinética para a enzima Lipozyme TL IM, para aw entre 0,30 – 0,43 e razão molar de 1:4. O uso de peneira molecular (10% p/p) conferiu discreto aumento na incorporação de EEAGCL nos TCM. No sistema de reator de interesterificação piloto foram avaliados o efeito do condicionamento da enzima na mistura reacional (TCM + EEAGCL) e a influência da razão molar de substratos. A enzima agindo com aw original (0,33) conferiu maior incorporação quando comparada com a enzima previamente condicionada na mistura reacional, para 30 horas de reação, 67 e 48%, respectivamente. Quando se passou a razão molar dos substratos de 1:3 para 1:4 houve aumento no percentual de incorporação e o tempo necessário para a incorporação máxima no TCM (~66,6%) foi reduzido de 30 para 10 horas. A aplicação da tecnologia de membranas no sistema de obtenção enzimático de LE foi avaliada em reator de membrana plana (poliméricas) a 60°C, com agitação de 600 rpm, utilização da enzima Lipozyme TL IM (5% peso/substrato) e razão molar de 1:3 -

TCM/EEAGCL. O uso de membranas favoreceu a incorporação de EEAGCL nos TCM a partir de 54 horas de reação e ao final de 102 horas foi de 70 e 57%, com e sem membrana, respectivamente. Os teores de AGE ω -6 e ω -3 observados foram de 23,5 e 11,7%, respectivamente. No entanto, a razão entre os AGE ω -6/ ω -3 não apresentou variação significativa. A associação do processo de membrana enzimática e fluidificação por dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC) também foi avaliada. A enzima *Candida antarctica* foi imobilizada por ligação covalente a uma camada de biopolímero (Gelatina/PEI), adsorvida na membrana tubular (α -alumina). Os experimentos foram conduzidos a 60°C e pressão transmembrana de 0,05MPa. Pressões de CO₂ (PCO₂) de 6, 12 e 18MPa foram avaliadas. Verificou-se uma grande influência da PCO₂ sobre a cinética de interesterificação, tendo a PCO₂ de 18MPa permitido incorporação máxima de 34,5% de EEAGCL no TCM; dentre os quais 24,7% de ácidos graxos essenciais. Experimentos foram conduzidos com o objetivo de purificar o LE através da extração por CO₂SC dos subprodutos do meio reacional e retenção seletiva do LE através de membrana de osmose reversa. Foram avaliadas diferentes pressões de CO₂ (9, 11 e 13MPa) e pressões transmembranas (1, 2, 3 e 4MPa), a 40°C. A membrana de osmose reversa BW-30 apresentou boa resistência às pressões utilizadas e maior retenção de triacilgliceróis nos testes seletivos. Incrementos na PCO₂ de 9 a 13MPa ocasionaram decréscimos no fator de retenção de triacilgliceróis devido ao aumento na solubilização dos solutos e consequente redução na seletividade da extração. O fator máximo de retenção de triacilgliceróis foi obtido com baixa PCO₂ (9MPa) e baixa pressão transmembrana (0,7MPa). A membrana apresentou, no período de estabilização, um fator de retenção de triacilgliceróis médio de 95% e máximo a partir de 3 horas de filtração. A utilização de baixa temperatura (40°C) na extração e purificação do LE confere boa proteção aos ácidos graxos poliinsaturados contra a oxidação e migração acila.

Palavras-chave: membranas, fluido supercrítico, lipídio estruturado, enzima.

Summary

Specific-structured lipids (SL) are a lipid source with high nutritional value due to changes in its glycerol backbone's fatty acid composition and specific distribution aiming medical, nutritional and food applications. This study had as objective the production of SL through enzymatic interesterification between medium chain triacylglycerol (MCT) and long chain fatty acid ethyl esters (LCFAEt) applying membrane technology, with or without supercritical fluid technology for synthesis and/or SL purification. The production conditions of LCFAEt, used to obtain SL, were optimized according to an experimental planning (2^3). Ethyl esters' conversion rate was 95%, at 40°C, 1% NaOH, 36% ethanol, running 5 minutes under 600rpm stirring speed. Reaction parameters like water activity (a_w), moisture absorbent (10%w/w), molar ratio between substrates of 1:2 e 1:4 (MCT/LCFAEt) and types of enzymes (Lipozyme TL IM and RM IM) were evaluated according to their influences on the SL interesterification in the batch reactor, at 60°C. The best incorporation results were obtained using Lipozyme TL IM with a_w between 0,30-0,43 and molar ratio of 1:4. 10% (p/p) of moisture absorbent the interesterification kinetic presented a discreet increase. The impact of the enzyme conditioning process in the blend and the influence of the molar ratio of substrates were evaluated in the pilot reactor system. The usage of the enzyme with original water activity (0,33) provided higher kinetic incorporation in comparison with the conditioned enzyme, for a reaction time of 30 hours, 67 and 48%, respectively. The increase in the molar ratio of substrates from 1:3 to 1:4 improved the kinetic incorporation and reduced the maximum incorporation reaction time (66,6%) from 30 to 10 hours. The usage of membrane technology in the enzymatic system to obtain SL was evaluated in a plain membrane reactor (polymeric) under 60°C temperature; 600rpm stirring speed; Lipozyme TL IM enzyme (5% based on substrates' weight) and molar ratio of substrates of 1:3(MCT/LCFAEt). The application of membranes increased the kinetic incorporation of LCFAEt in the MCT after 54 hours of reaction. In the end of 102 hours incorporation was 70 and

57%, with and without membrane in the reactor, respectively. The final SL, obtained with and without membrane, showed fatty essential acids composition of 23,5 and 11,7%, respectively. However, the ratio between the essential fatty acids ω -6/ ω -3 was not significantly different. The coupling of the membrane filtration process and fluidification by supercritical carbon dioxide (SCCO₂) was also evaluated. The enzyme (*Candida antarctica*) was immobilized on the membrane support (α -alumina) by covalent attachment to a gelatin/PEI layer previously adsorbed. Tests were performed at 60°C and 0,05MPa of transmembrane pressure. CO₂ pressures (PCO₂) of 6, 12 and 18MPa were evaluated. This parameter showed a high influence in the kinetic interesterification, with highest incorporation value of LCFAEt in the MCT (34,5%) at 18MPa, being 24,7% of essential fatty acids. Tests to purify the SL by SCCO₂ extraction of the undesired solutes and triacylglycerol retention by reverse osmosis and nanofiltration membrane were also performed. PCO₂ of 9, 11 and 13MPa and transmembrane pressure of 1, 2, 3 and 4MPa were evaluated at temperature of 40°C. Reverse osmosis membrane (BW-30) demonstrated good resistance to the pressure conditions and higher triacylglycerol retention. The increment in the PCO₂ from 9 to 13MPa reduced the triacylglycerol retention factor by increasing solute's solubilization. The highest triacylglycerol retention factor was obtained at the lowest PCO₂ (9MPa) and at low transmembrane pressure (0,7MPa). The membrane showed, in the initial time, triacylglycerol retention factor of 95% and the maximum value with 3 hours of filtration. The low temperature (40°C) usage in SL extraction and purification reactions provided good protection to the polyunsaturated fatty acids against the oxidation and acyl migration.

Keywords: structured lipids, supercritical fluid, membrane, enzyme.

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, tem-se explorado tópicos voltados aos problemas de saúde e sua possível associação ao tipo de dieta lipídica. Estudos epidemiológicos têm verificado a influência da dieta lipídica sobre a incidência de doenças coronarianas, onde se verifica o efeito protetor da ingestão de ácidos graxos essenciais ω -3, eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω -3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6 ω -6), presentes em animais marinhos (CONNOR, 1994).

Baseando-se nestas perspectivas, muita atenção tem sido direcionada à síntese de lipídios estruturados específicos que, sendo moléculas com estrutura particular em termos de composição e distribuição de ácidos graxos na cadeia do glicerol, apresentam características físico-químicas especiais. A estrutura molecular dos triacilgliceróis (TG) influencia o seu metabolismo no organismo (isto é, digestão e absorção) e suas características físicas (ponto de fusão). Consequentemente, através da síntese de lipídios estruturados (LE) é possível controlar o comportamento dos TG e melhorar suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (IWASAKI e YAMANE, 2000).

A síntese de lipídios estruturados através de interesterificação enzimática apresenta diversas vantagens quando comparada à interesterificação química: pode ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, exige menor consumo energético, minimiza a degradação térmica dos produtos obtidos; confere maior controle sobre a distribuição dos ácidos graxos no produto final devido à especificidade e regioseletividade enzimática e possibilita a obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação, alcoólise, acidólise e transesterificação (GUNSTONE, 1999; LEE, AKOH, 1998).

A utilização de enzimas na forma imobilizada, visando reações com maior uniformidade tecnológica e viabilidade econômica, resulta em considerável aumento na estabilidade enzimática e permite, assim, maior diversidade de aplicações de fundamental importância para o desenvolvimento de processos associados à bioconversão (HILAL, NIGMATULLIN, ALPATOVA, 2004). Segundo Swaisgood (1991), as vantagens da utilização de enzima imobilizada são: maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso da extensão das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas.

A aplicação da tecnologia de membranas no processo enzimático de obtenção de lipídios estruturados favorece a integração da reação de interesterificação e a separação dos lipídios estruturados obtidos, processos que ocorrem simultaneamente. Representa uma forma de otimizar a reação, visto que, a separação simultânea de substratos indesejáveis do meio reacional pode alterar a concentração durante o processo e conduzir a reação para um melhor nível de equilíbrio (XU *et al.*, 2000).

Reatores de membranas visam integrar a conversão catalítica à separação e/ou concentração de produtos e à recuperação do catalisador em uma única etapa. As membranas também podem funcionar exclusivamente como matriz para imobilização da enzima, sem visar à separação (PRAZERES e CABRAL, 1994).

A associação do processo de extração por FSC e separação por membranas permite a integração da reação de extração pelo CO₂SC (favorecida pelo alto poder solvente do CO₂SC) e a separação seletiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (CO₂SC + solutos extraídos). O sistema CO₂SC/membrana melhora o potencial de separação da membrana e a seletividade da extração, o que permite a obtenção de frações extraídas sob estreita faixa de massa molar (SARRADE, RIOS, CARLÈS, 1998).

Este trabalho teve como objetivo a obtenção enzimática de lipídios estruturados específicos a partir da interesterificação entre triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL) e a aplicação da tecnologia de membranas, associada ou não à tecnologia de fluido supercrítico, durante a síntese e/ou purificação dos LE.

Bibliografia

CONNOR, W. E. ω -3 Fatty Acids and Heart Disease. In: **Nutrition and Disease Uptade: Heart Disease**. Ed. Kritchevsky, D.; Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.

GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.79, p.1535-1549, 1999.

HILAL, N.; NIGMATULLIN, R.; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**. v.238, p.131-141, 2004.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129-140, 2000.

LEE, K. T.; AKOH, C. C. Structured lipids: synthesis and applications. **Food Rev. Int.** v.14, n.1, p.17-34, 1998.

PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 738-750, 1994.

SARRADE, S.J.; RIOS, G.M.; CARLÈS, M. Supercritical CO₂ extraction coupled with nanofiltration separation - Applications to natural products. **Separation and Purification Technology**. v. 14, p.19-25, 1998.

SWAISGOOD, H.E. Immobilized Enzymes: Applications to bioprocessing of food. In: **Food Enzymology**. v.2. Ed. Fox, P.F. Elsevier Applied Science, Essex, p.309-343, 1991.

XU, X.; BALCHEN, S.; JONSSON, G.; ADLER-NISSEN, J. Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, vol. 77, n.10, p.1035-1041, 2000.

CAPÍTULO I

LIPÍDIOS ESTRUTURADOS: OBTENÇÃO E APLICAÇÕES NUTRICIONAIS

Lipídios estruturados específicos: obtenção e aplicações nutricionais

Resumo

O interesse na produção de lipídios estruturados específicos (LE) tem aumentado continuamente devido às suas aplicações médicas, nutricionais e alimentícias. LE são triacilgliceróis modificados quimicamente ou enzimaticamente contendo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Esta combinação de ácidos graxos confere efeitos de rápida absorção e oxidação, devido à presença de AGCM, e outros benefícios à saúde em decorrência dos AGCL. Através da utilização de enzimas régio-específicas pode-se obter triacilgliceróis, contendo ácidos graxos desejados em posições específicas, denominados lipídios estruturados. As reações de interesterificação enzimáticas são fortemente influenciadas por parâmetros operacionais, tais como: temperatura, tempo de reação, atividade de água, presença de solventes orgânicos, razão molar de substratos, quantidade e tipo de enzima. Estes fatores operacionais influenciam não apenas o rendimento e a velocidade da reação, mas também a pureza dos produtos finais obtidos. Os lipídios estruturados têm sido utilizados em nutrição infantil, parenteral e enteral, para pessoas com problemas de absorção de gorduras e insuficiência pancreática e em formulações para desportistas.

1 Considerações gerais

Nas últimas décadas muita atenção esteve voltada aos problemas de saúde e sua possível associação ao tipo de dieta lipídica utilizada. As doenças coronarianas, responsáveis por grande número de mortes nos Estados Unidos, constituem-se numa desordem complexa e estão relacionadas a uma série de fatores de risco, tais como, hiperlipidemia e outras anormalidades lipoprotéicas resultantes de fatores genéticos e interações com a dieta, hipertensão, tabagismo,

obesidade, diabetes, sedentarismo e estresse. Estudos epidemiológicos têm relacionado a maior ou menor incidência de doenças coronarianas às diferenças na composição lipídica de gorduras provenientes de animais marinhos e terrestres e as de origem vegetal. Estudos epidemiológicos verificaram a influência da composição lipídica da dieta dos esquimós, que se alimentavam quase exclusivamente de animais marinhos (ricos em colesterol e gorduras) e dos dinamarqueses que viviam na mesma região, mas que se alimentavam de animais terrestres. Os esquimós não desenvolveram doenças coronarianas ateroscleróticas na mesma extensão dos dinamarqueses. A dieta lipídica dos esquimós, proveniente de animais marinhos, é rica em ácidos graxos poliinsaturados ω -3, eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω -3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6 ω -6), não encontrados em alimentos provenientes de animais terrestres (CONNOR, 1994).

2 Importância dos ácidos graxos ω -3 (EPA e DHA) e ω -6

Estudos sobre a nutrição paleolítica e nutrição moderna têm demonstrado grandes diferenças em termos de composição lipídica das dietas ingeridas. A dieta dos paleolíticos era constituída por um baixo teor de gorduras saturadas e quantidades similares de ácidos graxos ω -3 e ω -6, apresentando uma razão de ω -6/ ω -3 de aproximadamente 1:1. O desenvolvimento tecnológico contribuiu para alterações marcantes no tipo de dieta lipídica consumida pelas populações. A ingestão de ácidos graxos *trans*, provenientes dos produtos hidrogenados, e de ácidos graxos ω -6, provenientes de óleos vegetais e produtos de origem animal, têm aumentado significativamente. Comparada com a dieta da era paleolítica, a dieta moderna é rica em ácidos graxos saturados, ácidos graxos ω -6 e ácidos graxos *trans*, mas pobre em ácidos graxos ω -3. Os ácidos graxos ω -3 são necessários ao bom crescimento e desenvolvimento infantil, atuam prevenindo doenças cardiovasculares, trombose, hipertensão, alterações inflamatórias e auto-

imunes. A razão ω -6/ ω -3 na dieta norte americana atual varia entre 10:1 e 25:1, o que reflete a carência em termos de ácidos graxos ω -3. A FAO/WHO recomenda a ingestão de uma dieta lipídica que forneça uma razão ω -6/ ω -3 entre 5:1 e 10:1 (FLAXSEED COUNCIL OF CANADA, 2002).

Óleos de peixes e outros bioativos marinhos (tais como cartilagem de tubarão e óleo de fígado de tubarão) são considerados, atualmente, como compostos nutracêuticos e funcionais devido a sua composição específica em termos de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs) como EPA e DHA. A maioria da população ocidental não ingere níveis adequados de ácidos graxos da série ω -3 através de fontes naturais como peixe. Suplementos de óleos de peixes são uma alternativa bastante popular na Europa e no Japão. O enriquecimento de produtos alimentícios com ácidos graxos ω -3 de cadeia longa mostra-se uma alternativa bastante atrativa (GARCIA, 1998).

Um alto conteúdo de DHA no cérebro e na retina é importante para o funcionamento adequado do sistema nervoso e visual. Uma ingestão balanceada de ambos os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 parece necessária para um desenvolvimento satisfatório do cérebro e da retina. O óleo de peixe é rico em DHA, entre outros poliinsaturados ω -3, sugerindo que a ingestão de peixe é recomendável tanto sob o ponto de vista nutricional quanto fisiológico. Recentemente, esforços consideráveis têm sido alocados para o desenvolvimento de técnicas para a produção e concentração de DHA através de métodos biotecnológicos (LINKO e HAVAKAWA, 1996).

3 Definição

Lipídios estruturados (LE) são definidos como triacilgliceróis (TG) modificados quimicamente ou enzimaticamente em sua composição de ácidos graxos e/ou na sua distribuição posicional na molécula do glicerol. No sentido

estrito, são definidos como moléculas especiais de TG com estrutura definida. A estrutura molecular dos TG influencia o seu metabolismo no organismo (isto é, digestão e absorção) e suas características físicas (ex: ponto de fusão). Consequentemente, através da síntese de lipídios estruturados (LE) é possível controlar o comportamento dos TG e melhorar suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (IWASAKI e YAMANE, 2000).

A Figura 1 apresenta a estrutura geral de um tipo de LE. O seu potencial aumenta se na mesma molécula do glicerol existirem ácidos graxos de cadeia curta/média (AGCC/AGCM) e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (AKOH,1998).

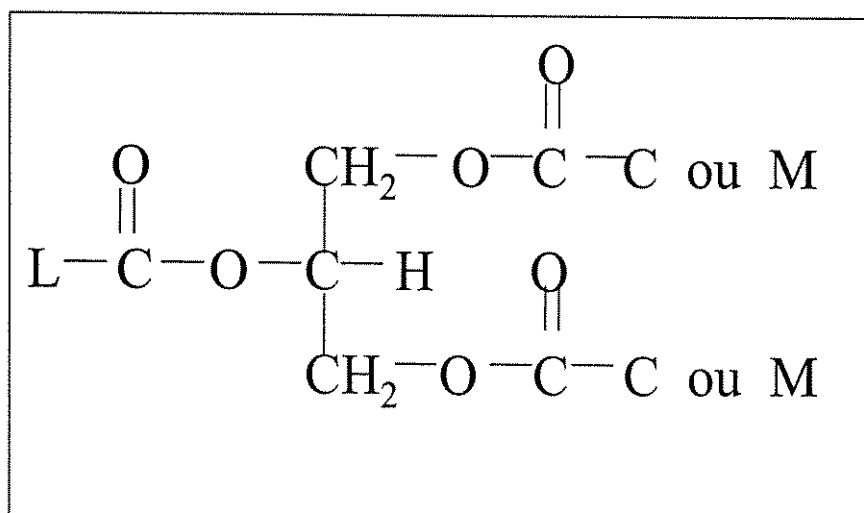


Figura1. Estrutura geral dos triacilgliceróis estruturados: onde C, M e L são ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, respectivamente. As posições C, M e L são intercambiáveis.

Os LE podem ser classificados de acordo com a sua estrutura. Baseando-se no número de ácidos graxos constituintes e na sua distribuição na molécula do glicerol, os TG podem ser classificados em TG monoácido (tipo AAA, onde A representa um único tipo de ácido graxo), TG diácido (tipo ABA, AAB e BAA, isômeros posicionais) e TG triácido (tipo ABC, com diferentes ácidos graxos) (IWASAKI e YAMANE, 2000).

Lipídios estruturados específicos obtidos através de enzimas *sn*-1,3 específicas podem apresentar as seguintes estruturas em função da distribuição dos ácidos graxos na molécula do glicerol: ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2 (MLM) ou ácidos graxos de cadeia longa nas posições *sn*-1,3 e ácidos graxos de cadeia média na posição *sn*-2 (LML). Lipídios estruturados do tipo MLM fornecem energia de rápida absorção pela oxidação dos AGCM, rapidamente hidrolisados pela lipase pancreática, e favorecimento na absorção dos AGCL na forma de 2-monoacilglicerol (IWASAKI e YAMANE, 1999; XU *et al.*, 1998; YANG, FRUEKILDE, XU, 2005). Lipídios estruturados do tipo LML são considerados como TG de superior digestibilidade e absorção (SETO e YAMADA, 1988). Várias composições em ácidos graxos podem ser encontradas nos lipídios estruturados, cuja escolha vai depender do tipo de aplicação nutricional ou alimentícia desejada.

4 Desenvolvimento dos lipídios estruturados

Durante muito tempo, os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL), predominantemente óleo de soja e cártamo, foram utilizados como lipídios padrões na formulação de emulsões gordurosas para aplicações em nutrição parenteral e enteral. A emulsão fornece energia e serve como fonte de ácidos graxos essenciais (AGE). No entanto, os AGCL são metabolizados lentamente no corpo. Foi proposta a utilização de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) devido a sua rápida metabolização pelo organismo (AKOH, 1998).

Os TCM, geralmente contendo ácidos graxos saturados C6 a C10, têm sido utilizados em aplicações clínicas. Enquanto as gorduras e os óleos convencionais são absorvidos lentamente e transportados via sistema linfático, os TCM são absorvidos rapidamente e transportados via sistema portal. Devido à sua capacidade de atravessar a membrana intestinal diretamente para o sistema portal, os TCM têm se tornado um lipídio padrão no tratamento de várias síndromes de má absorção de gorduras. Outras aplicações de TCM incluem o seu

uso como fonte de gordura rapidamente absorvível para pacientes com problemas intestinais e para bebês prematuros. Em certas fórmulas de dietas líquidas e fluido intravenoso, os TCM podem ser combinados em proporções variadas com óleo de milho, soja ou girassol. Recentemente, trabalhos têm sugerido que a combinação de TCM e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) para síntese de triacilgliceróis podem ajudar em certas situações clínicas (ZILLER *et al.*, 1994). Os TCM isoladamente não podem prover ácidos graxos essenciais ou ácidos graxos funcionais como o ácido eicosapentaenóico, docosahexaenóico e gama linolênico, além de que a ingestão de grandes doses de TCM pode levar ao acúmulo de corpos cetônicos, condição conhecida como acidose ou cetonemia (AKOH, 1998).

O benefício da ingestão de lipídios estruturados específicos está relacionado com a composição e balanço adequado entre AGCM e AGCL (ω -6, ω -3 e ω -9), refletindo-se na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e nível de triacilgliceróis, prevenção de trombose, melhoria na função imunológica, etc. Emulsões de TCM e TCL são denominadas misturas físicas; contudo, estas misturas não são equivalentes ao lipídio estruturado obtido pela interesterificação (AKOH, 1998).

CHAMBRIER *et al.* (1999) avaliaram as diferenças resultantes da ingestão de TCL e TCM, sob a forma de mistura física e de lipídios estruturados (Figura 2), por pacientes em estado pós-operatório. A ingestão do LE foi bem tolerada, não ocasionando distúrbios nas funções hepáticas. Os níveis de triacilgliceróis permaneceram normais com a ingestão do LE, havendo significativa elevação dos mesmos com a ingestão da mistura física.

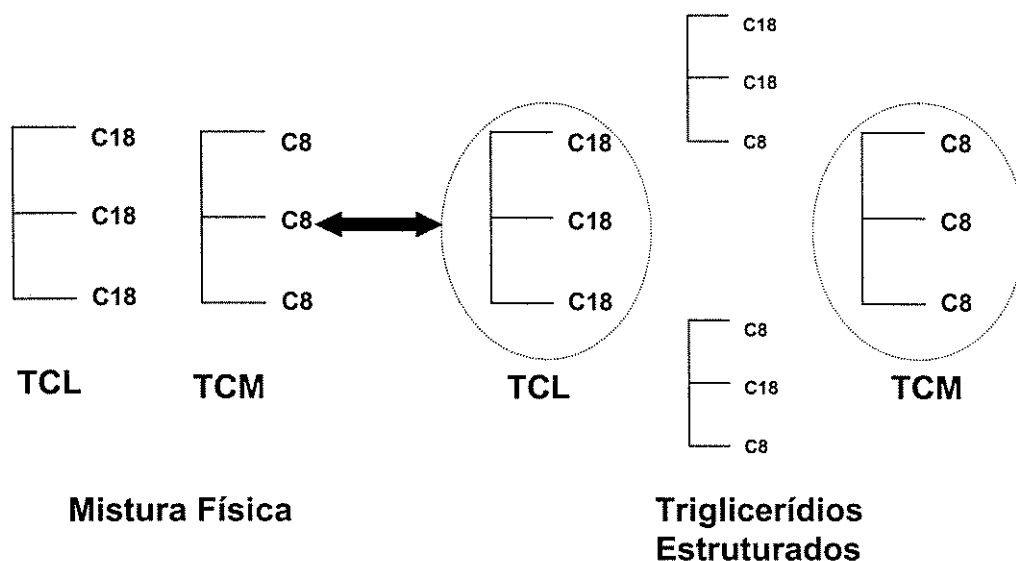


Figura 2. Estrutura de uma mistura física de TCL e TCM e espécies de lipídios estruturados.

5 Produção de lipídios estruturados

5.1 Fontes de ácidos graxos para síntese de lipídios estruturados

Os LE, contendo ácidos graxos específicos em posições pré-determinadas, têm sido propostos como uma alternativa à utilização das misturas físicas de diferentes triacilgliceróis. A composição em ácidos graxos e sua posição no triacilglicerol determinam suas propriedades funcionais e físicas, metabolismo e os benefícios conferidos à saúde. Estes ácidos graxos incluem ácidos graxos de cadeia curta/média, ácidos graxos saturados, poliinsaturados e monoinsaturados. A Tabela 1 sugere níveis de determinados ácidos graxos nos LE e suas aplicações clínicas (AKOH, 1998).

Tabela 1. Níveis sugeridos de ácidos graxos para LE em nutrição clínica

Ácido Graxo	Níveis e função
ω -3	2-5% - eleva a função imune, reduz coagulação sanguínea, diminui níveis de TG e riscos de doenças cardiovasculares
ω -6	3-4% - satisfaz a exigência de ácido graxo essencial na dieta
ω -9	C18:1 ω -9 para balanço dos ácidos graxos de cadeia longa
*LE	30-65% - energia de rápida absorção, especialmente para neonatos prematuros, pacientes hospitalizados e indivíduos com doenças relacionadas à má absorção lipídica

LE – AGCC/AGCM – Lipídio estruturado contendo ácidos graxos de cadeia curta e/ou média como principal componente.

Os TCM, excelente fonte de ácidos graxos para a síntese de LE, são utilizados puros ou misturados com TCL nas emulsões lipídicas para nutrição enteral e parenteral. Os AGCM são comumente encontrados em óleos láuricos como, por exemplo, o óleo de coco e babaçu que contém 10 a 15% de C8:0 – C10:0, sendo extremamente estáveis à oxidação. Os TCM possuem valor calórico de 8,3Kcal comparando-se com as 9,0Kcal fornecidas pelos TCL, característica que os torna desejáveis na elaboração de sobremesas de menor valor calórico. A ingestão de TGCM/AGCM apresenta algumas vantagens, tais como: a) os AGCM são mais rapidamente oxidados do que os AGCL; b) não é necessária a presença de carnitina para o transporte dos TCM para a mitocôndria; c) não necessitam da formação de quilomícrons; d) são transportados de volta para o fígado diretamente pelo sistema portal; e) não são prontamente reesterificados em TG e apresentam maior densidade calórica que proteínas e carboidratos, podendo ser absorvidos e metabolizados tão rapidamente como a glicose, enquanto que os TCL são metabolizados mais lentamente (AKOH, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados C18:2 ω -6 e C18:3 ω -3 sofrem diversas elongações e dessaturações até a produção de metabólitos, tais como, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, respectivamente. O ácido graxo mais comum em nossa dieta, o ácido linoléico, considerado como precursor da família ω -6, inicialmente é dessaturado (dessaturase-n-6) de 18:2 ω -6 para 18:3 ω -6 (γ -linolênico). Esta primeira dessaturação é considerada fator limitante em bebês prematuros, idosos e em determinados estados doentes, daí o grande interesse em alguns óleos que contêm ácido graxo γ -linolênico. Fontes relativamente ricas em ácido γ -linolênico incluem a groselha preta, primula e óleo de borage. O ácido γ -linolênico é elongado para C20:3 ω -6, ácido dihomio γ -linolênico, sendo este o precursor da série 1 de prostaglandinas. Após dessaturação (dessaturase n-5), o ácido dihomio γ -linolênico origina o ácido araquidônico, C20:4 ω -6, precursor da série 2 de prostaglandinas. O ácido araquidônico pode vir a ser dessaturado e elongado a C22:5 ω -6 e C22:6 ω -6, no entanto, a função destes ácidos ainda não está bem definida (O'KEEFE, 1998).

A ausência de ácido linoléico na dieta é caracterizada por dermatite escamosa, perda de água excessiva através da pele, comprometimento no crescimento, na reprodução e na cura de lesões (AKOH, 1998).

Os ácidos graxos ω -3, representados pelo ácido linolênico, são comumente encontrados em certos óleos vegetais, como óleo de soja, canola e linhaça. Os óleos provenientes de peixes marinhos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ω -3 que são oriundos do ácido linolênico advindo das plantas utilizadas na sua alimentação. Os principais ácidos graxos desta classe são o EPA e DHA, chegando a representar cerca de 26% dos ácidos graxos presentes no óleo de peixe. Pesquisas anteriores sugerem que o ácido linolênico e outros ácidos graxos ω -3, EPA e DHA, têm o mesmo efeito sobre os níveis de colesterol LDL que o ácido linoléico. Contudo, EPA e DHA na dieta apresentam uma maior influência no metabolismo dos triacilgliceróis do que uma dieta rica somente em ácido linoléico. Ingestões altas de EPA e DHA ativam

triacilgliceróis menores, especialmente em pacientes com hipertrigliceridemia. Estes ácidos graxos podem apresentar outros benefícios além da redução no risco de doenças cardiovasculares, podendo interferir na agregação plaquetária e reduzir o risco de trombose coronariana. Alguns pesquisadores têm sugerido que estes compostos podem alterar as respostas na parede celular prevenindo a aterogênese (GRUNDY, 1994).

O ácido linolênico, precursor do EPA e DHA, não apresenta a mesma atividade biológica que o EPA e DHA. O processo de conversão do ácido linolênico em EPA e DHA envolve uma série de etapas bioquímicas de dessaturação e alongação que, por vezes, limitam sua eficácia da conversão. Portanto, fontes ricas em ácido linolênico provenientes de sementes de plantas, como a linhaça, nozes, canola, não apresentariam o mesmo efeito biológico e efeitos médicos do EPA e DHA provenientes de peixe e óleo de peixe (CONNOR, 1994). As elongações e dessaturações do ácido linolênico, C18:3 ω -3, levam ao ácido docosahexaenóico, C22:6 ω -3. Inicialmente, o ácido linolênico, C:18:3 ω -3, é dessaturado (dessaturase n-6) para C18:4 ω -3, que após sofrer alongação resulta no ácido C20:4 ω -3 que, após dessaturação (dessaturase n-5), converte-se no ácido eicosapentaenóico, C20:5 ω -3. O ácido eicosapentaenóico é alongado a docosapentaenóico, C22:5 ω -3, que sofre nova alongação originando o ácido tetracosapentaenóico, C24:5 ω -3. O ácido tetracosapentaenóico é dessaturado (dessaturase n-6) à tetracosahexaenóico, C24:6 ω -3 que, através de β -oxidação, transforma-se no ácido docosahexaenóico, C22:6 ω -3 (O'KEEFE, 1998).

Ambas as séries de ácidos graxos ω -3 e ω -6 são importantes constituintes das membranas celulares fosfolipídicas e estão particularmente presentes no córtex cerebral, na retina e nos espermatozóides. Em concentrações menores o ácido araquidônico e docosahexaenóico estão presentes na maioria das membranas celulares fosfolipídicas do corpo. Além da importância na composição celular, estes ácidos graxos poliinsaturados atuam como precursores das prostaglandinas e uma série pode antagonizar a ação da outra. Os ácidos graxos

ω -3, presentes no óleo de peixe, exibem outras ações biológicas relevantes: atuam como precursores das prostaglandinas e leucotrienos; apresentam propriedades antiinflamatórias; anti-cancerígenas, anti-plaquetárias, propriedades hipolipidêmicas, efeito no colesterol do plasma, nos triacilgliceróis e nas lipoproteínas (CONNOR, 1994).

5.2 Síntese de lipídios estruturados

A síntese de um LE de estrutura particular requer modificações específicas nas posições desejadas na molécula do TG. O processo de interesterificação é uma ferramenta bastante utilizada no processo de alteração das características de fusão e cristalização das gorduras (ponto de fusão, curva de sólidos, espalhabilidade, estrutura dos cristais, etc). A interesterificação envolve a troca e redistribuição de grupos acilas de triacilgliceróis e pode ser dividida em três categorias de acordo com o tipo de reação: acidólise, alcoólise e transesterificação (HUYGHEBAERT *et al.*, 1994).

A interesterificação pode ocorrer de duas formas especiais: pode ser de natureza randomizada ou dirigida. Na interesterificação randomizada ocorre à distribuição dos grupos acila de maneira aleatória, ou seja, em todas as possíveis combinações. Através de equações específicas (onde se leva em consideração a porcentagem molar dos ácidos graxos presentes) pode-se calcular a composição do óleo interesterificado randomicamente. Através da remoção de parte dos ácidos graxos da mistura de reação, o equilíbrio tende a se restabelecer através da continuidade da reação. Na interesterificação dirigida, ácidos graxos de baixo peso molecular ou ésteres de ácidos graxos podem ser continuamente destilados da gordura ou também a interesterificação pode ser conduzida a baixas temperaturas, onde triacilgliceróis de maiores pontos de fusão estão cristalizados. A cristalização seletiva para a remoção dos TG tri-saturados do produto de interesterificação de uma gordura ou mistura de gorduras pode ser efetiva na

conversão de todos os ácidos graxos saturados em TG triinsaturados (SONNTAG,1982).

A interesterificação pode ocorrer sem a adição de catalisadores, mas altas temperaturas são necessárias, a reação tende ao equilíbrio de forma lenta e os TG sofrem decomposição e polimerização resultando no aparecimento de ácidos graxos livres. É conveniente a utilização de catalisadores que acelerem a reação e possibilitem o emprego de temperaturas mais baixas. A interesterificação pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente.

5.2.1 *Síntese química*

A síntese química do LE envolve a hidrólise de uma mistura de TGCL e TGCM e posterior reesterificação após mistura randomizada destes TG. A interesterificação química é catalisada por metóxidos de metais alcalinos, sendo uma reação simples e não dispendiosa. Este processo requer altas temperaturas e condições anidras. No entanto, devido à natureza randomizada da reação, não é possível obter modificações em posições específicas, o que ocasiona a produção de LE desejados e outros compostos não desejáveis, que podem ser de difícil remoção (IWASAKI e YAMANE, 2000; AKOH,1998).

5.2.2 *Síntese enzimática*

As enzimas apresentam diversas vantagens quando utilizadas em processos industriais, pois apresentam especificidade, permitem o uso de condições suaves de processo e redução de águas residuais. Através da especificidade obtém-se um produto final sob controle. Enzimas usualmente atuam em locais específicos da molécula, ao contrário das reações químicas (reação randomizada). A especificidade pode também aumentar o rendimento da reação através da redução de reações laterais. Enzimas são biodegradáveis e devido a sua especificidade produtos indesejáveis que normalmente aparecem na água de descarte são reduzidos ou eliminados (POSORKE,1984). As lipases podem apresentar diferentes tipos de especificidade, algumas relacionadas com o substrato (TG/DG/MG – onde TG corresponde ao triacilglicerol, DG – diacilglicerol

e MG- monoacilglicerol), posição e tipo de ácidos graxos (HUYGHEBAERT *et al.*, 1994).

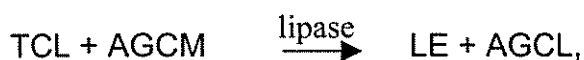
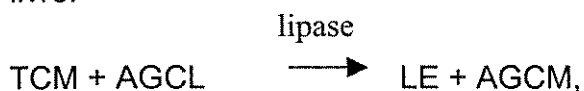
Vários métodos podem ser utilizados na produção enzimática de lipídios estruturados, cuja escolha vai depender do tipo de substrato disponível e dos produtos desejáveis:

- Esterificação direta – pode ser utilizada na preparação dos LE pela reação de ácidos graxos e glicerol. O maior problema é que o conteúdo de água decorrente do processo de esterificação deve ser removido para prevenir a hidrólise do produto obtido. Esta reação, descrita a seguir, raramente é utilizada na síntese de LE:



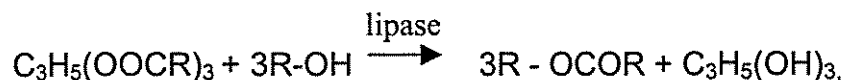
onde AGCM – ácidos graxos de cadeia média, AGCL – ácidos graxos de cadeia longa e LE- lipídios estruturados.

- Acidólise – envolve a troca de grupos acila entre um éster e um ácido graxo livre:



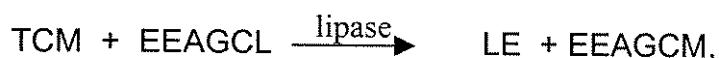
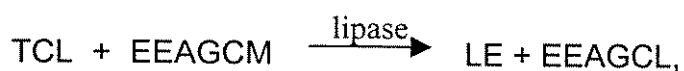
onde TCM e TCL – são triacilgliceróis de cadeia média e longa, respectivamente.

- Alcoólise – envolve a troca de grupos acila entre um éster e um álcool:



- Transesterificação – envolve a troca de grupos acila entre ésteres:





onde EEAGCM e EEAGCL - ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média e longa, respectivamente (AKOH, 1998; WILLIS e MARANGONI, 1998; SONTAG, 1982).

A transesterificação utilizando lipase *sn*-1,3 resulta em LE onde o ácido graxo da posição *sn*-2 permanece praticamente inalterado. Isto é bastante importante sob ponto de vista nutricional, pois os 2-monoacilgliceróis produzidos pela lipase pancreática são os principais carreadores dos ácidos graxos através da parede intestinal. Além de serem mais facilmente absorvidos do que os ácidos graxos esterificados nas posições *sn*-1,3. Os triacilgliceróis contendo ácidos graxos essenciais na posição *sn*-2 e ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1,3 apresentam a vantagem de prover energia de rápida absorção além dos ácidos graxos essenciais (AKOH, 1998).

A síntese de lipídios estruturados do tipo MLM pode ser realizada através da interesterificação entre TCM e TCL, da acidólise dos TG ou ainda pela interesterificação de TG com ésteres de ácidos graxos (EEAG) (Figura 3). No primeiro caso, a mistura de TCM e TCL reage com uma lipase 1,3 - específica. Nesta reação, todas as substâncias na mistura de reação (isto é, produtos interesterificados e não interesterificados) são consideradas, teoricamente, TG, caso a hidrólise do substrato seja evitada. No entanto, a reação produz uma mistura não homogênea de muitas espécies de TG (isto é, MLM, LML, MLL, LMM, TCM e TCL), difíceis de serem isoladas por meios práticos. No segundo caso, a estratégia é substituir os resíduos de ácidos graxos especificamente nas posições 1,3 do TG com a lipase 1,3 específica, deixando o resíduo de ácido graxo na posição *sn*-2 do TG inalterado. Teoricamente, estas reações dão misturas de TG, contendo os lipídios estruturados desejados e ácidos graxos ou seus ésteres. Os

ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos podem ser removidos, depois da reação, através de destilação, para ambos, ou por extração alcalina para ácidos graxos. No entanto, se todos os resíduos de ácidos nas posições 1,3 forem substituídos pelos ácidos graxos desejados, eventualmente as espécies de TG com estruturas específicas podem ser obtidas com alto grau de pureza (IWASAKI e YAMANE, 2000).

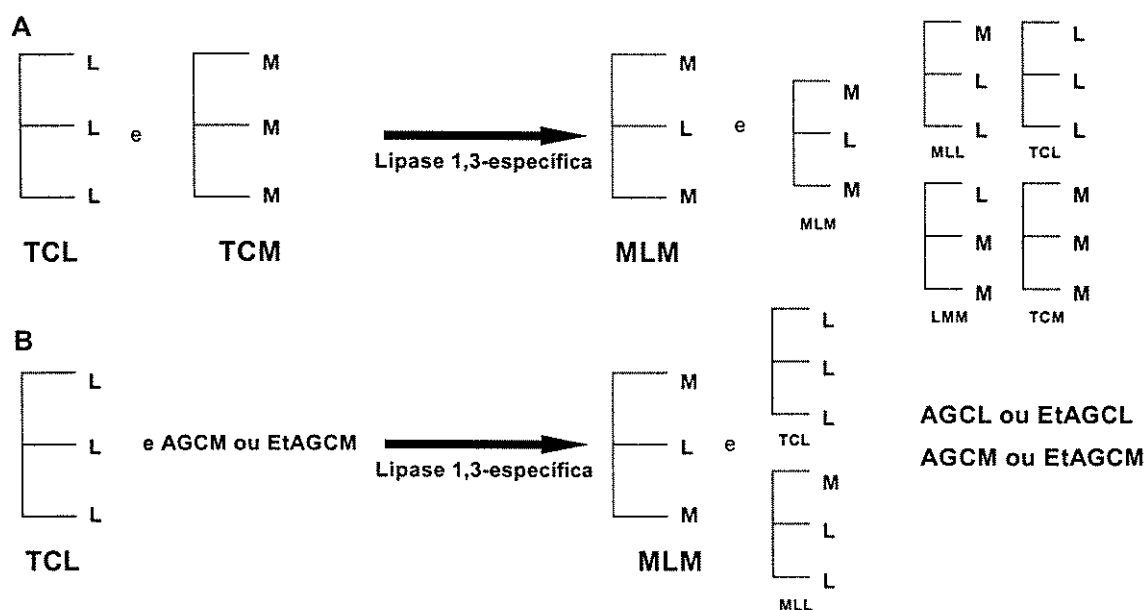


Figura 3: Síntese de LE do tipo MLM. A) Interesterificação entre TCL e TCM, B) Acidólise de TCL com AGCM ou interesterificação entre TCL e EEAGCM. Os triacilgliceróis estão representados esquematicamente. “M” e “L” indicam os resíduos de AGCM e AGCL, respectivamente. Os subprodutos possíveis (impurezas) são mostrados em tamanho menor no esquema.

