

OTIMIZAÇÃO DO pH E MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE DEGOMAGEM ENZIMÁTICA DO ÓLEO BRUTO DE MILHO UTILIZANDO A FOSFOLIPASE-A₂.

Rubia Mariana da Silva, Rafaela Menezes dos Passos, Marcela Cravo Ferreira, Mateus Ferreira de Souza e Klicia Araujo Sampaio.
Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, SP, Brasil.

Resumo

A degomagem de óleos brutos vegetais tem por objetivo remover compostos indesejáveis, como fosfolipídios, que causam o escurecimento, além de problemas durante o transporte e armazenamento dos óleos. Dentre os métodos existentes, a degomagem enzimática de óleos vegetais tem-se mostrado uma alternativa viável, pois se trata de um processo menos poluente e mais eficiente devido à especificidade da enzima em atuar diretamente na molécula de fosfolipídio. O objetivo deste trabalho foi avaliar o pH ótimo de atuação da fosfolipase PLA₂ (Rohalase PL-XTRA®), bem como realizar uma modelagem matemática da cinética da reação. Para isso, diferentes valores de pH (3,5; 4,0; 5,0 e 6,0) foram ajustados através do condicionamento químico e posteriormente avaliados durante o processo de degomagem enzimática. A eficiência da degomagem em diferentes pHs foi avaliada em função do teor residual de fósforo atingido no óleo degomado. O pH ótimo de atuação da enzima deu-se em 4,06 com redução de fósforo de 266,0 para 27,0 mg/kg. Em seguida, avaliou-se a cinética de degomagem enzimática com dados experimentais obtidos na literatura com parâmetros do processo semelhantes ao utilizado no presente trabalho. As equações referentes ao modelo exponencial e ao modelo obtido por Jiang et al. (2014) foram usadas para descrever a cinética de degomagem de óleo bruto de milho com a enzima PLA₂. Desta forma conclui-se que em um pH ótimo a enzima PLA₂ consegue atingir a sua maior eficiência diminuindo assim o seu teor de fósforo consideravelmente e a utilização de modelos matemáticos podem descrever o comportamento da degomagem com PLA₂ podendo assim ser utilizado para prever o seu comportamento em diferentes condições.

Palavras-chaves: degomagem enzimática; fosfolipases-A₂; óleo de milho bruto; modelagem matemática.

1. Introdução

O refino de óleos vegetais brutos visa a remoção de componentes indesejáveis minoritários, denominados fosfolipídios (gomas), que afetam a qualidade sensorial do óleo, tornando-o susceptível a precipitação de materiais sólidos que prejudicam o armazenamento e transporte (Jorge, 2009).

A remoção dos fosfolipídios ocorre durante a primeira etapa do refino, denominada degomagem. Fosfolipídios hidratáveis podem ser facilmente removidos através da degomagem aquosa, enquanto os não hidratáveis, sendo estes ácidos fosfatídicos complexados com metais divalentes, podem ser removidos com a redução do pH pela adição de solução de ácido cítrico através da degomagem ácida. Ambos os métodos fornecem teores de fósforo no óleo degomado que variam entre 3-150 mg/kg, entretanto a utilização de fosfolipases, processo denominado de degomagem enzimática, tem se destacado por ser um método bastante promissor no cenário mundial, pois além de ser capaz de atingir < 10 mg/kg de fósforo, apresenta maior rendimento e reduz drasticamente a geração de efluentes (Sampaio et al., 2015; Dijkstra, 2010).

Fosfolipases do tipo A₂, como a Rohalase PL-XTRA, atuam especificamente na hidrólise da molécula dos fosfolipídios na posição sn₂, resultando em liso-fosfolipídios e ácidos graxos livres. O caráter hidrofílico dos liso-fosfolipídios e lipossolúvel dos ácidos graxos contribuem para o maior rendimento do processo,

visto que com atuação da enzima os ácidos graxos não são arrastados com a goma, pois possuem maior afinidade pela fase óleo, e, portanto, permanecem na fase óleo (Schoot, 2015).

A degomagem pode ser otimizada quando o conjunto de variáveis que afetam a atividade da enzima for adequado a sua atuação ótima. O pH é uma dessas variáveis (Yang et al., 2008).

