UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em *spreads*

Juliana Neves Rodrigues Ract

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo
2006

Juliana Neves Rodrigues Ract

Desenvolvimento de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em *spreads*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador, Professor Luiz Antonio, com quem divido por igual todos os méritos deste trabalho. Sua disciplina, paciência, humildade e sabedoria tornaram muito prazerosa nossa convivência diária e contribuíram imensamente para meu desenvolvimento como pesquisadora e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Antônio e Eni, pela dedicação de suas vidas à boa formação dos filhos e pelas férias tão divertidas que passamos juntos nos intervalos desse longo período de estudos que continua.

Ao meu irmão, Júnior, querido, engraçado, protetor, amigo, pelo privilégio exclusivo de tê-lo como irmão.

Ao meu marido, Paulo, que acompanhou de perto a rotina do meu trabalho, pelo apoio e estímulo constantes, pela valorização da minha profissão e por todo o nosso amor.

À minha nova família, adquirida neste período, D. Elza, Sr. Celso, Binda, Flávia, Vitória e Glória.

Aos meus amigos queridos, Helô, Elis, Fefê, Rê, Daniel, Jorge, Clayton, Careca, Gel, Gordo, Tuba, Alê, Marité, Batata, João, Nat, Vivi, Bu, Dani, Loc, Cris, Giu, Dayloca, entre tantos outros, companheiros nos momentos de descanso.

À Karen, Carla e Amanda, “minhas estagiárias”, e ao Jonas, que me ajudaram a aprender a ensinar e orientar.

A todos os meus colegas de trabalho, Roberta, Denise e Chiu, Haíssa, Flávia, Cíntia, Sabrina e Lucas, Keila, Regina e Rafael, Magda, Eli, Marissol, Joyce e Maurício, Guilherme, Ana Maria, Camila e Virgílio, Riana e Tatiana, entre outros tantos, pela ajuda e pela convivência diária.

Aos funcionários Ivani, Nilton, Alexandre, Fátima, Juarez, Elza, Mirian, etc. e aos professores Suzana Lannes, Susana Saad, Maricê, Pitombo, João Carlos e Adalberto, pela contribuição para meu crescimento científico e intelectual.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas e à Faculdade de Saúde Pública, por ceder o uso do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Alejandro Marangoni, pelo estágio em seu laboratório na Universidade de Guelph, Ontário, Canadá, e a todos os profissionais que me acompanharam nesse período, Elena, Ken, Anand, César e Alejandra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão das bolsas de Doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E a todos os que não foram citados, mas que estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana".

Louis Pasteur

RESUMO

RODRIGUES, J.N. **Desenvolvimento de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads**. 2006. 164 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Durante anos, a manteiga foi muito apreciada pelo consumidor, mas por conter grande quantidade de ácidos graxos saturados e colesterol, seu consumo tem diminuído. Recentemente, a descoberta dos malefícios causados pelos ácidos graxos *trans* presentes nas margarinas produzidas por hidrogenação parcial aumentou o interesse por métodos alternativos de modificação de lipídios. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um lipídio estruturado à base de gordura do leite que apresentasse maiores teores de ácidos graxos insaturados que a manteiga original e, conseqüentemente, melhor espalhabilidade, além de conter fitosteróis, constituindo a base de um alimento funcional com capacidade de reduzir os níveis de colesterol no sangue. Foram realizadas misturas da gordura do leite (GL) com óleo de girassol (OG) e ésteres de fitosteróis (EF) e foi efetuada interesterificação química e enzimática. As misturas e os lipídios estruturados obtidos foram analisados quanto a composição em ácidos graxos, consistência, conteúdo de gordura sólida (CGS), cinética de cristalização e estrutura cristalina, entre outras propriedades físico-químicas. Foram obtidos produtos contendo cerca de 60% de ácidos graxos insaturados pela adição de até 40% de OG e 25% de EF à gordura do leite, que originalmente possuía cerca de 33% de ácidos graxos insaturados. A interesterificação química melhorou a plasticidade das misturas, enquanto que a modificação enzimática não modificou de maneira expressiva sua consistência. A adição de pequenas quantidades de OG à GL provocou grande diminuição de sua consistência, enquanto que a diminuição do CGS ocorreu em proporções semelhantes às esperadas por interpolação linear. A edição de vídeos que permitam a observação da formação da estrutura cristalina de gorduras mostrou ser uma ferramenta de grande utilidade no estudo da cristalização de óleos e gorduras. A emulsão preparada com a mistura contendo 25,0% de EF, 7,5% de OG e 67,5% de GL apresentou diminuição expressiva na consistência quando comparada à manteiga, representando um efeito benéfico.

Palavras-chave: lipídios estruturados, gordura do leite, fitosteróis, óleo de girassol, consistência, estrutura cristalina.