XU *et al.* (1998) realizaram uma investigação preliminar sobre o efeito da incorporação e migração acila na obtenção enzimática de lipídios estruturados por batelada. Foram avaliados os efeitos do conteúdo de água, tempo de reação e suas relações na produção de dois tipos de lipídios estruturados específicos (MLM e LML) em sistema livre de solvente. Utilizaram Lipozyme IM como catalisador e os substratos para os tipos MLM e LML foram, no primeiro caso, óleo de peixe e ácido cáprico e, no segundo, triacilgliceróis de cadeia média e ácidos graxos livres de óleo de girassol. A incorporação seguiu em concordância com a equação de

Michaelis-Menten em função do tempo, enquanto que a migração acila foi proporcional ao tempo até uma razão de 20%(mol). Considerando MLM e LML, o conteúdo de água (% peso sobre a enzima) variou de 3,0 a 11,6% e 3,0 para 7,3% e a razão de incorporação, nas primeiras cinco horas, aumentou de 3,34 para 10,30 %(mol) e de 7,29 para 11,12%(mol), mas, por outro lado, a migração acila também aumentou de 0,22 para 1,12%(mol) e de 0,56 para 1,37%(mol), respectivamente. Diferentes efeitos na produção dos dois tipos de lipídios estruturados foram observados, provavelmente devido aos diferentes comprimentos das cadeias dos ácidos graxos envolvidos. Observaram, finalmente, que as relações entre tempo de reação e conteúdo de água são inversas e podem prever quantitativamente a incorporação e migração acila em condições seletivas de reações.

SCHMID *et al.* (1999) sintetizaram o *sn*-1,3 oleoil – 2-palmitoilglicerol (OPO), um lipídio estruturado importante para nutrição infantil, através de um processo que compreende duas etapas, produzindo um LE com alto rendimento e pureza através da utilização de lipase *sn*-1,3 específica. No primeiro passo, procedeu-se à alcoólise do tripalmitoilglicerol (TP) em solvente orgânico, utilizando lipase *sn*-1,3, da qual resultou o 2-monopalmitoilglicerol (2-MP). O 2-MP foi isolado (em até 85% de rendimento e com pureza superior a 96%) através de cristalização e esterificado com ácido oléico para formar o triacilglicerol OPO, contendo ácido palmítico na posição *sn*-2. A importância do OPO em nutrição infantil deve-se ao fato do leite materno conter em sua estrutura o ácido palmítico, predominantemente, na posição *sn*-2, ao passo que na maioria das formulações infantis o ácido se encontra nas posições *sn*-1,3. Isto faz com que, durante a sua digestão e liberação, ocorra a formação de sabões de cálcio fracamente absorvíveis ocasionando indigestão e perda de cálcio. Os 2-monoacilgliceróis são melhor absorvidos na parede intestinal independentemente do seu ácido graxo constituinte.

KIM *et al.* (2001) realizaram a transesterificação entre TCM e ésteres de ácido linoléico utilizando seis lipases comerciais e sete diferentes solventes. A

reação de transesterificação foi conduzida com razão molar entre TCM/ éster de ácido oléico de 1:2 em 3mL de solvente a 55°C. Os produtos foram analisados por cromatografia gasosa. Foram escolhidas três lipases para efeito de comparação de suas atividades: Novozymes 435, Lipozyme IM e lipase PS-C. A maior incorporação de ácido oléico com Novozymes 435 e Lipozyme IM foi obtida com hexano, tendo o isooctano promovido maior incorporação com a utilização da lipase PS-C. Novozymes 435 foi a enzima mais efetiva na incorporação de ácido linolênico em TCM.

JENNINGS e AKOH (2001) utilizaram lipase imobilizada IM60 na acidólise de óleo de peixe com ácido cáprico em meio contendo, ou não, hexano. Após 24h de incubação, obteve-se uma incorporação média de $31,1 \pm 4,6$ mol% e de $28,8 \pm 4,7$ mol% de ácido cáprico (C10:0) no óleo de peixe para o meio contendo hexano e em sua ausência, respectivamente. Foram avaliados o efeito do tempo de incubação, razão molar de substrato, quantidade de enzima e água adicionada sobre a incorporação do C10:0. Considerando o tempo de reação, a maior incorporação de C10:0 ocorreu em 72h para reação em hexano (33,5 mol%) e isento de hexano (36 mol%). Em função da razão molar de substratos os maiores valores foram para 1:8: 50,7 mol% em hexano e 36,7 mol% em meio isento de hexano.

LEE e AKOH (1998) sintetizaram lipídios estruturados a partir de óleo de amendoim e ácido caprílico através de catálise enzimática em meio isento de solvente. Diferentes razões de substratos foram utilizadas (1:1 – 1:4 óleo de amendoim/ácido cáprico) e a maior incorporação foi obtida com a razão molar 1:2, 28% superior quando comparada à obtida com a razão 1:1, após 72h de reação. Empregando velocidade de agitação de 640rpm foi observada a maior incorporação de ácido caprílico (14,3%), sob 200rpm a incorporação foi de apenas 2,2%, evidenciando a influência da agitação sobre a reação.

5.2.3 Síntese enzimática em reator de membrana

XU *et al.* (2000) investigaram a utilização de reator de membrana na síntese enzimática de lipídios estruturados (LE) buscando integrar a reação de interesterificação e a separação dos LE, processos que acontecem simultaneamente, permitindo assim uma forma de otimização. A integração de reações catalisadas enzimaticamente com a tecnologia de separação por membranas resulta em melhor desempenho em alguns processos. A separação simultânea dos substratos indesejáveis do meio reacional pode alterar a concentração durante o processo de reação, conduzindo a reação a um melhor nível de equilíbrio. Os autores avaliaram vinte e seis membranas planas de distintos materiais poliméricos. As membranas foram selecionadas quanto à habilidade em separar os ácidos graxos de cadeia média (AGCM), liberados dos triacilgliceróis de cadeia média (TCM), sob processo de acidólise com concentrado de ácidos graxos poliinsaturados de óleo de peixe, e menor taxa de permeação de óleo de canola, que atuou como óleo extrator. Também avaliou-se a estabilidade das membranas e o efeito do comprimento da cadeia dos ácidos graxos nos fluxos de permeado. As reações foram conduzidas em reator de membrana com base no processo de difusão. Utilizou-se enzima Lipozyme TL IM *sn*-1,3 específica como biocatalisador e óleo de canola como extrator. A incorporação de ácidos graxos poliinsaturados *n*-3 (PUFA), para 90h de reação, e nas mesmas condições operacionais, foi 15% maior quando se efetuou a separação simultânea dos AGCM liberados da reação de interesterificação, do que com a sua não separação.

XU *et al.* (2000a) investigaram a produção enzimática de lipídios estruturados específicos em reator de membrana de ultrafiltração. A reação de interesterificação enzimática ocorreu entre TCM e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa de óleo de peixe, razão molar de 1:4, respectivamente. Utilizou-se como catalisador Lipozyme TL IM, *sn*-1,3 específica (5%p/p), com umidade de 3%. Os experimentos foram realizados em célula de ultrafiltração, sob atmosfera de nitrogênio, temperatura de 50°C e agitação de 200-400 rpm. A pressão no reator

foi regulada a 1 bar após 5 horas de reação. A incorporação de ácidos graxos poliinsaturados nos TCM aumentou cerca de 15%, para 80h de reação, através da separação simultânea dos ácidos graxos de cadeia média liberados da reação de interesterificação, do que com a não utilização de membranas.

5.3 Parâmetros de processo

5.3.1 Tempo de reação

O tempo de reação foi considerado o fator mais crítico na produção de lipídios estruturados por interesterificação enzimática em reator contínuo em escala laboratorial por MU *et al.* (1998). Um maior tempo de reação resultou em maior rendimento, mas foi acompanhado pelo aumento na migração acila. A migração acila é o maior problema em reatores de batelada, resultando num decréscimo da pureza dos lipídios estruturados específicos até mesmo com a utilização de lipases 1,3 específicas.

Diferentes tempos de reação de substrato, em coluna de vidro (38cm, d=5cm e d.i.= 2.6cm) empacotada com 58g de Lipozyme IM (Comprimento = 28cm) e coberta com folha de alumínio para prevenir foto-oxidação, foram investigados por MU *et al.* (1998). Houve uma incorporação de ácido cáprico no triacilglicerol de 42% mol nas duas primeiras horas e, depois de 7 horas de reação, essa incorporação atingiu valores de 48% mol. A migração acila aumentou de 0,4 para 4,2 mol% durante todo o período de reação.

O reator contínuo apresenta menor migração acila que o reator de batelada, mesmo para maiores tempos de reação. Para uma incorporação de 48% de ácido cáprico, a migração no reator de batelada foi de 10%, para 50h de reação (XU *et al.*, 1998), mas apenas 4%, para 7 horas de reação (MU *et al.*, 1998). Em reator contínuo, menor migração acila resulta do menor tempo necessário de reação devido a uma maior eficiência entre o contato do substrato e da lipase (MU *et al.*, 1998).

5.3.2 Temperatura do reator

A incorporação de ácido caprílico aumentou de 13 para 40% quando a temperatura do reator contínuo mudou de 30 para 60°C, enquanto que a migração de ácido caprílico para a posição *sn*-2 aumentou de 0,3 para 0,6%. Quando se elevou a temperatura para 70°C a incorporação de ácido caprílico acresceu em 2%. Por outro lado, a migração acila aumentou de 0,6 para 1,4%. A temperatura de 60°C foi a melhor condição para o rendimento máximo quando se usou Lipozyme IM neste reator. Isso sugere que uma maior temperatura no reator pode ser utilizada para aumentar o conteúdo de triacilgliceróis desejados na interesterificação de produtos. No entanto, altas temperaturas também podem acelerar a inativação enzimática e aumentar a migração acila (MU *et al.*, 1998).

5.3.3 Conteúdo de água

A atividade enzimática em um sistema de reação anidro está relacionada com o conteúdo de água. Geralmente, um conteúdo mínimo (crítico) é necessário para ativar a enzima. Se o conteúdo for muito alto, a reação de hidrólise será favorecida e o rendimento irá decrescer. Se o conteúdo for muito baixo, a atividade da enzima irá decrescer. O conteúdo de água recomendado para a Lipozyme IM (Novo Nordisk) é 10%. O conteúdo adequado de água deverá levar em consideração tanto o efeito da incorporação de ácidos graxos como o efeito da migração acila. A incorporação acila é definida como a quantidade desejável de ácidos graxos incorporados nas posições *sn*-1,3 ou nas posições *sn*-1,2,3, levando-se em consideração o triacilglicerídio total. Já a migração acila é definida como a quantidade de ácidos graxos que migram para a posição *sn*-2 (XU *et al.*, 1998).

FACIOLI e GONÇALVES (1998) utilizaram enzima Lipozyme IM TL na reação de interesterificação entre óleo de piqui e ácido esteárico com duas umidades diferentes: a original (2,4%) e com 10% como recomendada pelo fabricante. A incorporação do ácido esteárico nos triacilgliceróis do piqui utilizando a enzima com sua umidade original mostrou-se mais efetiva. Não houve

diferenças significativas na composição em ácidos graxos dos produtos obtidos sob os dois níveis de umidade testados. Apenas o tempo de reação foi diferente, ou seja, de 40 minutos para a umidade original e 60 minutos para a de 10%.

Com o aumento do conteúdo de água, baseado na % de peso da enzima, de 3,0 para 11,6% para triacilgliceróis do tipo MLM e de 3,0 para 7,2% para os de tipo LML, a razão de incorporação nas primeiras 5 horas aumentou de 3,34 para 10,30% e de 7,29 para 11,12%, respectivamente. No entanto, a migração acila aumentou de 0,22 para 1,12% e de 0,56 para 1,37%, respectivamente (XU *et al.*, 1998).

O conteúdo de água é expresso como uma percentagem relativa da quantidade de enzima utilizada. SHIMADA *et al.* (1996) reportaram o efeito do conteúdo de água utilizado na produção de lipídios estruturados específicos com a lipase imobilizada *Rhizopus delemar*. Com o aumento do conteúdo de água de 0 para 100% a incorporação de ácido caprílico aumentou de 0,4 para 29% (mol), no entanto, os acilgliceróis parciais aumentaram de 7 para 28%. Com adição de 50% de água, a incorporação de ácido caprílico atingiu níveis de 34% (mol) e a geração de diacilgliceróis parciais foi minimizada a valores de 15%. Verificou-se que a reutilização da lipase, sob as mesmas condições de reação, mas sem adição de água (água foi adicionada apenas na primeira reação – 50%) reduziu a produção de acilgliceróis parciais de 18 para 1% (quarta reação), mostrando que a hidrólise simultânea pode ser reprimida pela reutilização da enzima imobilizada sem adição de água e sem perdas no rendimento. A lipase, após duas reutilizações, apresentou o melhor rendimento na obtenção do lipídio estruturado.

5.3.4 Razão molar entre substratos

MU *et al.* (1998) verificaram a influência do efeito da razão molar entre substratos na incorporação de ácidos graxos e na migração acila quando a reação de interesterificação não tinha atingido o equilíbrio. A incorporação de ácido caprílico aumentou com o aumento da razão molar entre ácido caprílico e óleo de girassol (de 1:1 para 1:8), enquanto que a migração acila foi menor que 0,5%.

Portanto, uma maior razão molar pode aumentar a razão de reação, diminuindo o tempo necessário para reação e resultando na redução de migração acila. A análise dos TG nos produtos de interesterificação também mostrou que o aumento da razão molar na reação do substrato pode aumentar o rendimento dos TG desejados nos produtos da interesterificação. Contudo, com o aumento da razão molar podem surgir problemas decorrentes do aumento da viscosidade, como a dificuldade de separação entre os TG e ácidos graxos. A utilização de uma elevada quantidade de ácido cáprico não é economicamente viável devido ao seu elevado custo.

5.3.5 *Quantidade de enzima*

Análises de variância indicaram que a incorporação de ácido cáprico (mol%) em óleo de peixe não foi significativamente diferente para quantidades de enzima variando entre 10, 15 e 20%, exceto por um pequeno aumento observado com a quantidade de 20% de enzima em reação livre de solvente. Um aumento na concentração apenas vai aumentar a velocidade da reação. Uma avaliação custo-benefício deve ser feita, levando-se em consideração o custo dos substratos, da enzima, consumo de energia e as características desejáveis do produto a ser obtido, para a determinação da quantidade de enzima a ser adicionada (JENNINGS e AKOH, 2001).

5.3.6 *Avaliação da estabilidade oxidativa*

Lipídios estruturados, em função da presença de ácidos graxos poliinsaturados, constituem uma fonte lipídica bastante susceptível à oxidação. Em função de suas aplicações nutricionais e alimentícias, onde os mesmos podem ser utilizados individualmente ou como constituintes de um produto alimentício, devem ser avaliados quanto a resistência à oxidação e características sensoriais. Diversos trabalhos sobre avaliação da estabilidade oxidativa de lipídios estruturados têm sido reportados na literatura (TIMM-HEINRICH *et al.*, 2003; TIMM-HEINRICH *et al.*, 2004, NIELSEN *et al.*, 2006; HAMAM e SHAHIDI, 2005).

6 Purificação dos LE

A obtenção de lipídios estruturados através da acidólise de triacilgliceróis ou através da interesterificação entre triacilgliceróis e ésteres de ácidos graxos produz uma mistura reacional composta de triacilgliceróis, entre quais os lipídios estruturados desejados, ácidos graxos e/ou ésteres. Os ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos podem ser removidos do meio reacional através de destilação molecular, para ambos, ou extração alcalina para os ácidos graxos (IWASAKI e YAMANE, 2000). O teor de subprodutos liberados pela reação de interesterificação depende do grau de substituições alcançada, bem como da razão molar de substratos utilizada. Com o objetivo de conferir maior proteção oxidativa aos ácidos graxos poliinsaturados e redução na migração acila os lipídios estruturados têm sido comumente purificados através de destilação molecular, utilizando-se temperaturas máximas de 185°C, sob vácuo (XU *et al.*, 2002; LAI, LOW, AKOH, 2005).

7 Absorção, transporte e metabolismo dos lipídios estruturados

A influência da estrutura do triacilglicerol no metabolismo lipídico tem sido objeto de vários estudos. Os LE podem ser transportados via sistema portal ou linfático. Os ácidos graxos de cadeia curta e média são transportados via sistema portal enquanto que os de cadeia longa são transportados via sistema linfático. Há uma crescente evidência de que os AGCM podem realmente ser absorvidos como 2-monoacilglicerol, principalmente se estes estiverem esterificados na posição *sn*-2 do LE. A razão de hidrólise da posição *sn*-2 do TG é muito baixa, o que faz com que os ácidos graxos da posição *sn*-2 permaneçam praticamente intactos durante a digestão e absorção. Aproximadamente 75% dos ácidos graxos *sn*-2 permanecem inalterados durante o processo de digestão e absorção. Os TCL são parcialmente hidrolisados pela lipase pancreática e absorvidos lentamente como acilgliceróis parciais em mistelas compostas. Os AGCL resultantes são re-esterificados e incorporados em quilomicrons nos enterócitos, atingindo o sistema

linfático através da circulação geral. A via metabólica proposta para os LE vai depender da sua natureza e composição em termos de ácidos graxos, o que pode determinar as diferenças em termos de caminhos de absorção, linfático ou portal (AKOH, 1998).

8 Aplicações nutricionais

As alterações de composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula do triacilglicerol podem ser realizadas com o objetivo de melhoria nos efeitos metabólicos específicos ou de suas características físicas. Os lipídios estruturados têm sido aplicados em nutrição infantil, parenteral e enteral, em pessoas com problemas de absorção de gorduras e insuficiência pancreática e em formulações para desportistas.

CHAMBRIER *et al.* (1999) verificaram a influência da ingestão de LE e misturas físicas de TCL e TCM/TCC, através de nutrição parenteral em pacientes em estado pós-operatório. Foram realizados exames de sangue, urina e outros exames laboratoriais nos pacientes. A administração dos LE foi melhor tolerada, não apresentando distúrbios nas funções hepáticas e alterações no nível de TG no plasma, ao passo que na dieta com mistura física foram observadas alterações significativas no nível de TG no plasma e outros distúrbios. As emulsões de LE foram mais eficazes do que a mistura física na produção do balanço positivo de nitrogênio nos pacientes pós-operados.

LEE e KIM (2000) reportaram a realização de várias pesquisas sobre a utilização de TCM em nutrição parenteral para crianças. Os resultados têm evidenciado efeitos positivos das misturas de TCL/TCM quanto às funções hepáticas e balanço de nitrogênio.

Lipídios estruturados têm sido obtidos com o objetivo de mimetizar a gordura do leite humano que apresenta peculiar composição em ácidos graxos. Nela, cerca de 60-70% de ácido graxo palmítico estão esterificados na posição *sn*-2 do triacilglicerol. As posições *sn*-1,3 são ocupadas principalmente por ácidos

graxos insaturados (XU, 2000b; SCHMID *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2006).

Em função da crescente preocupação com a ingestão de dieta com altos valores lipídicos, lipídios estruturados com baixo valor calórico têm sido propostos como alternativa para os substitutos convencionais de gorduras baseados em carboidratos ou proteínas, que não apresentam boa estabilidade a altas temperaturas. Lipídios estruturados de baixo valor calórico baseiam-se nas vantagens da limitada absorção dos AGCL e no baixo valor calórico dos AGCM (OSBORN e AKOH, 2002).

9 Referências Bibliográficas

AKOH, C. S. Structured Lipids. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed Akoh, C.C; MIN, D.B. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.

CHAMBRIER, C. *et al.* Medium- and Long-Chain triacylglycerols in Postoperative Patients: Structured Lipids Versus a Physical Mixture. **Nutrition**, vol. 15, p. 274-277, 1999.

CONNOR, W. E. ω -3 Fatty Acids and Heart Disease. In: **Nutrition and Disease Update: Heart Disease**. Ed. Kritchevsky, D.; Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L.A.G. Modificação por via enzimática de composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense camb*). **Química Nova**, vol.21, n.1, p.16-19, 1998.

FLAXSEED COUNCIL OF CANADA. The importance of omega-3 fatty acids for adults and infants. Disponível em: www.flaxseed.ca . Acesso em 15/02/2002.

GARCIA, D. J. Omega-3 Long-Chain PUFA Nutraceuticals. **Food Technology**. v. 52, n. 6, 1998.

GRUNDY, S. M. Lipids and Cardiovascular Disease. In: **Nutrition and Disease Update: Heart Disease**. Ed. Kritchevsky, D.; Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.

HAMAM, F.; SHAHIDI, F. Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. **Food Chemistry**. v. 91, p. 583-591, 2005.

HUYGHEBAERT, A.; VERHAEGHE, D.; MOOR, H. Fat Products Using Chemical and Enzymatic Interesterification. In: **Fats in Food Products**. Ed MORAN, D. P. J.; RAJAH, K. K. Chapman & Hall, London, 1994.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129 -140, 2000.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, p. 273-278, 2001.

KIM, I. H.; YOON, C. S.; LEE, K. W. Transesterification of conjugated linoleic acid and tricaprylin by lipases in organic solvents. **Food Research International**. v. 34, p. 301-306, 2001.

LAI, O.M.; LOW, C. T.; AKOH, C.C. Lipase-catalysed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor. **Food Chemistry**. v. 92, p. 527-533, 2005.

LEE, K-T; AKOH, C.C. Solvent –Free Enzymatic Synthesis of Structured Lipids from Peanut Oil and Caprylic Acid in a Stirred Tank Batch Reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, vol. 75, n.11, p. 1533 -1537, 1998.

LINKO, Y-Y; HAYAKAWA, K. Docosahexaenoic acid: A valuable nutraceutical? **Trends in Food Science & Technology**. v.7, p. 59-63, 1996.

MU, H.; XU, X.; HOY, C. E. Production of Specif-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Interesterification in a Laboratory-Scale Continuous Reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**. vol. 75, n. 9, p. 1187-1193, 1998.

NIELSEN, N. S. *et al.* Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. **Food Chemistry**. v. 94, p. 53-60, 2006.

O'KEEFE, S. F. Nomenclature and Classification of Lipids. In: **Food Lipids; chemistry, nutrition and biotechnology**. Ed. AKOH, C.C.; MIN, D. B. Marcel Dekker, Inc, New York, 1998.

OSBORN, H. T.; AKOH, C.C. Structured Lipids – Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.1, p. 93-103, 2002.

POSORKE, L.H. Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. **Journal of American Oil Chemists' Society**. vol. 61, n. 11, p. 1758-1765, 1984.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. J. Chemical Interesterification of Food Lipids: Theory and Practice. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed. Akoh, C. C.; Min, D. B. Marcel Dekker: New York, 1998.

SCHMID, U. *et al.* High Selective Synthesis of 1,3-Oleoyle-2-Palmitoylglycerol by Lipase Catalysis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 64, n. 6, p. 678-684, 1999.

SETO, A., YAMADA, O. Fats and Oils Having Superior Digestibility and Absortivity. Patente 120871, 1998.

SONNTAG, N. O.V. Fat Splitting, Esterification, and Interesterification. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 2, 4ed. Ed. Swern, D. Wiley & Sons, New York, 1982.

TIMM-HEINRICH, M. *et al.* Oxidative stability of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in *sn*-2 position – as bulk lipids and in milk drinks. **Innovative Food Science & Emerging Tecnologies**. v. 5, p. 249-261, 2004.

TIMM-HEINRICH, M. *et al.* Oxidative stability of structured lipids produced from sunflower oil and caprylic acid. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v. 105, p. 436-448, 2003.

XU, X. *et al.* Pilot Batch Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalysed Interesterification: Preliminary Study on Incorporation and Acyl Migration. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 75, p. 301-308, 1998.

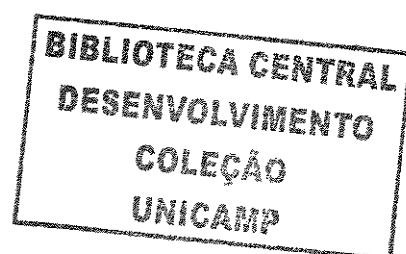
XU, X.; JACOBSEN, C.; NIELSEN, N. S.; HEINRICH, M. T.; ZHOU, D. Purification and deodorization of structured lipids by short path distillation. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v. 104, p. 745-755, 2002.

XU, X. Production of specific-structured triacilglicerols by lipase-catalysed reactions: a review. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** p. 287-303, 2000b.

XU, X. *et al.* Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology Letters**. v. 22, p.1667-1671, 2000a.

XU, X. *et al.* Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, vol. 77, n.10, p.1035-1041, 2000.

YANG, T.; FRUEKILDE, M.-B.; XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. **Food Chemistry**, v. 92, p.101-107, 2005.



CAPÍTULO II

APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NO PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS

Artigo publicado no Boletim CEPPA, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 1-22, 2005.

Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais comestíveis

Resumo

A utilização de membranas nos processos de separação apresenta-se como uma tecnologia fortemente promissora no refino de óleos vegetais, uma vez que se caracteriza por condições brandas de processamento, menor consumo energético e retenção de nutrientes desejáveis. Este artigo relata pesquisas que têm sido conduzidas sobre a aplicação de tecnologia de membranas na área de lipídios, com ênfase particular nas etapas de degomagem, desacidificação e remoção de pigmentos, refletindo uma tendência mundial por processos menos dispendiosos e tecnologicamente mais avançados.

Palavras chaves: membranas, óleos vegetais.

1 Introdução

Em termos de volume de produção mundial, os óleos mais importantes são soja, palma, canola e girassol. Aproximadamente 80% dos óleos vegetais são usados para aplicações em alimentos que incluem óleos para saladas, fritura, maionese e margarinas. Os 20% restantes são usados para aplicações industriais que incluem detergentes, cosméticos, lubrificantes, tintas, vernizes e plásticos (HATJE, 1989).

Óleos vegetais brutos são constituídos por mais de 95 % de triacilgliceróis e por compostos minoritários como fosfolipídios, esteróis, pigmentos, carboidratos, proteínas, ácidos graxos livres, matéria insaponificável, tocoferóis e seus produtos de degradação. Estas substâncias podem conferir “flavor” e cor indesejáveis, podendo ocasionar uma redução na estabilidade do óleo. Torna-se necessário submeter o óleo bruto a um processo de refino para que o mesmo adquira

características desejáveis (LIN, RHEE, KOSEOGLU, 1997).

O refino do óleo bruto, visando remover ou reduzir compostos minoritários indesejáveis, é um procedimento extensivo e consiste em um grande número de estágios. Devido à importância econômica do refino, grandes esforços têm sido realizados para melhorá-lo e simplificá-lo.

O interesse na aplicação de membranas na tecnologia de lipídios tem crescido bastante nos últimos anos. Sua utilização melhora o processo de produção, simplificando a tecnologia, reduzindo o consumo de energia e a produção de águas residuais, com a possibilidade de não adição de insumos químicos e de fácil mudança de escala (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

Logo, o processamento de óleos por membranas pode ser considerado uma alternativa fortemente promissora, visando processos menos dispendiosos, tecnologicamente eficientes e que preservem as características nutricionais da matéria-prima.

2 Processamento convencional de óleos vegetais comestíveis

A etapa inicial do processamento de óleos vegetais consiste na extração de óleos a partir de grãos oleaginosos. O tipo de extração depende do teor de óleo do material a ser processado. Para matérias-primas com teor de óleo inferior a 20 % como, por exemplo, a soja e a torta extraída pela prensagem mecânica, utiliza-se a extração por solvente, originando uma miscela óleo/solvente que deve ser posteriormente submetida a um complexo processo de destilação para obtenção do óleo bruto livre de solvente (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

O processo convencional de refino químico consiste em quatro etapas: degomagem, em que são removidos os fosfolipídios; neutralização, em que os ácidos graxos livres são neutralizados com NaOH produzindo sabões; branqueamento, em que os pigmentos são adsorvidos por terras clarificantes e

desodorização, em que são eliminados ácidos graxos livres remanescentes, aldeídos, cetonas e produtos de decomposição (HOFFMAN, 1989).

A degomagem é a primeira etapa do processo de refino de óleos vegetais e seu objetivo é, principalmente, a remoção de fosfolipídios através da adição de agentes flocculantes (água/ácido), permitindo assim a precipitação e remoção de gomas através de centrífugas separadoras (ERICKSON, 1995a).

O óleo degomado é tratado com uma solução alcalina de hidróxido de sódio para reagir e precipitar os ácidos graxos livres como sabões e, ao mesmo tempo, remover traços remanescentes de fosfolipídios. O uso de soluções cáusticas para remoção de não glicerídios indesejáveis e ácidos graxos livres é efetivo, mas pode ocasionar a saponificação de lipídios neutros e arraste dos mesmos pelos sabões formados (KOSEOGLU e ENGELGAU, 1990; ERICKSON, 1995b).

O óleo neutro, lavado e seco, pode ainda conter pequenas quantidades de impurezas que devem ser removidas para produzir um óleo de cor e sabor aceitáveis ao consumo final (GUNSTONE, 1983).

O branqueamento de óleos vegetais consiste na adição de terras clarificantes, ativadas ou naturais, ao óleo neutralizado. Resumidamente, as funções do branqueamento são a remoção ou redução dos níveis dos pigmentos (cor), sabões, produtos de oxidação, traços de metais e fosfolipídios. A ação da terra clarificante é mais eficiente em meio anidro e, portanto, a primeira etapa do branqueamento é a secagem do óleo, já que o óleo proveniente da etapa de neutralização e lavagem contém sempre umidade (ERICKSON, 1995c).

A etapa final do processamento de óleos vegetais é a desodorização, que visa à remoção dos sabores e odores indesejáveis. Nesta etapa as seguintes substâncias são removidas: compostos desenvolvidos durante armazenagem e processamento das sementes e óleos, tais como, aldeídos, cetonas, ácidos graxos oxidados, produtos de decomposição de proteínas, carotenóides, esteróis, fosfolipídios e outros; substâncias naturais presentes nos óleos, tais como,

hidrocarbonetos insaturados e ácidos graxos de cadeia curta e média; ácidos graxos livres e peróxidos (MORETO e FETT, 1998).

3 Tecnologia de membranas

Os processos de separação com membranas destacam-se como alternativas aos processos convencionais de separação nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos. Em muitos casos, o baixo consumo de energia, a redução do número de etapas em um processamento, maior eficiência na separação e melhor qualidade do produto final são os principais atrativos para o uso destas tecnologias (STRATHMANN, 1990).

O fator que distingue os processos mais comuns de separação por membranas – microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa – é a aplicação de pressão hidráulica para acelerar o processo de transporte. Entretanto, a natureza da membrana controla quais componentes permearão e quais ficarão retidos, uma vez que os mesmos são diferencialmente separados de acordo com suas massas molares ou tamanho de partícula (CHERYAN, 1998).

O mecanismo de separação ocorre, na prática, de maneira mais complexa devido à influência de diversos parâmetros tais como: composição da membrana, configuração do equipamento, superfície da membrana, pressão, temperatura e dinâmica do fluido (KOSEOGLU, RHEE, LUSAS, 1989).

Em um sistema de filtração convencional, o escoamento do fluido, líquido ou gasoso, é perpendicular à superfície da membrana, fazendo com que os solutos se depositem sobre a mesma, sendo necessária a interrupção do processo para limpeza ou substituição do filtro. Na filtração tangencial por membranas o escoamento do fluido é paralelo à superfície da membrana. Devido à alta velocidade ocorre o arraste dos solutos que tendem a se acumular na superfície, o que torna esse processo mais eficiente (PAULSON, WILSON, SPATZ, 1984). A Figura 1 representa a comparação entre os dois sistemas de filtração, sendo que a

filtração com membrana pode ser classificada quanto ao tipo de membrana utilizada e à força motriz de separação.

A força motriz usada para atingir o fluxo hidrodinâmico desejado é um gradiente de pressão hidrostática. Em alguns casos, os gradientes de concentração e potencial elétrico podem ser usados como forças motrizes adicionais (ROSENBERG, 1995).

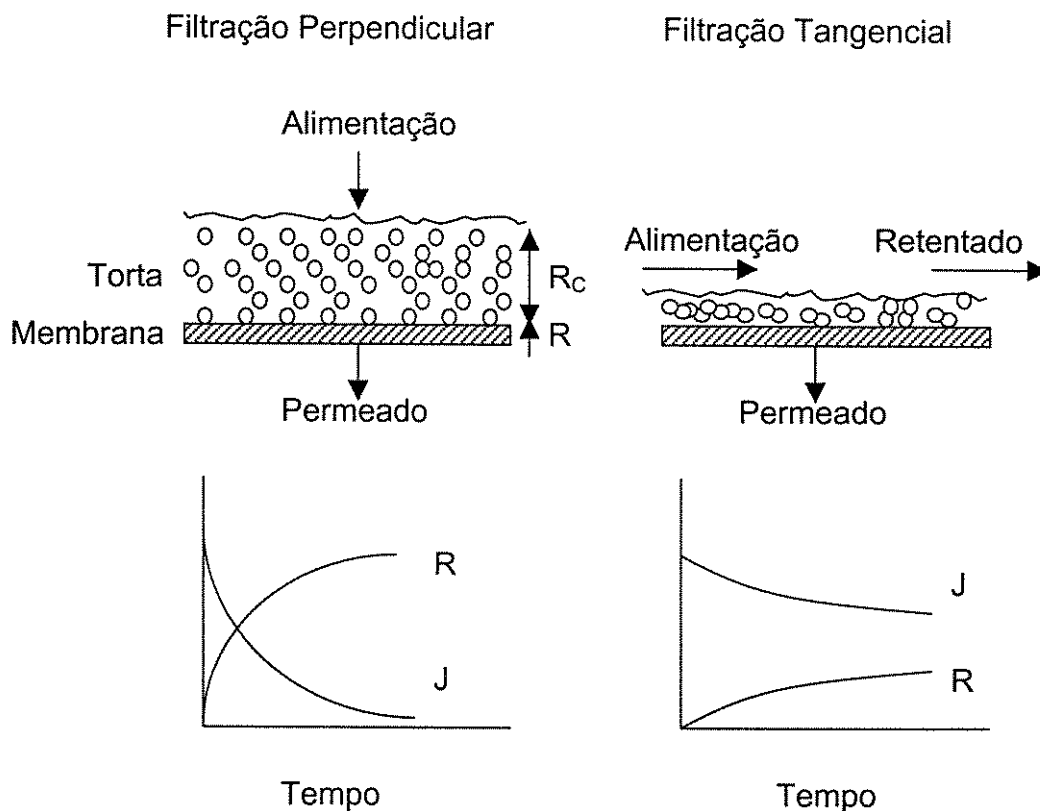


Figura 1. Diferença entre a filtração perpendicular (convencional) e a filtração tangencial. R_c é a resistência da torta formada na membrana devido aos solutos impermeáveis, R é a resistência da membrana, J é o fluxo (Cheryan, 1998).

De um modo geral, a filtração convencional separa solutos maiores que $10\mu\text{m}$, enquanto que tamanhos menores são separados pelo sistema tangencial. A osmose reversa retém todos os componentes exceto a água, enquanto que a ultrafiltração retém macromoléculas ou partículas maiores que $0,002$ a $0,2\mu\text{m}$ (ou 500 a 300.000 Daltons). Sendo assim, pode-se dizer que a osmose reversa é essencialmente um processo de concentração, enquanto que a microfiltração e a

ultrafiltração são processos de fracionamento (OSTERGAARD, 1989).

3.1 Membranas

A principal função de uma membrana é atuar como barreira seletiva, permitindo a passagem de certos componentes de uma mistura e retendo outros. Sua seletividade está relacionada às dimensões da molécula ou partícula e ao tamanho do poro, assim como à difusividade do soluto na matriz e às cargas elétricas associadas (CHERYAN, 1998).

Um sistema de membranas é selecionado a partir do tipo de aplicação. Além disso, a porosidade e o coeficiente de retenção da membrana devem ser considerados na escolha de um sistema adequado (HABERT, BORGES, NÓBREGA, 1997).

Geralmente o tamanho de poro de uma membrana é indicado na literatura e principalmente pelos fabricantes, através da massa molar de corte (MWC), que designa a massa molar do menor componente que será retido com uma eficiência de pelo menos 95%. De um modo geral, quando se trata da separação de macromoléculas, a unidade mais utilizada para a massa molar de corte é o Dalton. Para o poro de membranas de microfiltração, geralmente maior que o de membranas de ultrafiltração, é preferencialmente dado pelo diâmetro de poro em μm (MODLER, 2000).

3.1.1 Características das membranas

De um modo geral as características mais importantes das membranas são: espessura, diâmetro dos poros (seletividade), permeabilidade à água e porosidade. Outras características são fluxos de permeado, resistência térmica, química e mecânica (CHERYAN, 1998).

A porosidade não deve ser confundida com o tamanho dos poros e sim,

como uma relação entre a parte sólida e os poros da membrana, ou seja, a “quantidade de vazios” em sua estrutura (porosidade global). Pode ser relativa à parte filtrante da membrana (pele filtrante) e, nesse caso, é expressa em poros/cm² (densidade dos poros). Quanto maior a porosidade da subcamada, menor será a resistência ao fluxo de solvente através da membrana. A determinação do diâmetro de poros de uma membrana é de grande importância para sua caracterização (CHERYAN, 1998).

3.1.2 *Tipos de membranas*

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes distintas de material: os polímeros, constituídos de material orgânico como acetato de celulose, poliamidas, polissulfonas, polifluoreto de vinilideno dentre outros; e os inorgânicos, como metais e materiais cerâmicos (CHERYAN, 1998). De acordo com a evolução tecnológica, as membranas podem ser classificadas em três classes distintas:

Primeira geração: membranas derivadas de acetato de celulose que foram desenvolvidas originalmente para dessalinização da água do mar. São sensíveis ao pH (3 – 8) e à temperatura (máximo 50°C), além de serem suscetíveis a microrganismos e desinfetantes (CHERYAN, 1998).

Segunda geração: são membranas elaboradas com polímeros sintéticos, principalmente derivados de polissulfona ou poliolefina. Foram introduzidas a partir de 1975, com diferentes composições químicas e propriedades funcionais, tais como as de poliamidas e polibenzimidazoles que são resistentes à hidrólise e ao ataque de microrganismos, porém degradam-se na presença de cloro (ZANINI, 1994).

Terceira geração: são membranas constituídas de material cerâmico à base de óxido de zircônio ou alumina depositados sobre uma superfície de grafite ou outros materiais. Possuem grande resistência mecânica, suportando altas pressões (20 bar). Além disso, toleram toda faixa de pH (0 a 14) e temperaturas

superiores a 400°C; são quimicamente inertes e de custo muito mais elevado (SUTHERLAND e FREE, 1991).

3.2 Fenômenos envolvidos no processo

Durante o processo de separação por membrana, geralmente ocorre um declínio do fluxo de permeado (à pressão constante) com o tempo. Os principais problemas relacionados com esse comportamento são: polarização por concentração, formação da camada de gel e colmatagem.

A formação da camada de gel ocorre a partir da deposição de solutos na superfície da membrana, polarização por concentração, ocasionando um prejuízo no funcionamento hidrodinâmico do sistema, pois constitui-se em mais uma barreira para o fluxo de permeação. Essa camada de gel ocorre quando na superfície da membrana há uma precipitação de macromoléculas. A colmatagem, entretanto, resulta da penetração de solutos presentes em soluções de macromoléculas ou de suspensões coloidais nos poros da membrana, acarretando também uma diminuição no fluxo do solvente e alterando as características de retenção. Além disso, durante o processo de membrana ocorre um acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana, por transporte convectivo, onde parte do solvente é removida do fluido, o que ocasiona uma maior concentração de solutos na superfície da membrana em relação à da solução. Esse aumento da concentração de solutos na superfície da membrana é conhecido como polarização da concentração e é responsável pela diferença observada entre o fluxo de permeado final e inicial, comparando-se com o fluxo de água pura (CHERYAN, 1998).

3.3 Parâmetros operacionais

Os principais parâmetros de operação que afetam o fluxo de permeado são: pressão, temperatura, concentração de alimentação e velocidade tangencial. O fluxo de permeado é diretamente proporcional à pressão aplicada e inversamente proporcional à viscosidade. A viscosidade pode ser controlada por dois fatores: concentração de sólidos na alimentação e temperatura. Sob condições restritas, o aumento da pressão ou da temperatura acarreta um aumento de fluxo de permeado. Entretanto, a utilização de pressões muito elevadas pode ocasionar a compactação da camada de gel, aumentando a colmatagem da membrana (CHERYAN, 1998).

O aumento na concentração de alimentação afeta a viscosidade, densidade e difusividade da solução de alimentação, ocasionando um decréscimo no fluxo de permeado. Em geral, temperaturas maiores proporcionam maiores fluxos de permeados em regiões em que existe controle de pressão e de transferência de massa. O efeito da temperatura é decorrente da redução ocasionada na viscosidade do fluido e na mobilidade das moléculas, ou seja, na difusividade. O aumento da velocidade tangencial aumenta a taxa de permeação por provocar maior turbulência. A turbulência, proveniente de agitação ou bombeamento do fluxo, promove uma desorganização na concentração de solutos na superfície da membrana, reduzindo a espessura da camada limite. Este é um dos métodos mais simples e efetivos de se controlar o efeito da polarização da concentração (CHERYAN, 1998).

A configuração também afeta o desempenho das membranas. Um alto desempenho de uma membrana, quanto ao fluxo de permeado e retenção do soluto desejado, deve ser balanceado quanto à sua maior propensão à colmatagem, custo, facilidade de limpeza e substituição (PORTER, 1990).

3.3.1 Parâmetros importantes para a análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração

Para a análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração os seguintes parâmetros são fundamentais (RENNER e SALAM, 1991):

Fluxo de permeado (F): é a quantidade obtida de permeado em kg, por m² de membrana por hora (kg. m⁻².h⁻¹).

Coeficiente de retenção: fornece uma medida quantitativa da capacidade da membrana em reter, por exemplo, as moléculas de fosfolipídios, sob determinadas condições de operação. É dada em porcentagem. $R = (1 - C_p/C_i) \cdot 100$, onde C_i e C_p são respectivamente, a concentração inicial de fosfolipídios no óleo e a concentração de fosfolipídios no permeado em cada amostragem.