A modelagem matemática da cinética de reações auxilia em um melhor entendimento do processo, permitindo prever o efeito de mudanças nas condições da reação, bem como identificar mais facilmente os fatores de maior influência sobre a conversão. Além disso, contribui para a otimização do processo, simulações, aumento de escala e na economia de tempo e recursos (Godoy, 2019; Carvalho, 2011).

Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar o pH ótimo de atuação da fosfolipase PLA₂ (Rohalase PL-XTRA®), bem como avaliar a modelagem matemática da cinética da reação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

O óleo de milho bruto foi cedido pela empresa Cargill. A fosfolipase-A₂ (Rohalase PL-Xtra), doada pela AB enzymes. Realizou-se o ajuste do pH utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH) (14 %) e o ácido cítrico (30 %).

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização do óleo bruto de milho

O óleo foi caracterizado partir dos teores das diferentes classes de acilgliceróis (TAG, DAG e MAG), composição em ácidos graxos, acidez, elementos minerais (Ca, Mg, Fe e P), teor de umidade (Karl Fischer) e estabilidade oxidativa, todos seguindo os métodos oficiais da American Oil Chemist's Society (AOCS, 2009).

2.2.2. Condicionamento químico

Os valores de pH (3,5; 4,0; 5,0 e 6,0) estudados durante a degomagem enzimática foram obtidos durante o condicionamento químico do óleo de acordo com o método proposto por Sampaio et al. (2015). A medição do pH foi realizada com a inserção direta do eletrodo na goma. Avaliou-se a acidez e os elementos minerais do óleo degomado.

2.2.3. Estudo do pH ótimo para a degomagem enzimática utilizando a fosfolipase PLA₂

Mantendo-se constantes as variáveis de 50 mg/kg de enzima, 50 °C e 2 % de água, o processo de degomagem enzimática foi realizado posteriormente ao condicionamento químico seguindo o método proposto por Sampaio et al. (2015). Após a degomagem enzimática foi realizada a medição do pH da goma, e o teor de acidez e elementos minerais do óleo degomado.

2.2.4. Obtenção, ajuste e avaliação de modelos matemáticos para representar a cinética de degomagem enzimática em óleos vegetais

Para a obtenção de um modelo matemático que representasse a cinética de degomagem enzimática da fosfolipase-A₂ no óleo bruto de milho, primeiramente realizou-se uma busca na literatura de modelos já avaliados para situações semelhantes. Optando-se por trabalhos onde a enzima fosse uma fosfolipase- A₁ ou A₂, além disso, parâmetros como temperatura, pH e porcentagem de água também foram considerados importantes na escolha.

Os dados experimentais obtidos da literatura não estavam numericamente explícitos, sendo apresentados apenas na forma de gráficos. Logo, a extração dos dados a partir dos gráficos foi realizada com auxílio do programa de análise de dados WebPlotDigitizer. Para cada conjunto de dados obtidos realizou-se o ajuste com diferentes modelos matemáticos através de ferramentas disponíveis no Excel. O Excel apresenta uma série de modelos como: linear, exponencial, polinomial e logarítmica, possibilitando avaliar o que melhor descrevesse a reação em questão.

2.2.5. Ajuste do modelo cinético de degomagem enzimática do óleo bruto de milho através da fosfolipase-A₂

Após a escolha de um modelo matemático que melhor descrevesse a cinética de degomagem enzimática de dados da literatura de degomagem de óleos vegetais, e utilizando os dados experimentais dos teores iniciais e

finais de fósforo obtidos experimentalmente com a PLA₂ em óleo bruto de milho, foram obtidas as constantes do modelo, e uma previsão das curvas de degomagem.

3. Resultados

3.1. Caracterização físico-química do óleo bruto de milho

O óleo bruto de milho utilizado durante o projeto foi caracterizado e os dados estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados obtidos mostram que o ácido graxo linoleico (46,78%) e oleico (37,25%) são predominantes na matéria-prima. A acidez de 1,62 % representa um baixo teor de ácidos graxos livres, e encontra-se dentro do permitido pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 2009) para óleos brutos (2,0% em ácido oleico), enfatizando a boa qualidade do óleo. Em relação aos elementos minerais, o óleo bruto utilizado apresentou 266,0 mg/kg de fósforo.

O teor de umidade, sendo este um parâmetro que possibilita avaliar a qualidade e estabilidade do óleo resultou em 0,12 %. Freitas (2015) obteve valores similares de umidade para óleo bruto de milho. O valor do índice de estabilidade oxidativa (OSI – *Oxidative Stability Index*) de 19,35 h obtido para o óleo em estudo encontra-se dentro da variação (2,93 a 22,81 h) descrita por Freitas (2015).