Fator de concentração (Fc): quantifica a redução de massa atingida pela ultrafiltração. É calculada como a razão entre a massa inicial na alimentação e a massa final de retentado: $F_c = M_A / M_R$, onde M_A = massa na alimentação e M_R = massa no retentado.

Pressão transmembrana (PTM): é a média do gradiente da pressão entre o lado do retentado e o lado do permeado, que normalmente está à pressão atmosférica, no início e no fim da membrana. $P = (P_{ent} + P_{saida})/2$.

4 Aplicação de membranas em tecnologia de óleos vegetais

As pesquisas de membranas no processamento de óleos vegetais iniciaram-se no final da década de 80 e ainda se encontram em fase de estudos laboratoriais.

O processo convencional de refino de óleos é caracterizado por altos requerimentos energéticos, perdas de óleo neutro, necessidade de grandes

quantidades de água e insumos químicos, perda de nutrientes e elevada produção de efluentes. Em contraste, o processamento através de membranas mostra-se notadamente mais simples, oferecendo vantagens em relação ao processo convencional devido ao baixo consumo energético, operação sob temperaturas amenas, não adição de produtos químicos e retenção de nutrientes e outros compostos desejáveis (SUBRAMANIAN *et al.*, 2001a).

Estudos de viabilidade econômica do processo aplicado à indústria de óleos não existem. Dados de 1990 relatam que a substituição ou complementação do refino convencional pela tecnologia de membranas poderia acarretar uma economia de 15 a 21 trilhões Btu/ano, sendo 2 trilhões Btu/ano correspondentes à recuperação do solvente. Adicionalmente, o decréscimo nas perdas de óleo neutro e nos requerimentos de terra clarificante apresenta-se como vantagem potencial desta alternativa tecnológica (KOSEOGLU e ENGELGAU, 1990).

O processo convencional de refino de óleos vegetais e o refino baseado na tecnologia de membranas são mostrados na Figura 2.

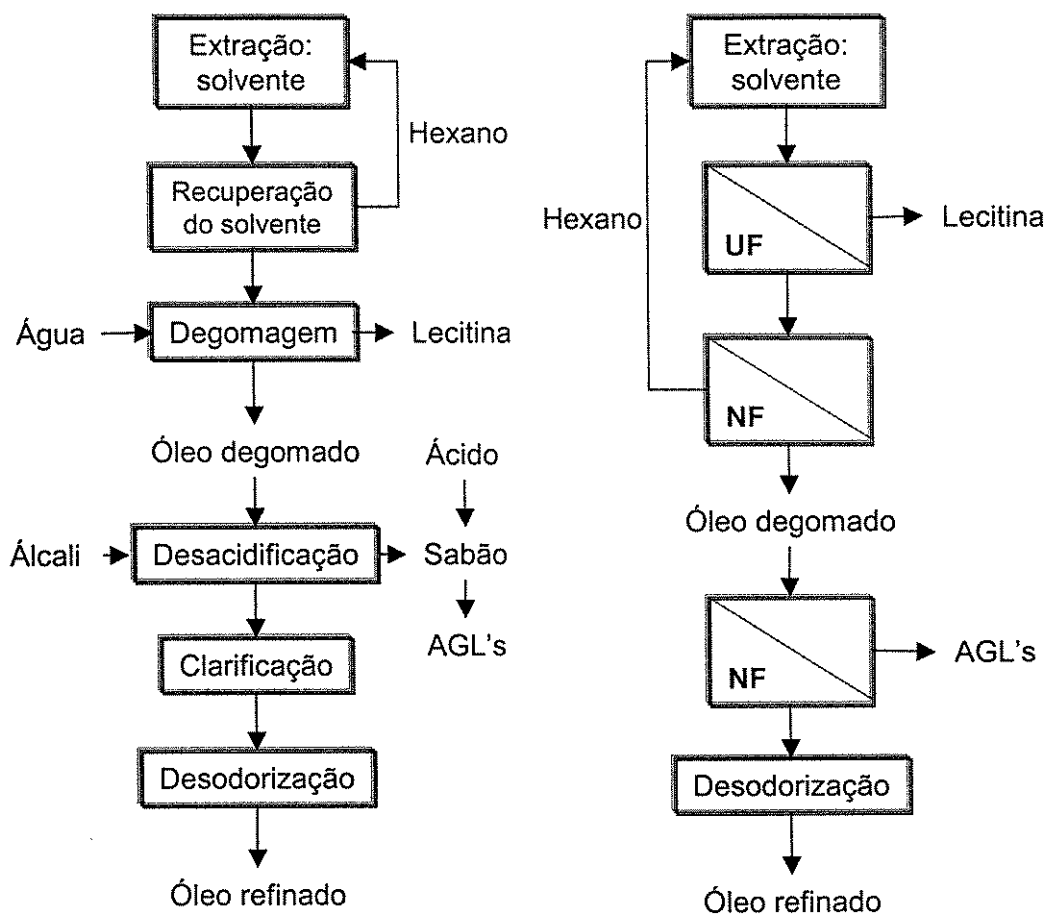


Figura 2. Comparação entre os processos convencionais e baseado na tecnologia de membranas. Fonte: SNAPE e NAKAJIMA (1996).

4.1 Degomagem

Segundo Subramanian e Nakajima (1997), é difícil separar triacilgliceróis (massa molar média de 900 Da) e fosfolipídio (massa molar 800 Da) por membranas de ultrafiltração devido à similaridade de suas massas molares. Entretanto os fosfolipídios tendem a formar micelas em meio não-polar de hexano ou óleo. "Micelle enhanced ultrafiltration" (MEUF) é uma técnica recentemente descoberta em membranas em que se empregam agentes surfactantes. Os fosfolipídios são removidos do fluxo de alimentação por criar um complexo maior que não pode passar através dos poros das membranas.

A utilização de membranas no processo de degomagem de óleos vegetais tem sido exaustivamente pesquisada. Diferentes alternativas têm sido propostas, algumas baseadas na remoção de fosfolipídios a partir da miscela (óleo/hexano) e outras na remoção a partir do óleo sem adição de solventes. No primeiro caso, a maior dificuldade encontrada é a baixa estabilidade das membranas em solventes orgânicos e, no segundo caso, o baixo fluxo de permeado como consequência da alta viscosidade do óleo (OCHOA *et al.*, 2001).

A aplicação de membranas poliméricas para uso orgânico requer estabilidade química e física frente ao hexano e a temperaturas em torno de 50 – 60°C. Materiais como poliamida aromática, imida aromática, polifluoreto de vinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno parecem ser adequados (IWAMA, 1987). Segundo Koseoglu (1991), o processo de degomagem por membranas requer elevadas resistências mecânica, química e térmica. As membranas cerâmicas atendem a estes requisitos e têm sido introduzidas para aplicação em processos de ultrafiltração, embora a disponibilidade quanto a diferentes tamanhos de poro ainda seja restrita.

Alguns estudos com óleos brutos de origem vegetal foram desenvolvidos visando à remoção de fosfolipídios através de membranas em escala laboratorial. De *et al.* (1998) e Alicieo *et al.* (2002), utilizando membranas cerâmicas em condições diversas de temperatura e pressão (30 a 70°C; 3 a 50bar) obtiveram retenções ao redor de 85%, porém com baixos fluxos de permeado (4kg/m²h). Alternativamente, o uso de membranas poliméricas foi efetuado por Subramanian *et al.* (1998) e Koris e Vatai (2002) com pressões variando de 2 a 30 bar e temperaturas entre 40 e 60°C, o que resultou em menores retenções (70-77%), entretanto com uma melhoria no fluxo de permeado (30L/m²h).

Subramanian *et al.* (2001a) conduziram estudos com caráter exploratório acerca dos fenômenos de retenção de fosfolipídios em óleos vegetais nos processos com membranas, baseando-se na caracterização de micelas reversas formadas a partir destes compostos, em um sistema modelo contendo óleo de

soja sem a adição de solventes. As micelas apresentaram tamanho variando entre 3,56 e 4,80nm, fato que levou os autores a concluir que uma membrana de natureza hidrofóbica com diâmetro de poro igual a 4nm consistiria em uma escolha ideal para a separação de fosfolipídios em óleos brutos. No entanto, os fosfolipídios são surfactantes naturais e formam micelas em meio não aquoso. As micelas formadas têm uma massa molar em torno de 20kDa ou mais e podem ser separadas dos triacilgliceróis através da utilização de membranas adequadas (GUPTA, 1977).

Neste sentido, torna-se viável a utilização de miscela óleo/solvente no processo de degomagem por membranas, o que propicia adicionalmente um aumento significativo no fluxo de permeado (10 a 200L/m²h), constatado por diversos estudos (LIN, RHEE, KOSEGLU, 1997; OCHOA *et al.*, 2001; PAGLIERO *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2005; PAGLIERO *et al.*, 2003; PAGLIERO *et al.*, 2004) também em escala laboratorial com membranas poliméricas (massa molar média de corte entre 0,5 a 70kDa) resistentes a hexano. As condições avaliadas por esses autores corresponderam a pressões entre 0 a 20bar, temperaturas de 20 a 50°C e teores de óleo em hexano de 20 a 40% (m/m).

Em trabalhos recentes Bei *et al.* (2003) e Soares *et al.* (2003) estudaram a degomagem de óleo bruto de soja em miscela (32 a 45% m/m), em escala piloto, utilizando membranas cerâmicas (alumina) multicanais com diâmetro de poro de 0,01µm, a 40°C, com pressões de 1 a 1,5bar resultando em retenções ao redor de 87 a 97% e fluxos de permeado variando de 60 a 100L/m²h.

4.2 Separação de ácidos graxos

Kumar e Browmickd (1996) realizaram em um teste de planta piloto, nanofiltração de mistura de ácidos graxos, óleo e álcool através de membranas de acetato de celulose, polissulfona e poliamida. Para a membrana de poliamida, com massa molar média de corte entre 500 e 600 Da, obtiveram um fluxo de 67,36

L/m²h, à pressão de 0,7 MPa e os seguintes resultados: 86,82% de ácidos graxos livres no permeado e 61,71% de ácidos graxos livres no retentado. Segundo os autores, a melhor separação dos triacilgliceróis de ácidos graxos livres e álcool ocorreu com poliamidas, porque são membranas menos hidrofílicas, resultando em menor compactação.

Kale, Katikaneni e Cheryan (1999), reportaram a desacidificação de óleo bruto de arroz em solvente através de nanofiltração. A concentração de ácidos graxos livres foi reduzida de 16,5 % para 3,7 % através da extração com metanol, na proporção de 1,8:1 metanol/óleo (peso) e foi recuperada por nanofiltração utilizando-se membranas comerciais (Osmonics, Film Tec). Segundo os autores, um sistema com dois estágios de membrana pode recuperar 97,8 % dos ácidos graxos livres e resultar em uma fonte de retentado final com 20% de ácidos graxos livres, que podem ser reciclados para uma outra extração de ácidos graxos.

Zwijnenberg *et al.* (1999) utilizaram membrana de poliamida (nanofiltração) preparada em laboratório, na separação de dois tipos de mistura: óleo de girassol/acetona e ácidos graxos provenientes do óleo de breu/acetona. Os ensaios foram realizados a 20 bar e 20°C, com área efetiva de membrana igual a 37 cm². Misturas contendo óleo de girassol/acetona tiveram suas concentrações variando de 10 a 50% (em óleo), resultando em uma rejeição de triacilgliceróis praticamente constante, entre 92-94%. A rejeição de ácidos graxos livres (AGL) foi estudada utilizando-se frações separadas contendo 10% AGL e 10% AGL metilados, ambas em acetona. Obteve-se para ambas entre 48 – 54% de rejeição. Segundo os autores, uma vez que moléculas de AGL e AGL metilados diferem significativamente em polaridade mas não em tamanho, a diferença de tamanho entre triacilgliceróis e AGL consistiria no principal mecanismo de separação entre os mesmos, em detrimento da diferença de polaridade.

Koike *et al.* (2002), avaliaram diferentes tipos de membranas poliméricas comerciais sem identificação de tamanho de poro (série NTGS – Nitto Denko, Japão) quanto às suas capacidades de separação de ácidos graxos livres.

Utilizou-se óleo de girassol alto oléico anteriormente submetido à hidrólise enzimática, diluído em hexano ou etanol. Os ensaios foram realizados em célula com capacidade de 100 mL, a 30°C e 4 MPa. O melhor resultado foi obtido com membrana composta silicone/poliamida, para misturas óleo/hexano, em que a rejeição de ácidos graxos livres foi de 70,2 %.

4.3 Remoção de pigmentos

O alto custo de terra de branqueamento, associado com perdas de óleo e subsequentes problemas de descarte da terra, tem levado a um interesse na aplicação de tecnologia de membranas para substituir o processo de branqueamento tradicional (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

Experimentos utilizando óleo de soja bruto, sem a adição de solventes orgânicos, foram realizados por Subramanian, Nakajima e Kawakatsu (1998). Foram testadas membranas poliméricas compósitas com silicone como camada ativa e polissulfona e poliamida como camadas de suporte, respectivamente. As condições de operação foram mantidas em 40°C, pressão de 3MPa e agitação de 800rpm. A redução de clorofila no permeado variou de 74 a 80%, para as duas membranas estudadas.

Reddy *et al.* (2001) estudaram a clarificação de óleo de soja bruto e em solução com hexano (50 % p/p), através de duas membranas poliméricas compósitas (NTGS – 2100 e NTGS – 1100, Nitto Denko, Japão) e uma membrana de polietileno para microfiltração. Os testes foram realizados em célula pressurizada por nitrogênio, com agitação de 500 rpm e temperatura de 40 °C. A membrana NTGS – 2100 propiciou os melhores resultados, com remoção de 96% e 72% de clorofila do óleo bruto e da solução óleo/hexano, respectivamente.

Subramanian *et al.* (2001b) avaliaram o mecanismo de rejeição de carotenóides em amostras de óleo de soja bruto e óleo de girassol alto oléico refinado, utilizando membrana de poliimida sem identificação de tamanho de poro

(NTGS-2200, Nitto Denko, Japão) de 32cm² de área efetiva, a 4Mpa, 30 a 40°C e agitação de 400rpm. Observou-se baixa rejeição de carotenos (11 a 20%), enquanto que as xantofilas, principais carotenóides do óleo de soja, foram rejeitadas em 60%. O estudo também verificou a ausência de afinidade entre beta-caroteno e os fosfolipídios presentes no óleo.

4.4 Estudo de componentes minoritários: tocoferóis

Tocoferóis são antioxidantes naturais presentes nos óleos vegetais, apresentando efeito benéfico sobre a qualidade dos mesmos. Portanto, estudos recentes têm focado a aplicação da tecnologia de membranas na preservação ou concentração destes compostos (SUBRAMANIAN *et al.*, 2003).

A permeação preferencial de tocoferóis em relação aos triacilgliceróis nos processos com membranas foi primeiramente observada por Subramanian *et al.* (1998), na filtração de óleos de amendoim e girassol brutos, em que obtiveram permeados com altos teores de tocoferóis. De acordo com os autores, tocoferóis parecem não apresentar afinidade com as micelas de fosfolipídios e a baixa massa molar destes compostos, aliado as possíveis interações com o material da membrana, resultariam em maior permeação, ou, da mesma forma, em valores negativos de rejeição.

Da mesma forma, estudos de Subramanian, Nakajima e Kawakatsu (1998) revelaram retenção de tocoferóis negativa (entre -18 e -24%) para óleo de soja. Tais valores resultaram em um aumento de 12-15% destes compostos no permeado. Experimentos com óleo de canola realizados nas mesmas condições elevaram o teor de tocoferóis no permeado em 25%.

Subramanian *et al.* (2003) reportaram a aplicação de membranas densas (não porosas) no estudo da permeação diferenciada de tocoferóis. Foi utilizada membrana com camada ativa de silicone e poliimida como camada de suporte

(NTGS-2200, Nitto Denko, Japão). Os experimentos foram realizados com óleo de girassol alto oléico enriquecido com α -tocoferol, com pressão e temperatura variando entre 2 a 5 MPa e 20 a 50°C, respectivamente. Tocoferóis apresentaram permeação preferencial quando comparados aos triacilgliceróis, correspondendo a valores de rejeição negativos (-30 a -52%). Todavia, o aumento da concentração de tocoferóis na alimentação acarretou diminuição da taxa de permeação dos mesmos, embora sem efeito significativo sobre o fluxo total.

Nagesha, Subramanian e Sankar (2003) avaliaram a seletividade de membranas densas não porosas com silicone e poliimida como camada ativa e de suporte, respectivamente, quanto à permeação de tocoferóis. Utilizaram-se amostras de destilado do desodorizado de óleo de soja (DDOS), diluídas ou não em hexano e de destilado do desodorizado de óleo de soja esterificado, sem diluição. Para comparação foram selecionados sistemas modelo constituídos por ácido oléico e tocoferóis em diferentes proporções (80:20 e 50:50), diluídos ou não em hexano. Ao sistema modelo isento de hexano adicionou-se uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de óleo de soja e tocoferóis (90:10). Os experimentos foram conduzidos em célula de filtração pressurizada com nitrogênio, a 3 MPa, 30°C e 800 rpm. O estudo revelou que ocorreu permeação preferencial de tocoferóis em relação aos outros constituintes de baixo peso molecular (ácidos graxos livres e FAME). A seletividade da membrana quanto aos tocoferóis aumentou com o DDOS esterificado. A presença de hexano influenciou positivamente a permeação de tocoferóis, por propiciar maior solubilidade destes compostos em relação aos outros constituintes da alimentação. Os autores concluem que os processos com membranas parecem ter potencial no enriquecimento de tocoferóis do DDOS. Entretanto, experimentos em escala piloto seriam necessários para o desenvolvimento do processo.

5 Conclusões

A aplicação da tecnologia de membranas na área de óleos tem apresentado um desenvolvimento crescente nos últimos anos, a despeito de dificuldades encontradas quanto à disponibilidade de membranas para uso orgânico e estabilidade química das mesmas frente a solventes como hexano. Uma membrana ideal para utilização no processamento de óleos vegetais deve combinar requerimentos específicos de retenção com fluxos de permeados adequados a processos industriais. A escolha de uma membrana deve, portanto, considerar aspectos relacionados a interações físico-químicas entre possíveis solventes, materiais constituintes da membrana e componentes presentes no óleo em questão.

Embora a etapa de degomagem através de membranas encontre-se relativamente fundamentada, os processos de desacidificação e clarificação em particular apresentam elevado potencial de exploração no que se refere a parâmetros específicos de processo, como pressão, temperatura e escolha de membranas compatíveis, uma vez que os estudos realizados ainda revelam resultados díspares.

A aplicação da tecnologia de membranas sobre os compostos minoritários dos óleos vegetais, como os tocoferóis, colabora não somente para o desenvolvimento das próprias etapas do refino, mas principalmente para constantes buscas por novos produtos, baseados na concentração ou fracionamento destes compostos, em geral de alto valor agregado.

6 Referências bibliográficas

ALICIEO, T. V. R. *et al.* Membrane ultrafiltration of crude soybean oil. **Desalination**. v. 148, p. 99-102, 2002.

BEI, N. *et al.* **Ultrafiltração de miscela de óleo bruto de soja através de membrana cerâmica**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL "TENDÊNCIAS E

INOVAÇÕES EM TECNOLOGIAS DE ÓLEOS E GORDURAS". Campinas, SP, Brasil. Resumos. Editado por SBOG – Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, Campinas, SP, 2003.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publ. Co., Illinois, 1998. 526p.

DE, B.K. *et al.* Membrane degumming and dewaxing of rice brain oil and its refining. **Fett/Lipid**. v.100, n.9, p. 416 -421, 1998.

ERICKSON, D.R. Degumming and Lecithin Processing and Utilization. In: **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Ed. ERICKSON, D.R. American Soybean Association, St. Louis, Missouri and American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, p.174-183, 1995a.

ERICKSON, D.R. Neutralization. In: **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Ed. ERICKSON, D.R. American Soybean Association, St. Louis, Missouri and American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, p.184-202, 1995b.

ERICKSON, D. R. Bleaching/ Adsorption Treatment. In: **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Ed. ERICKSON, D. R. American Soybean Association, St. Louis, Missouri and American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, p.203-217, 1995c.

GUNSTONE, F.D. **Lipids in Food Chemistry: Biochemistry and Technology**. S.1: Pergamon International Library, 1983.

GUPTA, A.K.S. Process for refining crude glyceride oils by membrane filtration. US Patent 4062882, 1997.

HARBERT, A. C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Aspectos gerais dos processos com membranas. In: **Processos de separação com membranas**. HARBERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Rio de Janeiro, cap.1, 1997.

HATJE, G. World importance of oils crops and their products. In: **Oils crops of the world: their breeding and utilization**. Mc Graw Hill, 1989. p.6-8.

HOFFMAM, G. **The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and their High Fat Products**. Academic Press, San Diego, CA, 1989.

IWAMA, A. New process for purifying soybean oil by membrane separation and an economical evaluation of the process. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 64, n. 9, p. 244-250, 1987.

KALE, V.; KATIKANENI, S.P.R.; CHERYAN, M. Deacidifying rice bran oil by solvent extraction and membrane technology. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 76, n. 6, p. 723-727, 1999.

KIM, I. *et al.* Phospholipids separation (degumming) from crude vegetable oil by polyimide ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**. v. 205, p. 113-123, 2002.

KOIKE, S. *et al.* Separation of oil constituents in organic solvents using polymeric membranes. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 79, n. 9, p. 937-942, 2002.

KORIS, A.; VATAI, G. Dry degumming of vegetable oils by membrane filtration. **Desalination**. v. 148, p. 149-153, 2002.

KOSEOGLU, S.S. Membrane technology for edible oil refining. **Oils & Fats International**. v. 5, p. 16-21, 1991.

KOSEOGLU, S.S.; ENGELGAU, D.E. Membrane applications and research in edible oil industry: an assessment. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 67, n. 4, p. 239-249, 1990.

KOSEOGLU, S.S.; RHEE, K. C.; LUSAS, E.W. Membrane processing of crude vegetables oils: laboratory scale membrane degumming, refining and bleaching. **Journal of American Oil Chemists' Society**. p. 182-188, 1989.

KUMAR, K. N.; BHOWMICK, N. Separation of fatty acids/triacylglycerols by membrane. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 73, n. 3, p. 399-401, 1996.

LIN, L.; RHEE, K.C.; KOSEOGLU, S.S. Bench-scale membrane degumming of crude vegetable oil: process optimization. **Journal of Membrane Science**. v. 134, p. 101-108, 1997.

MODLER, W.H. Milk Processing. In: SHURYO, N.; MODLER, W.H. **Food Protein Processing Applications**, Wiley – VCH, Inc, United States of America, p. 1-88, cap.1, 2000.

MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Ed. Varela, São Paulo, 1998.

MOURA, J.M.L.N. *et al.* Degumming of vegetable oil by microporous membrane. **Journal of Food Engineering**. v. 70, p. 473-478, 2005.

NAGESHA, G.K.; SUBRAMANIAN, R.; SANKAR, K.U. Processing of tocopherol and FA systems using a nonporous denser polymeric membrane. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 80, n. 4, p. 397-402, 2003.

OCHOA, N. *et al.* Ultrafiltration of vegetable oils Degumming by polymeric membranes. **Separation and Purification Technology**. v. 22-23, p. 417-422, 2001.

OSTERGAARD, B. **Applications of membrane processing in the Dairy Industry; Diarmuid MacCarthy**. In: Concentration and Drying of Foods, Elsevier Applied Science Publishers, England, p. 133-145, 1989.

PAGLIERO, C. *et al.* Degumming of crude soybean oil by ultrafiltration using polymeric membranes. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 78, n. 8, p. 793 -796, 2001.

PAGLIERO, C.; *et al.* **Aplicación de membranas para el desgomado de aceite crudo de soja y girasol**. In: 4 °CONGRESSO IBERO- AMERICANO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEMBRANAS. Florianópolis, SC, Brasil. Resumos, p.51. Editado por Petrus, J.C.C.; Porto, L.M. e Laurindo, J.B. Florianópolis, SC, 2003.

PAGLIERO, C.; *et al.* Vegetable oil degumming with polyimide and polyvinylidene fluoride ultrafiltration membranes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.79, p.148-152, 2004.

PAULSON, D.J.; WILSON, R. L.; SPATZ, D.D. Crossflow membrane technology and its applications. **Food Technology**. v. 12, p. 77-87, 1984.

PORTER, M.C. Ultrafiltration. In: PORTER, M.C. (Ed.) **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990.

REDDY, K. *et al.* Decolorization of vegetable oils by membrane processing. **European Food Research Technology**. v. 213, p. 212-218, 2001.

RENNER, E.; SALAM, M. H. A. Basic principles. In: RENNER, E.; SALAM, M.H.A ed. **Application of ultrafiltration in the industry**. London, Elsevier Science. Cap. 2, p. 7-29, 1991.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane process in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**. v. 6, p. 12-19, 1995.

SNAPE, J. B.; NAKAJIMA, M. Processing of agricultural fats and oils using membrane technology. **Journal of Food Engineering**. v. 30, p. 1-41, 1996.

SOARES, M. S. *et al.* **Degomagem de misturas de óleo de soja bruto por membrana cerâmica de ultrafiltração**. In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS. Campinas, SP, Brasil. Resumos. Editado por Pastore, G. M; Amaya, D. R.; Macedo, G.A., Campinas, SP, 2003.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, M.C. (Ed.) **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990.

SUTHERLAND, J.; FREE, M. J. A method for monitoring leakage through membranes during ultrafiltration of milk, **Journal Dairy Technology**. v. 46, n. 1 p. 40-42, 1991.

SUBRAMANIAN, R. *et al.* Membrane process for premium quality expeller-pressed vegetable oils. **Food Research International**. v. 31, n. 8, p. 587 -593, 1998.

SUBRAMANIAN, R. *et al.* Characterization of phospholipid reverse micelles in relation to membrane processing of vegetable oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.103, p. 93-97, 2001a.

SUBRAMANIAN, R. *et al.* Rejection of carotenoids in oil systems by a nonporous polymeric composite membranes. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 78, n. 8, p. 803 -807, 2001b.

SUBRAMANIAN, R. *et al.* Application of dense membrane theory for differential permeation of vegetable oil constituents. **Journal of Food Engineering**. v. 60, p. 249-256, 2003.

SUBRAMANIAN, R.; NAKAJIMA, M. Membrane degumming of crude soybean and rapessed oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 74, n. 8, p. 971 - 975, 1997.

SUBRAMANIAN, R.; NAKAJIMA, M.; KAWAKATSU, T. Processing of vegetable oils using polymeric composite membranes. **Journal of Food Engineering**. v. 38, p. 41-56, 1998.

ZANINI, J.M. Reaproveitamento de águas de lavagem das lavadoras de garrafas das indústrias de bebidas. **Engarrafador Moderno**. v. 36, p. 8-13, 1994.

ZWIJNENBERG, H.J. *et al.* Acetone-stable nanofiltration membranes in deacidifying vegetable oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 76, n. 1, p. 83 -87, 1999.

CAPÍTULO III

REATOR DE MEMBRANA ENZIMÁTICO E FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: ASSOCIAÇÃO DE PROCESSOS

Reator de membrana enzimático e fluidos supercríticos: associação de processos

Resumo

O objetivo deste trabalho é apresentar novas aplicações da tecnologia de membranas na área de lipídios, com ênfase para o desenvolvimento e aplicações de reator de membrana enzimático e sua associação com a tecnologia de extração e purificação por fluidos supercríticos. Reatores de membrana visam à integração da conversão catalítica, separação e/ou concentração de produtos e recuperação de catalisadores em uma única etapa. A associação do processo de extração por fluidos supercríticos (FSC) e separação por membranas permite a integração da reação de extração, favorecida pelo alto poder solvente dos FSC, à separação seletiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (FSC + solutos extraídos). A referida associação permite uma importante economia energética quanto aos custos de recompressão do FSC.

Palavras – chave: reator de membrana, fluidos supercríticos, reator enzimático, bioconversão.

1 Introdução

A tecnologia de membranas tem se desenvolvido bastante nas últimas décadas e suas aplicações têm se expandido em vários setores industriais: químico, petroquímico, mineral e metalúrgico, farmacêutico, alimentício, tratamento de águas residuais, etc. A separação por membranas compete com métodos físicos de separação, como a adsorção seletiva, absorção, extração por solventes, destilação, cristalização e outras técnicas. A diferença entre o processo de separação por membranas e outras técnicas de separação é a provisão da fase

da membrana, que é geralmente definida como uma barreira seletiva entre duas fases e normalmente se refere à membranas sintéticas (MULDER, 1996).

O processo de separação por membranas é, principalmente, um processo regido sob pressão, baseando-se na exclusão dos componentes de acordo com suas massas molares, formas específicas e nas interações entre os componentes e a superfície da membrana (CHERYAN, 1998). Quando esta barreira imperfeita é colocada entre duas fases, a existência de uma força motriz propicia o fluxo de solvente e/ou soluto. Esta força motriz pode estar associada à diferença de concentração, pressão, potencial elétrico e temperatura. Nas operações governadas por diferenciais de pressão tais como filtração clássica (FC), microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF), a separação das partículas e macromoléculas ocorre em função de suas dimensões ou massas molares médias. Já na nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR), pequenas moléculas são separadas também em função de um mecanismo de solução-difusão no material da membrana. Entretanto, em todos os casos, ocorrem sempre interações entre o material da membrana e o soluto (FRIEDLANDER e RICKES 1966).

O desempenho de separação das membranas é afetado pela sua composição, temperatura, pressão, vazão de alimentação e interações entre os componentes da solução e a superfície da membrana (LIN, RHEE, KOSEOGU, 1997). Suas principais características estão relacionadas ao perfil de tamanho dos poros (usualmente o diâmetro dos poros ou equivalente), densidade dos poros (número de poros por unidade de área de superfície da membrana) e porosidade, que é a fração de volume não ocupado pela própria membrana. Outras características importantes são a rejeição da membrana em relação a determinados solutos, fluxos de permeado, resistência a temperaturas elevadas, solventes e pressões utilizadas (CHERYAN, 1998).

As membranas industriais podem ser classificadas em várias categorias com base na pressão a ser utilizada e na massa molar dos solutos a serem separados. A microfiltração utiliza pressões inferiores a 0,2 MPa e separa moléculas entre 0,025-10 μ m; a ultrafiltração utiliza pressões acima de 1,0 MPa e

geralmente separa partículas de peso molecular entre 1 e 300 KDa; a nanofiltração utiliza pressões entre 1 e 4MPa e separa partículas de massa molar entre 350 e 1000Da e a osmose reversa utiliza pressões entre 4 e 10MPa e concentra partículas com massa molar de corte menor que 350Da (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

O interesse na aplicação de membranas em tecnologias de lipídios tem crescido bastante nos últimos anos. As aplicações geralmente melhoram o processo de produção, simplificando-o, reduzindo o consumo de energia e a produção de águas residuais, com a possibilidade de não adição de insumos químicos e de fácil mudança de escala (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

A maioria das pesquisas utilizando membranas em tecnologia de lipídios tem focado a recuperação de solvente da miscela, a degomagem, o branqueamento, a neutralização, a desacidificação, a hidrólise de óleos e gorduras, a síntese enzimática em reator com membrana, a extração e a purificação de matrizes lipídicas através da utilização de reatores de membranas e fluidos supercríticos.

2 Bioconversão enzimática

As propriedades físico-químicas, nutricionais e o valor comercial de óleos e gorduras dependem de sua estrutura triacilglicerídica, relacionada aos ácidos graxos presentes e suas respectivas posições na molécula de glicerol. A modificação destas matérias primas tem sido extensivamente realizada por processos como fracionamento, hidrogenação e interesterificação, visando à melhoria de suas propriedades funcionais. Entretanto, a crescente disponibilidade comercial de enzimas relacionadas à tecnologia de lipídios tem promovido alternativas interessantes aos processos de modificação usualmente empregados pela indústria de óleos vegetais (PUGAZHENTHI e KUMAR, 2004).

As enzimas apresentam diversas vantagens quando utilizadas em processos industriais. As reações enzimáticas podem ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, exigindo menor consumo energético e minimizando a degradação térmica dos produtos finais. Em função da seletividade enzimática é possível a obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação, alcoólise, acidólise e transesterificação (GUNSTONE, 1999).

Os processos de bioconversão enzimática têm sido bastante utilizados na produção, transformação e valorização de matérias-primas. Importantes aplicações têm sido realizadas nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e no desenvolvimento de propostas ambientais. A maioria das reações enzimáticas é realizada em reatores por bateladas, apresentando alguns inconvenientes como altos custos operacionais, baixa produtividade, alta variação na qualidade dos produtos obtidos e problemas de remoção da enzima (RIOS *et al.*, 2004).

Portanto, visando à obtenção de reações com maior uniformidade tecnológica e viabilidade econômica, a utilização de enzimas na forma imobilizada permite considerável aumento na estabilidade e maior diversidade de aplicação, de fundamental importância para o desenvolvimento de processos associados à bioconversão (HILAL, NIGMATULLIN, ALPATOVA, 2004). Segundo Swaisgood (1991), as vantagens da utilização de enzima imobilizada são: maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso da extensão das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e re-emprego das enzimas.

3 Reator de membrana

O conceito básico de reator de membrana é baseado na separação da enzima e produtos (ou substratos) por uma membrana seletiva que cria uma barreira seletiva entre as fases. Solutos permeáveis podem ser separados da mistura de reação por uma força propulsora (potencial químico, pressão, campo elétrico, etc.) que atue através da membrana. A separação dos reagentes dos produtos, bem como a recuperação e reuso de catalisadores da mistura reacional, constitui-se numa etapa de grande importância econômica do processo. Reatores de membranas visam integrar a conversão catalítica, separação de produtos e/ou concentração e recuperação de catalisador em uma única etapa. As membranas também podem ser utilizadas em reator exclusivamente como matriz para imobilização da enzima, sem nenhuma intenção de separação (PRAZERES e CABRAL, 1994).

As membranas de ultrafiltração, devido sua ampla faixa de distribuição de poros (entre 1-100nm ou massa molar de corte – PMC 500-100.000 Da), são mais adequadas para retenção da maioria das enzimas (10.000-100.000), nativas ou modificadas. A massa molar de corte de uma membrana é dada pela massa molar da menor molécula retida em pelo menos 90% pela membrana (PRAZERES e CABRAL, 1994; PORTER, 1990).

A seleção da membrana a ser utilizada em reatores de membranas enzimáticos deve levar em consideração o tamanho da enzima, substratos e produtos, bem como a natureza química das substâncias e do material da membrana. Um importante parâmetro a ser utilizado nesta seleção é o coeficiente de rejeição de solutos, que deve ser zero para facilitar a permeação, e deve ser 100% para a enzima, permitindo completa retenção do catalisador no sistema reacional (PRAZERES e CABRAL, 1994).

Em função do tipo de contato entre enzimas e substratos, os reatores de membranas podem ser classificados em:

- reator de membrana com contato direto – ocorre o contato direto entre enzimas e substratos (i.e., substratos são introduzidos no lado da membrana que contém a enzima). Neste tipo de reator as enzimas (imobilizadas ou em sua forma livre) podem atuar no substrato tão logo entre no sistema;
- reator de membrana por difusão – promove o contato entre enzima e substrato após passagem difusiva dos substratos através da membrana para o compartimento adjacente onde a enzima está localizada, solúvel ou imobilizada. Após a catálise os produtos difundem-se no sentido do fluxo de substratos que ainda não reagiram;
- reator de membrana multifásico – neste tipo de reator a membrana não apenas separa duas fases de líquidos mas também promove um contato interfacial, juntamente com a enzima, atuando como um catalisador interfacial (PRAZERES e CABRAL, 1994).

Um novo reator, combinando enzima, membrana e CO₂SC, foi utilizado por Pomier *et al.* (2005) na modificação de óleo de mamona. Basicamente, o novo reator baseia-se em dois conceitos originais: fluidificação da mistura viscosa (óleo de mamona e oleato de metila) pelo CO₂SC, facilitando a filtração tangencial e reação enzimática em meio CO₂SC/óleo, catalisada por lipase imobilizada em suporte cerâmico (Magnan *et al.*, 2004). Através da análise de retentados e permeados, quanto à presença de ricinoleato de metila, verificou-se que a reação enzimática aconteceu predominantemente nos poros da membrana, onde o contato entre enzimas e substratos é favorecido em relação à superfície interna da membrana. Durante 25h, a atividade de conversão da enzima imobilizada foi de aproximadamente 30% no permeado e 16% no retentado.

Xu *et al.* (2000a) investigaram a utilização de reator de membrana na síntese enzimática de lipídios estruturados buscando obter a integração da reação de interesterificação e de separação dos lipídios estruturados específicos, visto que os processos acontecem simultaneamente, permitindo assim uma forma de

otimização. Especificamente, a integração de reações catalisadas enzimaticamente com a tecnologia de separação por membranas constitui uma melhoria em potencial em alguns processos. A separação simultânea de componentes de substratos indesejáveis pode alterar a concentração durante o processo de reação, conduzindo a reação para um melhor nível de equilíbrio. Os autores avaliaram vinte e seis membranas planas de distintos materiais poliméricos. As membranas foram selecionadas em termos de suas habilidades de separar os ácidos graxos de cadeia média (AGCM), liberados dos TG de cadeia média (TGCM) sob processo de acidólise com concentrado de ácidos graxos poliinsaturados de óleo de peixe, e menor taxa de permeação de óleo de canola, que atuou como óleo extrator. Foram também avaliados a estabilidade das membranas e o efeito do comprimento da cadeia dos ácidos graxos nos fluxos de efluentes. As reações foram realizadas em reator de membrana baseado no processo de difusão. Utilizou-se a enzima Lipozyme IM *sn*-1,3 específica como biocatalisador. A incorporação de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA) foi aumentada em 15%, em 90h de reação, através da separação simultânea dos AGCM liberados pela reação.

Xu *et al.* (2000b) investigaram a obtenção enzimática de lipídios estruturados específicos através da utilização de reator de membrana de ultrafiltração. A reação de interesterificação enzimática ocorreu entre TCM e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa de óleo de peixe, com razão molar de 1:4, respectivamente. Utilizou-se como catalisador a enzima Lipozyme TL IM, *sn*-1,3 específica (5%p/p), com umidade de 3%. Os experimentos foram realizados em célula de ultrafiltração, sob atmosfera de nitrogênio, temperatura de 50°C e agitação de 200-400 rpm. Após 5 horas de reação, aplicou-se pressão transmembrana de 1 bar. A incorporação de ácidos graxos poliinsaturados nos TCM aumentou cerca de 15%, após 80h de experimento, através da separação simultânea dos AGCM liberados pela reação.

3.1 Imobilização enzimática

Diversos sistemas têm sido propostos para imobilização enzimática: adsorção ou ligação covalente de moléculas catalisadoras em suporte sólido, reticulação ou inclusão em cápsula, matriz ou fibra. A escolha da técnica a ser utilizada tem sido determinada principalmente pelo tempo, em detrimento do tipo e escala da aplicação considerada. Reduções na atividade enzimática de 10 a 90% têm sido reportadas na literatura. Várias razões podem estar envolvidas na explicação destes fenômenos, incluindo o impedimento estérico (o sítio ativo da enzima pode ter sido alterado pelo processo de imobilização) ou o fenômeno de limitação interfacial (a difusão dos substratos ou produtos nas imediações da superfície onde as moléculas catalisadoras são imobilizadas pode ser muito lenta) (RIOS *et al.*, 2004).

Rucka e Turkiewicz (1990) avaliaram técnicas de impregnação enzimática (*Rhizopus* sp.) por oclusão da enzima na matriz polimérica e adsorção em membranas de ultrafiltração. A imobilização na membrana, durante seu processo de elaboração, mostrou-se como uma alternativa simples e atrativa em relação à imobilização por adsorção. A oclusão física da enzima pela matriz polimérica é mais forte que a adsorção, onde interações hidrofóbicas não são fortes o suficiente para a manutenção da lipase ligada a membrana. O principal benefício associado à imobilização da enzima por oclusão durante o processo de inversão de fases é a obtenção de uma membrana com bom tempo de estabilidade.

Bouwer, Cuperus e Derksen (1997) avaliaram o desempenho de reatores de membrana com lipase *Rhizopus javanicus* imobilizada. A enzima foi imobilizada através da filtração de solução enzimática. Para aplicação em reatores, lipases têm sido imobilizadas em membranas microporosas hidrofóbicas e hidrofílicas. As membranas têm aproximadamente a mesma produtividade, mas a atividade enzimática é muito menor com membranas hidrofóbicas. O fator limitante mais importante é a baixa utilização da enzima devido à zona de contato entre as fases

aquosa e orgânica nas membranas hidrofóbicas ser muito fina, permitindo a atuação da lipase somente nessa zona de contato. Para aplicações economicamente viáveis, membranas hidrofílicas são preferidas desde que menor quantidade de enzima seja requerida. Foram testadas membranas tipo fibra oca (com 40 canais de 1,8 mm diâmetro interno, espessura da parede 0,065 mm, área porosa interna 680 m²) e membranas planas (espessura de 120 µm, área de superfície 0,029 m² e área porosa interna de 53 m²). As reações estudadas foram a hidrólise de TG e a peroxidação de ácidos graxos. No caso da hidrólise, as atividades das membranas foram da mesma magnitude ($\sim 20 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) independentemente do tipo de membrana ou de sua espessura. O modelo de reação-difusão foi desenvolvido para que se conseguissem duas zonas na membrana, uma camada de difusão e uma camada de reação. Com este modelo, a espessura da camada de reação e o grau de utilização da enzima podem ser estimados.

Balcão e Malcata (1998) reportaram mudanças ocorridas na composição em ácidos graxos da manteiga submetida à interesterificação e acidólise com ácido oléico, catalisada pela lipase comercial de *Mucor javanicus*, imobilizada por adsorção física em membrana fibra oca hidrofóbica, a 40° C e sob atividade de água controlada. O principal objetivo dessa pesquisa foi aumentar o nível de ácidos graxos insaturados da manteiga e reduzir, concomitantemente, o nível de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (láurico e mirístico). Com a hidrólise observou-se na manteiga modificada um aumento de 30% p/p de ácido oléico e redução de 8 e 2% para os ácidos graxos láurico e mirístico, tendo em vista a composição original da manteiga. A imobilização da enzima na membrana foi por adsorção, seguindo procedimentos descritos por Balcão, Vieira e Malcata (1996) e Balcão e Malcata (1997). O conteúdo de pó da lipase bruta (M10TM) foi aproximadamente 10% (peso/peso). A quantidade de proteína adsorvida pela membrana de fibra oca foi de 6,36 µg proteína/cm² de membrana, e correspondeu a um rendimento de imobilização de aproximadamente 54% de proteína da solução sobrenadante.

Lozano *et al.* (2002) otimizaram método de preparo de membranas dinâmicas através da filtração de solução de polímeros solúveis em água (gelatina e/ou polietilenoimina – PEI) em suporte cerâmico α -alumina, seguido da imobilização da enzima *Candida antártica* B (CALB) através de ligação covalente. A enzima liga-se covalentemente à camada de gelatina e/ou PEI previamente adsorvida utilizando-se glutaraldeído como agente ligante. O processo de imobilização da CALB em membranas dinâmicas foi otimizado em função dos diferentes parâmetros envolvidos em cada etapa (formação da camada dinâmica, ativação com glutaraldeído e ligação enzimática) tendo como critérios de avaliação a atividade hidrolítica do p-nitrofenil palmitato e a estabilidade operacional. A membrana preparada com deposição de gelatina/PEI foi utilizada na obtenção de butirato de butila a partir de butirato de vinila e 1-butanol com três solventes orgânicos (hexano, acetona e acetonitrila) e em meio com baixo teor de umidade (<3% v/v). A “membrana enzimática” apresentou maior estabilidade operacional em meio anidro, possivelmente atribuídas à não solubilização da camada de gel (gelatina/PEI e de moléculas de enzimas).

Magnan *et al.* (2004), através de adaptação do protocolo de imobilização descrito por Lozano *et al.* (2002), avaliaram a estabilidade e atividade de membrana cerâmica imobilizada com *Candida antartica* quanto à reação de hidrólise de acetato butílico em água e síntese de laurato butílico a partir de acetato butílico e ácido láurico em solventes orgânicos. Verificou-se boa reprodutibilidade na elaboração das membranas, através do controle de determinações hidrolíticas, e boa estabilidade da membrana enzimática à estocagem a temperatura ambiente, sob vácuo com P_2O_5 . A estabilidade enzimática da membrana foi avaliada após quatro reutilizações, onde a membrana, depois de utilizada, foi lavada, seca e acondicionada até próxima utilização. Após redução de 35% na atividade hidrolítica entre a primeira e segunda utilização, a atividade permaneceu constante. Como a estocagem não ocasionou perda na atividade enzimática, a redução observada está provavelmente associada às etapas de secagem e hidratação das membranas. Segundo os autores, o processo de secagem induz a remoção da água da

estrutura da camada de gel polimérica, sendo responsável pela aproximação das cadeias protéicas. Estas interações podem ocasionar modificações irreversíveis na conformação da estrutura enzimática, podendo favorecer sua inativação. Contudo, como parte das enzimas esta ligada covalentemente por mais de uma ligação, suas estruturas são fixas e modificações na sua conformação, envolvendo sua inativação, não podem mais ocorrer durante a secagem, o que torna negligível a perda de atividade após dois ciclos de estocagem.

4 Fluidos supercríticos

Fluidos supercríticos são substâncias que se encontram sob condições críticas de pressão e temperatura, ou seja, acima de sua pressão e temperatura críticas (BRUNNER, 2005). No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gás, apresentando densidade próxima à dos líquidos, viscosidade próxima à dos gases, difusividade duas vezes maior que a típica dos líquidos, alta compressibilidade e baixa tensão superficial (BRUNNER, 2005; LIM *et al.*, 2002).

Fluidos supercríticos (FSC) têm recebido bastante atenção no que se refere aos processos de extração, apresentando diversas vantagens em relação ao processo de extração com solventes orgânicos. Entre estas vantagens temos: a baixa viscosidade e alta difusividade dos FSC, melhorando a transferência de massa em matrizes sólidas e líquidas com redução do tempo total de extração; possibilidade de utilização sob temperaturas brandas, conferindo maior proteção oxidativa aos compostos termo-sensíveis; possibilidade de modificação de suas propriedades de solvatação através do ajuste da pressão e temperatura, permitindo a obtenção de extrações seletivas; fácil remoção do produto extraído através de sua descompressão; são considerados seguros para o meio ambiente e não geram resíduos químicos (ANDERSSON, DEMIRBUKER, BLOMBERG, 1997).

Em particular, o dióxido de carbono (CO_2) é o FSC mais utilizado como solvente em aplicações alimentícias. O CO_2 apresenta baixo custo, disponibilidade em alto grau de pureza, facilidade e segurança em sua manipulação, é atóxico, não inflamável, apresentando interessantes propriedades físico-químicas, como, baixo ponto crítico de temperatura e pressão, $31,1^\circ\text{C}$ e 72bar, respectivamente (BRUNNER, 2005; CASTRO, VALCÁRCEL, TENA, 1994).

A aplicação da tecnologia de fluidos supercríticos (FSC) no processamento de óleos e gorduras é uma alternativa aos processos de extração e purificação de matrizes lipídicas envolvendo solventes orgânicos. A extração e purificação de compostos lipídicos, como triacilgliceróis, ácidos graxos livres, tocoferóis, carotenóides, esteróis, através do CO_2SC tem sido investigada por diversos autores, bem como a influência dos parâmetros operacionais utilizados, temperatura e pressão de CO_2 , sobre a seletividade da extração (BRUNETTI *et al.*, 1989; ANDERSSON, DEMIRBUKER, BLOMBERG, 1997; MENDES *et al.*, 2005; MENDES, REIS, PALAVRA, 2005; GAST *et al.*, 2005; CAO e ITO, 2003; LIM *et al.*, 2002).

5 Associação de extração por FSC e tecnologia de membranas

A associação do processo de extração por FSC e separação por membranas permite a integração da reação de extração pelo CO_2SC (favorecida pelo seu alto poder solvente) e separação seletiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (CO_2SC + solutos extraídos). A combinação do sistema CO_2SC /membrana confere melhoria no potencial de separação da membrana e seletividade para a extração, possibilitando a extração de frações com estreita faixa de massa molar (SARRADE, RIOS, CARLÈS, 1998).

A separação de solutos no processo de extração por FSC realiza-se através de despressurização e/ou resfriamento, onde o fluido passa à forma gasosa,

seguido da coleta dos solutos extraídos. Os custos de recompressão do CO₂ gasoso para fase líquida ou supercrítica são altos e a associação do processo de extração por FSC e separação por membranas permite a não expansão do fluxo do retentado a cada ciclo, permitindo uma importante economia energética quanto aos custos de recompressão (SPRICIGO *et al.*, 2001; SARRADE, RIOS, CARLÈS, 1998).

Sarrade, Rios e Carlès (1998) utilizaram a associação da extração de CO₂SC e separação através de membranas de nanofiltração no fracionamento de triacilgliceróis de óleo de peixe e na purificação de β -caroteno. Foram testadas duas membranas tubulares: TN – baseada no conceito orgânico-inorgânico e T – baseada no conceito inorgânico. A referida associação permitiu o fracionamento de triacilgliceróis de óleo de peixe, determinado através da verificação do aumento de triacilgliceróis de cadeia média no permeado e predominância de triacilgliceróis de cadeia longa no retentado. A membrana TN apresentou maior seletividade quanto ao fracionamento de triacilgliceróis do que a membrana T. Foram utilizadas condições operacionais de 31MPa, 313K, pressão transmembrana de 3MPa. Para a purificação de carotenóides, provenientes do óleo de cenoura, obteve-se um aumento de 30% de caroteno no retentado através da utilização da membrana TN. A membrana T não foi efetiva na retenção de carotenos.

Spricigo *et al.* (2001) testaram uma membrana de osmose reversa de acetato de celulose quanto à separação de óleo essencial de noz-moscada na presença de CO₂SC. A membrana apresentou uma retenção média de óleo essencial de 96,4%, não tendo sido influenciada de forma significativa pela temperatura, pressão transmembrana e concentração de óleo na alimentação. Para pressão de CO₂ de 12MPa, maiores fluxos de permeado foram obtidos com pressão transmembrana de 4MPa, sem perdas na retenção do óleo essencial. O fluxo de CO₂ foi linearmente proporcional à pressão transmembrana aplicada, sendo reduzido com o aumento da concentração de óleo na alimentação. A membrana apresentou boa permeabilidade ao CO₂ e boa resistência às severas condições de pressão utilizadas.

Sarmento *et al.* (2004) avaliaram três membranas de osmose reversa (SG, CG e AG – Osmonics) quanto à permeabilidade ao CO₂SC e retenção de limoneno e óleos essenciais de noz-moscada e laranja a 12MPa e 40°C. A retenção de óleos e a permeabilidade ao CO₂SC foram avaliadas em função da concentração na alimentação e pressão transmembrana. O fluxo de CO₂ foi linearmente dependente da pressão transmembrana aplicada. A retenção de óleos essenciais foi reduzida com o aumento da pressão transmembrana, não sendo afetada pelas diferentes concentrações de óleo na alimentação. A membrana SG apresentou maior retenção de óleos essenciais, atingindo valores de aproximadamente 90%. No entanto, concomitantemente, esta membrana apresentou menor fluxo de CO₂, com valores de até 8,75 kg/h.m², quando submetida à diferença de pressões de 1MPa. Os resultados experimentais indicaram a ocorrência de colmatagem da membrana após a permeação de óleo essencial. Todas as membranas testadas apresentaram boa permeabilidade ao CO₂ e boa resistência às severas condições de pressão utilizadas.

Carlson, Bolzan e Machado (2005) avaliaram três membranas de osmose reversa (SG, AK e CE – Osmonics) e uma de nanofiltração (HL – Osmonics) quanto à retenção de D-limoneno sob extração por CO₂SC. Experimentos foram conduzidos sob pressão de 12MPa, pressão transmembrana de 0,5MPa e temperatura de 40°C. A membrana SG apresentou maior fator de retenção de D-limoneno (0,94) para concentração de limoneno na alimentação de 30%; apresentando, no entanto, baixos fluxos de CO₂. Os resultados obtidos com a membrana SG mostraram que a associação de membranas e extração com CO₂SC representa aplicação potencial para a redução de custos energéticos na reciclagem do solvente. Com esta membrana, quase 70% do solvente (permeado de CO₂) pôde ser reciclado com apenas 0,5MPa de pressurização (de 11,5 a 12,0MPa) enquanto que para os 30% restantes (retentado CO₂) houve necessidade de pressurização de de 5 a 12MPa, para a ocorrência de mudança de fase, com maior necessidade de energia para se atingir a pressão de extração. A membrana CE apresentou fluxo de CO₂ praticamente nulo, inviabilizando testes com a matriz lipídica. O fator de retenção da membrana AK foi reduzido à zero

após 80 minutos de filtração. A membrana HL apresentou fator de retenção estável (0,3) após 75 minutos.

6 Conclusão

A utilização de reatores de membrana enzimáticos constitui-se numa tecnologia promissora para os processos de bioconversão devido à possibilidade de ocorrência simultânea da reação enzimática, separação entre enzima e produtos/substratos e separação e/ou purificação de produtos, em função da disposição da enzima no reator de membrana, em sua forma livre ou imobilizada. Reações enzimáticas conduzidas em meio de CO_2SC são favorecidas pelo alto poder solvente do CO_2 , podendo favorecer a atividade catalítica. O processo caracteriza-se por operar com baixas pressões e temperaturas críticas; ausência de toxicidade; baixo custo e facilidade de remoção do produto final quando comparado com os demais solventes orgânicos. A associação do processo de extração por FSC e separação por membranas constitui-se numa ferramenta de grande impacto econômico e ambiental, podendo ser considerada como uma tecnologia limpa e segura quando comparada aos processos que envolvem extração e purificação com solventes orgânicos.

7 Bibliografia

ANDERSSON, M. B. O; DEMIRBUKER, M.; BLOMBERG, G. Semi-continuous extraction/purification of lipids by means of supercritical fluids. **Journal of Chromatography A**. v. 785, p. 337-343, 1997.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. **Journal of Molecular Catalisys B: Enzymatic**. v. 3, p. 161-1699, 1997.

BALCÃO, V. M.; VIEIRA, M. C; MALCATA, F. X. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. **Biotechnology Progress**. v. 12, p. 164-172, 1996.

- BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes pool of fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 511-519, 1998.
- BOUWER, S. T.; CUPERUS, F. P.; DERKSEN, J. T. P. The performance of enzyme-membrane reactors with immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21, p. 291-296, 1997.
- BRUNETTI, L. *et al.* Deacidification of Olive Oils by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 66, n. 2, p. 209-216, 1989.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. **Journal of Food Engineering**. v.6 7, p. 21-23, 2005.
- CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-sped counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1021, p. 117-124, 2003.
- CARLSON, L. H. C.; BOLZAN, A.; MACHADO, R. A. F. Separation of D- limonene from supercritical CO₂ by means of membranes. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 143-147, 2005.
- CASTRO, M.D.L.; VALCÁRCEL, M.; TENA, M.T. **Analytical Supercritical Fluid Extraction**. Springer-Verlag, Berlin, 1994, 321p.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publ. Co., Illinois, 1998. 526p.
- FRIEDLANDER, H. Z.; RICKES, R. N. Membrane Separation Processes. **Chemical Engineering**. v. 73, p. 111-6, 1966.
- GAST, K. *et al.* Purification of tocochromanols from edible oil. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 17-25, 2005.
- GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 1535-1549, 1999.
- HILAL, N.; NIGMATULLIN, R.; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**. v. 238, p. 131-141, 2004.
- LIM, G. *et al.* Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**. v. 11, p.181-187, 2002.

LIN, L.; RHEE, K.C.; KOSEOGLU, S.S. Bench-scale membrane degumming of crude vegetable oil: process optimization. **Journal of Membrane Science**. v. 134, p.101-108, 1997.

LOZANO, P. *et al.* Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. **Journal of Membrane Science**. v. 201, p. 55-64, 2002.

MAGNAN, E. *et al.* Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. **Journal of Membrane Science**. v. 241, p.161-166, 2004.

MENDES, M. F. *et al.* Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids. **The Journal of the Supercritical Fluids**. v. 34, p.157-162, 2005.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) máxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**. In press, 2005.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**, 2^a ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996.

POMIER, E. *et al.* A new reactor design combining enzyme, membrane and SCCO₂: application to castor oil modification. **Journal of Membrane Science**. v. 249, p. 127-132, 2005.

PORTER, M. C. Microfiltration. In: **Handbook of Industrial Membrane technology**. Ed. PORTER, M. C. Noyes Publications, Westwood, New Jersey, USA, 1990.

PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 738-750, 1994.

PUGAZHENTHI, G.; KUMAR, ANIL. Enzyme membrane reactor for hydrolysis of olive oil using lipase immobilized on modified PMMA composite membrane. **Journal of Membrane Science**. v.228, p. 187-197, 2004.

RIOS, G. M. *et al.* Progress in enzymatic membrane reactors – a review. **Journal of Membrane Science**. v. 242, p.189-196, 2004.

RUCKA, M.; TURKIEWICZ, B. Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, p. 52-55, 1990.

SARMENTO, L. A. *et al.* Performance of reverse osmosis membranes in the separation of supercritical CO₂ and essential oils. **Journal of Membrane Science**. v. 237, p. 71-76, 2004.

SARRADE, S.J.; RIOS, G.M.; CARLÈS, M. Supercritical CO₂ extraction coupled with nanofiltration separation - Applications to natural products. **Separation and Purification Technology**. v. 14, p. 19-25, 1998.

SNAPE, J.B.; NAKAJIMA, M. Processing of agricultural fats and oils using membrane technology. **Journal of Food Engineering**. v. 30, p. 1-41, 1996.

SPRICIGO, C. B. *et al.* Separation of nutmeg essential oil and dense CO₂ with a cellulose acetate reverse osmosis membrane. **Journal of Membrane Science**. v. 188, p. 173-179, 2001.

SWAISGOOD, H.E. Immobilized Enzymes: Applications to bioprocessing of food. In: **Food Enzymology**. v.2. Ed. Fox, P.F. Elsevier Applied Science, Essex, p.309-343, 1991.

XU, X. *et al.* Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology Letters**. v. 22, p. 1667-1671, 2000b.

XU, X. *et al.* Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 77, n.10, p.1035-1041, 2000a.

CAPÍTULO IV

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE COM ELEVADOR TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS ω -3

Artigo a ser publicado no periódico Química Nova (2006).

Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω -3

Resumo

The production of ethyl esters by alcoholysis process is an alternative for splitting process of triacylglycerols due to the possibility of utilization of low temperatures, which results in oxidative protection for the polyunsaturated fatty acids. Ethyl esters produced under mild conditions of temperature, could be used as substrate for the obtention of structured lipids. The reaction parameters of production of ethyl esters from fish oil enriched with ω -3 fatty acids by alcoholysis reaction were optimized using response surface methodology. An experimental design (2^3), (with levels +1 and -1, six axial points with levels $-\alpha$ and $+\alpha$ and three central points), was applied. The variables for investigation were concentration of catalyst, amount of ethylic alcohol and temperature. Ethyl esters conversion was monitored by High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) technique and the best result obtained was 95% of conversion rate. The optimal conditions were 40°C, 1% of NaOH and 36% of ethanol.

Keywords: ethyl esters, alcoholysis, high performance size exclusion chromatography

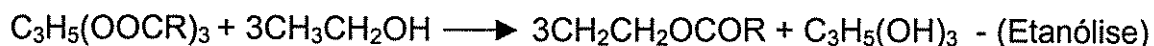
1 Introdução

Os óleos provenientes de peixes marinhos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ω -3 que são oriundos do ácido graxo linolênico, advindo das plantas utilizadas na alimentação dos peixes. Sua

composição específica em ácidos graxos ω -3 justifica sua grande utilização em nutrição humana. Os principais ácidos graxos desta classe são o eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), podendo representar cerca de 26% dos ácidos graxos presentes em óleos de peixe. A utilização de ácidos graxos da série ω -3 apresenta grande influência no metabolismo dos triacilgliceróis, nos níveis de LDL colesterol, além da interferência na agregação plaquetária reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (GRUNDY, 1994; STANSBY, 1990).

Os óleos e gorduras têm a sua aplicação industrial limitada pela sua distribuição e composição em ácidos graxos, sendo necessário submetê-los a processos de modificação, tais como, hidrogenação, interesterificação e fracionamento, para que suas características físico-químicas sejam alteradas (ROUSSEU e MARANGONI, 1998; WILLIS e MARANGONI, 1998).

O processo de interesterificação pode ser dividido em quatro classes de reações: alcoólise, acidólise, glicerólise e transesterificação. A alcoólise, reação entre uma gordura e um álcool, oferece meios de preparação de ésteres como alternativa ao processo de hidrólise e reesterificação. Os ésteres são obtidos através do deslocamento do glicerol pelo álcool, que pode ser metílico ou etílico, na presença de catalisadores, produzindo metil ou etil ésteres (SONNTAG, 1982):



O processo convencional de obtenção de ácidos graxos utiliza temperaturas elevadas, na faixa de 150 – 280°C, sendo que a temperatura escolhida determina maior ou menor tempo de reação, podendo levar à oxidação de óleos poliinsaturados (SONNTAG, 1982), como o óleo de peixe.

Os ésteres etílicos têm surgido como um substrato alternativo para a obtenção de lipídios estruturados específicos devido à possibilidade de utilização de baixas temperaturas no processo, o que permite proteger os ácidos graxos poliinsaturados da oxidação.

O objetivo do presente trabalho foi otimizar as condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe, enriquecido com ácidos graxos ω -3, através do processo de alcoólise em escala piloto, visando sua utilização como substrato para a reação de produção de lipídios estruturados específicos.

2 Material e Métodos

2.1 Óleo de peixe

Para a produção dos ésteres etílicos foi utilizado como matéria-prima óleo de peixe enriquecido em ácidos graxos ω -3 (ROPUFA - Roche), gentilmente cedido pela empresa Parmalat.

2.2 Caracterização da matéria-prima

-Teor de ácidos graxos livres - método AOCS Ca 5a-40 (2002), Composição em ácidos graxos - método AOCS Ce 1-62, – Condições da análise: Cromatógrafo CGC Agilent 6850 GC System. Coluna DB – 23 – Agilent (50% Cianopropil – metilpolisiloxano), 60m x 0,25mm x 0,20 μ m. Forno: 195°C – 20 min; 195 – 215°C a 5°C/min; 215°C – 16 min. Gás de arraste: He; fluxo da coluna – 1,0 mL/min; injetor – 250°C; detector – 280°C; split – 1:50. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras e do padrão cromatográfico NU-CHEK GLC-87;- Metilação - método AOCS Ce 2 –66 (2002);- Índice de Peróxido – método AOCS Cd 8b-90 (2002);- Índice de Anisidina – método AOCS Cd 18 – 90 (2002).

2.3 Reação de alcoólise

A reação de alcoólise foi realizada em reator de 3L, encamisado e provido de agitação mecânica. Para os testes preliminares foram utilizados 2kg de óleo de peixe, soluções de NaOH em álcool etílico anidro com concentrações de 1,0, 1,13 e 1,20% e 40 partes de álcool etílico anidro. A reação ocorreu sob agitação de 600rpm, durante 5 minutos, a temperatura de 60°C. Para os ensaios experimentais utilizou-se um sistema em batelada com lotes de 0,6Kg de óleo de peixe, que foi aquecido a diferentes temperaturas. Para cada experimento foi adicionada solução de NaOH em álcool etílico anidro, de acordo com concentrações descritas no planejamento experimental. A reação ocorreu sob agitação mecânica de aproximadamente 600rpm, durante 5 minutos. Após o término da reação, adicionou-se glicerol em quantidade suficiente para acelerar a separação do glicerol produzido durante a reação e, após a decantação do mesmo, foi realizada sua remoção, sendo os ésteres submetidos a diversas lavagens com água pré-aquecida até que os mesmos estivessem límpidos e neutros. No mesmo reator foi realizada a secagem a vácuo dos ésteres a 60°C.

2.4 Planejamento experimental

Para a obtenção das melhores condições operacionais para a produção de ésteres etílicos de óleo de peixe foi aplicado um modelo fatorial completo (2^3), com os níveis de +1 e -1, seis pontos axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$), três pontos centrais (nível zero), em que as variáveis estudadas foram concentração do catalisador, quantidade de álcool etílico e temperatura. O planejamento constou de 18 experimentos, sendo três no ponto central e seis nos pontos axiais. Os valores das variáveis foram selecionados em função de testes preliminares (Tabela 1). O tempo de reação e a velocidade de agitação foram de 5 minutos e 600rpm, respectivamente. Os resultados foram avaliados através da aplicação de MSR – Metodologia de

Superfície de Resposta e Análise de Regressão Múltipla (BARROS NETO, SCARMINO, BRUNS, 1996).

Tabela 1. Níveis e variáveis avaliados no planejamento experimental.

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	39	45	52,5	60	65,20
NaOH(%)	0,93	1	1,1	1,2	1,27
Etanol Anidro (v/m)	26,53	30	35	40	43,47

A resposta ao delineamento foi dada em função da avaliação quantitativa do rendimento em ésteres, determinado através da técnica de cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho.

2.5 Controle da reação

A reação de obtenção dos ésteres foi avaliada através da técnica de Cromatografia de Alta Performance por Exclusão de Tamanho (HPSEC) nas seguintes condições: duas colunas conectadas em série, Hewlett Packard – DVB (Polidivinilbenzeno), com diâmetros de poros de 100 e 500Å; detector de índice de refração (Differential Refractometer LCD 201 - SICON - ANALYTIC); bomba isocrática (Perkin-Elmer, série 10 - Liquid Chromatograph), injetor de 20 μ L e fluxo de fase móvel (Tetrahidrofurano) de 1mL/min (RUIZ-MÉNDEZ, MÁRQUES-RUIZ e DOBARGANES; 1997).

O mecanismo de separação dos ésteres, através da técnica HPSEC, ocorre através da diferença de massa molar entre os compostos presentes no meio reacional, sendo que, neste caso, a ordem de eluição é triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ésteres e ácidos graxos livres.

3 Resultados e Discussão

A eficiência da reação de conversão de triacilgliceróis em ésteres depende diretamente das condições de processo utilizadas, bem como das características físico-químicas da matéria-prima. Dentre as variáveis que afetam a reação de alcoólise temos o teor de ácidos graxos livres, umidade, tipo de catalisador e concentração utilizada, razão molar de álcool/óleo e tipo de álcool utilizado, tempo de reação, temperatura, agitação e pureza dos reagentes (MEHER, SAGAR, NAIK; 2005).

3.1 Caracterização da matéria-prima

A composição em ácidos graxos do óleo de peixe utilizado como matéria-prima para a produção de ésteres é apresentada na Tabela 2.

As características físico-químicas do óleo utilizado na reação de alcoólise, tais como, teor de ácidos graxos livres e umidade, apresentam grande influência na eficiência da reação, pois pode haver reação com o catalisador e diminuição na eficiência da conversão de triacilgliceróis em ésteres. Quanto maior a acidez do óleo, menor a eficiência da conversão. Para a obtenção de maior eficiência na conversão, o óleo utilizado deve apresentar teores de ácidos graxos livres, índice de peróxido e umidade máximos de 0,1%, 10 meq O₂/kg e 0,1%, respectivamente (ERICKSON, 1995).

A partir dos resultados dos testes preliminares foi elaborado um planejamento experimental onde as variáveis independentes (temperatura, concentração de NaOH e etanol) foram avaliadas dentro de uma faixa específica (Tabela 1). De acordo com este planejamento, o número total de combinações de tratamento foi $2k + 2k + n$, onde k é o número de variáveis independentes e n é o número de repetições dos experimentos no ponto central.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos do óleo de peixe

Ácidos Graxos		%
C12:0	Láurico	0,31
C14:0	Mirístico	7,06
C15:0	Pentadecanóico	0,59
C16:0	Palmítico	17,98
C16:1	Palmitoléico	7,55
C17:0	Margárico	0,90
C17:1	Margaroléico	1,04
C18:0	Estearico	5,25
C18:1	Oléico	13,53
C18:2	Linoléico	2,37
C18:3	Linolênico	1,13
C18:4	Estearidônico	3,37
C20:0	Araquídico	0,46
C20:1	Gadoléico	1,31
C20:3	Eicosatrienóico	0,87
C20:4	Araquidônico	0,77
C20:5	Eicosapentaenóico (EPA)	14,80
C22:0	Behênico	0,63
C22:5	Docosapentaenóico (DPA)	1,92
C22:6	Docosahexaenóico (DHA)	18,15
Total (EPA + DPA + DHA)		34,87
Total n-3 PUFA		36,30

3.2 Otimização dos parâmetros reacionais

A Tabela 3 apresenta o planejamento experimental para a otimização das variáveis avaliadas (X1-temperatura, X2-concentração de NaOH, X3-etanol

anidro) para a produção de ésteres etílicos e os resultados de conversão em ésteres.

Tabela 3. Planejamento experimental para otimização das variáveis avaliadas para a produção de ésteres etílicos de óleo de peixe

Experimentos	X1	X2	X3	Rendimento em ésteres
	(Temperatura °C)	(NaOH %)	(Etanol v/p)	(%)
1	1(60)	1(1,2)	1(40)	95,08
2	-1(45)	1(1,2)	1(40)	93,95
3	1(60)	-1(1)	1(40)	92,64
4	-1(45)	-1(1)	1(40)	93,89
5	1(60)	1(1,2)	-1(30)	86,71
6	-1(45)	1(1,2)	-1(30)	90,01
7	1(60)	-1(1)	-1(30)	89,36
8	-1(45)	-1(1)	-1(30)	85,83
9	0(52,5)	0(1,1)	0(35)	92,83
10	0(52,5)	0(1,1)	0(35)	91,42
11	0(52,5)	0(1,1)	0(35)	92,01
12	1,68(65,20)	0(1,1)	0(35)	89,97
13	-1,68(39,8)	0(1,1)	0(35)	89,81
14	0(52,5)	1,68(1,27)	0(35)	92,18
15	0((52,5)	-1,68(0,93)	0(35)	89,67
16	0(52,5)	0(1,1)	1,68(43,47)	94,96
17	0(52,5)	0(1,1)	-1,68(26,53)	72,19

A técnica HPSEC permitiu a separação dos diferentes compostos de acordo com sua massa molar. A Figura 1 apresenta um exemplo de perfil cromatográfico em que se verifica a conversão de triacilgliceróis em ésteres do experimento №17 do planejamento experimental. Através do perfil cromatográfico obtido verifica-se a presença de 15% de triacilgliceróis (TG), 12,7% de diacilgliceróis (DG) e 72% de ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL), mostrando a eluição dos compostos em função da sua massa molecular.

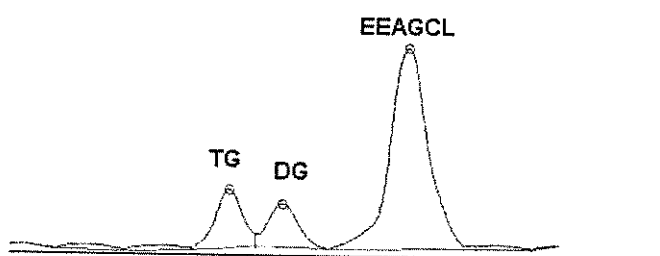


Figura 1. Perfil cromatográfico para avaliação do rendimento dos ésteres, onde TG= triacilgliceróis, DG = diacilgliceróis e EEAGCL = ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa

Em testes preliminares realizados para a obtenção de ésteres etílicos de óleo de peixe obteve-se uma taxa de conversão de 100% para a concentração de 1,20% de hidróxido de sódio e 40 partes de álcool etílico anidro (Tabela 4).

Tabela 4. Condições preliminares utilizadas na produção de ésteres

% NaOH	Rendimento em ésteres (%)
1,0	95,6
1,13	98,0
1,20	100,0

Temperatura = 60°C e Volume de etanol =40 partes (v/p)

No entanto, verificou-se nos ensaios do planejamento experimental uma taxa máxima de conversão em ésteres de 95%. Os testes preliminares e os ensaios experimentais foram realizados nas mesmas condições, exceto a quantidade da matéria-prima utilizada, 2kg e 0,6Kg, respectivamente. A agitação é um parâmetro importante para se chegar à melhor eficiência do processo. O reator

utilizado foi desenhado com pás de agitação para volumes da ordem de 3L. Quando se diminuiu a massa inicial de amostras para 0,6Kg, parte da hélice de agitação deixou de estar totalmente submersa no óleo, o que pode ter alterado a excelente condição de agitação encontrada nos testes preliminares, reduzindo assim a taxa de conversão em ésteres.

A equação de regressão de segunda ordem mostra a dependência da conversão de óleo em ésteres etílicos como função da quantidade de etanol utilizada na reação. Os parâmetros da equação foram obtidos pela análise de regressão múltipla dos dados do experimento:

$$Y = 92,05296 + 4,53679X_3 - 2,37387 X_3^2$$

Onde Y é a variável dependente, rendimento em ésteres, em relação a variável independente X_3 – etanol. As variáveis X_1 – temperatura e X_2 – concentração de NaOH não apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

Através da análise de variância (ANOVA) determinou-se o valor de F, que é a razão da média quadrática devido à regressão sobre a média quadrática devido ao erro (Tabela 5). O valor do F calculado da regressão apresentou-se maior que o F tabelado e o valor do F da falta de ajuste mostrou-se menor que o F tabelado, mostrando que o modelo é preditivo e significativo ao nível de confiança de 95% e que o mesmo não apresenta falta de ajuste dentro da faixa avaliada.

Tabela 5. Efeitos das variáveis avaliadas no rendimento dos ésteres etílicos.

Fontes de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}
Regressão	353,99	2	176,99	25,14	3,74*
Resíduo	98,54	14	7,04		
Falta de ajuste	97,53	12	8,12	16,19	19*
Erro puro	1,00	2	0,50		
Total	452,52	16			

*ao nível de 95% de confiança

O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,78 para a variável ésteres. O valor R^2 é a medida da variação total dos valores observados do rendimento em ésteres sobre a média determinada pelo modelo ajustado, que é freqüentemente expressa em porcentagem. Isto denota que 78% das variações no rendimento em ésteres são explicadas pelo modelo ajustado. O coeficiente de correlação $R = 0,89$ explica a correlação entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo.

De acordo com as áreas de contorno obtidas (Figuras 2 e 3) verifica-se que as variáveis concentração de NaOH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), dentro da faixa avaliada, não influenciaram a conversão de triacilgliceróis em ésteres. Entretanto, a concentração de etanol apresentou efeito positivo sobre o rendimento, com melhores resultados quando utilizada entre 35,5 e 44%.

Verifica-se na literatura que a concentração de catalisadores alcalinos utilizados tem variado de 0,4 a 2,0% (m/m) de óleo. A grande variação nas concentrações utilizadas pode ser atribuída às diferenças existentes nos diversos sistemas reacionais utilizados, tais como, tipo e razão molar do álcool utilizado, configuração do reator e matéria-prima (MEHER, SAGAR, NAIK, 2005). Ferrari; Oliveira, Scabio (2005) obtiveram 97,5% de conversão em ésteres etílicos a partir de óleo de soja e etanol anidro sob as seguintes condições operacionais: 3L de

óleo, 50% (v/v) de etanol anidro e 15g de NaOH, durante 5 minutos. De acordo com a área de contorno obtida na figura 2, verifica-se que a concentração de NaOH, dentro da faixa avaliada (0,93 a 1,27%), não apresentou influência significativa no rendimento em ésteres etílicos, permitindo a escolha da menor concentração de NaOH testada sem perdas na taxa de conversão em ésteres.

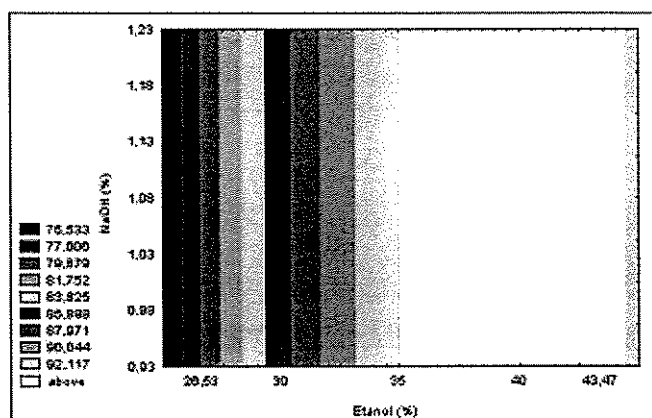


Figura 2. Efeito da concentração de etanol e de NaOH sobre a conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos

A reação de alcoólise pode ocorrer a diferentes temperaturas, dependendo do óleo utilizado, estando correlacionada ao tempo de reação. A reação de alcoólise tem sido conduzida a partir de temperatura ambiente até 60°C (FERRARI, OLIVEIRA, SCABIO, 2005). No entanto, alguns autores sugerem que temperaturas superiores a 60°C podem acelerar a saponificação dos triacilgliceróis pelo catalisador alcalino antes da alcoólise completa (MEHER, SAGAR, NAIK, 2005). De acordo com a área de contorno obtida na figura 3, verifica-se que a temperatura, na faixa avaliada (39 a 65,2°C), não apresentou influência significativa no rendimento em ésteres etílicos, permitindo a escolha da menor temperatura avaliada sem perdas na taxa de conversão em ésteres. A utilização de baixas temperaturas confere maior proteção oxidativa aos ácidos graxos poliinsaturados presentes no óleo de peixe.

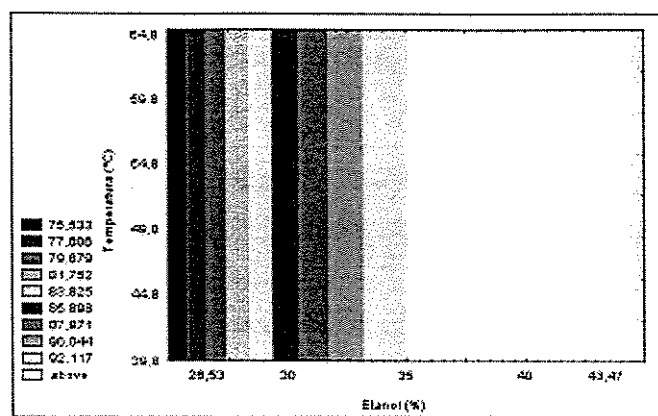


Figura 3. Efeito da concentração de etanol e da temperatura sobre a conversão de triacilgliceróis em ésteres etílicos

Uma das variáveis mais importantes que afetam a conversão de triacilgliceróis em ésteres é a razão molar entre álcool e triacilglicerol. A razão estequiométrica para alcoólise requer três moles de álcool e um de triacilglicerol para a produção de três moles de ésteres e um de glicerol. No entanto, a reação de alcoólise, devido ao seu caráter reversível, requer um excesso de álcool para que haja um deslocamento da reação para a produção de ésteres. Contudo, um elevado excesso de álcool interfere na separação do glicerol que, devido ao aumento da solubilidade, permanece no meio reacional, ocasionando um deslocamento do equilíbrio da reação para sentido oposto e conseqüente redução na conversão em ésteres. Enciner *et al.* (2002) avaliaram a influência de diferentes razões molares (3:1 e 15:1) entre etanol e óleo de cardoon (*Cynara cardunculus* L.). A reação de alcoólise foi incompleta para razões molares inferiores a 6:1, apresentando melhores resultados de conversão em ésteres entre as razões molares de 9:1 e 12:1. No entanto, com a utilização da razão molar de 15:1 verificou-se uma dificuldade de separação do glicerol do meio reacional e conseqüente decréscimo do rendimento em ésteres. As áreas de contorno obtidas nas Figuras 2 e 3 mostram que a variável etanol apresentou efeito positivo significativo na conversão em ésteres etílicos quando utilizado entre as concentrações de 35 e 43,47%(v/m), o que corresponde a utilização de razões molares de 5,3:1 e 6,6:1(etanol/óleo), respectivamente. Verifica-se um menor

rendimento em ésteres etílicos para razões molares inferiores a 5,3:1 e superiores a 6,6:1.

4 Conclusão

A reação de alcoólise mostrou-se viável para a produção de ésteres etílicos devido à possibilidade de utilização de temperaturas muito baixas, na faixa de 40°C, quando comparada ao processo de obtenção convencional de hidrólise de ácidos graxos, no qual se utiliza temperaturas entre 150-280°C. O processo proposto é uma alternativa tecnológica para óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, conferindo maior proteção oxidativa ao mesmo.

A reação apresentou taxa de conversão máxima em ésteres etílicos de 95%, dentro da faixa estudada, onde apenas a variável etanol anidro apresentou influência positiva significativa. De acordo com os dados obtidos, sugere-se a utilização de temperatura de 40°C, concentração de 1% de NaOH e 36% de etanol anidro, sendo esta reação realizada em apenas 5 minutos sob agitação de 600 rpm. Estas condições são consideradas brandas em termos de agressão térmica ao óleo e possibilitam a obtenção industrial de produtos de alto valor nutricional, com mais proteção contra a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados.

5 Bibliografia

AOCS - American Oil Chemists Society - **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, Washington, 5ª ed., 2002.

BARROS NETO, B; SCARMINO, S. I; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª ed., Editora da Unicamp: Campinas, 1996.

ENCINER, J. M. *et al.* Biodiesels fuel from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. **Energy Fuels**. v. 16, p. 443-450, 2002.

ERICKSON, M. D. **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. Ed. D. R. Erickson, AOCS, Champaign: Illinois, 1995.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, p. 19-23, 2005.

GRUNDY, S. M. Lipids and Cardiovascular Disease. In: **Nutrition and Disease Uptade: Heart Disease**. Ed. Kritchevsky, D.; Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.

MEHER, L.C; SAGAR, D.V; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 10, p. 248-268, 2006.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. J. Chemical Interesterification of Food Lipids: Theory and Practice. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed. Akoh, C. C.; Min, D. B. Marcel Dekker: New York, 1998.

RUIZ-MÉNDEZ, M. V; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 549-554, 1997.

SONNTAG, N. O.V. Fat Splitting, Esterification, and Interesterification. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 2, 4ed. Ed. Swern, D. Wiley & Sons, New York, 1982.

STANSBY, M. E. **Fish Oils in Nutrition**. Ed. Stansby, M. E. Van Nostrand Reinhold: New York, 1990.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Enzymatic Interesterification. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed. Akoh, C. C & Min, D. B. Marcel Dekker: New York, 1998.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS NA SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS

Avaliação de parâmetros enzimáticos na síntese de lipídios estruturados específicos

Resumo

O interesse na produção de lipídios estruturados específicos (LE) tem aumentado continuamente devido às suas aplicações médicas, nutricionais e alimentícias. Sua obtenção enzimática apresenta diversas vantagens em relação a sua obtenção por via química. Em função da especificidade e seletividade enzimática é possível a obtenção de produtos específicos que dificilmente seriam obtidos através de reações químicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade catalítica das enzimas Lipozyme TL IM e RM IM, a influência da atividade de água, da razão molar de substratos e da utilização de peneira molecular na obtenção de lipídios estruturados a partir de ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL) e triacilgliceróis de cadeia média (TCM). Para a obtenção de resultados de incorporação satisfatórios, a atividade de água deve situar-se entre valores de 0,30 e 0,43. Através do aumento da razão molar de substratos de 1:2 para 1:4 obteve-se uma curva de interesterificação crescente e estável, evidenciando a importância de se trabalhar com um pequeno excesso de substratos. A utilização de peneira molecular (10% p/p) conferiu discreto aumento no rendimento da incorporação de EEAGCL no TCM devido à absorção de parte da água liberada pela reação de hidrólise no meio reacional.

1 Introdução

Lipídios estruturados são triacilgliceróis modificados em sua composição em ácidos graxos e/ou em sua distribuição posicional na cadeia do glicerol através de catálise química ou enzimática. Especificamente, são triacilgliceróis com propriedades nutricionais e funcionais superiores. O benefício da ingestão do lipídio estruturado específico está relacionado com a composição e balanço adequado entre ácidos graxos de cadeia média (AGCM), fonte de energia de

rápida absorção, e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), fontes de ácidos graxos essenciais (ω -6 e ω -3), podendo ser utilizados na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e nível de triacilgliceróis, prevenção de trombose e melhoria da função imunológica (OSBORN e AKOH, 2002).