Tabela 1. Caracterização do óleo bruto de milho

Parâmetros	Óleo Bruto de Milho
Acidez (% C18:1)	1,62 ± 0,02
Umidade (%)	0,12 ± 0,01
TAG (%)	98,18 ± 0,09
DAG (%)	1,67 ± 0,08
MAG (%)	0,15 ± 0,01
OSI (h)	19,35 ± 0,20
Elementos minerais (mg/kg)	
P	266 ± 8,00
Ca	2,57 ± 0,50
Mg	34 ± 1,00
Fe	1,06 ± 0,02
Composição em Ácidos Graxos (%)	
Ácido Palmítico (C 16:0)	12,28 ± 0,04
Ácido Estearico (C 18:0)	2,22 ± 0,01
Ácido Oleico (C 18:1)	37,25 ± 0,01
Ácido Linoleico (C 18:2)	46,78 ± 0,04
Ácido Linolênico (C 18:3)	0,90 ± 0,01
Ácido Araquidônico (C 20:4)	0,57 ± 0,00

Médias ± desvios padrões das análises realizadas em triplicata

3.2. Condicionamento químico

O condicionamento químico tem por objetivo auxiliar retirada dos fosfolípidios não hidratáveis, através da conversão em compostos hidratáveis no ajuste do pH que será importante para ação da enzima (Dayton, Galhardo, 2014; O'Brien, 2008). Os resultados obtidos para cada um dos condicionamentos realizados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Condicionamento químico do óleo bruto de milho.

Amostra	CQ 1	CQ 2	CQ 3	CQ 4
kg CA/t óleo	0,65	0,65	0,65	0,65
kg NaOH/t óleo	0,11	0,23	0,46	0,69
Acidez (% C18:1)	1,55 ± 0,03	1,52 ± 0,06	1,47 ± 0,06	1,47 ± 0,10
Elementos minerais	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
P	116,30 ± 0,20	62,80 ± 0,30	10,90 ± 0,10	9,15 ± 0,02
Fe	0,51 ± 0,02	0,26 ± 0,01	ND <0,10	ND <0,10
Ca	1,04 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Mg	15,31 ± 0,03	7,35 ± 0,08	0,86 ± 0,02	0,70 ± 0,01
pH da goma	3,7	4,19	5,12	6,38

CQ- Condicionamento químico. Médias ± desvios padrões das análises realizadas em triplicata.

As análises realizadas apontam que as proporções das soluções de ácido cítrico e NaOH foram suficientes para obter os valores de pHs próximos do esperado. O experimento CQ 1 obteve o pH de 3,7, CQ 2 de 4,2, CQ 3 de 5,1 e CQ 4 de 6,4.

Os condicionamentos CQ 3 (pH 5,12) e CQ 4 (pH 6,38) resultaram em óleos com menores valores residuais de fósforo, sendo $10,91 \pm 0,10$ e $9,15 \pm 0,02$ mg/kg respectivamente, seguindo o mesmo comportamento para os teores de Ca, Mg e Fe. Essas amostras foram condicionadas com maiores quantidades de hidróxido de sódio. Segundo O'Brien (2008) a presença do NaOH eleva o pH e possibilita uma maior conversão em compostos hidratáveis.

3.3. Estudo do pH para a degomagem enzimática utilizando a fosfolipase PLA₂

Na Tabela 3 encontram-se os resultados de acidez, conteúdo residual de elementos minerais, umidade do óleo, pH da goma e as massas de óleo e de goma obtidos para cada um dos experimentos realizados, sendo ED 1, ED 2, ED 3 e ED 4 referente as degomagens enzimáticas realizadas em diferentes pHs.

A análise do teor de fósforo no óleo é importante para avaliar a eficiência da degomagem, sendo este o principal componente dos fosfolipídios que compõem a goma. Na degomagem enzimática, a goma formada é resultado da hidrólise enzimática das moléculas de fosfolipídios, em ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Desta forma, a otimização do pH tem por objetivo identificar o pH ótimo de atuação da enzima na reação (Dijkstra, 2010).