A síntese de lipídios estruturados através de interesterificação enzimática apresenta diversas vantagens quando comparada à interesterificação química: pode ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, exige menor consumo energético, minimiza a degradação térmica dos produtos obtidos; confere maior controle sobre a distribuição dos ácidos graxos no produto final devido à especificidade e regioseletividade enzimática e possibilita a obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação, alcoólise, acidólise e transesterificação (GUNSTONE, 1999; LEE e AKOH, 1998).

As reações de interesterificação enzimáticas são fortemente influenciadas por parâmetros operacionais, tais como: temperatura, tempo de reação, atividade de água, presença de solventes orgânicos, razão molar de substratos, quantidade e tipo de enzima. Estes fatores operacionais influenciam não apenas o rendimento e a velocidade da reação, mas também a pureza dos produtos finais obtidos. Diversos autores têm investigado a influência dos parâmetros operacionais sobre a cinética de interesterificação nos mais diversos sistemas propostos para a obtenção de lipídios estruturados específicos (LEE e AKOH, 1998; MU, XU, HOY, 1998; XU *et al.*, 1998; SCHIMID *et al.*, 1998; JENNINGS e AKOH, 2000; KIM *et al.* 2001; IRIMESCU, IWASAKI, HOU, 2002; YANG, FRUEKILDE, XU, 2005; NIELSEN *et al.*, 2006).

A atividade de água exerce grande influência sobre a cinética de interesterificação e formação de produtos secundários durante a reação. Uma hidratação mínima é necessária para a ativação da enzima. No entanto, o

2.5 Composição do lipídio estruturado

A composição em ácidos graxos do LE obtido foi analisada por cromatografia gasosa para a verificação da incorporação dos ésteres etílicos de ácidos graxos provenientes do óleo de peixe.

2.6 Métodos analíticos

Composição em ácidos graxos (ISO5508:1990); condições de análise: cromatógrafo Carbo Erba, modelo GC 8000; coluna capilar Innowax (30m x 0,25mm x 0,25µm, Supelco), 100% polietileno. Forno: 80°C – 2 min, 80 - 225°C a 5°C/min; 225°C – 15min. Gás de arraste: He; fluxo da coluna – 2mL/min; injetor – 250°C; detector – 270°C; split – 1:100; preparação de ésteres metílicos (NF T60-223, Maio de 1997); determinação de acidez (NF T60-204, dezembro de 1985), cromatografia em camada delgada (CHRISTIE,1982). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Lipídios do CIRAD (Montpellier/FR), razão pela qual se utilizou diferentes metodologias nos ensaios subseqüentes.

As amostras experimentais referentes aos ensaios com diferentes razões molares e peneira molecular foram analisadas no Laboratório de Óleos e Gorduras, FEA/UNICAMP (Brasil), segundo as seguintes metodologias. Composição em ácidos graxos - método AOCS Ce 1-62 (2002). Condições de análise: Cromatógrafo CG Agilent 6850 GC System. Coluna DB – 23 – Agilent (50% Cianopropil – metilpolisiloxano), 60m x 0,25mm x 0,20µm. Forno: 195°C – 20min; 195 – 215°C a 5°C/min; 215°C – 16min. Gás de arraste: He; fluxo da coluna – 1,0mL/min; injetor – 250°C; detector – 280°C; split – 1:50. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras e do padrão cromatográfico NU-CHEK GLC-87; -Metilação - método AOCS Ce 2 -66 (2002).

3 Resultados

3.1 Testes com diferentes enzimas

Os valores originais da atividade de água das enzimas Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, eram de 0,33 e 0,11, respectivamente, como determinado. As enzimas foram condicionadas em dessecador contendo solução supersaturada de K_2CO_3 para que atingissem atividade de água em torno de 0,43.

Muderhwa, Pina e Graille (1998) avaliaram a influência da atividade de água de alguns biocatalisadores (Lipozyme T_M, *Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus*) sobre a reação de interesterificação, verificando que a atividade de água deve estar entre valores de 0,25 a 0,45, o que corresponde a uma hidratação do meio reacional de 0,5 e 1%. Para valores abaixo de 0,25, os catalisadores apresentaram baixa eficiência e acima de 0,45 a reação de hidrólise tornou-se privilegiada em relação à interesterificação.

A Figura 1 apresenta a evolução da cinética de interesterificação para a enzima Lipozyme TL IM, com atividade de água de 0,42. Verificaram-se oscilações nos valores de incorporação de ésteres etílicos nos TCM em função do tempo. Estas oscilações podem estar relacionadas com a elevada atividade da enzima e com a limitada razão molar entre TCM e EEAGCL (1:2), o que pode levar à reesterificação dos AGCM liberados pela reação. Considerando-se o fornecimento limitado de EEAGCL e a ocorrência inevitável da reação de hidrólise, atuando competitivamente com a reação de interesterificação, novos experimentos com enzima Lipozyme TL IM foram realizados com o objetivo de elucidar estas alterações na cinética de incorporação.

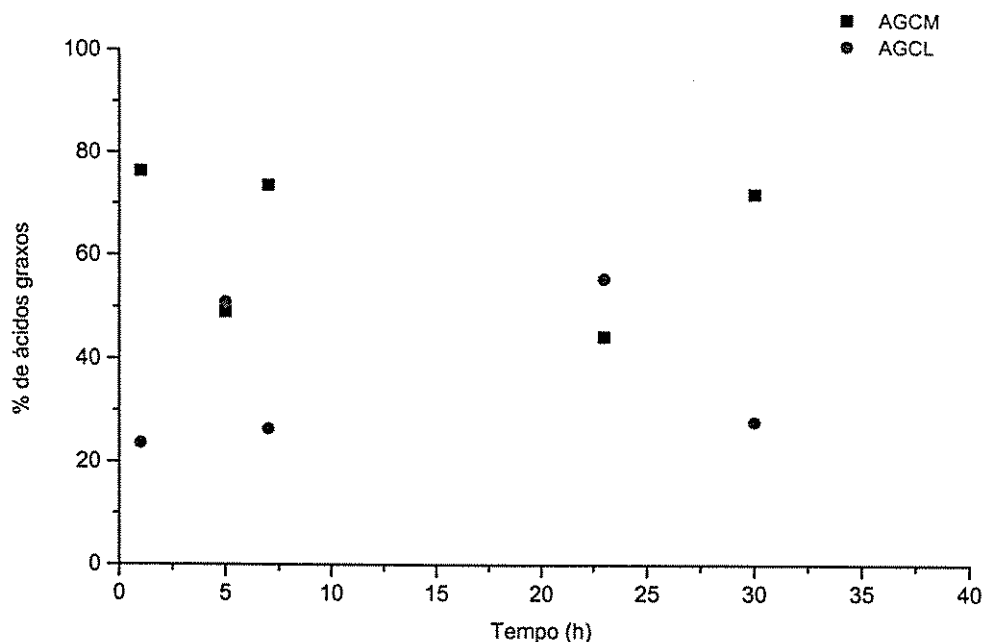


Figura 1. Cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM quando catalisada pela enzima Lipozyme TL IM.

A Figura 2 apresenta a evolução da cinética de interesterificação para a enzima Lipozyme RM IM, com atividade de água de 0,43. A enzima Lipozyme RM IM apresentou uma cinética de incorporação crescente em função do tempo, atingindo um valor de incorporação de 48% em 30 horas de interesterificação.

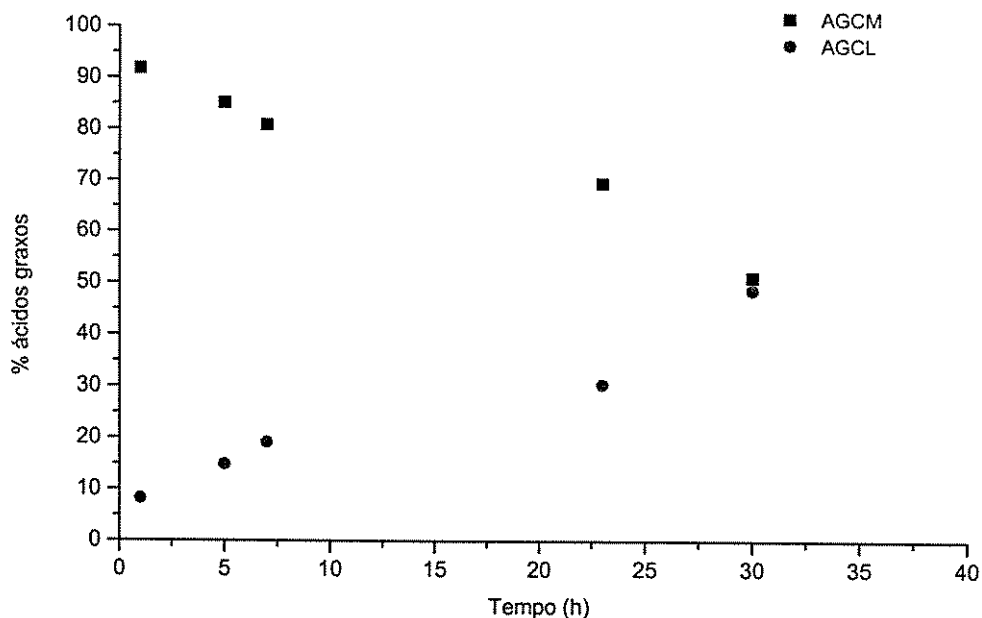


Figura 2. Cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM quando catalisada pela enzima Lipozyme RM IM.

Em função da maior atividade enzimática apresentada, a enzima Lipozyme TL IM foi escolhida para os ensaios subseqüentes.

3.2 Influência da atividade de água na cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM

Dentre as atividades de água avaliadas, maiores atividades catalíticas foram obtidas para os valores de 0,34 e 0,44 (Figura 3). A determinação de ácidos graxos livres (AGL%) da mistura reacional para as atividades de água de 0,27, 0,34, 0,44 e 0,65 foi de 5,2, 4,9, 5,2, e 7,8%, respectivamente; evidenciando que maiores valores de atividade de água estão associados ao maior percentual de hidrólise nos triacilgliceróis. Os maiores rendimentos de interesterificação obtidos com atividades de água de 0,34 e 0,44 estão relacionados com menor teor de hidrólise no meio reacional. Obteve-se baixa atividade catalítica para valores de atividade de água de 0,27 e alta atividade catalítica para atividade de água de

0,65. No entanto, a atividade de água de 0,65 favoreceu a reação de hidrólise em detrimento da reação de interesterificação. Verificou-se, para todas as atividades de água, elevada atividade catalítica nas primeiras horas de reação. Oscilações nos valores de incorporação de EEAGCL nos TCM foram novamente obtidos, como apresentados na Figura 1. Esta oscilação parece acontecer após incorporação de todo substrato disponível, onde a enzima continua com sua atividade catalítica reesterificando os ésteres de ácidos graxos de cadeia média liberados pelos TCM. O decréscimo na atividade catalítica foi verificado para todos os valores de atividade de água testados.

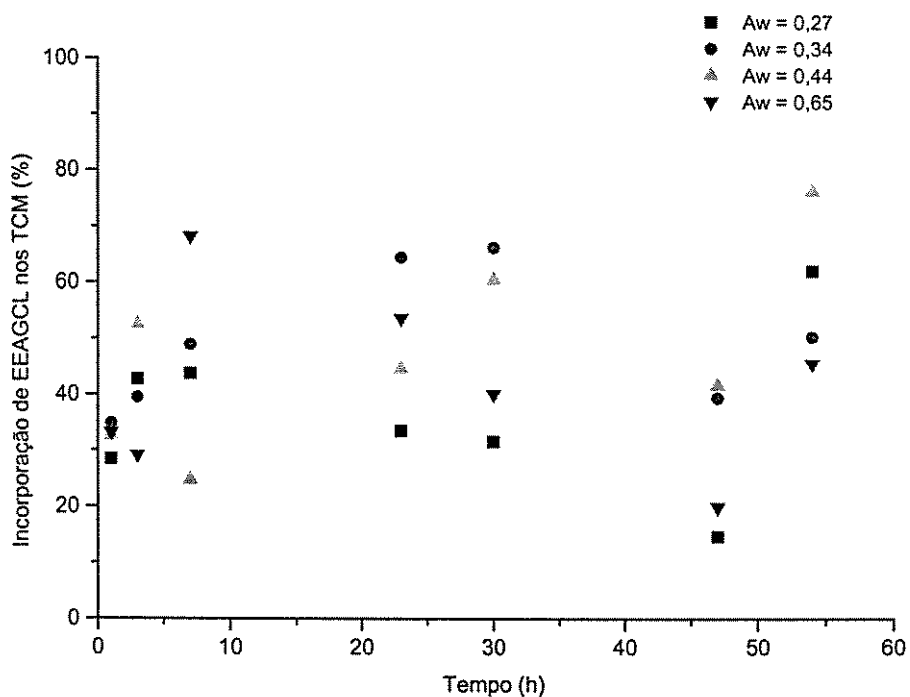


Figura 3. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM (54 horas)

No intuito de analisar mais detalhadamente o comportamento da cinética de interesterificação nas primeiras horas, realizou-se um experimento, com valores de atividade de água semelhantes, durante 10 horas (Figura 4).

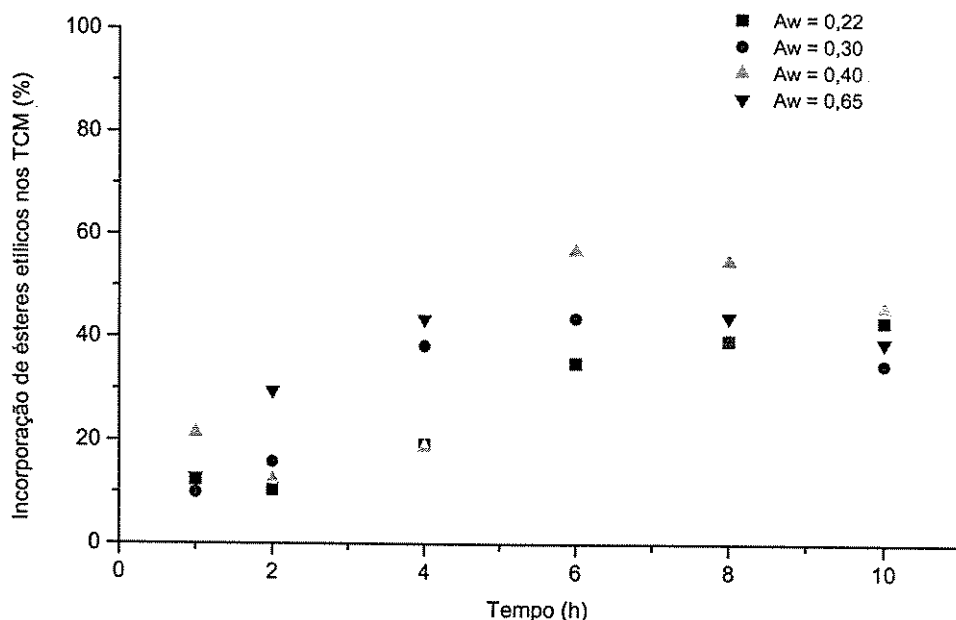


Figura 4. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM (10 horas)

De forma geral, maiores valores de incorporação de EEAGCL nos TCM foram obtidos com seis horas de interesterificação, para todas as atividades de água avaliadas. Os resultados sugerem que a cinética de incorporação máxima (~66%) pode ter acontecido entre o tempo de reação de 6 e 8 horas. A partir de 8 horas de reação, verificou-se, novamente, redução na incorporação dos EEAGCL, como apresentado na Figura 3. A determinação de ácidos graxos livres (AGL%) da mistura reacional, após 10 horas de reação, para as atividades de água de 0,22, 0,30, 0,40 e 0,65 foi de 3,8, 4,0, 4,3, e 6,3%, respectivamente.

Em função da impossibilidade de se evitar completamente a reação de hidrólise, o estudo experimental da influência da atividade de água permitiu determinar as melhores condições de hidratação, favorecendo a cinética de incorporação com menores valores de hidrólise.

3.3 Influência da utilização de peneira molecular e de diferentes razões molares de substratos

A utilização de absorvedores de umidade ou peneira molecular durante reações de interesterificação tem por objetivo remover parte da água liberada pela reação de hidrólise, já que a mesma é inevitável e compete com a reação de interesterificação. Através da Figura 5 verifica-se a influência da utilização de peneira molecular (10% p/p) sobre o rendimento da incorporação de EEAGCL nos TCM, verificando-se um discreto aumento no rendimento com a utilização da peneira molecular. Os ensaios foram conduzidos com a enzima condicionada a 0,43 de atividade de água e razão molar de substratos de 1:2 (TCM/EEAGCL). A cinética de incorporação apresentou tendência a decrescer a partir de 3 horas de reação.

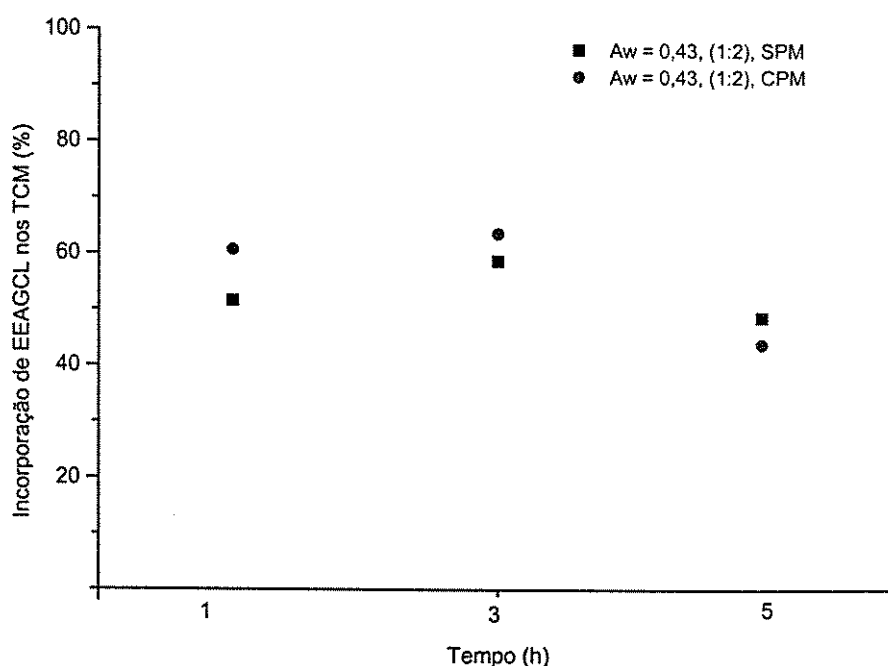


Figura 5. Influência da utilização de peneira molecular na reação de interesterificação (SPM – sem peneira molecular e CPM – com peneira molecular).

A fim de elucidar a causa da não obtenção de uma curva de incorporação estável em função do tempo, foram realizados experimentos com maior razão

molar, 1:4 (TCM/EEAGCL) (Figura 6). O aumento da razão molar de substratos de 1:2 para 1:4 conferiu discreto aumento na cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM, além de ter favorecido a obtenção de uma curva de interesterificação mais estável quando comparada com a curva obtida através da utilização da razão molar de 1:2. O excesso de substratos pode estar relacionado com a manutenção do rendimento da reação, evitando a reesterificação dos ésteres etílicos de cadeia média liberados da reação.

MU *et al.* (1998) verificaram a influência do efeito da razão molar entre substratos na incorporação de ácidos graxos e migração acila quando a reação de interesterificação não tinha atingido o equilíbrio. A incorporação de ácido caprílico aumentou com o aumento da razão molar entre ácido caprílico e óleo de girassol (de 1:1 para 1:8), enquanto que a migração de acila foi menor que 0,5%.

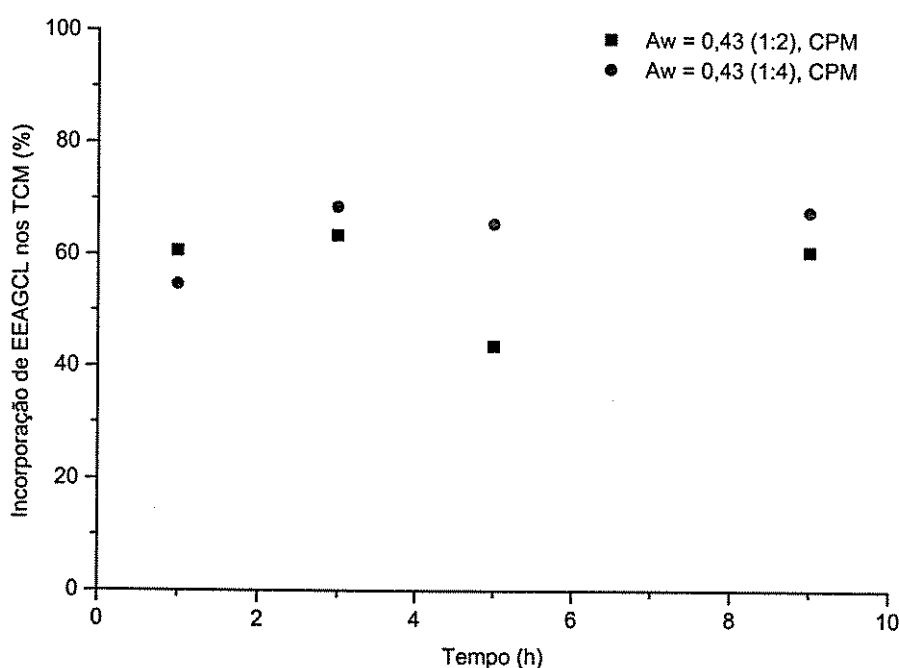


Figura 6. Influência da razão molar sobre a incorporação de EEAGCL nos TCM (CPM – com peneira molecular).

Experimentos com razão molar, 1:4 (TCM/EEAGCL), utilização 10% (p/p) de peneira molecular e atividade de água de 0,36 e 0,43 foram realizados (Figura 7).

Confirmou-se uma tendência estável na evolução da incorporação com utilização da razão molar 1:4(TCM/EEAGCL). O percentual de incorporação, na presença de absorvedores de umidade, foi praticamente similar para os dois valores de atividade de água avaliados.

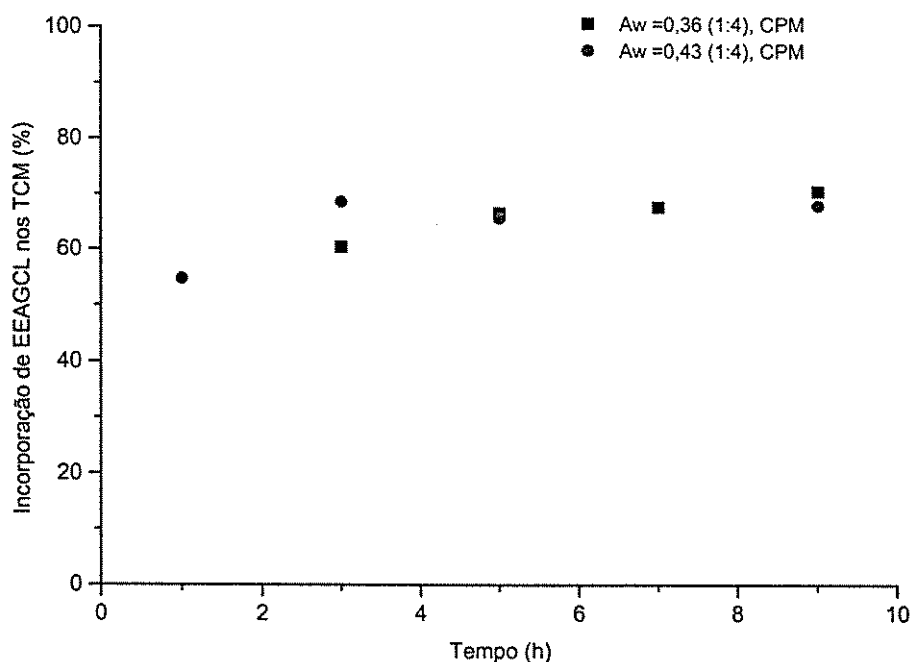


Figura 7. Influência da atividade de água na incorporação de EEAGCL nos TCM (CPM – com peneira molecular)

4 Conclusão

O presente trabalho permitiu avaliar a atividade das enzimas Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM quanto à incorporação de EEAGCL nos TCM em sistema de batelada específico. A enzima Lipozyme TL IM apresentou melhores resultados quanto à cinética de incorporação quando comparada com a Lipozyme RM IM. O estudo da influência da atividade de água permitiu determinar o melhor intervalo de hidratação da enzima para o favorecimento da reação de interesterificação, em detrimento da hidrólise. Para a obtenção de resultados satisfatórios, a atividade de água deve situar-se entre valores de 0,30 e 0,43. A presença de limitado

fornecimento de substratos (razão molar 1:2) influenciou a estabilidade da curva de incorporação, sendo observados aumentos e decréscimos sucessivos. Através do aumento da razão molar de substratos para 1:4 obteve-se uma curva de interesterificação crescente e estável, evidenciando a importância de se trabalhar com um pequeno excesso de substrato. A utilização de peneira molecular (10% p/p) conferiu discreto aumento no rendimento da incorporação de EEAGCL nos TCM devido à absorção de parte da água liberada pela hidrólise no meio reacional.

5 Bibliografia

AOCS - American Oil Chemists Society - **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. Washington, 5ª ed., 2002.

AKOH, C. S. Structured Lipids. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed. Akoh, C. C; MIN, D. B. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.

CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. 2ª ed, Pergamon Press, Oxford, England, 1982.

IRIMESCU, R.; IWASAKI, Y.; HOU, C. T. Study of TAG Ethanolysis to 2-MAG by Immobilized *Candida Antarctica* Lipase and Synthesis of Symmetrically Structured TAG. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 79, n. 9, p. 879-883, 2002.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**. v. 72, p. 273-278, 2001.

KIM, I. H.; YOON, C. S.; LEE, K. W. Transesterification of conjugated linoleic acid and tricaprylin by lipases in organic solvents. **Food Research International**. v. 34, p. 301-306, 2001.

LEE, K.-T.; AKOH, C. C. Solvent – Free Enzymatic Synthesis of Structured Lipids from Peanut Oil and Caprylic Acid in a Stirred Tank Batch Reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 75, n. 11, p. 1533-1537, 1998.

MOURA, J. M. L. N. de *et al.* **Otimização da síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos ω -3 como substrato para a obtenção de lipídios estruturados específicos**. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PE. Anais do XIX CBCTA, 2004.

MU, H.; XU, X.; HOY, C. E. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Interesterification in a Laboratory-Scale Continuous Reactor. **Journal of American Oil Chemists' Societ.** v. 75, n. 9, p. 1187-1193, 1998.

MUDERHWA, J. M.; PINA, M.; GRAILLE. Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. II – Taux de conversion et glycérides partiels en fonction de l'activité de l'eau des biocatalyseurs (1). **Oléagineux.** v. 43, n. 10, p. 385-392, 1988.

NIELSEN, N. S. *et al.* Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. **Food Chemistry.** v. 94, p. 53-60, 2006.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** v. 3, p. 93-103, 2002.

SCHMID, U. *et al.* Optimization of the Reaction Conditions in the Lipase-Catalysed Synthesis of Structured Triglycerides. **Journal of American Oil Chemists' Society.** v. 75, n. 11, p. 1527-1531, 1998.

XU, X. *et al.* Pilot Batch Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalysed Interesterification: Preliminary Study on Incorporation and Acyl Migration. **Journal of American Oil Chemists' Society.** v. 75, p. 301-308, 1998.

YANG, T.; FRUEKILDE, M.-B.; XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. **Food Chemistry.** v. 92, p. 101-107, 2005.

CAPÍTULO VI

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS ESPECÍFICOS EM REATOR PILOTO

Produção enzimática de lipídios estruturados específicos em reator piloto

Resumo

O interesse na produção de lipídios estruturados específicos (LE) tem aumentado continuamente devido às suas aplicações médicas, nutricionais e alimentícias. Os LE, contendo ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e ácidos graxos essenciais (AGE), apresentam ampla aplicação nutricional. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de um lipídio estruturado através da interesterificação enzimática entre ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe (EEAGCL) e triacilgliceróis de cadeia média (TCM). As misturas de substratos constituem-se em fonte energética de rápida absorção, AGCM, e de ácidos graxos essenciais, presentes nos EEAGCL, rico em ácidos graxos ω -3. Verificou-se a cinética de interesterificação em função da atividade de água da enzima original (0,33) e após a etapa de condicionamento da mesma. Foram utilizadas as seguintes condições operacionais: razão molar 1:3 (TCM/EEAGCL), temperatura de 60°C, agitação de 100 rpm sob vácuo. A enzima com atividade de água original (0,33) proporcionou maior cinética de incorporação do que a enzima previamente condicionada na mistura reacional, resultando, em 30 horas de reação, em incorporações da ordem de 67 e 48%, respectivamente. O incremento na razão molar de substratos de 1:3 para 1:4 conferiu aumento na cinética de incorporação, reduzindo o tempo necessário para obtenção de incorporação máxima no TCM (~66,6%) de 30 para 10 horas.

Palavras-chaves: Lipídios estruturados, interesterificação enzimática, TCM, AGCL.

1 Introdução

Nas últimas décadas, tem-se explorado tópicos voltados aos problemas de saúde e sua possível associação ao tipo de dieta lipídica. Estudos epidemiológicos têm demonstrado a influência da dieta lipídica sobre a incidência de doenças coronarianas, com evidências do efeito protetor da ingestão de ácidos graxos essenciais ω -3, eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω -3) e docosahexaenóico (DHA, C:22:6 ω -6), presentes em animais marinhos (CONNOR, 1994).

Baseando-se nestas perspectivas, muita atenção tem sido direcionada à síntese de lipídios estruturados específicos que, sendo moléculas com estrutura particular em termos de composição e distribuição de ácidos graxos na cadeia do glicerol, apresentam características físico-químicas especiais. A estrutura molecular dos triacilgliceróis (TG) influencia o seu metabolismo no organismo (isto é, digestão e absorção) e suas características físicas (ponto de fusão). Consequentemente, através da síntese de lipídios estruturados (LE), com estruturas químicas particulares, é possível controlar o comportamento dos TG e, desse modo, melhorar suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (IWASAKI e YAMANE, 1999).

Lipídios estruturados específicos obtidos através de enzimas *sn*-1,3 específicas podem apresentar as seguintes estruturas em função da distribuição dos ácidos graxos na molécula do glicerol: ácidos graxos de cadeia média nas posições 1,3 e ácidos graxos de cadeia longa na posição 2 (MLM) ou ácidos graxos de cadeia longa nas posições 1,3 e ácidos graxos de cadeia média na posição 2 (LML). Lipídios estruturados do tipo MLM fornecem energia de rápida absorção pela oxidação dos AGCM, rapidamente hidrolisados pela lipase pancreática, e favorecimento na absorção do AGCL na forma de 2-monoacilglicerol (IWASAKI e YAMANE, 1999; XU *et al.*, 1998; YANG, FRUEKILDE, XU, 2005). Lipídios estruturados do tipo LML são considerados como TG de superior digestibilidade e absorção (SETO e YAMADA, 1988).

O benefício da ingestão de lipídios estruturados específicos está relacionado com a composição e balanço adequado entre ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e longa (AGCL) (ω -6, ω -3 e ω -9) podendo ser utilizados na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de triacilgliceróis, prevenção de trombose, melhoria na função imunológica, etc. Emulsões de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e longa (TCL) são denominadas misturas físicas; contudo, estas misturas físicas não são equivalentes ao lipídio estruturado obtido pela interesterificação, que é rapidamente metabolizado comparando-se como os TCL (AKOH, 1998). Um lipídio estruturado contendo DHA, EPA e AGCM fornece energia de rápida absorção e ácidos graxos essenciais (AGE) (JENNINGS e AKOH, 2001). Várias composições em ácidos graxos podem ser encontradas nos lipídios estruturados, cuja escolha vai depender do tipo de aplicação nutricional ou alimentícia desejada.

A síntese enzimática de LE permite a incorporação de ácidos graxos desejados em posições específicas através da utilização de enzimas *sn*-1,3 específicas, permitindo um maior controle do produto final e utilização de condições suaves de processo quando comparadas ao processo de interesterificação química (LEE e AKOH, 1998; POSORKE, 1984).

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de lipídio estruturado, através de interesterificação enzimática entre ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe (EEAGCL), com elevado teor em AGE, e TCM. Foi avaliada a incorporação de EEAGCL nos TCM em função da umidade da enzima, antes e após condicionamento da mesma.

2 Material e Métodos

2.1 Substratos

Óleo de peixe refinado (ROPUFA[®] '30' n-3 Food Oil – ROCHE), gentilmente cedido pela DANONE, foi utilizado para a obtenção dos ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe, segundo condições descritas por Moura *et al.* (2004), TCM – Trigliceril CM – Support, enzima Lipozyme IM TL, gentilmente cedida pela empresa Novozymes.

2.2 Reator de interesterificação

Os experimentos foram realizados em reator encamisado de interesterificação (capacidade de 2L), sob vácuo, temperatura de 60°C, agitação de 100 rpm, 5% de enzima (peso/substrato) e razão molar de substratos de 1:3 e 1:4 (TCM/EEAGCL), respectivamente. Foram utilizados 500 gramas de substratos.

2.3 Condicionamento da enzima

O processo de condicionamento da enzima objetivou eliminar bolhas de ar, contidas nos poros da sílica, e remover grande parte da umidade original contida na enzima (5%) para reduzir a reação de hidrólise e conseqüente formação de diacilgliceróis. A enzima foi condicionada através de lavagens nos substratos (TCM + EEAGCL), previamente aquecidos a 70°C, sob vácuo. Foram realizados quatro procedimentos de lavagem da enzima.

2.4 Separação dos lipídios estruturados específicos

O lipídio estruturado obtido foi separado do meio reacional através da utilização de placas cromatográficas de sílica, preparadas com espessura de 0,5mm e ativadas por 30 minutos a 105°C. Foi utilizada como eluente a combinação de hexano/éter etílico/ácido acético na proporção de 80:20:1(v/v),

permitindo separação na seguinte ordem de eluição: ésteres, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e, quando presentes, diacilgliceróis (1,3) e (1,2).

2.5 Análises

-Teor de ácidos graxos livres - método AOCS Ca 5a-40 (2002); Composição em ácidos graxos - método AOCS Ce 1-62 (2002); Metilação - método AOCS Ce 2 -66 (2002); Cromatografia em camada delgada (CCD) – CHRISTIE (1982).

3 Resultados

3.1 Efeito do condicionamento enzimático na cinética de interesterificação

A Figura 1 mostra o comportamento de incorporação de EEAGCL nos TCM em função do tempo de reação para a enzima não condicionada (atividade de água original) e enzima condicionada. O uso da enzima com atividade de água original promoveu uma cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM mais elevada quando comparada com a enzima condicionada, atingindo o percentual de incorporação máxima (66,66%), referente às posições *sn*-1,3 do triacilglicerol, após 30h de reação, fato não verificado para a enzima condicionada no período de 150 horas de reação. A enzima com atividade de água original (0,33) apresentou incorporação máxima (67%) de EEAGCL nos TCM com 30 horas de reação, a partir do qual se verificou um aumento na incorporação, além do valor máximo desejado de 66,66%, sugerindo uma possível incorporação de EEAGCL na posição *sn*-2 do glicerol, fato este que prejudica a pureza do lipídio estruturado.

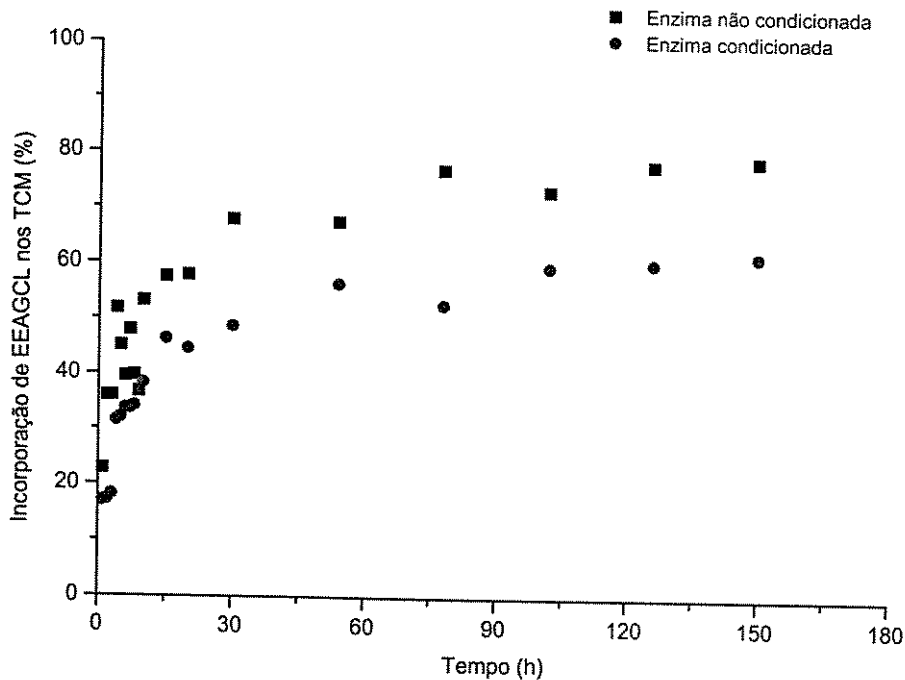


Figura 1. Incorporação de EEAGCL nos TCM em função do tempo de reação para a enzima condicionada e não condicionada.

A Figura 2 apresenta o percentual de incorporação dos ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima não condicionada. O LE obtido no tempo final de reação (150h) apresentou um teor de 29% de ácidos graxos essenciais, 21% de AGCM, e outros ácidos graxos presentes no óleo de peixe, o que confere a este lipídio características de fornecimento de energia de rápida absorção, devido à presença de AGCM, e fornecimento de ácidos graxos essenciais, através dos ácidos graxos da série da ω -3 (ácido linolênico, EPA e DHA) e ω -6 (ácido linoléico e ácido araquidônico).

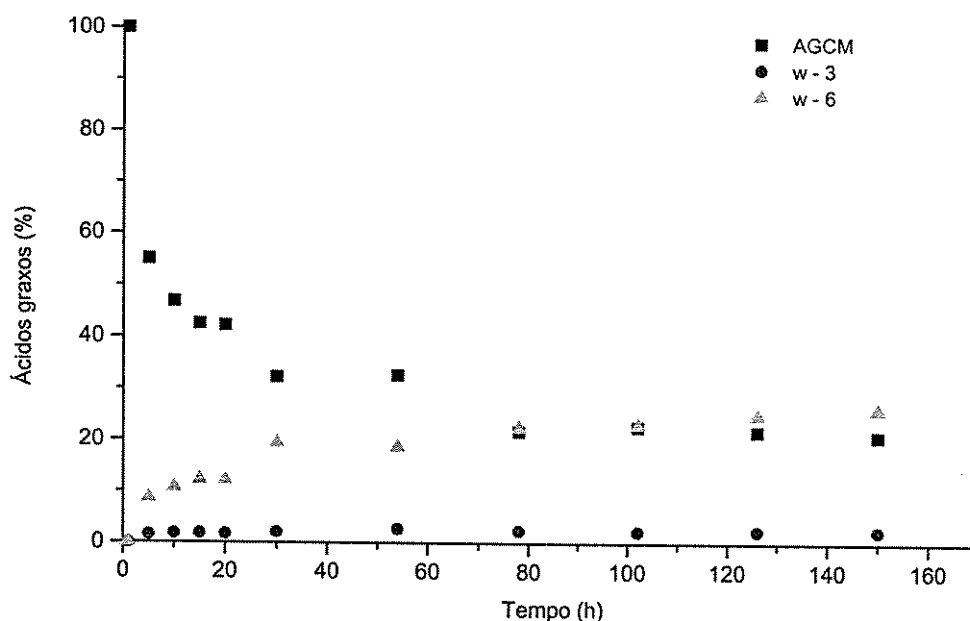


Figura 2. Incorporação de ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima não condicionada.

A Figura 3 apresenta o percentual de incorporação dos ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima condicionada. O LE obtido no tempo final de reação (150h) apresentou um teor de 15% de ácidos graxos essenciais, 38% de AGCM, e outros ácidos graxos presentes no óleo de peixe. O condicionamento da enzima, que tem por objetivo reduzir a umidade da mesma, pode ter reduzido a atividade de água para valores inferiores à faixa de atividade de água que favorece a cinética de interesterificação.

Muderhwa, Pina e Graille (1998) avaliaram a influência da atividade de água de alguns biocatalisadores (*Lipozyme T_M*, *Candida deformans*, *Rhizopus arrhizus*) sobre a reação de interesterificação, verificando que a atividade de água deve estar entre valores de 0,25 a 0,45, o que corresponde a uma hidratação do meio reacional de 0,5 e 1%. Para valores abaixo de 0,25, os catalisadores apresentam baixa atividade e, acima de 0,45, a reação de hidrólise torna-se privilegiada em relação a interesterificação.

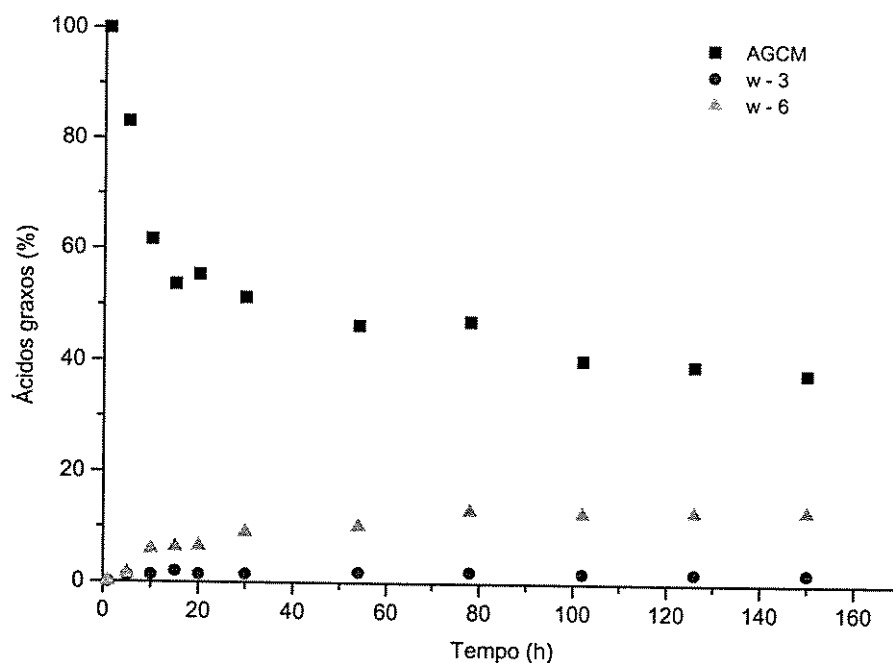


Figura 3. Incorporação de ácidos graxos da série ω -3 e ω -6 nos TCM em função do tempo de reação para a enzima condicionada.

3.2 Influência da razão molar de substratos na cinética de interesterificação

O aumento da razão molar de 1:3 para 1:4 (TCM/EEAGCL) aumentou a cinética de interesterificação, reduzindo o tempo de reação necessário para a obtenção da máxima incorporação. A utilização das razões molares de 1:3 e 1:4 apresentou incorporação máxima com 30 e 10 horas, respectivamente.

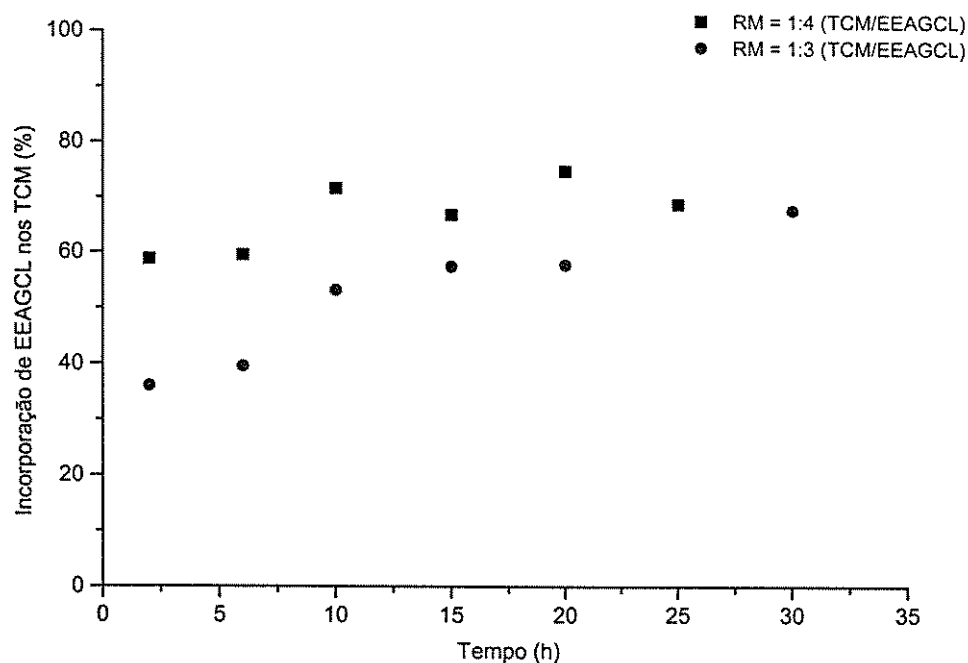


Figura 4. Influência da razão molar de substratos sobre a cinética de interesterificação

4 Conclusão

A utilização da enzima com atividade de água original (0,33) apresentou melhor cinética de incorporação quando comparada com a enzima previamente condicionada na mistura reacional. Foram observadas, em 30 horas de reação, incorporações da ordem de 67 e 48%, com a enzima em seu estado original e condicionada, respectivamente. O incremento na razão molar de substratos de 1:3 para 1:4 melhorou a cinética de incorporação dos AGCL nos TCM, reduzindo o tempo necessário para a obtenção da incorporação máxima nos TCM (~66,6%) de 30 para 10 horas.

5 Bibliografia

- AKOH, C. S. Structured Lipids. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed. Akoh, C.C; MIN, D. B. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.
- AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, Washington, 5ªed., 2002.
- CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. 2ª ed, Pergamon Press, Oxford, England, 1982.
- CONNOR, W. E. ω -3 Fatty Acids and Heart Disease. In: **Nutrition and Disease Uptade: Heart Disease**. Ed. Kritchevsky, D.; Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.
- IWASAKI, Y. e YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129-140, 2000.
- JENNINGS, B. H., AKOH, C. C. Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**. v. 72, p. 273-278, 2001.
- LEE, K. T.; AKOH, C. C. Structured lipids: synthesis and applications. **Food Rev. Int.** v.14, n.1, p.17-34, 1998.
- MOURA, J. M. L. N. de *et al.* **Otimização da síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos ω -3 como substrato para obtenção de lipídios estruturados específicos**. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PE. Anais do XIX CBCTA, 2004.
- MUDERHWA, J. M.; PINA, M.; GRAILLE. Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. II–Taux de conversion et glycérides partiels en fonction de l'activité de l'eau des biocatalyseurs (1). **Oléagineux**. v. 43, n. 10, p. 385-392, 1988.
- POSORKE, L.H. Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 61, 1984.
- SETO, A., YAMADA, O. Fats and Oils Having Superior Digestibility and Absortivity. Patente 120871, 1998.
- XU, X. *et al.* Pilot Batch Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalysed Interesterification: Preliminary Study on Incorporation and Acyl

Migration. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 75, p. 301-308, 1998.

YANG, T.; FRUEKILDE, M.-B., XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. **Food Chemistry**. v. 92, p. 101-107, 2005.

CAPÍTULO VII

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIO ESTRUTURADO ESPECÍFICO EM REATOR DE MEMBRANA PLANA

Síntese enzimática de lipídio estruturado específico em reator de membrana plana

Resumo

A maioria das pesquisas utilizando membranas em tecnologia de lipídios tem focado a recuperação de solvente da miscela, degomagem, branqueamento, neutralização, hidrólise de óleos e gorduras e síntese enzimática de lipídios estruturados (LE) em reator com membrana. O interesse na produção de lipídios estruturados específicos tem aumentado continuamente devido às suas aplicações médicas, nutricionais e alimentícias. Os LE contendo ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e ácidos graxos essenciais (AGE) possuem a combinação de efeitos de rápida absorção e oxidação, proporcionados pela presença dos AGCM, e outros benefícios à saúde devido à presença dos AGE, tais como, melhoria das condições cardiovasculares, redução do colesterol, formação e manutenção das atividades cerebrais e da visão. São utilizados em dietas para pessoas com problemas de má absorção de gorduras, insuficiência pancreática, em nutrição enteral e parenteral, alimentação infantil e em formulações para desportistas. A obtenção enzimática de lipídios estruturados permite a obtenção de LE com ácidos graxos desejados, em posições específicas, através da utilização de enzimas régio-específicas. A aplicação da tecnologia de membranas no sistema de obtenção enzimático de LE permite a integração da reação de interesterificação e separação dos ácidos graxos/ésteres de ácidos graxos liberados por esta reação, o que favorece a obtenção do equilíbrio da reação e de produtos mais puros, possibilitando ainda a recuperação de catalisadores quando os mesmos não se encontram imobilizados na membrana. Este trabalho teve como objetivo a utilização de um reator de membrana plana em batelada para obtenção de um LE, a partir de triacilglicerol de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω -3 (EEAGCL). As seguintes condições operacionais foram utilizadas: temperatura de

60°C, agitação de 600rpm, enzima Lipozyme TL IM (5% peso/substrato), membranas planas poliméricas e razão molar de substratos de 1:3 - TCM/EEAGCL. A reação de interesterificação foi avaliada durante 102 horas, quando se obteve uma incorporação máxima da ordem de 70% de EEAGCL nos TCM, dentre os quais, 23,5% referentes aos AGE da série ω -3 e ω -6. O produto obtido apresenta características de fornecimento de energia de rápida absorção, devido à presença de AGCM, e fornecimento de ácidos graxos essenciais. Foram realizados experimentos no mesmo reator, sem a presença da membrana, com o objetivo de verificar sua influência sobre a obtenção do LE final. O percentual de incorporação final de ésteres etílicos nos TCM, com 102 horas de reação, foi de ~70% e 57%, para o LE obtido com e sem utilização de membrana, respectivamente.

Palavras chaves: Lipídios estruturados, reator de membrana, ácidos graxos essenciais.

1 Introdução

A aplicação de membranas no processamento de óleos vegetais tem crescido bastante nos últimos anos devido aos benefícios proporcionados por sua utilização, tais como, utilização de baixas temperaturas e possibilidade de operação à temperatura ambiente, o que confere maior proteção oxidativa aos óleos vegetais; menor consumo de energia; retenção de componentes desejáveis; redução na produção e tratamento de efluentes; possibilidade de conduzir reações em direções específicas e possibilidade de não adição de insumos químicos (SUBRAMANIAN e NAKAJIMA, 1997; OCHOA *et al.*, 2001).

Os lipídios estruturados específicos (LE), triacilgliceróis modificados química ou enzimaticamente quanto à sua estrutura e composição em ácidos graxos, apresentam importantes propriedades nutricionais e farmacêuticas, principalmente quando apresentam um balanço adequado entre ácidos graxos de

cadeia média (AGCM), fonte de energia rapidamente absorvida pelo organismo, e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), fonte de ácidos graxos essenciais. Os LE podem ser utilizados em nutrição enteral e parenteral, em pacientes com deficiência na absorção de gorduras, bebês prematuros, na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e nível de triacilgliceróis, na prevenção de trombose e na melhoria da função imunológica (AKOH, 1998; IWASAKI e YAMANE, 2000).

A aplicação da tecnologia de membranas no processo enzimático de obtenção de lipídios estruturados favorece a integração da reação de interesterificação e separação dos lipídios estruturados obtidos, processos que acontecem simultaneamente, permitindo uma forma de otimização da reação, já que a separação simultânea de componentes indesejáveis do meio reacional pode alterar a concentração durante o processo, conduzindo a reação para um melhor nível de equilíbrio (XU *et al.*, 2000).

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da utilização de membranas planas durante a reação de interesterificação entre triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe (EEAGCL) com elevado teor de ácidos graxos essenciais, através da utilização da enzima Lipozyme TL IM *sn*-1,3 específica.

2 Material e métodos

2.1 Substratos

Triacilglicerol de cadeia média (TCM), Trigliceril CM – Support, ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos essenciais - obtidos pelo processo de alcoólise, segundo condições descritas por MOURA *et al.* (2004), Lipozyme TL IM *sn*-1,3 específica, imobilizada em resina macroporosa.

2.2 Membranas

Foram utilizadas membranas preparadas a partir de diferentes polímeros e com diferentes faixas nominais de poro, no Laboratório de Separação por Membranas – LABSEM (UFSC/Florianópolis), e membranas comerciais planas Millipore. Foram utilizadas membranas poliméricas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa) constituídas dos seguintes polímeros: PVDF – polifluoreto de vinilideno, PES – polietersulfona, EMC – éster misto de celulose, PTFE, PTFE laminado, Poliamida e Nylon (Tabela 1). As membranas foram avaliadas em função da capacidade em permear ácidos graxos livres e reter triacilgliceróis.

2.3 Reação de interesterificação e reator de membrana plana

A reação de interesterificação enzimática ocorreu entre TCM e EEAGCL, com razão molar de 1:3, respectivamente, sob agitação de 600 rpm e temperatura de 60°C. Utilizou-se 5% de enzima – Lipozyme IM TL ($A_w = 0,3$) – *Thermomyces lanuginosus* (p/p em relação ao substrato). Foram adicionados 70g de substratos (TCM e EEAGCL) no compartimento A do reator de membrana e óleo refinado de soja no compartimento B. Foram coletadas amostras em intervalos de tempo de 5, 10, 24, 48 e 102 horas de experimento. A reação de interesterificação ocorreu no reator de membrana plana, descrito na Figura 1.

Na reação de interesterificação entre TCM e EEAGCL, a remoção dos ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média (EEAGCM) liberados pela reação depende do gradiente de concentração existente nos compartimentos A e B (Fig.1). A concentração de EEAGCM liberados no compartimento A depende do tempo de reação, razão de substratos e quantidade de enzima utilizada.

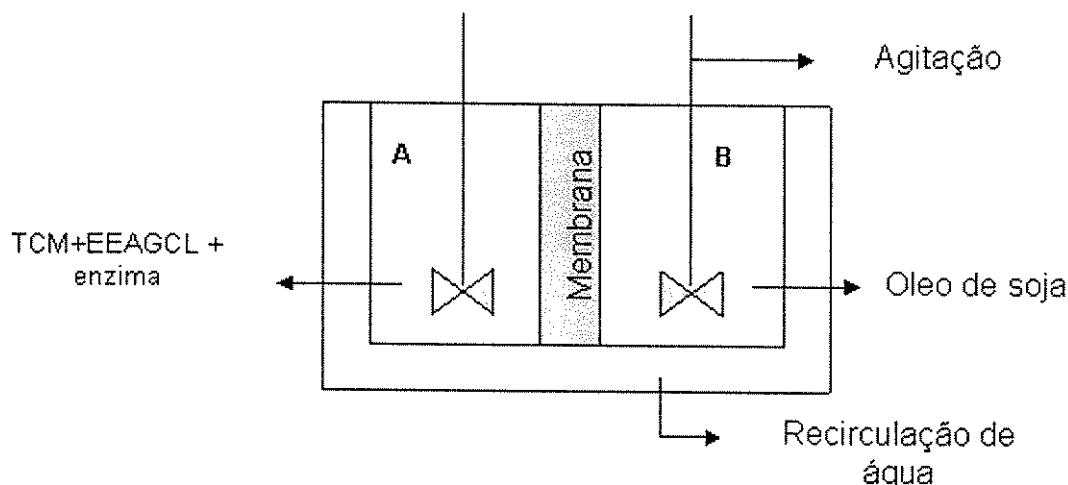


Figura 1. Esquema simplificado do reator de membrana plana utilizado nos experimentos

2.4 Procedimento experimental para testes seletivos das membranas

Para a realização dos testes seletivos das membranas adicionou-se nos compartimentos A e B do reator, ácido graxo oléico e óleo refinado de soja, respectivamente. As membranas foram selecionadas baseando-se em sua habilidade de permear o ácido graxo oléico, do compartimento A para o compartimento B e na sua capacidade em não permear triacilgliceróis do compartimento B para o compartimento A.

Uma quantidade determinada de ácido oléico e óleo de soja refinado foi adicionada nos compartimentos A e B do reator, respectivamente. Utilizou-se a temperatura de 60°C sob agitação mecânica de 600rpm. O conteúdo de ácidos graxos livres presentes no óleo contido no compartimento B, que funcionou como extrator dos mesmos, foi determinado por titulação alcalina. Os fluxos foram calculados de acordo com a seguinte equação (Xu *et al.*, 2000):

$$\text{Fluxo}(\text{mol/h.m}^2) = \frac{\text{AGL}(\%h) \times P(g)}{\text{PM(AGL)} \times \text{área} (\text{m}^2)} \quad (1)$$

O conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) foi calculado por regressão entre o conteúdo de ácido graxo livre presente no compartimento B e o tempo de permeação (h), P é o peso em gramas do óleo contido no compartimento B, PM é o peso molecular do ácido graxo livre, ácido oléico, contido no compartimento A e a área (m^2) é a área da membrana. A área da membrana utilizada foi de $9,8 \cdot 10^{-4} m^2$. Os fluxos foram medidos durante 10 horas, sendo coletadas amostras a cada duas horas de intervalo. Foram coletadas amostras de 1 e 2mL dos respectivos compartimentos.

Dois fatores devem ser levados em consideração quanto ao comportamento de fluxo permeado apresentado por membranas de filtração: orientação da superfície de contato da membrana e características que podem afetar o fluxo de permeado das membranas, tais como, massa molar de corte, espessura, homogeneidade da superfície, material e pré-tratamento da membrana (XU *et al.*, 2000).

Utilizando a superfície funcional da membrana voltada para o compartimento B pode-se verificar o comportamento da membrana quanto à passagem de triacilgliceróis do compartimento B para o A e a passagem dos ácidos graxos livres do compartimento A para o B. Num experimento de filtração tangencial a superfície funcional da membrana ficará retendo os triacilgliceróis devendo permitir apenas a passagem dos ácidos graxos livres, o que fundamentou os testes apenas com a superfície funcional orientada para o lado B, que continha óleo de soja (triacilgliceróis).

2.5 Influência do comprimento da cadeia carbônica no fluxo permeado de ácidos graxos

Uma das qualidades promissoras das aplicações de membranas é a seletividade de diferentes ácidos graxos de acordo com o comprimento de sua cadeia e estrutura. Ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia e estruturas possuem diferentes raios Stokes-Einstein e diferentes hidrofobicidades

(BOUWER *et al.*, 1997 e PRONK *et al.*, 1998; citados por XU *et al.*, 2000). Essas diferenças podem ser utilizadas nos processos de separação.

Foram verificados os fluxos de permeado de ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia carbônica (ácido caprílico e ácido oléico) na membrana selecionada para a reação de interesterificação. O procedimento de determinação do fluxo de permeado foi o mesmo utilizado no processo seletivo das membranas, onde se utilizou óleo refinado de soja como extrator dos ácidos graxos do compartimento A.

2.6 Separação do lipídio estruturado do meio reacional

O lipídio estruturado obtido foi separado do meio reacional através da utilização de placas cromatográficas de sílica, preparadas com espessura de 0,5mm e ativadas por 30 minutos a 105°C. Foi utilizada como eluente a combinação de hexano/éter etílico/ácido acético na proporção de 80:20:1(v/v), permitindo separação na seguinte ordem de eluição: ésteres, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e, quando presentes, diacilgliceróis (1,3) e (1,2).

2.7 Controle da interesterificação

Composição em ácidos graxos – método AOCS Ce 1-62 (2002), com ácidos graxos esterificados segundo método de HARTMAN e LAGO (1973); Cromatografia em camada delgada – CHRISTIE (1982).

3 Resultados

3.1 Testes seletivos das membranas

A Tabela 1 refere-se aos testes seletivos das membranas quanto à determinação de ácido graxo oléico (%AGL) no compartimento B, determinação de triacilglicerol (TG) presente no compartimento A e o fluxo de permeado do

ácido oléico (mol/h. m^2), com 10 horas de reação.

Tabela 1. Testes seletivos das membranas

Membrana	Ø poro	AGL(%)	TG (%)	Fluxo (mol/h.m^2)	Descrição
PVDF	0,22 μm	3,60	5,10	1,22	Microfiltração
PES	0,22 μm	4,60	5,90	1,56	
EMC	0,1 μm	3,00	6,10	1,02	
EMC	0,45 μm	3,90	2,30	1,08	
EMC	0,8 μm	8,70	13,70	2,96	
PTFE	0,45 μm	5,40	7,56	1,84	
Nylon	0,45 μm	0,90	6,85	0,30	
PTFE- lam	0,5 μm	1,64	12,44	0,55	Ultrafiltração
M26 (PVDF)		0,60	0,	0,23	
A2		0,63	4,30	0,22	
MR1		0,70	0	0,24	
CF		0,27	0	0,09	
LII		1,50	0	0,51	
YM1 (EC)	1K	3,82	0	1,37	Osmose reversa
PLBC	3K	8,09	0	2,82	
PLGC	10k	0,20	0	0,07	
PLTK	30k	1,85	0	0,66	
AG		0,10	0	0,03	
Poliamida		0,20	0	0,06	
					Nanofiltração

A determinação de acidez no óleo de soja no compartimento B foi realizada por titulação alcalina por potenciômetro e a verificação da permeação de triacilgliceróis (% TG no compartimento A) do compartimento B para o A foi determinada através de Cromatografia de Alta Performance por Exclusão de Tamanho, fornecendo o percentual de triacilgliceróis que permeou para o compartimento A.

O transporte do ácido oléico para o compartimento B ocorreu de forma linear em função do tempo de reação para todas as membranas testadas nas primeiras 10 horas de filtração. No entanto, houve uma perda de triacilgliceróis do compartimento B para o compartimento A para grande parte das membranas testadas. Normalmente, membranas com maior tamanho de poros apresentam maiores fluxos de permeado; no entanto, isto não ocorreu para todas as membranas. Vários fatores podem ter afetado o fluxo de ácido oléico, tais como, material constituinte da membrana, tamanho de poros, espessura da membrana, homogeneidade da superfície da membrana e pré-tratamento das membranas.

Todas as membranas foram testadas em seu estado seco. As membranas de ultrafiltração (YM1, PLBC, PLGC e PLTK) foram testadas também após serem submergidas em água destilada por 2h e em etanol por 1h. A aplicação do tratamento não conferiu diferenças significativas para os fluxos de permeados obtidos. As membranas (YM1, PLBC, PLGC e PLTK) apresentaram fluxos de 1,37; 2,82; 0,07 e 0,66 mol/h. m² e 1,35; 2,69; 0,07 e 0,69 mol/h.m² para o estado seco e após pré-tratamento com água e etanol, respectivamente.

Dentre as membranas testadas, as membranas de ultrafiltração (YM1, PLBC e PLTK) apresentaram bons fluxos de permeado, não apresentando perda de triacilgliceróis para o compartimento A. No entanto, o fluxo permeado não aumentou com o aumento da faixa nominal de poros. As membranas YM1 e PLBC, de 1 e 3K, apresentaram maiores fluxos de permeado do que as membranas PLGC e PLTK, de 10K e 30K, respectivamente.

A membrana PLBC foi escolhida para os ensaios de interesterificação enzimática em reator de membrana em batelada devido ao seu maior fluxo de permeado e retenção completa dos triacilgliceróis.

A verificação da influência do comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos foi avaliada em relação aos ácidos oléico e caprílico. No entanto, o fluxo obtido para o ácido caprílico, massa molar 144,22, foi bastante inferior ao fluxo apresentado pelo ácido oléico, massa molar 282,47, o que não é condizente com

a diferença de massa molar. Este menor fluxo de permeado para o ácido caprílico pode estar relacionado com uma possível interação entre o ácido caprílico e o material da membrana.

3.2 Interesterificação entre TCM e EEAGCL

3.2.1 Caracterização da matéria-prima

A Tabela 2 apresenta a composição em ácidos graxos dos TCM utilizados nos experimentos.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos dos TCM

Ácido graxo		%
C6:0	Capróico	1,45
C8:0	Caprílico	65,74
C10:0	Cáprico	31,99
C12:0	Láurico	0,37

Na Tabela 3 é apresentada a composição em ácidos graxos dos ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe.

Tabela 3. Composição em ácidos graxos dos EEAGCL

Ácido graxo	%
Láurico (C12:0)	0,12
Mirístico (C14:0)	6,60
Pentadecanóico (C15:0)	0,89
Palmítico (C16:0)	16,97
Palmitoléico (C16:1)	6,87
Hexadienóico (C16:2)	1,55
Margárico (C17:0)	0,83
Margaroléico (C17:1)	1,36
Estearíico (C18:0)	4,11
Oléico (C18:1n9)	12,80
Linoléico (C18:2n6)	1,59
γ -linolênico (C18:3n6)	0,34
Linolênico (C18:3n3)	1,12
Estearidônico (C18:4)	3,38
Araquídico (C20:0)	0,44
Gadoléico (C20:1n9)	1,79
Araquidônico (C20:4n6)	0,91
(C20:4n3)	0,81
Eicosapentanóico (C20:5n3)	15,12
Cetoléico (C22:1)	1,12
Docosapentaenóico (C22:5n3)	1,90
Docosaheptaenóico (C22:6n3)	17,97
Outros	1,41

3.2.2 Incorporação de EEAGCL nos TCM

A Figura 2 representa a evolução da cinética de interesterificação entre TCM e EEAGCL em função do tempo de reação. Os valores expressos são a média de três experimentos realizados. Observa-se que houve uma incorporação crescente dos ésteres em função do tempo de reação. No entanto, esta incorporação engloba não apenas os ácidos graxos essenciais (AGE) da série ω -6 e ω -3, mas também vários outros ácidos graxos presentes no óleo de peixe.

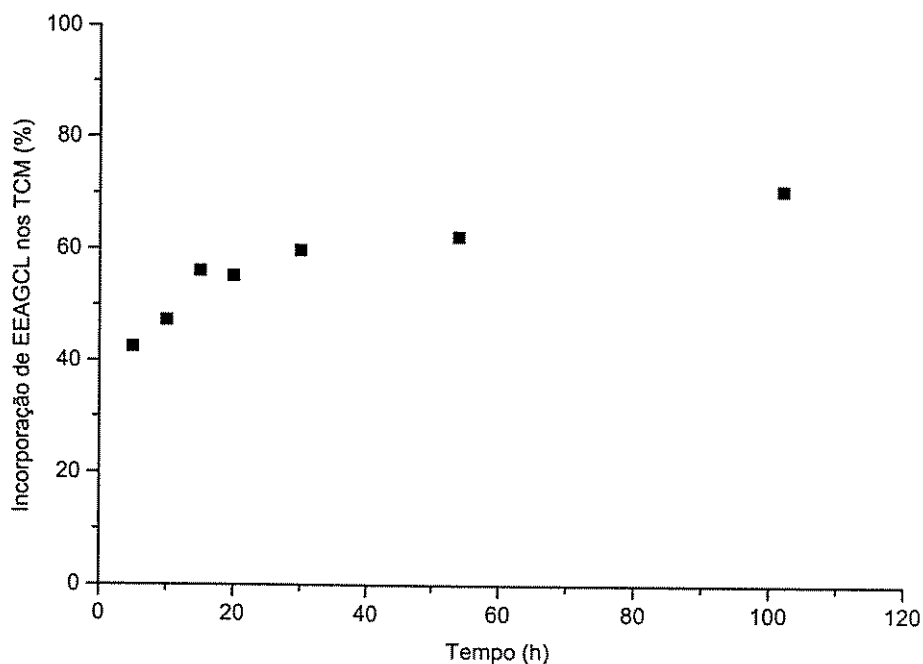


Figura 2. Incorporação de EEAGCL nos TCM em função do tempo.

A Figura 3 demonstra a incorporação, em termos percentuais, dos ácidos graxos da série ω -6 e ω -3 nos TCM.

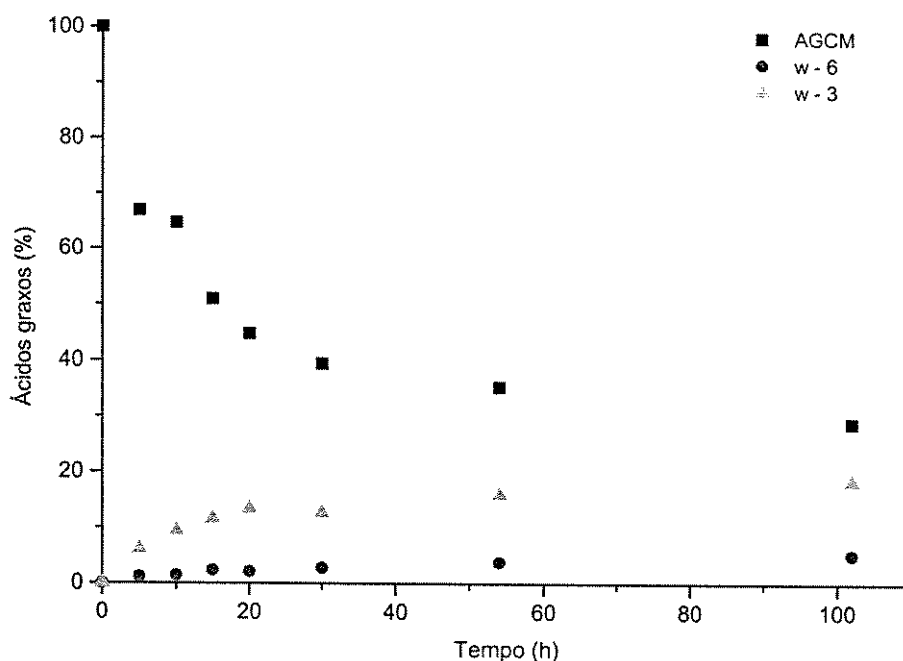


Figura 3. Incorporação de ácidos graxos essenciais nos TCM

Observa-se que o aumento dos ácidos graxos da série ω -6 e ω -3 foi crescente durante todo o tempo de experimento. O lipídio estruturado obtido no tempo final da reação (102h) apresentou um teor de 23,53% de ácidos graxos essenciais e de 28,84% de TCM, o que confere a este lipídio características de fornecimento de energia de rápida absorção, devido à presença de AGCM, e fornecimento de ácidos graxos essenciais, através dos ácidos graxos da série ω -6 (ácido linoléico e ácido araquidônico) e da série ω -3 (ácido linolênico, EPA, DPA e DHA).

A Figura 4 mostra a obtenção do lipídio estruturado com e sem a utilização de membranas.

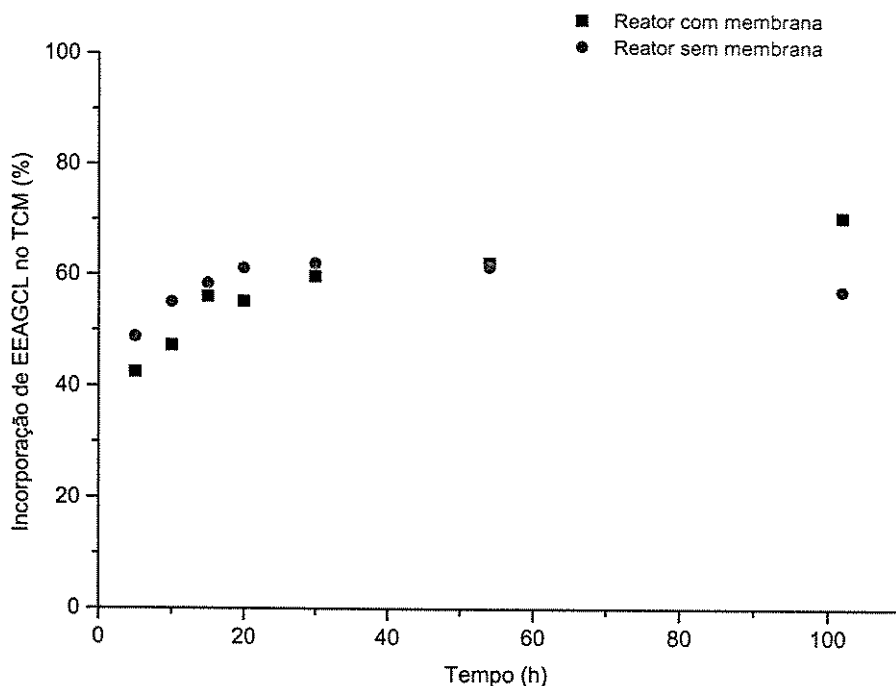


Figura 4. Incorporação de ésteres etílicos no TCM em função da utilização ou não de reator com membrana.

Através da Figura 4 verifica-se que não houve diferenças significativas na incorporação de EEAGCL nos TCM até o tempo de reação de 54 horas, mas observa-se um discreto aumento na incorporação, entre 60 e 102 horas de reação, para o LE obtido através da utilização do reator com membrana. A incorporação obtida no tempo final de 102 horas foi de 70 e 57 % para a utilização de reator com e sem membrana, respectivamente. O discreto aumento da incorporação, quando utilizada a membrana, pode estar relacionado à permeação dos ésteres etílicos de cadeia média (EEAGCM) liberados pela reação de interesterificação, podendo deslocar o equilíbrio reacional em direção à obtenção do lipídio estruturado específico.

A Tabela 4 apresenta a composição em ácidos graxos do lipídio estruturado final obtido em reator com e sem membrana.

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado final

Ácidos graxos	% (reator com membrana)	% (reator sem membrana)
C6:0	0,11	1,33
C8:0	18,73	25,77
C10:0	10,92	14,99
C12:0	0,27	0,39
C14:0	5,43	6,55
C15:0	0,56	0,47
C16:0	14,53	14,73
C16:1	5,72	6,32
C17:0	0,71	1,25
C17:1	0,70	0,15
C18:0	4,45	3,52
C18:1	11,29	10,16
C18:2	4,65	1,39
C18:3	1,00	0,86
C18:4	1,51	0,85
C20:0	0,79	0,26
C20:1	0,0	0,89
C20:3	0,36	0,37
C20:4	0,52	0,44
C20:5	9,66	5,86
C22:0	0,0	0,10
C22:5	1,64	1,21
C22:6	6,06	1,96

Pode-se verificar na tabela 4 que, embora na reação com e sem membrana a composição do LE tenha apresentado um percentual de ácidos graxos essenciais de 23,5 e 11,7 %, respectivamente, a razão entre os ácidos graxos essenciais ω -6/ ω -3 não apresentou variação significativa, conforme é mostrado na Fig. 5. Isto demonstra que a incorporação não foi seletiva para uma série específica de ácidos graxos. Em termos nutricionais este lipídio estruturado apresenta uma relação inversa de ω -6/ ω -3 (1:5) em relação à sugerida pela FAO/WHO (5:1), constituindo-se num produto altamente concentrado em AGE ω -3. O elevado teor de AGE ω -3, principalmente de cadeia longa (EPA e DHA) possibilita a sua utilização em dietas especiais. Este produto diferenciado, além de ser fonte altamente rica em AGE ω -3, importantes em muitas dislipidemias, fornece também energia de rápida absorção devido à presença de ácidos graxos de cadeia média.

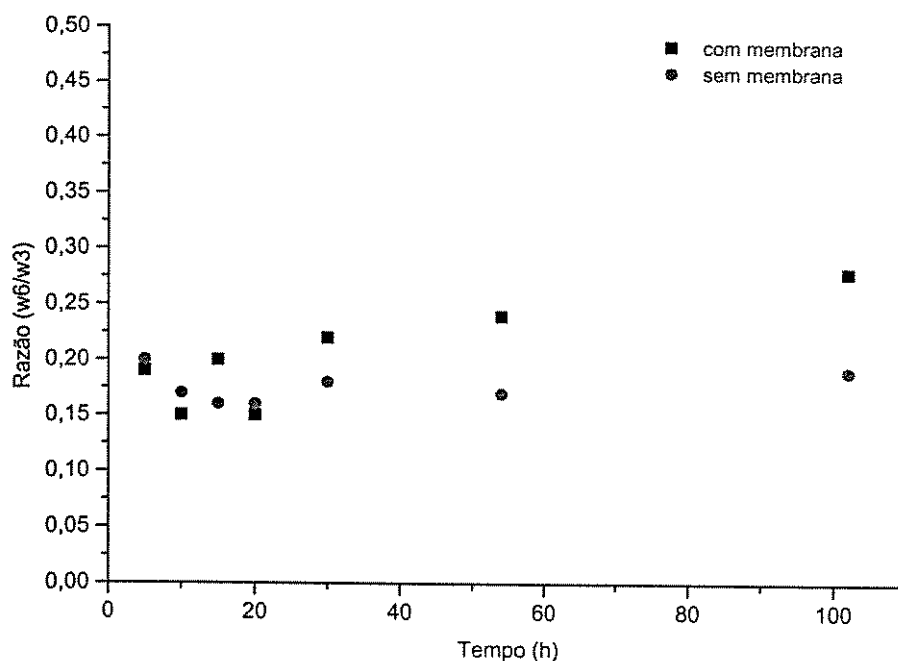


Figura 5. Razão entre AGE ω -6/ ω -3 do LE em função do tempo

4 Conclusão

A utilização de membranas durante a reação de interesterificação enzimática entre TCM e EEAGCL favoreceu a cinética de incorporação dos EEAGCL nos TCM a partir de 54 horas de reação. A incorporação obtida no tempo final de 102 horas foi de 70 e 57 % para a utilização de reator com e sem membrana, respectivamente. O aumento da incorporação, quando utilizada a membrana, pode estar relacionado à permeação dos EEAGCM liberados pela reação de interesterificação, o que deslocaria o equilíbrio reacional em direção à obtenção do lipídio estruturado. A composição em ácidos graxos do LE obtido em reator, com e sem membrana, foi significativamente diferente. Os teores de AGE ω -6 e ω -3 observados foram de 23,5 e 11,7%, respectivamente. No entanto, a razão entre os AGE ω -6/ ω -3 não apresentou variação significativa. O LE obtido constitui-se num produto diferenciado, com elevado teor de AGE ω -3, além de conter AGCM, fonte de energia de rápida absorção.

5 Bibliografia

AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, Washington, 5ªed., 1997.

AKOH, C. S. Structured Lipids. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed Akoh, C.C; MIN, D.B. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.

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.

IWASAKI, Y. e YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.10, p. 129-140, 2000.

MOURA, J. M. L. N de *et al.* **Otimização da síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos ω -3 como substrato para obtenção de lipídios estruturados específicos**. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PE. Anais do XIX CBCTA, 2004.

OCHOA, N. *et al.* Ultrafiltration of vegetable oils Degumming by polymeric membranes. **Separation and Purification Technology**. v. 22-23, p. 417-422, 2001.

SUBRAMANIAN, R e NAKAJIMA, M. Membrane degumming of crude soybean and rapeseed oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 74, n. 8, p. 971-974, 1997.

XU, X. *et al.* Production of structured lipids by lipase-catalysed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**. vol. 77, n. 10, p. 1035-1041, 2000.

CAPÍTULO VIII

REATOR DE MEMBRANA E CO₂SC: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

Reator de membrana e CO₂SC: produção de lipídios estruturados

Resumo

A associação do processo de filtração por membrana enzimática e fluidificação por dióxido de carbono supercrítico foi avaliada quanto à interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe (EEAGCL). A enzima *Candida antarctica* foi imobilizada por ligação covalente a uma camada de biopolímero (Gelatina/PEI), previamente adsorvida na membrana. Os experimentos foram conduzidos sob temperatura de 60°C e pressão transmembrana de 0,05MPa. Foram avaliadas diferentes pressões de CO₂ (PCO₂): 6, 12 e 18MPa. Verificou-se uma grande influência deste parâmetro operacional sobre a cinética de interesterificação, tendo a PCO₂ de 18MPa favorecido a máxima incorporação de EEAGCL nos TCM (34,5%), dentre os quais 24,7% de ácidos graxos essenciais.

Palavras - chave: reator de membrana, fluido supercrítico, imobilização enzimática, lipídio estruturado.

1 Introdução

Lipídios estruturados (LE) são definidos como triacilgliceróis (TG) modificados, química ou enzimaticamente, em sua composição de ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula do glicerol (IWASAKI e YAMANE, 2000). O benefício da ingestão do lipídio estruturado específico está relacionado com a composição e balanço adequado entre ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e longa (AGCL), entre eles podem ser citados o ω -6, o ω -3 e o ω -9. Estes compostos podem ser utilizados na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de triacilgliceróis, na prevenção de trombose e melhoria da função imunológica (AKOH, 1998).

Os processos de bioconversão enzimática têm sido bastante utilizados na produção, transformação e valorização de matérias-primas. Importantes aplicações têm sido realizadas nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e no desenvolvimento de propostas ambientais (RIOS *et al.*, 2004). As reações enzimáticas podem ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, exigindo menor consumo energético e possibilitando a obtenção de produtos menos degradados termicamente. Em função da seletividade enzimática é possível a obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação, alcoólise, acidólise e transesterificação (GUNSTONE, 1999).

A maioria das reações enzimáticas é realizada em reatores em batelada, apresentando alguns inconvenientes como altos custos operacionais, baixa produtividade, alta variação na qualidade dos produtos obtidos e remoção da enzima (RIOS *et al.*, 2004).

A utilização de enzimas na forma imobilizada, visando à obtenção de reações com maior uniformidade tecnológica e viabilidade econômica, permite considerável aumento na estabilidade enzimática e maior diversidade de aplicações, de fundamental importância para o desenvolvimento de processos associados à bioconversão (HILAL, NIGMATULLIN, ALPATOVA, 2004). Segundo Swaisgood (1991), as vantagens da utilização de enzima imobilizada são: maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso da extensão das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas.

Diversos sistemas têm sido propostos para imobilização enzimática: ligações químicas (LOZANO *et al.*, 2002); adsorção física (BALCÃO e MALCATA, 1998) e oclusão da enzima na matriz polimérica (RUCKA e TURKIEWICZ, 1990).

Reatores de membranas visam integrar a conversão catalítica à separação e/ou concentração de produtos e recuperação de catalisador em uma única etapa.

As membranas também podem ser utilizadas em reator exclusivamente como matriz para imobilização da enzima, sem nenhuma intenção de separação (PRAZERES e CABRAL, 1994).

Reações enzimáticas em meio supercríticos apresentam diversas vantagens em relação às reações conduzidas em meio de solventes orgânicos, tais como: baixa temperatura crítica (31,1°C), favorecendo o processamento de compostos termolábeis; facilidade de separação do meio reacional, ausência de toxicidade e alto poder solvente de CO₂ (CASTRO, VALCÁRCEL, TENA, 1994).

Um novo reator, combinando enzima, membrana e dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC), foi utilizado por Pomier *et al.* (2005) na modificação de óleo de mamona. Basicamente, o novo reator baseia-se em dois conceitos originais: fluidificação da mistura viscosa (óleo de mamona e oleato de metila) pelo CO₂SC, facilitando a filtração tangencial e reação enzimática em meio CO₂SC/óleo, catalisada por lipase imobilizada em suporte cerâmico, segundo Magnan *et al.* (2004). Através da análise de retentados e permeados, quanto à presença de ricinoleato de metila, verificou-se que a reação enzimática aconteceu predominantemente nos poros da membrana, onde o contato entre enzimas e substratos é favorecido em relação à superfície da membrana. Durante 25h, a atividade de conversão da enzima imobilizada foi de aproximadamente 30% no permeado e 16% no retentado.

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de lipídios estruturados, através da interesterificação entre triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL), utilizando o sistema de reator de membrana proposto por Pomier *et al.* (2005). Avaliou-se a influência de diferentes pressões de dióxido de carbono (PCO₂), 6, 12 e 18MPa sobre a cinética de incorporação de EEAGCL nos TCM. Os experimentos foram realizados a 60°C.

2 Material e Métodos

2.1 Substratos e enzimas

Foram utilizados TCM (Miglioli); EEAGCL, com elevado teor de ácidos graxos essenciais, obtidos pelo processo de alcoólise, segundo condições descritas por Moura *et al.* (2004) e a lipase Novozym 525L (EC 3.1.1.3) proveniente de *Candida antarctica* B (Novo Nordisk), posteriormente imobilizada em membrana cerâmica.

2.2 Membrana

Utilizou-se membrana tubular porosa composta de α -alumina com diâmetro de poro de 1,4 μ m, comprimento de 15,5cm e diâmetros interno e externo de 7 e 10mm, respectivamente (Pall Exekia).