O ensaio de degomagem enzimática ED 2 foi o que obteve menor valor residual de fósforo (27,00 mg/kg) com pH de 4,06, assim como de ferro, cálcio e magnésio, elementos esses que também compõem os fosfolipídios não hidratáveis. O experimento ED 2 obteve o teor de acidez de 1,79%, o maior entre os experimentos. Segundo Dijkstra (2010) a ação da enzima na molécula de fosfolipídio resulta na liberação de ácidos graxos no óleo degomado, elevando sua acidez.

O maior rendimento também pode ser observado através das massas finais de óleo e de goma. ED 2 também obteve a segunda maior massa de óleo degomado (284,7 g) e a menor massa de goma (3,6 g), desta forma pode-se observar que neste experimento além de do menor teor de fósforo obtido, o rendimento final de óleo também foi satisfatório, pois apresentou uma menor perda de óleo. Desta forma, pode-se concluir que o pH ótimo de atuação da enzima ocorre em 4,06.

Tabela 3. Estudo de otimização do pH da fosfolipase Rohalase PL-XTRA a 50 °C, 50 mg/kg de enzima e 2% de água e degomagem aquosa do óleo bruto de milho com 3% de água.

Amostra	ED 1	ED 2	ED 3	ED 4
CQ Aplicado	CQ 1	CQ 2	CQ 2	CQ 3
% água	2	2	2	2
FFA (% as C18:1)	1,75 ± 0,04	1,79 ± 0,02	1,76 ± 0,06	1,56 ± 0,001
Elementos minerais	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
P	61,00 ± 1,00	27,00 ± 2,00	37,00 ± 1,00	54,00 ± 1,00
Fe	0,32 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Ca	0,59 ± 0,05	0,28 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,42 ± 0,01
Mg	10,50 ± 0,2	4,34 ± 0,28	5,37 ± 0,07	8,55 ± 0,16
Umidade do óleo (%)	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01
mi (g)	300,05	300,01	300,07	300,02
mf (g)	282,59	284,72	285,69	279,00
mg (g)	5,1	3,62	4,6	11,97
pH da goma	3,51	4,06	5,01	6,56

ED- Degomagem enzimática; CQ- Condicionamento aplicado, mi emf – massa inicial e final de óleo degomado, mg – massa de goma obtida. Médias ± desvios padrões das análises realizadas em triplicata.

3.4. Obtenção de modelos matemáticos para a avaliação da cinética de degomagem enzimática

A partir dos dados experimentais obtidos dos ensaios de degomagem enzimática realizados por Lamas et al. (2016) com uma enzima PLA₁ em óleo de girassol, Jiang et al. (2014) com uma PLA₁ em óleo de canola e Yu et al. (2014) com uma PLA₂ em óleo de soja, verificou-se que o modelo exponencial (Modelo 1) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais dos estudos analisados.

Além disso, dentre os três estudos avaliados, apenas Jiang et al. (2014) apresentaram um modelo cinético ajustado que posteriormente também foi avaliado.

Modelo 1: Exponencial

$$y = A * e^{(-B*x)} \quad (1)$$

Modelo 2: Modelo utilizado por Jiang, et al. (2014)

$$y = A + \frac{B}{1 + \left(\frac{x_h}{C}\right)^D} \quad (2)$$

em que:

y – teor de fósforo (mg/kg)

x – tempo (minutos)

x_h – tempo (horas)

A, B, C e D – constantes ajustáveis dos modelos

3.5. Análise da degomagem enzimática do óleo bruto de milho pela fosfolipase_{A2}, através dos modelos obtidos

O modelo exponencial foi utilizado para descrever a degomagem enzimática do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂ nas condições do pH ótimo (4,06).

Na Figura 1 estão representadas as curvas de degomagem enzimática descritas pelo modelo escolhido (Modelo 1) referente aos estudos obtidos na literatura em comparação com a curva cinética de degomagem do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂ durante os primeiros 120 minutos de reação. Na Tabela 4 estão apresentadas as constantes obtidas para cada uma das curvas.

Verifica-se que o experimento realizado Lamas et al. (2016) e a degomagem do óleo bruto de milho apresentam teores de fósforo acima de 250 mg/kg e o tempo de duração da reação varia de 120 a 180 minutos, com isso observa-se a similaridade entre as curvas cinéticas de degomagem geradas pelo modelo exponencial, em decorrência da proximidade dos dados experimentais. De forma análoga, as curvas cinéticas geradas para os estudos realizados por Jiang et al. (2014) e Yu et al. (2014) também apresentam similaridade entre si, visto que o teor inicial de fósforo dos experimentos é menor que 150 mg/kg e o tempo de duração das reações variaram de 420 a 600 minutos.