2.3 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática na membrana de α -alumina ocorreu em uma unidade de microfiltração tangencial semi-piloto, composta por um tanque encamizado (5L), uma bomba e uma membrana em circuito fechado, com constante recirculação do retentado. Este processo foi realizado em três etapas principais, descritas por Magnan *et al.* (2005): formação de uma membrana dinâmica, ativação da membrana dinâmica com agente ligante (glutaraldeído) e imobilização enzimática (Figura 1).

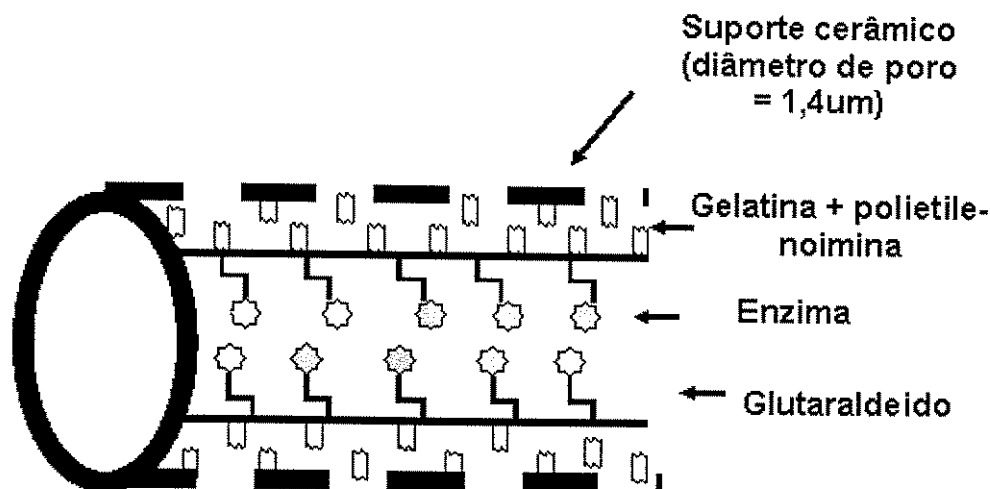


Figura 1. Representação esquemática da membrana enzimática.

Inicialmente a membrana foi hidratada através de filtração tangencial de água pura, com pressão transmembrana (ΔP) de 0,2MPa, velocidade tangencial de 2m/s e temperatura de 20°C, durante 30 minutos. A formação da membrana dinâmica no tubo cerâmico deu-se através da filtração tangencial da solução de gelatina/PEI (1:1 v/v) com 10g/L através da membrana. A solução de gelatina/PEI foi preparada em tampão carbonato 200mM (pH=9,2) sob as mesmas condições hidrodinâmicas utilizadas na etapa de hidratação. Moléculas de gelatina/PEI foram depositadas na superfície e nos poros da membrana por filtração tangencial sob forma de um filme fino, sendo compactado pela pressão. O excesso de gelatina foi eliminado e o suporte tubular foi colocado em posição vertical, tendo sua extremidade obstruída por uma rolha vedante. Para a sua ativação, a membrana foi completada com solução aquosa de glutaraldeído 4% (p/v), preparada com tampão de carbonato 200mM (pH=9,2), permanecendo em reação durante 60 min à temperatura ambiente. Após retirada do glutaraldeído, a membrana foi lavada com tampão carbonato para a remoção do excesso de glutaraldeído e completada com solução enzimática (diluída dez vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,8), a qual permaneceu durante 2 horas à temperatura ambiente, com o objetivo de imobilizar a enzima. Finalmente, a membrana enzimática foi submetida a um processo de secagem sob vácuo e P₂O₅ antes de sua utilização.

A membrana enzimática deve ser regenerada após utilização. A regeneração da membrana realizou-se através das seguintes etapas: filtração tangencial de solução de NaOH 2%(p/v) a 80°C, durante 20 minutos (5 min com $\Delta P = 0$ e 15 min com $\Delta P = 0,2\text{MPa}$), recirculação com água até total neutralização, filtração tangencial de solução de HNO₃ 2%(p/v) a 60°C, durante 20 minutos (5 min com $\Delta P = 0$ e 15 min com $\Delta P = 0,2\text{MPa}$) e nova recirculação com água até total neutralização. Após a regeneração, a membrana permaneceu acondicionada em meio aquoso de azoteto de sódio (0,02%) até próxima imobilização enzimática.

2.4 Reação de interesterificação entre TCM e EEAGCL

Os experimentos de interesterificação enzimática entre TCM e EEAGCL foram realizados com razão molar de 1:4 e temperatura de 60°C, tendo sido realizados em equipamento piloto de filtração de altas pressões, esquematizado na Figura 2.

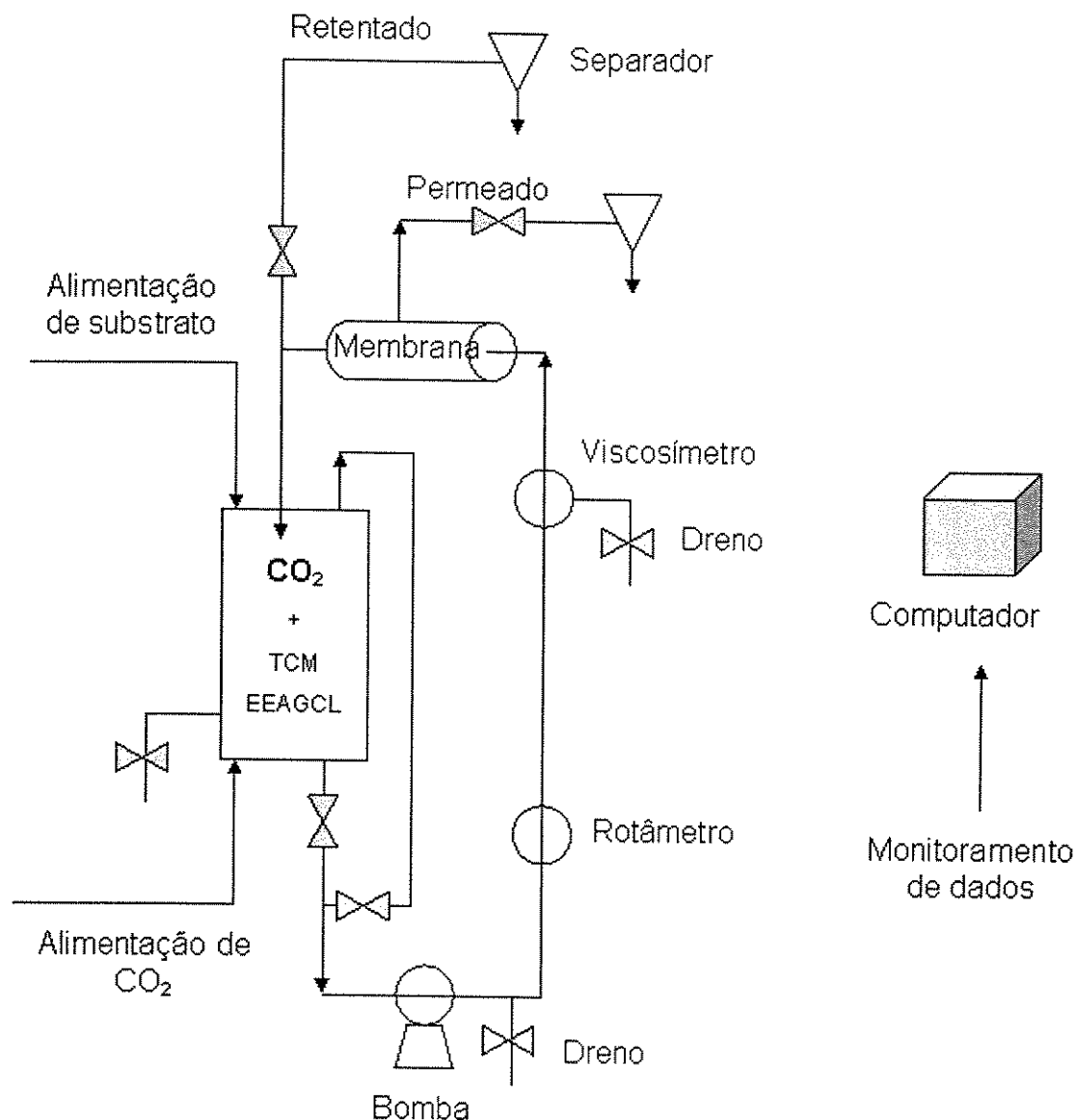


Figura 2. Representação do equipamento utilizado nos ensaios de interesterificação enzimática.

O equipamento utilizado era composto de três partes distintas: zona de alimentação de substratos e CO₂ sob pressão, sistema de filtração e uma zona de recuperação de permeado e retentado. O sistema de filtração é composto de um tanque de alimentação, bomba de circulação (Micro Pump, SK 5000), rotâmetro Coriolis (Fisher Rosemount, Elite RFT 9739), viscosímetro (Sofraser, Mivi 6001) equipado com sonda de temperatura PT100 e membrana em "housing" sob temperatura controlada. Os separadores permitem a coleta de amostras de

retentado e permeado. O sistema é monitorado por inúmeros sensores, estando conectado a um computador capaz de registrar as medidas fornecidas pelos sensores através de um programa de aquisição de dados (Horus 32).

A mistura de substratos (TCM + EEAGCL) e CO₂ foi introduzida no tanque de alimentação sob temperatura de 60°C e PCO₂ inicial de 6MPa e circulada no sistema de filtração a fim de solubilizar a mistura reacional e CO₂. A pressão transmembrana foi mantida em zero até a estabilização da densidade e viscosidade da mistura reacional (fração lipídica + CO₂), indicando que a mesma atingiu o equilíbrio. Ajustou-se o equipamento para a mais baixa pressão transmembrana (0,05MPa) permitida pelo equipamento, para iniciar-se o experimento propriamente dito. O retentado foi recirculado no tanque de alimentação, sendo avaliadas as PCO₂ de 6, 12 e 18MPa. O experimento foi finalizado com o retorno da pressão CO₂ para 6MPa, sendo a pressão transmembrana incrementada para 0,2MPa devido à necessidade de manter o fluxo de permeado constante. Para cada pressão de CO₂ avaliada foram coletados em média três permeados e um retentado.

2.5 Separação dos lipídios estruturados obtidos do meio reacional

A separação do LE obtido realizou-se através da cromatografia de camada delgada, utilizando-se placas analíticas de sílica. Através da utilização da fase móvel hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1 v/v) obteve-se a separação entre o LE obtido e os demais componentes presentes no meio reacional, com a seguinte ordem de eluição: ésteres, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e diacilgliceróis (CHRISTIE,1982).

2.6 Composição do lipídio estruturado

Determinou-se a composição em ácidos graxos para verificar-se a incorporação dos AGCL nos TCM. A composição em ácidos graxos (ISO5508:1990) foi realizada sob as seguintes condições de análise: cromatógrafo Carbo Erba, modelo GC 8000; coluna capilar Innowax (30m x 0,25mm x 0,25µm, Supelco), 100% polietileno; temperatura de forno: 80°C – 2 min, 80 - 225°C a 5°C/min; 225°C – 15min; gás de arraste: He; fluxo da coluna – 2mL/min; injetor – 250°C; detector – 270°C; split – 1:100, preparação de ésteres metílicos através da NF T60-223 de Maio de 1997.

3 Resultados

3.1 Caracterização da matéria-prima utilizada como substrato para a produção dos lipídios estruturados

A Tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos do triacilglicerol de cadeia média utilizado (TCM).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos dos TCM

Ácido graxo	%
Capróico (C 6:0)	0,01
Caprílico (C8:0)	39,45
Cáprico (C10:0)	59,64
Láurico (C12:0)	0,89

Na tabela 2 é apresentada a composição em ácidos graxos dos ésteres etílicos de ácidos graxos de óleo de peixe.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos dos ésteres etílicos.

Ácido graxo	%
Láurico (C12:0)	0,12
Mirístico (C14:0)	6,60
Pentadecanóico (C15:0)	0,89
Palmitico (C16:0)	16,97
Palmitoléico (C16:1)	6,87
Hexadienóico (C16:2)	1,55
Margárico (C17:0)	0,83
Margaroléico (C17:1)	1,36
Esteárico (C18:0)	4,11
Oléico (C18:1n9)	12,80
Linoléico (C18:2n6)	1,59
γ -linolênico (C18:3n6)	0,34
Linolênico (C18:3n3)	1,12
Estearidônico (C18:4)	3,38
Araquídico (C20:0)	0,44
Gadoléico (C20:1n9)	1,79
Araquidônico (C20:4n6)	0,91
(C20:4n3)	0,81
Eicosapentanóico (C20:5n3)	15,12
Cetoléico (C22:1)	1,12
Docosapentaenóico (C22:5n3)	1,90
Docosaheptaenóico (C22:6n3)	17,97
Outros	1,41

3.2 Interesterificação enzimática em meio fluidificado por CO₂SC

Na interesterificação enzimática realizada no equipamento piloto de filtração de altas pressões avaliaram-se três PCO₂: 6, 12, 18MPa. A pressão transmembrana constitui-se num parâmetro muito importante, pois a mesma determina o tempo de permanência da mistura reacional nos poros da membrana, ou seja, o fluxo de permeado. Consequentemente, utilizou-se a mais baixa pressão transmembrana permitida (0,05MPa) para o referido sistema. A cinética de interesterificação foi avaliada através da incorporação de EEAGCL nos TCM.

Através da Figura 3 verifica-se o efeito visco-redutor do CO₂ sobre a mistura reacional (fração lipídica + CO₂) em função de diferentes PCO₂. Os resultados evidenciam uma considerável fluidificação da mistura reacional em função do incremento da PCO₂, podendo-se observar uma redução de 72% na viscosidade entre a PCO₂ de 6 e 18MPa. Segundo Castro, Valcárcel, Tena (1994), em uma temperatura fixa, o poder solvente do CO₂ aumenta com o incremento da pressão, favorecendo maior solubilização na mistura reacional e consequente redução na viscosidade. Este efeito é mais pronunciado na região imediatamente superior a pressão crítica.

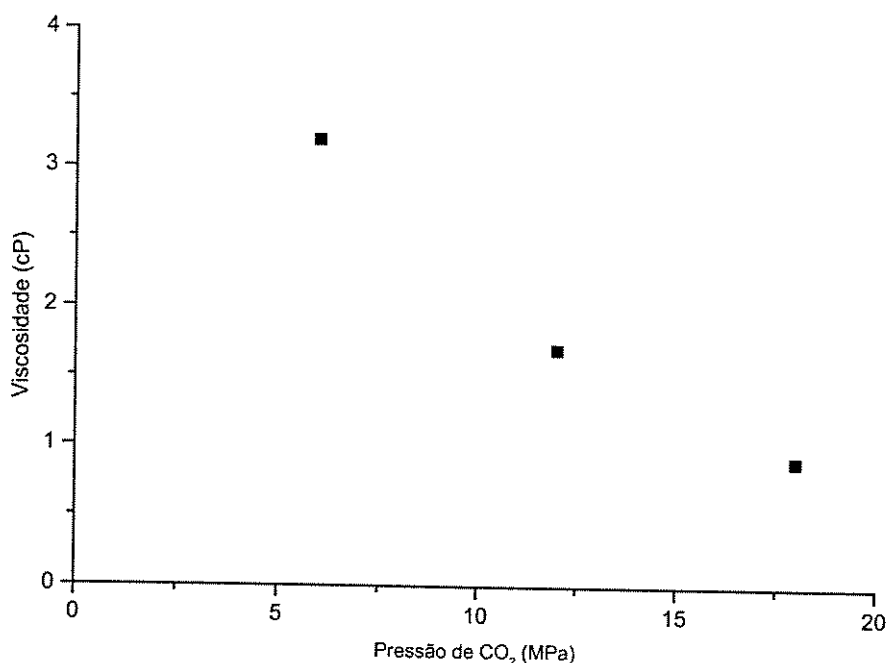


Figura 3. Evolução da viscosidade da mistura reacional em função da PCO₂.

A Figura 4 apresenta os fluxos de permeado ao longo do experimento em função de diferentes pressões de CO₂. Verifica-se uma discreta redução no fluxo inicial de permeado, o que pode estar relacionado com a compactação da membrana ativa ou com a colmatagem pela fração lipídica permeada. O experimento foi conduzido sob pressão transmembrana de 0,05MPa, exceto para o retorno da PCO₂ de 6MPa, onde foi necessário aumentá-la para 0,2MPa para a manutenção de fluxo de permeado constante. A redução no fluxo de permeado verificada com a redução da PCO₂ de 18 para 6MPa pode estar relacionada com a redução da quantidade de CO₂ solubilizada na mistura reacional e consequente aumento na viscosidade da mistura ou com a colmatagem ocorrida ao longo do experimento. Avaliando-se a curva de fluxo de permeado em função da PCO₂, verifica-se que o incremento da PCO₂ de 6 até 18MPa não conferiu o aumento no fluxo de permeado esperado, evidenciando a ocorrência da colmatagem e/ou compactação ao longo da filtração, fato que impede a verificação do aumento do fluxo de permeado em função do aumento da PCO₂.

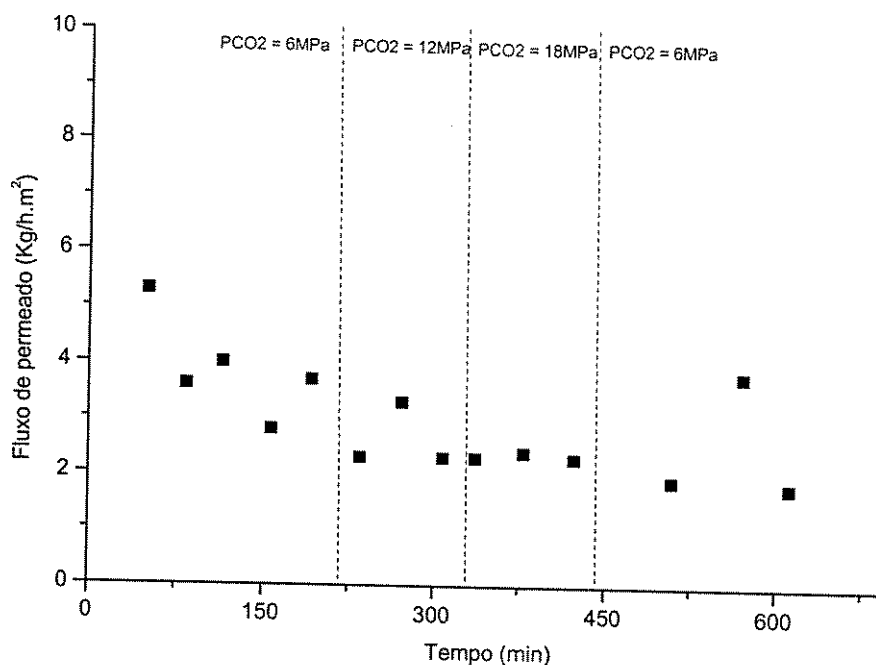


Figura 4. Fluxo de permeado em função de diferentes pressões de CO₂.

A Figura 5 mostra a influência das diferentes PCO₂ sobre a cinética de interesterificação. Valores mínimos de interesterificação foram observados para a PCO₂ de 6 e 12MPa. No entanto, para PCO₂ de 18MPa, verificou-se um elevado aumento na cinética de interesterificação.

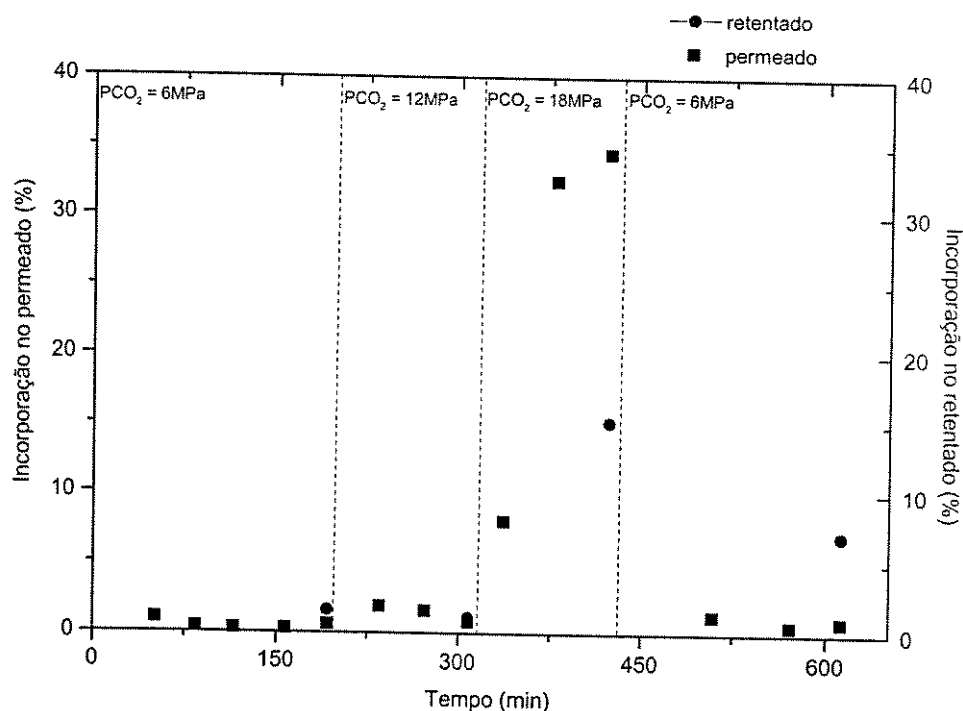


Figura 5. Cinética de interesterificação no permeado e retentado.

A densidade na região supercrítica aumenta consideravelmente com o aumento da pressão, à temperatura constante. Em função do aumento da densidade do CO₂, ou seja, maior solubilização, as distâncias intermoleculares são reduzidas, favorecendo o aumento nas interações específicas entre solutos e solventes e conferindo benefícios ao poder solvente do fluido supercrítico (CASTRO *et al.*, 1994). Além de refletir na densidade e viscosidade da mistura reacional, o incremento na PCO₂ pode também agir mecanicamente sobre a superfície da membrana. O mesmo fenômeno foi verificado na cinética de interesterificação no retentado. A maior incorporação verificada no retentado final, quando retornou-se para PCO₂ de 6MPa, deveu-se ao fato do retentado ter sido permanentemente recirculado, principalmente depois da utilização da PCO₂ de 18MPa, quando se observou maior cinética de incorporação. Em função da maior incorporação dos EEAGCL no permeado (34%) e retentado (15%) obtidos a PCO₂ de 18MPa, confirmou-se a predominância da reação de interesterificação nos poros da membrana, indicando maior facilidade de contato entre substratos e

enzimas. A permeação da mistura reacional pela membrana favoreceu o contato com as enzimas na região porosa, onde a relação superfície/volume é mais elevada.

Pomier (2004) verificou comportamento semelhante na investigação do efeito da PCO₂ sobre a interesterificação de óleo de mamona e oleato de metila. Foram avaliadas PCO₂ de 6, 8, 10, 12, 14 e 16MPa, tendo sido observada uma redução na cinética de incorporação (6 - 8MPa), permanência num valor mínimo (10 - 12MPa) e recuperação da cinética de incorporação a partir de 12MPa. Este comportamento ocorreu tanto no permeado como no retentado. Através da análise de retentados e permeados, quanto à presença de ricinoleato de metila, verificou-se que a reação enzimática aconteceu predominantemente nos poros da membrana, onde o contato entre enzimas e substratos é favorecido em relação à superfície da membrana. Durante 25h, a atividade de conversão da enzima imobilizada foi de aproximadamente 30% no permeado e 16% no retentado. A hipótese da existência de um fenômeno de dessolubilização dentro dos poros pode ser uma possível explicação para o efeito da PCO₂ sobre a cinética de interesterificação. Considera-se a mistura reacional (CO₂+ fração lipídica) uma mistura pseudo-homogênea no sistema de circulação. No entanto, questionam-se quais as condições vigentes no interior dos poros. Uma possível queda de pressão dentro dos poros, ocasionada pela diminuição da área de escoamento na sua entrada, pode provocar uma dessolubilização do CO₂, dando origem a uma mistura bifásica na entrada e dentro dos poros, fato este que pode dificultar o contato dos substratos com a enzima. Considerando a hipótese de dessolubilização, o aumento da PCO₂ de 6 para 12MPa, pode ter conferido maior dessolubilização do CO₂ nos poros devido a maior quantidade de CO₂ solúvel no meio reacional. Aumentando-se a PCO₂ acima de 12MPa, atingiu-se o coeficiente máximo de solubilização de CO₂ no retentado, o que pode ter estabilizado o comportamento da mistura reacional, evidenciado pela retomada na cinética de interesterificação.

3.3 Composição do LE obtido na interesterificação

O lipídio estruturado obtido a 18MPa, após prévia separação em placas cromatográficas, foi analisado quanto a sua composição em ácidos graxos (Figura 6).

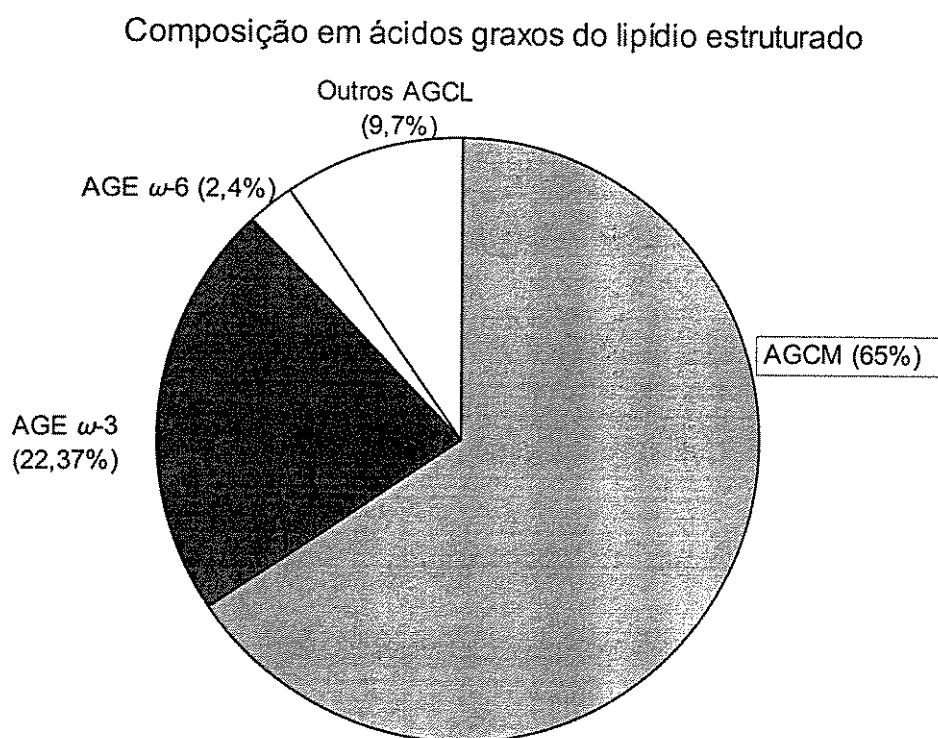


Figura 6. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado.

O lipídio estruturado obtido com a utilização da PCO₂ de 18MPa apresentou um teor de 24,7% de AGE e de 65% de AGCM, o que confere a este lipídio características de fornecimento de energia de rápida absorção e fornecimento de ácidos graxos essenciais, através dos ácidos graxos da série ω -6 (ácido linoléico e ácido araquidônico) e da série ω -3 (ácido linolênico, EPA, DPA e DHA).

4 Conclusão

O presente trabalho corrobora com o estudo de viabilidade da associação do sistema de reator de membrana e fluidificação da mistura reacional pelo CO₂SC quanto às reações enzimáticas de matrizes lipídicas. O CO₂SC apresentou extrema importância na cinética de interesterificação, influenciando as características de viscosidade da mistura reacional e o comportamento da mistura reacional dentro dos poros. Para as PCO₂ de 6 e 12MPa verificou-se, possivelmente, o fenômeno de dessolubilização do CO₂SC dentro dos poros, tendo o aumento da PCO₂ de 12 para 18MPa favorecido a cinética de incorporação. Estudos com maior variedade de PCO₂ devem ser realizados para verificar se PCO₂ inferiores a 6MPa favorecem a reação de interesterificação como observado com a utilização da PCO₂ de 18MPa. Dentre as condições de PCO₂ avaliadas, a pressão de 18MPa conferiu incorporação máxima de 34,5% de EEAGCL nos TCM, produzindo um lipídio estruturado contendo 24,7% de ácidos graxos essenciais. Considerando o reduzido tempo na passagem dos substratos pelos poros da membrana, região onde ocorre maior cinética de interesterificação, o referido sistema apresentou resultados bastante promissores.

5 Bibliografia

- AKOH, C. S. Structured Lipids. In: **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. Ed Akoh, C. C; MIN, D. B. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.
- BALCÃO, V. M; MALCATA, F. X. Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes pool of fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 511-519, 1998.
- CASTRO, M.D.L.; VALCÁRCEL, M.; TENA, M.T. **Analytical Supercritical Fluid Extraction**. Springer – Verlag, Berlin, 1994, 321p.
- CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. 2^a ed, Pergamon Press, Oxford, England, 1982.
- GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 1535-1549, 1999.

HILAL, N.; NIGMATULLIN, R.; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**. v. 238, p. 131-141, 2004.

IWASAKI, Y. e YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129-140, 2000.

LOZANO, P. *et al.* Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. **Journal of Membrane Science**. v. 201, p. 55-64, 2002.

MAGNAN, E. *et al.* Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. **Journal of Membrane Science**. v. 241, p. 161-166, 2004.

MOURA, J. M. L. N de *et al.* **Otimização da síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos ω -3 como substrato para obtenção de lipídios estruturados específicos.** In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife - PE. Anais do XIX CBCTA, 2004.

POMIER, E. **Etude d'un nouveau réacteur combinant enzymes, membrane et CO₂ supercritique: Application au biofaçonnement d'huiles vegetales.** Tese de Doutorado em Engenharia de Processos. Université de Montpellier II. Montpellier, França, 2005.

POMIER, E. *et al.* A new reactor design combining enzyme, membrane and SCCO₂: application to castor oil modification. **Journal of Membrane Science**. V. 249, p. 127-132, 2005.

PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 738-750, 1994.

RIOS, G. M. *et al.* Progress in enzymatic membrane reactors – a review. **Journal of Membrane Science**. v. 242, p.189-196, 2004.

RUCKA, M.; TURKIEWICZ, B. Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, p. 52-55, 1990.

SWAISGOOD, H.E. Immobilized Enzymes: Applications to bioprocessing of food. In: **Food Enzymology**. v. 2. Ed. Fox, P. F. Elsevier Applied Science, Essex, p.309-343, 1991.

CAPÍTULO IX

USO DE CO₂SC E MEMBRANA PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPÍDIO ESTRUTURADO

Uso de CO₂SC e membrana para extração e purificação de lipídio estruturado

Resumo

Fluidos supercríticos (FSC) são substâncias que se encontram acima de sua pressão e temperatura críticas apresentando propriedades físico-químicas intermediárias às dos líquidos e gases, tornando a extração por FSC (EFSC) bastante atrativa em relação às extrações por solventes orgânicos. O dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC) apresenta diversas vantagens quando utilizado nos processos alimentícios, farmacêuticos e bioquímicos. A extração e purificação de matrizes lipídicas através de CO₂SC beneficiam-se da possibilidade de ajustes nas suas propriedades de solvatação através do controle de parâmetros de pressão e temperatura, permitindo a obtenção de extrações seletivas. A associação do processo de EFSC ao processo de separação por membranas permite a integração da reação de extração, favorecida pelo alto poder solvente do CO₂SC, com a separação seletiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (CO₂SC + solutos extraídos). Esta associação permite uma importante economia energética quanto aos custos de recompressão do CO₂SC. Lipídios estruturados (LE) são triacilgliceróis modificados química ou enzimaticamente, normalmente contendo ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e ácidos graxos essenciais (AGE), apresentando alto valor nutricional. Seus processos de obtenção, transesterificação ou acidólise, geram como subprodutos ésteres de ácidos graxos ou ácidos graxos livres que devem ser removidos do meio reacional para a obtenção do LE purificado. A purificação de LE tem sido realizada através de destilação convencional ou molecular, utilizando temperaturas de evaporação que podem atingir 270°C. O presente trabalho visou à purificação do LE através da extração por CO₂SC dos subprodutos do meio reacional e retenção seletiva do LE através de membrana de osmose reversa. Foram avaliadas diferentes pressões de CO₂ (9, 11 e 13MPa) e pressões transmembranas (1, 2, 3 e 4MPa)

quanto à seletividade na extração da fração lipídica e retenção dos triacilgliceróis pela membrana. Os experimentos foram conduzidos a 40°C.

Palavras – chave: Extração, fluido supercrítico, membrana, lipídio estruturado.

1 Introdução

Fluidos supercríticos são substâncias que se encontram sob condições críticas de pressão e temperatura, ou seja, acima de sua pressão e temperatura críticas (BRUNNER, 2005). Temperatura crítica (T_c) é a máxima temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido por incremento da pressão e pressão crítica (P_c) é a máxima pressão na qual um líquido pode ser convertido em gás por incremento da temperatura (TAYLOR, 1996).

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gás; apresentando densidade próxima à dos líquidos, viscosidade próxima à dos gases, difusividade duas vezes maior que a típica dos líquidos, alta compressibilidade e baixa tensão superficial (BRUNNER, 2005; LIM *et al.*, 2002).

As vantagens do uso de extrações por FSC em relação aos solventes orgânicos são: a baixa viscosidade e alta difusividade dos FSC que melhoram a transferência de massa em matrizes sólidas e líquidas, reduzindo o tempo total de extração; nas extrações podem ser utilizados sob temperaturas brandas, conferindo maior proteção oxidativa aos compostos termo-sensíveis; suas propriedades de solvatação podem ser modificadas através do ajuste da pressão e temperatura, tornando possível extrações seletivas; podem ser facilmente removidos do produto extraído através de sua descompressão; são considerados seguros para o meio ambiente e não geram resíduos químicos (ANDERSSON *et al.*, 1997).

O dióxido de carbono (CO₂) é o FSC mais utilizado como solvente em aplicações alimentícias. Não apenas pelo seu baixo custo e disponibilidade em alto grau de pureza, mas também em função da facilidade e segurança em sua manipulação, bem como da sua segurança fisiológica quando presente em pequenas quantidades nos alimentos processados, já que o mesmo é facilmente removido através de simples despressurização do sistema. Consequentemente, o dióxido de carbono supercrítico (CO₂ SC) é aprovado para o processamento de alimentos sem necessidade de declaração (BRUNNER, 2005).

A aplicação da tecnologia de fluidos supercríticos (FSC) no processamento de óleos e gorduras tem surgido como uma alternativa aos processos de extração e purificação de matrizes lipídicas envolvendo solventes orgânicos. A extração e purificação de compostos lipídicos, como triacilgliceróis, ácidos graxos livres, tocoferóis, carotenóides, esteróis, através do CO₂SC tem sido investigada por diversos autores, bem como a influência dos parâmetros operacionais utilizados, temperatura e pressão de CO₂, sobre a seletividade da extração (BRUNETTI *et al.*, 1989; ANDERSON *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2005a; GAST *et al.*, 2005, CAO e ITO 2003; LIM *et al.*, 2002).

O interesse na aplicação de membranas em tecnologias de lipídios tem crescido bastante nos últimos anos. As aplicações geralmente melhoram o processo de produção, simplificando-o, reduzindo o consumo de energia e diminuindo a produção de águas residuais, com a possibilidade de não adição de produtos químicos e de fácil mudança de escala (SNAPE e NAKAJIMA, 1996).

A associação do processo de extração por FSC à separação por membranas permite a integração da reação de extração pelo CO₂SC (favorecida pelo alto poder solvente do CO₂SC) e separação seletiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (CO₂SC + solutos extraídos). A combinação do sistema CO₂SC/membrana confere melhoria ao desempenho da membrana e seletividade para a extração a fim de se obter frações extraídas com estreita faixa de massa molar (SARRADE *et al.*, 1998).

A separação de solutos no processo de extração por FSC realiza-se através de despressurização e/ou resfriamento, onde o fluido passa para sua forma gasosa e faz-se a coleta dos solutos extraídos. Os custos de recompressão do CO₂ gasoso para a fase líquida ou supercrítica são altos e a associação do processo de extração por FSC e separação por membranas permite a não expansão do fluxo do retentado a cada ciclo, resultando numa importante economia energética quanto aos custos de recompressão (SPRICIGO *et al.*, 2001; SARRADE *et al.*, 1998).

A associação de extração com CO₂SC e separação por membranas tem sido investigada no fracionamento de triacilgliceróis de óleo de peixe, visando à obtenção de um retentado rico em triacilgliceróis de alta massa molar, como ácidos graxos poliinsaturados ω -3; extração e purificação de carotenóides e separação de óleos essenciais (SARRADE *et al.*, 1998; CARLSON *et al.*, 2005; SPRICIGO *et al.*, 2001; SARMENTO *et al.*, 2004).

Lipídios estruturados (LE) são definidos como triacilgliceróis (TG) modificados, química ou enzimaticamente, em sua composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula do glicerol. A estrutura molecular dos TG influencia o seu metabolismo no organismo (digestão e absorção) e suas características físicas (ponto de fusão). Consequentemente, através da síntese de LE, com estruturas químicas particulares, é possível controlar o comportamento dos TG e, desse modo, melhorar suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (IWASAKI e YAMANE, 2000).

A obtenção de lipídios estruturados através da acidólise de triacilgliceróis ou através da transesterificação entre triacilgliceróis e ésteres de ácidos graxos produz uma mistura reacional composta de triacilgliceróis, contendo os lipídios estruturados desejados, ácidos graxos e/ou ésteres. Os ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos podem ser removidos do meio reacional através de destilação molecular, para ambos, ou extração alcalina para os ácidos graxos (IWASAKI e YAMANE, 2000). O teor de subprodutos liberados pela reação de

interesterificação depende do grau de substituições alcançado, bem como da razão molar de substratos utilizada.

O benefício da ingestão do LE está relacionado com a composição e balanço adequado entre os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), ω -6, ω -3 e ω -9, podendo ser utilizado na redução dos níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e nível de triacilgliceróis, prevenção de trombose e melhoria na função imunológica (AKOH, 1998). Lipídios estruturados devem ser processados sob condições brandas de temperatura, não apenas devido à presença de ácidos graxos essenciais, mas também para se evitar a migração acila (XU *et al.*, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo purificar os lipídios estruturados obtidos por via enzimática através da extração com CO₂SC dos compostos liberados da reação de interesterificação (ésteres de ácidos graxos e ácidos graxos livres) e da retenção seletiva do lipídio estruturado através de membrana polimérica de osmose inversa. O sistema proposto permite a separação e purificação do lipídio estruturado através da utilização de baixa temperatura, conferindo excelente proteção contra a oxidação dos graxos poliinsaturados.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção do lipídio estruturado

2.1.1 Substratos

Os lipídios estruturados foram obtidos através da interesterificação enzimática entre triacilglicerol de cadeia média (TCM) –Trigliceril CM - Support e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EEAGCL) de óleo de peixe, com elevado teor de ácidos graxos essenciais, segundo condições descritas por Moura *et al.* (2004). Utilizou-se enzima Lipozyme IM TL, *sn*-1,3 específica, gentilmente cedida pela empresa Novozymes.

2.1.2 Reator de interesterificação

Os experimentos foram realizados em reator encamisado de interesterificação (capacidade de 2L), sob vácuo, temperatura de 60°C, agitação de 100 rpm, 5% de enzima (peso/substrato) e razão molar de substratos de 1:4 (TCM/EEAGCL). Foram utilizados 500 gramas de substratos em cada experimento.

2.1.3 Separação do lipídio estruturado

A separação do LE obtido realizou-se através da cromatografia de camada delgada, utilizando-se placas analíticas de sílica. Através da utilização da fase móvel hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1 v/v) obteve-se a separação entre o LE obtido e os demais componentes presentes no meio reacional, com a seguinte ordem de eluição: ésteres, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e diacilgliceróis (CHRISTIE,1982).

2.1.4 Avaliação química

Composição em ácidos graxos - método AOCS Ce 1-62 (2002). Condições de análise: Cromatógrafo CGC Agilent 6850 GC System. Coluna DB – 23 – Agilent (50% Cianopropil – metilpolisiloxano), 60m x 0,25mm x 0,20µm. Forno: 195°C – 20min; 195 – 215°C a 5°C/min; 215°C – 16min. Gás de arraste: He; fluxo da coluna – 1,0mL/min; injetor – 250°C; detector – 280°C; split – 1:50. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras e do padrão cromatográfico NU-CHEK GLC-87; Metilação - método AOCS Ce 2 -66 (2002).

2.2 Membranas

Foram avaliadas duas membranas de nanofiltração modelos DL e HL (Osmonics) e uma de osmose reversa modelo BW30 – DOW – poliamida quanto à

retenção de triacilgliceróis e permeação de ácidos graxos livres. As membranas foram submetidas a testes seletivos através da extração e filtração da mistura CO₂SC + fração lipídica (triacilgliceróis e ácidos graxos livres).

2.2.1 Condicionamento de membranas

Interações membrana-solvente e suas conseqüências sobre a permeabilidade de solventes têm sido investigadas em membranas poliméricas e cerâmicas por diversos autores (MACHADO *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2000, SHUKLA e CHERYAN, 2002; SOARES, 2004). As membranas HL e DL foram submetidas a testes seletivos sem nenhum tipo de condicionamento com solventes, apresentando uma boa permeabilidade frente à mistura (CO₂SC + fração lipídica). No entanto, a membrana BW-30 apresentou resistência à permeação da mistura CO₂SC + fração lipídica, indicando baixa afinidade entre o material da membrana (poliamida) e a referida mistura. Realizou-se um condicionamento na membrana BW-30 através de sua imersão em etanol (4 horas) seguida de imersão em hexano (4 horas). O condicionamento da membrana foi realizado com o objetivo de adaptar a membrana, de forma gradativa, às condições de hidrofobicidade da mistura CO₂SC + fração lipídica, através da imersão em etanol e, posteriormente, em hexano; solventes que apresentam polaridades de 12,7 e 7,3, respectivamente (HAWLEY, 1997).

2.3 Equipamento de extração e separação por FSC/membrana

Os experimentos foram conduzidos em uma unidade piloto, esquematizada na Figura 1.

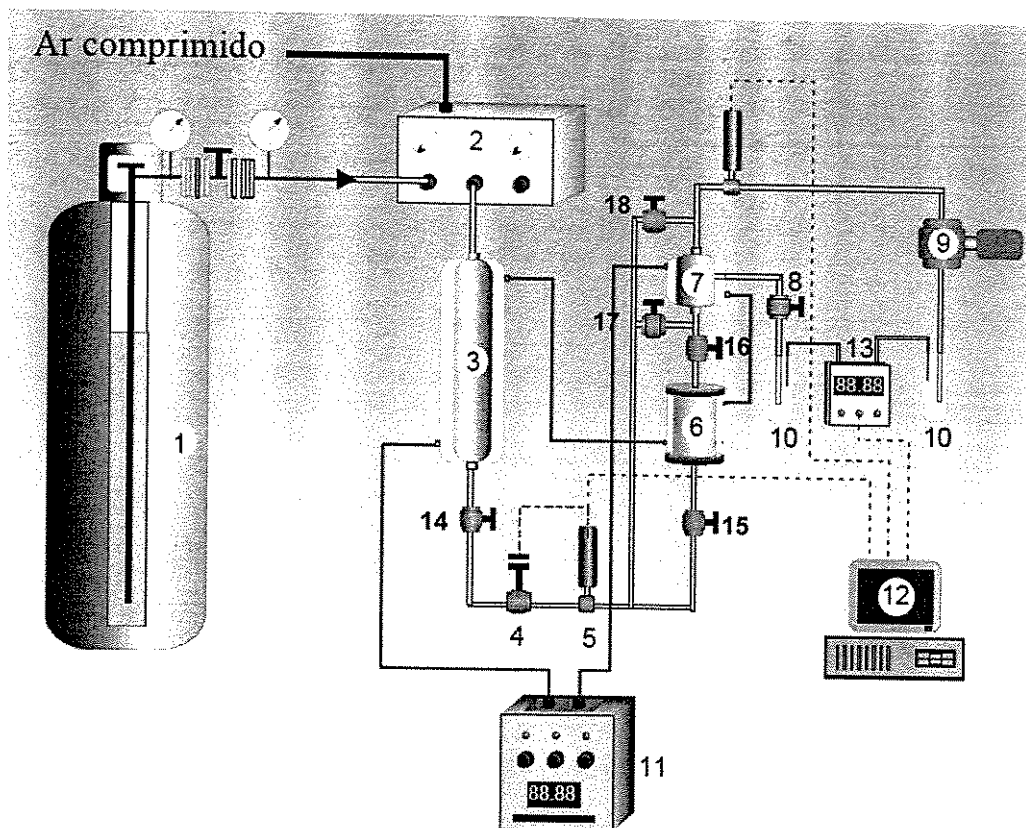


Figura 1. Unidade experimental. (1) Cilindro de CO₂, (2) Booster, (3) Tanque pulmão TP, (4) Válvula pneumática, (5) e (19) Transdutores de pressão, (6) e (7) Células, (8) Válvula micrométrica, (9) Válvula back-pressure, (10) Coletores, (11) Banho termostático, (12) Computador PC, (13) Medidor de fluxo (14), (15), (16), (17) e (18) Válvulas manuais.

Este esquema representa uma unidade piloto de extração e separação onde duas células (6) e (7) encamisadas e construídas em aço inoxidável com volume unitário de 30 cm³ e 2,3 cm de diâmetro interno estão dispostas em série. Como os experimentos não foram realizados com membranas colocadas em série, na célula (7) foram colocadas as membranas a serem testadas. A temperatura da célula foi mantida em 40°C pelo banho termostático (11). A membrana na célula (7) foi colocada sobre um suporte metálico perfurado e a vedação feita através de anéis de politetrafluoretileno. A área de filtração das membranas utilizadas foi de 3,14 cm² e utilizou-se o regime de fluxo *dead end* (perpendicular) durante os experimentos. A pressão operacional nas células foi monitorada pelo transdutor de pressão (5) (Modelo RTP12/BE53R, AEP, Itália) sendo controlada por uma válvula pneumática (4) tipo ar-abre/falha-fecha (Modelo 807, Badger Meter, EUA). A

pressão operacional no tanque pulmão (3) e nas células foi mantida pelo “booster” (2) (Modelo DLE 15-1, Maxpro, Alemanha). A temperatura no tanque pulmão foi mantida no mesmo valor da temperatura da célula através do banho termostático (11).

2.4 Procedimentos experimentais

Os testes de caracterização das membranas com relação ao fluxo de permeado de CO₂SC puro foram realizados quando a válvula (16) foi fechada, enquanto que as válvulas (15), (17) e (18) foram abertas para promover igual pressurização entre as faces da membrana. Depois de atingido o equilíbrio na pressão desejada, as válvulas (17) e (18) foram fechadas e a válvula (16) foi aberta. O diferencial de pressão sobre a membrana foi aplicado através da válvula tipo *back pressure* (9). O diferencial de pressão foi monitorado pelo transdutor de pressão (19) e a vazão de CO₂ foi obtida mediante um medidor de fluxo do tipo bolhômetro (13). Os diferenciais de pressão transmembrana (ΔP) aplicados foram de 1, 2, 3 e 4MPa e o fluxo correspondente de CO₂SC, para cada ΔP , foi medido até a obtenção de valores estáveis. A pressão de trabalho foi mantida em 13 MPa pelo booster (2), monitorada pelo transdutor de pressão (5) e controlada pela válvula pneumática (4). Os testes para a caracterização da membrana selecionada, com relação a sua capacidade de retenção de triacilgliceróis e permeabilidade ao CO₂SC, foram realizados com os mesmos equipamentos utilizados nos testes de fluxo do CO₂SC puro. Na célula (7) foram colocados 10mL do meio reacional (lipídio estruturado (TG) e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média e longa). As válvulas (15) e (16) foram fechadas e as válvulas (17) e (18) foram abertas. Uma vez estabelecido o equilíbrio da pressão entre as faces das membranas, a válvula (18) foi fechada e, da mesma forma que o procedimento para os testes de fluxo do CO₂SC puro, os diferenciais de pressão foram estabelecidos pela válvula *back pressure* (9) e monitorados pelo transdutor (19). As quantidades de óleo permeado foram medidas através da massa coletada

no separador (10). Estas medidas foram realizadas até a obtenção de fluxo constante através das membranas, o que durou aproximadamente 1 hora para cada ΔP aplicado. As medidas, tanto para caracterização da membrana com CO₂SC puro quanto para a mistura de CO₂SC e mistura reacional, foram tomadas a cada 15 minutos, exceto para o experimento conduzido sob $\Delta P = 0,7\text{MPa}$ e $\text{PCO}_2 = 9\text{MPa}$, onde a coleta de permeado foi feita a cada trinta minutos. Foram realizados experimentos com diferentes PCO_2 (9, 11 e 13MPa) e diferentes ΔP (1, 2, 3 e 4MPa). Todos os experimentos foram conduzidos a 40°C. Nestas condições, mesmo estabelecendo-se um diferencial de pressão de 4MPa, o solvente encontra-se em condições de pressão e temperatura superiores ao seu estado crítico (pressão crítica 73,8 bar e temperatura crítica 31,06°C) nas duas faces da membrana.

2.5 Análise dos permeados obtidos

A composição do permeado foi monitorada através da técnica de Cromatografia de Alta Performance por Exclusão de Tamanho (HPSEC) nas seguintes condições: duas colunas conectadas em série, Hewlett Packard – DVB (Polidivinilbenzeno), com diâmetros de poros de 100 e 500Å; detector de índice de refração (Differential Refractometer LCD 201 - SICON - ANALYTIC); bomba isocrática (Perkin-Elmer, série 10 - Liquid Chromatograph), injetor de 20μL e fluxo de fase móvel (Tetrahidrofurano) de 1mL/min (RUIZ-MENDEZ, MÁRQUEZ-RUIZ, DOBARGANES, 1997). O mecanismo de separação dos ésteres, através da técnica HPSEC, ocorre através da diferença de massa molar entre os compostos presentes no meio reacional, tomando-se como exemplo, a seguinte ordem de eluição: triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ésteres e ácidos graxos livres.

2.6 Retenção de triacilgliceróis

O fator real de retenção de triacilgliceróis pela membrana (α) foi calculado como indicado pela Equação 1:

$$\alpha = 1 - (C_{tp}/C_{tr}) \quad (1)$$

onde C_{tp} é a concentração de triacilgliceróis no permeado e C_{tr} é a concentração de triacilgliceróis no retentado.

3 Resultados

3.1 Testes seletivos de membranas

Foram realizados testes seletivos com três membranas em relação às suas capacidades de retenção de triacilgliceróis e permeação de ácidos graxos livres (Tabela 1). A mistura reacional utilizada nos testes seletivos das membranas apresentou a seguinte composição: 68% de triacilgliceróis, 16,8% de ácidos graxos de cadeia longa e 15% de ácidos graxos de cadeia média.

Tabela 1. Retenção de triacilgliceróis para os testes seletivos de membranas em meio a CO₂ denso

Membrana	Retenção de TG (%)	Pressão (MPa) retentado/permeado	ΔP (MPa)
DL	75	1,3/1,1	1,0
BW-30	91	1,3/1,0	1,5
HL	80	1,3/1,0	1,5

Os valores de retenção apresentados na tabela 1 são a média de quatro experimentos com duração de uma hora de extração e filtração. Utilizou-se PCO₂=13MPa e temperatura de 40°C.

O permeado coletado com uma hora de filtração, através da membrana BW-30, apresentou a seguinte composição centesimal: 3,99% de TG, 21,93% de AGCL e 74,0% de AGCM. A membrana apresentou uma excelente retenção de triacilgliceróis e permeação preferencial aos ácidos graxos presentes no meio reacional. Em função da maior retenção de TG apresentada, a membrana BW-30 foi selecionada para a continuação dos experimentos.

3.2 Composição da fração lipídica

A mistura reacional, obtida pela interesterificação enzimática entre TCM e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, apresentou a seguinte composição centesimal: 42,0% em TG (lipídio estruturado), 53,2% em ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa e 4,8% em ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média.

A Tabela 2 apresenta a composição em ácidos graxos do lipídio estruturado obtido através da interesterificação entre TCM e ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, durante 25 horas de interesterificação.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos do lipídio estruturado.

Ácido graxo	%
Capróico (C6:0)	0,52
Caprílico (C8:0)	20,98
Cáprico (C10:0)	9,39
Láurico (C12:0)	0,27
Mirístico (C14:0)	5,77
Pentadecanóico (C15:0)	0,70
Palmitico (C16:0)	13,61
Palmitoléico (C16:1)	5,75
Hexadienóico (C16:2)	0,47
Margárico (C17:0)	1,33
Margaroléico (C17:1)	0,77
Isoesteárico (C18:0 iso)	0,71
Esteárico (C18:0)	3,04
Oléico (C18:1n9cis)	9,78
Linoléico (C18:2n6)	1,47
γ-linolênico (C18:3n6)	0,09
Linolênico (C18:3n3)	0,86
Estearidônico (C18:4)	1,76
Araquídico (C20 :0)	0,33
Gadoléico (C20:1)	1,08
(C20:2n6)	0,19
Araquidônico (C20:4n6)	0,64
(C20:4n3)	0,43
Eicosapentanóico (C20:5n3)	11,28
Behênico (C22:0)	0,46
Cetoléico (C22:1)	0,18
C22:4n6	0,25
Docosapentaenóico (C22:5n3)	1,87
Docosahexaenóico (C22:6n3)	5,77

3.3 Caracterização da membrana através do fluxo de CO₂

A Figura 2 apresenta o fluxo de permeado de CO₂SC através da membrana BW-30 sob diferentes pressões transmembranas (1, 2, 3 e 4MPa) e PCO₂ de 13MPa. A pressão transmembrana foi aumentada (compressão) e depois reduzida (descompressão), observando-se a não ocorrência do fenômeno de histerese. Observa-se a dependência linear do fluxo de permeado de CO₂SC com a pressão transmembrana, indicando a não compactação da membrana com o aumento da pressão transmembrana de 1 a 4MPa. A permeabilidade da membrana ao CO₂SC foi de 27,8 Kg.h⁻¹m⁻².MPa⁻¹.

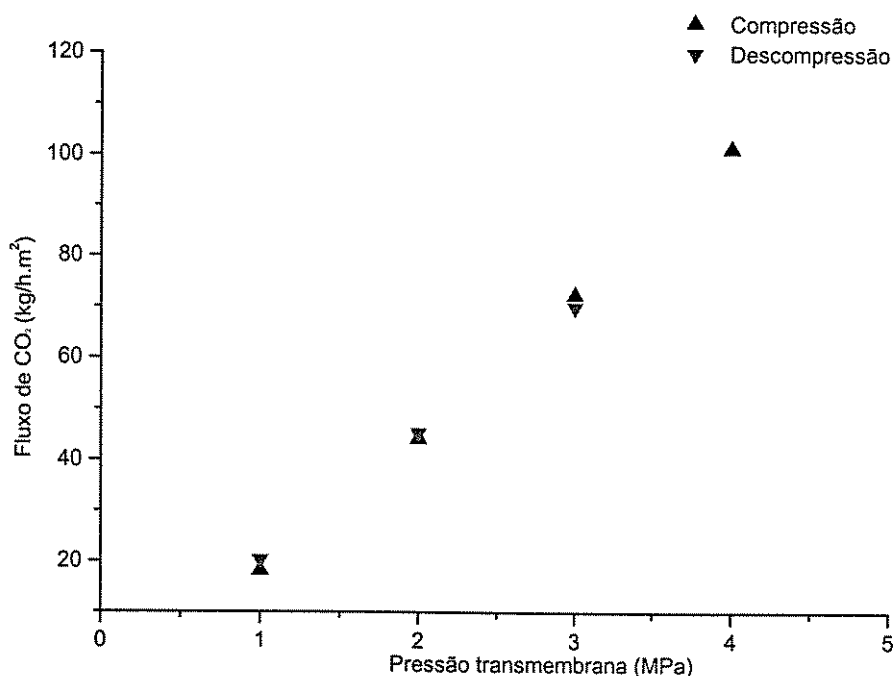


Figura 2. Fluxo de CO₂SC sob diferentes pressões transmembranas (PCO₂ = 13MPa, T = 40°C) ($y = 27,796x - 10,505$, $R^2 = 0,9994$)

3.4 Testes de retenção de triacilgliceróis

3.4.1 Diferentes pressões transmembranas

Na Figura 3 estão representados os fluxos de permeado de CO₂ e de lipídios sob diferentes pressões transmembranas. Como esperado, os incrementos na pressão transmembrana (1, 2, 3 e 4MPa) resultaram em aumentos nos fluxos de permeado de CO₂ e de lipídios.

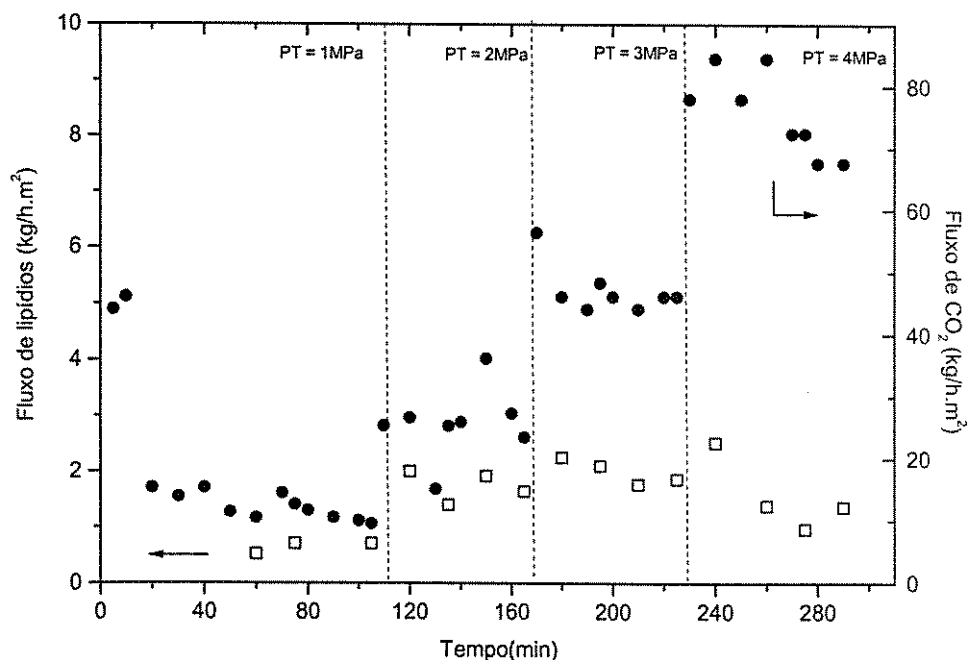


Figura 3. Fluxo de CO₂SC e de lipídios em função da pressão transmembrana (PCO₂ = 13MPa e T = 40°C).

A Figura 4 apresenta a retenção de triacilgliceróis em função da pressão. Verificou-se um aumento na retenção nos primeiros 105 min de filtração, que pode estar relacionado com a estabilização da membrana à permeação da mistura de CO₂ + fração lipídica. O incremento da pressão transmembrana de 1 até 4 MPa não apresentou efeito negativo na capacidade de retenção de triacilgliceróis da membrana no tempo de filtração avaliado para cada pressão transmembrana,

tendo a mesma apresentado um fator de retenção estável de aproximadamente 0,85.

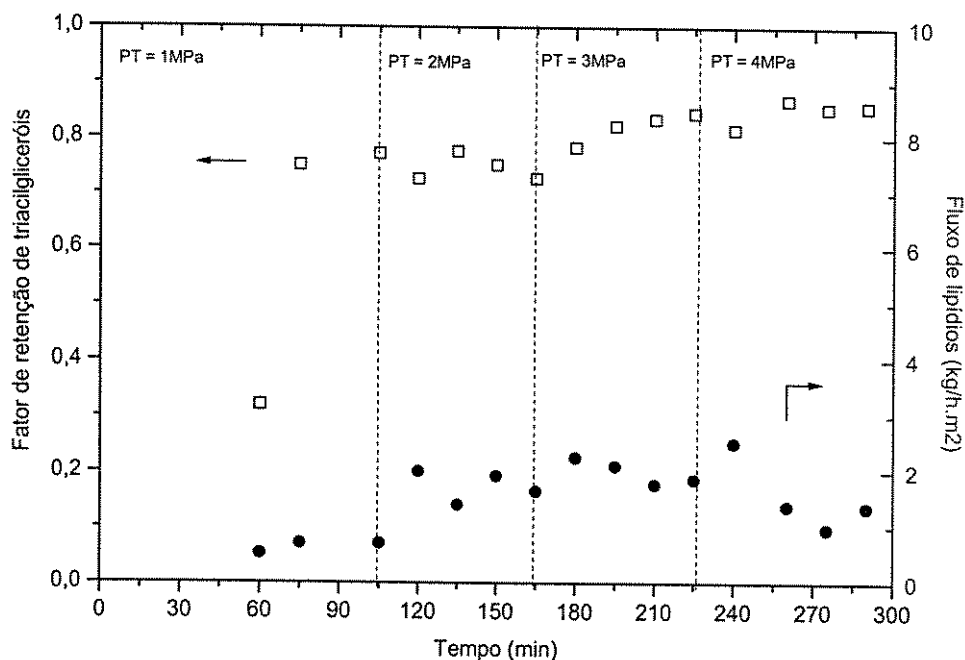


Figura 4. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios em função da pressão transmembrana ($PCO_2 = 13MPa$ e $T = 40^\circ C$).

3.4.2 Diferentes pressões de CO₂

A Figura 5 apresenta o fluxo de permeado de SO₂SC e de lipídios em função de diferentes pressões de CO₂ (9, 11 e 13MPa). O experimento foi conduzido sob pressão transmembrana de 1MPa e temperatura de 40°C. Verifica-se que os incrementos na PCO_2 de 9 até 13MPa ocasionaram uma maior extração dos componentes lipídicos e conseqüente redução no fluxo de permeado de CO₂. A densidade na região supercrítica aumenta consideravelmente com o aumento da pressão à temperatura constante. Em função do aumento da densidade de CO₂, as distâncias intermoleculares são reduzidas favorecendo o aumento nas interações específicas entre solutos e solventes, conferindo benefícios ao poder solvente do FSC (CASTRO *et al.*, 1994). Observa-se na Figura 5, como

consequência do aumento da PCO₂, o aumento do poder solvente do FSC, caracterizado por maior extração da fração lipídica.

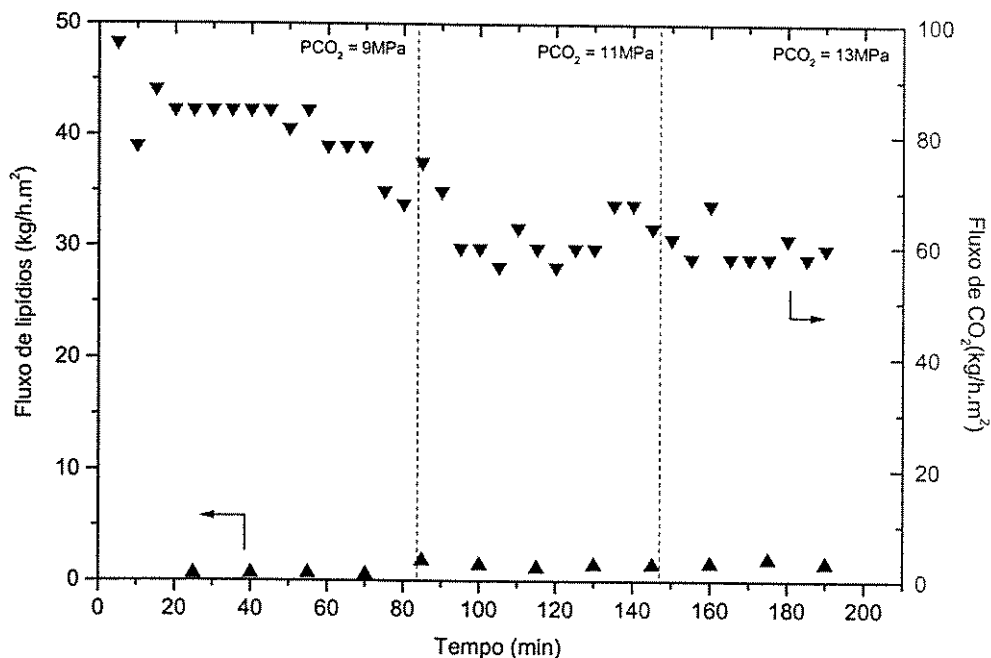


Figura 5. Fluxo de CO₂ e de lipídios sob diferentes pressões de CO₂ ($\Delta P = 10$ MPa).

A solubilidade de compostos orgânicos em CO₂SC é afetada fortemente pela polaridade, podendo alterar a seletividade do processo de extração. A solubilização em CO₂SC (apolar) é favorecida pela presença de insaturações, ramificações, eterificação e esterificação, sendo desfavorecida pelo aumento do número de átomos de carbono, presença de substituintes aromáticos, grupos hidroxílicos, carboxílicos e amínicos (grupos polares). A uma determinada temperatura, o poder solvente de um gás pode ser aumentado pelo aumento da pressão, sendo este aumento mais pronunciado na região imediatamente superior à pressão crítica (CASTRO *et al.*, 1994).

Observa-se na Figura 6 uma alteração na seletividade da extração dos componentes lipídicos em função das diferentes PCO₂ utilizadas. Verifica-se para baixas PCO₂ (levando-se em consideração o tempo de estabilização da membrana à permeação de CO₂SC + fração lipídica uma menor extração de triacilgliceróis e

maior extração de ésteres etílicos de cadeia longa e média. O incremento da PCO₂ de 1 até 4MPa ocasionou um aumento na solubilização da fração lipídica, caracterizada pelo aumento da extração de triacilgliceróis, alterando a seletividade da extração.

Brunetti *et al.* (1989) investigaram a desacidificação de óleo de oliva com elevada acidez através da extração por CO₂SC sob pressões de extração de 20 a 30MPa e temperaturas de 40 a 60°C, tendo relatado maior solubilidade dos ácidos graxos em CO₂SC em relação a seus respectivos triacilgliceróis, sob determinadas condições de temperatura e pressão (60°C e 20MPa).

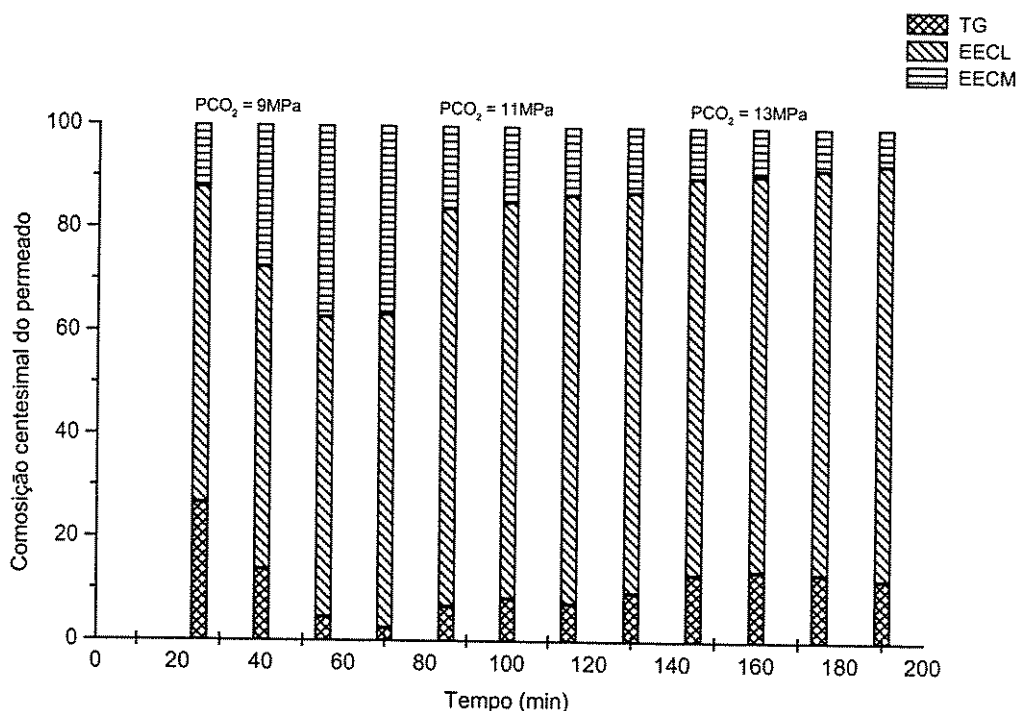


Figura 6. Composição centesimal dos permeados lipídicos obtidos sob diferentes PCO₂ ($\Delta P = 1\text{MPa}$ e $T = 40^\circ\text{C}$).

A Figura 7 apresenta o fator de retenção de triacilgliceróis em função das diferentes PCO₂ testadas. Para PCO₂ de 9MPa, verificou-se a estabilização da membrana à mistura de CO₂SC + fração lipídica e maior retenção de triacilgliceróis, estando a mesma associada a menor extração de triacilgliceróis.

Aumentando-se a PCO₂ de 9 até 13MPa, têm-se uma redução no fator de retenção de triacilgliceróis, associada a maior extração lipídica e perda na seletividade da extração.

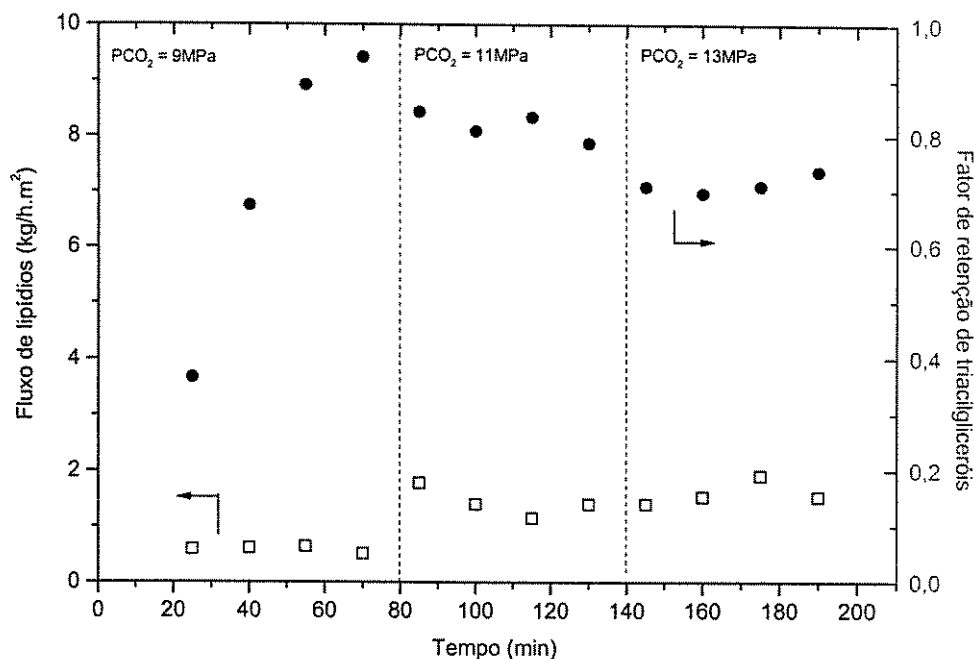


Figura 7. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios sob diferentes PCO₂ ($\Delta P = 1\text{MPa}$ e $T = 40^\circ\text{C}$).

3.4.3 Condições fixas de PCO₂ e ΔP

A fim de se verificar o comportamento da membrana durante um maior tempo de filtração realizou-se um experimento com PCO₂ de 9MPa (Fig. 8), escolhida em função da maior seletividade na extração da fração lipídica, ou seja, menor extração de triacilgliceróis (Fig. 6) e ΔP de 0,7 MPa, visando reduzir a perda de triacilgliceróis no período de estabilização da membrana à mistura CO₂ + fração lipídica e obter um fator de retenção de triacilgliceróis estável superior ao encontrado com pressões transmembrana superiores. Verificou-se na Figura 9 um fluxo de permeado de CO₂ e de lipídios bastante estável durante seis horas de extração e filtração, indicando uma boa resistência da membrana a colmatagem.

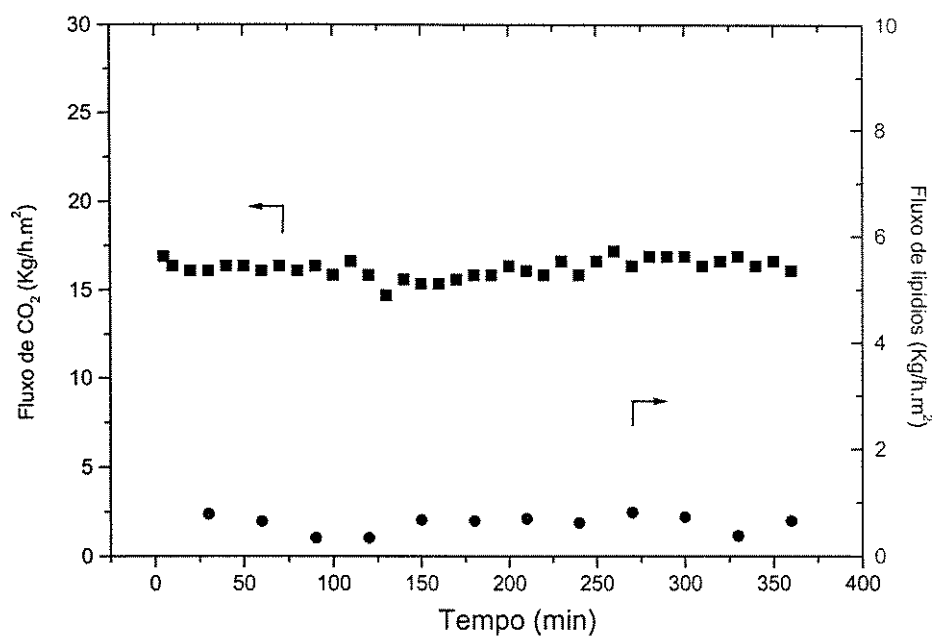


Figura 8. Fluxo de CO₂ e de lipídios sob PCO₂ de 9MPa e ΔP de 0,7MPa.

A utilização simultânea de baixa PCO₂ (9MPa) e baixo ΔP (0,7MPa) conduziu a valores máximos de retenção de triacilgliceróis, obtidos pela reduzida extração de triacilgliceróis pela PCO₂ de 9MPa e pela redução na permeação dos triacilgliceróis devido ao baixo ΔP utilizado (Figura 9). A membrana apresentou, nas primeiras horas de filtração, um fator de retenção médio de triacilgliceróis de 0,95, atingindo o fator máximo de 1 a partir de 3 horas de filtração. A obtenção do fator máximo de retenção de triacilgliceróis pela membrana não foi acompanhada de redução do fluxo de permeado de CO₂ nem do fluxo de permeado de lipídios, indicando boa resistência da membrana à colmatagem pelos solutos. Verificou-se a influência da estabilização da membrana à permeação da mistura de CO₂ + fração lipídica nas primeiras horas de filtração sobre a obtenção do fator estável de retenção de triacilgliceróis.

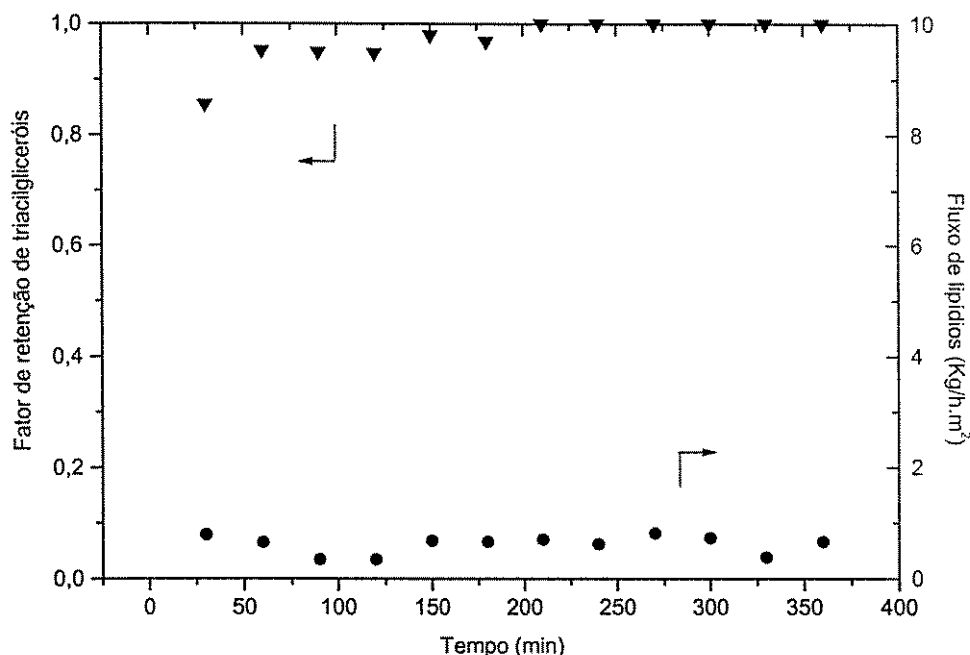


Figura 9. Fator de retenção de triacilgliceróis e fluxo de lipídios sob $PCO_2 = 9\text{MPa}$ e $\Delta P = 0,7\text{MPa}$.

4 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram a possibilidade de uso da membrana comercial de osmose reversa BW-30 na retenção de triacilgliceróis e permeação de ésteres de ácidos graxos e/ou ácidos graxos livres presentes no meio reacional (CO₂SC + fração lipídica). A membrana apresentou boa resistência às pressões utilizadas, tendo apresentado um período de estabilização à permeação do meio reacional de aproximadamente duas horas. A utilização de baixa pressão transmembrana conduziu a menores perdas na retenção de triacilgliceróis, levando a obtenção do fator de retenção máximo de triacilgliceróis. Incrementos na PCO_2 de 9 até 13MPa ocasionaram decréscimos no fator de retenção de triacilgliceróis devido ao aumento do poder solvente do CO₂, aumentando a solubilização dos solutos e ocasionando uma redução na seletividade da extração. O fator máximo de retenção de triacilgliceróis foi obtido através da utilização de baixa PCO_2 (9MPa), favorecendo a seletividade da

extração, e baixa pressão transmembrana (0,7MPa), reduzindo as perdas de triacilgliceróis nas primeiras horas de filtração. A membrana apresentou, no período de estabilização, um fator de retenção de triacilgliceróis médio de 0,95, atingindo valor máximo a partir de 3 horas de filtração. A utilização de baixa temperatura (40°C) na extração e purificação do lipídio estruturado confere boa proteção aos ácidos graxos poliinsaturados contra a oxidação e migração acila.

5 Bibliografia

- ANDERSSON, M. B. O; DEMIRBUKER, M.; BLOMBERG, G. Semi-continuous extraction/purification of lipids by means of supercritical fluids. **Journal of Chromatography A**. v.785, p.337-343, 1997.
- BRUNETTI, L. *et al.* Deacidification of Olive Oils by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 66, n.2, p. 209-216, 1989.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**. v. 67, p. 21-23, 2005.
- CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1021, p. 117-124, 2003.
- CARLSON, L. H. C.; BOLZAN, A.; MACHADO, R. A. F. Separation of D- limonene from supercritical CO₂ by means of membranes. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 143-147, 2005.
- CASTRO, M.D.L.; VALCÁRCEL, M.; TENA, M.T. **Analytical Supercritical Fluid Extraction**. Springer – Verlag, Berlin, 1994, 321p.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solutions: effect of membrane conditioning. **Journal of Membrane Science**, v. 198, p. 75-85, 2002.
- GAST, K. *et al.* Purification of tocopherols from edible oil. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 17-25, 2005.
- HAWLEY, G. G. **Condensed Chemical Dictionary**. New York: Litton Educational Publishing, Inc, 5ed. 1977.
- IWASAKI, Y. e YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, p. 129-140, 2000.

- LIM, G. *et al.* Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**. v. 11, p. 181-187, 2002.
- MACHADO, D. R.; HASSON, D.; SEMIAT, R. Effect of solvent properties on permeate flow through nanofiltration membranes. Part I: investigation of parameters affecting solvent flux. **Journal of Membrane Science**. v. 163, p. 93-102, 1999.
- MENDES, M. F. *et al.* Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids. **The Journal of the Supercritical Fluids**. v. 34, p. 157-162, 2005.
- MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) máxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**. 2005. **Article in press**.
- RUIZ-MÉNDEZ, M. V; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 549-554, 1997.
- SARMENTO, L. A. *et al.* Performance of reverse osmosis membranes in the separation of supercritical CO₂ and essential oils. **Journal of Membrane Science**. v. 237, p. 71-76, 2004.
- SNAPE, J.B.; NAKAJIMA, M. Processing of agricultural fats and oils using membrane technology. **Journal of Food Engineering**. v. 30, p. 1-41, 1996.
- SOARES, M. S. **Processamento de óleo de soja utilizando ultrafiltração em miscela na etapa de degomagem e na obtenção de lecitina**. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas/SP, 2004.
- SPRICIGO, C. B. *et al.* Separation of nutmeg essential oil and dense CO₂ with a cellulose acetate reverse osmosis membrane. **Journal of Membrane Science**. v.188, p. 173-179, 2001.
- Taylor, L. T. **Supercritical fluid extraction**. New York: Wiley-Interscience, p. 181, 1996.
- XU, X. *et al.* Purification and deodorization of structured lipids by short path distillation. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v. 104, p. 745-755, 2002.

Conclusão Geral

1. A obtenção de lipídios estruturados a partir de enzimas régio-específicas permite a obtenção de compostos com estruturas específicas de alto valor nutricional e com propriedades físicas peculiares. A reação de alcoólise mostrou-se viável para a produção de ésteres etílicos devido à possibilidade de utilização de temperaturas muito baixas, na faixa de 40°C. O processo proposto é uma alternativa tecnológica para óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, conferindo maior proteção oxidativa ao mesmo. A reação apresentou taxa de conversão máxima em ésteres etílicos de 95% (1% de NaOH, 36% de etanol anidro, 5 minutos de agitação a 600 rpm).
2. As reações de interesterificação entre TCM e EEAGCL, em reator em batelada, foram favorecidas por maior razão molar de substratos e utilização da enzima Lipozyme TL IM com atividades de água entre 0,30-0,43. A utilização de peneira molecular (10% p/p) conferiu discreto aumento no rendimento da incorporação de EEAGCL no TCM devido à absorção de parte da água liberada pela hidrólise no meio reacional.
3. A obtenção de LE em reator de membrana plana foi favorecida pela separação dos subprodutos da reação, no entanto, esta separação ocorreu lentamente, após 54 horas de reação. A incorporação obtida no tempo final de 102 horas foi de 70 e 57 % para a utilização de reator com e sem membrana, respectivamente. A composição em ácidos graxos do LE obtido em reator, com e sem membrana, foi significativamente diferente. Os teores de AGE ω -6 e ω -3 observados foram de 23,5 e 11,7%, respectivamente. No entanto, a razão entre os AGE ω -6/ ω -3 não apresentou variação significativa. O LE obtido constitui-se num produto diferenciado, com elevado teor de AGE ω -3, além de conter AGCM, fonte de energia de rápida absorção.

4. A utilização de reator de membrana (enzima imobilizada) e fluidificação por fluido supercrítico apresentou bons resultados sobre a cinética de incorporação de EEAGCL no TCM. A pressão de CO_2 apresentou influência determinante sobre a cinética de interesterificação. Dentre as condições de PCO_2 avaliadas, a pressão de 18MPa conferiu incorporação máxima de 34,5% de EEAGCL nos TCM, produzindo um lipídio estruturado contendo 24,7% de ácidos graxos essenciais. Considerando o reduzido tempo na passagem dos substratos pelos poros da membrana, região onde ocorre maior cinética de interesterificação, o referido sistema apresentou resultados bastante promissores.

5. A associação do processo de extração por fluidos supercríticos ao processo de separação por membranas conferiu excelentes resultados quanto à purificação do LE obtido através da permeação de ésteres de ácidos graxos liberados da reação e retenção dos triacilgliceróis modificados pela membrana de osmose reversa BW-30. A membrana apresentou, no período de estabilização, um fator de retenção de triacilgliceróis médio de 0,95, atingindo valor máximo a partir de 3 horas de filtração sob utilização de baixa pressão de CO_2 (9MPa) e baixa pressão transmembrana (0,7MPa). O sistema proposto permite a purificação dos LE a baixa temperatura (40°C) e com a utilização de solvente inerte, de fácil remoção da mistura reacional.