Uma vez que a reação de degomagem enzimática está relacionada à atividade da enzima,

diferenças nesta atividade podem interferir diretamente em mudanças nos coeficientes. A partir da figura pode-se concluir que o parâmetro “A” apresenta relação direta com o teor inicial de fósforo, e o parâmetro B apresenta relação com a atividade da enzima (coeficiente de degomagem), que por sua vez é afetada pelos parâmetros de degomagem.

A avaliação a curva de degomagem enzimática do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂, através do Modelo 2, obtido por Jiang et al. (2014) (Figura 2) também foi realizada. Os parâmetros A, B e C também foram calculados levando em consideração a relação das constantes com os dados experimentais de teor de fósforo inicial e final. Essas relações foram baseadas nas observações das conexões entre os dados experimentais e as constantes do modelo obtido por Jiang et al. (2014) e são mostradas na Tabela 5.

A partir da curva gerada pelo Modelo 2 verifica-se uma redução acentuada do teor de fósforo durante os primeiros 60 minutos de reação, em seguida, a diminuição no teor de fósforo ocorre de forma mais lenta e gradual. Segundo Padilha e Ruiz (2007) este é um comportamento característico de reações de hidrólise enzimática, em que no início da reação a velocidade é muito alta, até que se atinja a velocidade máxima e posteriormente há uma diminuição da velocidade até que se estabilize a reação.

Desta forma, este modelo também foi considerado para representar a curva cinética da degomagem enzimática do óleo bruto de milho.

Tabela 4. Constantes obtidas do modelo exponencial (Modelo 1) ajustado aos dados experimentais dos estudos de degomagem enzimática deste trabalho e da literatura.

Estudo	Constantes	
	A	B
Degomagem do Óleo bruto de milho utilizando a fosfolipase A ₂	266	0,019
Lamas <i>et al.</i> (2016)	378	0,028
Jiang <i>et al.</i> (2014)	17,92	0,15
Yu <i>et al.</i> (2014)	126,4	0,354

Tabela 5. Constantes obtidas do Modelo 2 de Jiang et al. ajustado aos dados experimentais do estudo de degomagem enzimática do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂.

Estudo	Constantes			
	A	B	C	D
Degomagem do Óleo bruto de milho utilizando a PLA ₂	26	240	0,38	3,31

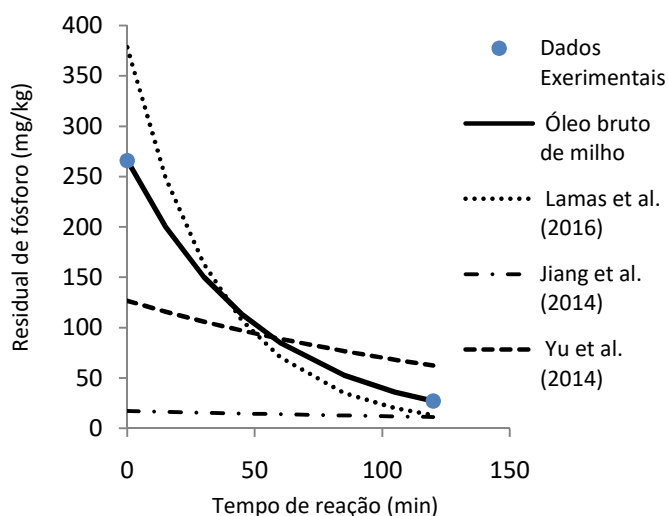


Figura 1. Dados experimentais da degomagem do óleo bruto de milho e curvas de degomagem enzimática obtidas através do ajuste do modelo exponencial (Modelo 1) para os estudos realizados por Lamas et al. (2016), Jiang et al. (2014), Yu et al. (2014) e para degomagem do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂

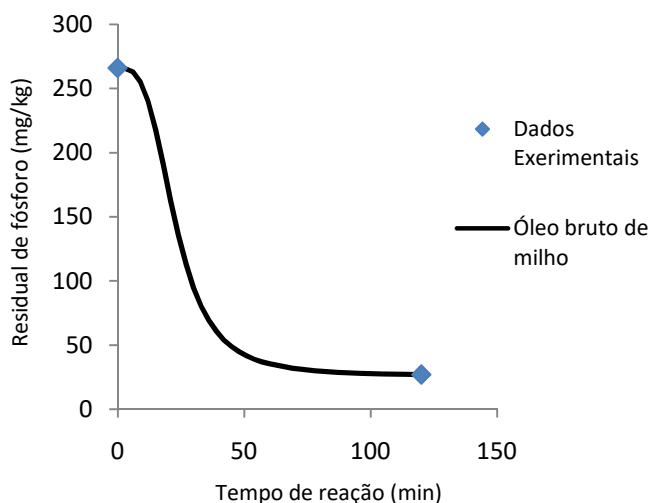


Figura 2. Dados experimentais e curva de degomagem enzimática obtida através do ajuste do Modelo 2 de Jiang, et al. (2014) para a degomagem do óleo bruto de milho pela enzima PLA₂.

A partir dos experimentos de degomagem enzimática a 50 °C, 2% de água e 50 ppm de enzima PLA₂ verificou-se que o pH ótimo de atuação da enzima deu-se em 4,06. Além disso, conhecendo o comportamento cinético característico de reações catalisadas por hidrólise enzimáticas, concluiu-se que o

modelo exponencial (modelo 1) e o modelo obtido por Jiang et al. (2014) (modelo 2) mostraram-se ser aptos para descrever a cinética de degomagem de óleo bruto de milho com a enzima PLA₂ dentro das limitações existentes para a realização do projeto.

5. Referências

AOCS (2009). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. AOCS Press, Champaign, USA.

Carvalho, M. L. D. (2011). **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**.

CODEX ALIMENTARIUM COMMISSION (2009). Codex Stan 210-1999: codex standard for named vegetable oils. Rome.

Dayton, C. L. G.; Galhardo F. (2014). Enzymatic degumming. **Green Vegetable Oil Processing**. AOCS Press, p 107-145.

Dijkstra, A. Enzymatic degumming (2010). **European Journal of Lipid Science and Technology**. 112(11). p. 1178–1189.

Dijkstra, A. J. (2013). Edible oil processing from a patent perspective. **New York: Springer**.

Freitas, I. R. (2015). **Caracterização físico-química e avaliação dos compostos bioativos de óleos brutos e refinados de soja, canola, milho e girassol**.

Godoy, C. M. D. (2019). **Modelagem matemática e avaliação de estratégias de hidrólise enzimática de bagaço de cana em altas cargas de sólidos**.

Jiang, X.; Chang, M.; Wang, X.; et al. (2014). The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 142-148.

Jorge, N. (2009). **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**, 1th ed., Unesp, Cultura Acadêmica: São Paulo.

Lamas, D.L.; Constenla, D. T.; Raab, D. (2016) Effect of degumming process on physicochemical properties of sunflower oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 6, p. 138–143.

O'Brien, R. D. (2008). Soybean Oil Purification. **In Soybeans**. AOCS Press, p. 377-408.

Padilha, M. E. D. S.; Ruiz, W. A. (2007). Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Food Science and Technology**, 27(2), p. 285-290.

Sampaio, K. A. et al (2015). Enzymatic degumming: Degumming efficiency versus yield increase. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 1, p. 81–86.

Sampaio, K. A., Zyaykina, N., Uitterhaegen, et al (2019). Enzymatic degumming of corn oil using phospholipase C from a selected strain of *Pichia pastoris*. **LWT - Food Science and Technology**. 107, p. 145-150.

Schoot, N. V. (2015). Rohalase PL-XTRA: Increasing oilyield. Disponível em: <https://www.asaga.org.ar/descargas/material/SESSION_BIOT/CFP111R_VanSchoot.pdf>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2020.

Yang B.; Zhou R.; Yang JG; et al (2008). Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil. **Journal of the American Oil**. JAOCS, v. 85, n. 5, p. 421–425.

Yang, B.; Wang Y. H.; Yang, J. G. (2006). Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. **Journal of the American Oil**. JAOCS, v. 83, n. 7, p. 653–658.

Yu, D.; Ma, Y.; Jiang, L.; et al. (2014). Stability of Soybean Oil Degumming Using Immobilized Phospholipase A2. **Journal of Oleo Science**. J. Oleo Sci., v. 63, n. 1, p. 25-30.