ABSTRACT

RODRIGUES, J.N. **Development of structured lipids obtained from milk fat, sunflower oil, and phytosterol esters for application in a tablespread.** 2006. 164p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

For many years, butter has been held in the highest esteem by consumer but its world consumption has steadily declined due to its high contents of saturated fatty acids and cholesterol. More recently, *trans* fatty acids, which are commonly present in hydrogenated margarines, have been found to cause detrimental effects when consumed in high amounts. This observation has increased the interest in alternative methods of lipid modification. Therefore, the objective of this work was to develop a milkfat based structured lipid, presenting higher contents of unsaturated fatty acids than original butter and consequently better spreadability, besides containing phytosterols and serving as a base of a functional food with a cholesterol lowering health claim. Blends containing milkfat (MF), sunflower oil (SO) and phytosterol esters (PE) were prepared and then chemically and enzymatically interesterified. The fatty acid composition, consistency, solid fat content (SFC), crystallization kinetics and crystal structure, among other physical and chemical properties were analyzed. The blends presented about 60% of unsaturated fatty acids with the addition of up to 40% of SO and 25% of PE to MF, which originally presented close to 33% of unsaturated fatty acids. Chemical interesterification improved the plasticity of the blends, while the enzymatic reaction did not substantially alter it. The addition of small amounts of SO and PE to MF caused a great decrease in its consistency, while SFC decreased almost proportionally to the addition of these components. The edition of videos made possible the observation of crystal structure formation and it represented a tool of great importance in the fats and oils crystallization research. The emulsion prepared with the blend containing 25.0% of PE, 7.5% of SO, and 67.5% of MF presented a substantial improvement in consistency when compared to butter commercially available.

Keywords: structured lipids, milk fat, phytosterols, sunflower oil, consistency, crystallization.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Fatores que influenciam as propriedades macroscópicas de uma rede cristalina de gordura</i>	33
<i>Figura 2. Tipos de cristais de gorduras</i>	36
<i>Figura 3. Fluxograma do processo de preparação das misturas e dos lipídios estruturados</i>	44
<i>Figura 4. Diagrama triangular do planejamento experimental das misturas</i>	48
<i>Figura 5. Curva força-deformação obtida pela análise de textura das amostras</i>	54
<i>Figura 6. Preparação de lâminas de gordura para microscopia de luz polarizada</i>	56
<i>Figura 7. Equipamento controlador de temperatura</i>	56
<i>Figura 8. Sistema de microscopia com controlador de temperatura</i>	58
<i>Figura 9. Diagrama triangular da acidez das misturas</i>	63
<i>Figura 10. Diagrama triangular do índice de iodo das misturas</i>	73
<i>Figura 11. Diagrama triangular do índice de saponificação das misturas</i>	75
<i>Figura 12. Diagrama triangular do ponto de amolecimento das misturas</i>	78
<i>Figura 13. Diagrama triangular do ponto de amolecimento das misturas após interesterificação química</i>	80
<i>Figura 14. Diagramas triangulares da consistência das misturas a 5 (A), 10 (B), 15 (C) e 20 °C (D)</i>	85
<i>Figura 15. Diagramas triangulares da consistência das misturas após interesterificação química a 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D) e 25 °C (E)</i>	89
<i>Figura 16. Consistência das misturas binárias a 5, 10, 15 e 20 °C</i>	91
<i>Figura 17. Curvas de consistência das misturas 1, 3, 6 e 9, respectivamente</i>	94
<i>Figura 18. Diagramas triangulares do conteúdo de gordura sólida das misturas a 10 (A), 15 (B), 20 (C), 25 (D), 30 (E) e 35 °C (F)</i>	100
<i>Figura 19. Diagramas triangulares do conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química a 10 (A), 15 (B), 20 (C), 25 (D) e 30 °C (E)</i>	103
<i>Figura 20. Conteúdo de gordura sólida das misturas binárias a 10, 15, 20, 25 e 30 °C</i>	105
<i>Figura 21. Curvas de conteúdo de gordura sólida das misturas 1, 3, 6 e 9 antes e após interesterificação química e enzimática</i>	107
<i>Figura 22. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C</i>	113

Figura 23. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C após interesterificação química	113
Figura 24. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C após interesterificação enzimática	114
Figura 25. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	120
Figura 26. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	121
Figura 27. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	122
Figura 28. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	125
Figura 29. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C, após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	126
Figura 30. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C, após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X. A barra representa 250 µm	127
Figura 31. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF) com aumento de 40X (a barra representa 250 µm) e 200X (a barra representa 50 µm)	130
Figura 32. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF), após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X (a barra representa 250 µm) e 200X (a barra representa 50 µm)	131
Figura 33. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF), após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X (a barra representa 250 µm) e 200X (a barra representa 50 µm)	132
Figura 34. Estrutura cristalina das amostras observada na última imagem dos vídeos, com aumento de 40X. A barra representa 100 µm	136
Figura 35. Área cristalizada da mistura 1 resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo	138
Figura 36. Área cristalizada da mistura 1 resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo	140

<i>Figura 37. Diâmetro dos cristais da mistura 1 resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo</i>	140
<i>Figura 38. Área cristalizada da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo</i>	142
<i>Figura 39. Área cristalizada da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo</i>	143
<i>Figura 40. Diâmetro dos cristais da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo</i>	143
<i>Figura 41. Curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 1 antes (A) e após interesterificação química (B) a 30 °C em função do tempo</i>	144
<i>Figura 42. Área cristalizada da mistura 3 resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo</i>	146
<i>Figura 43. Área cristalizada da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo</i>	147
<i>Figura 44. Área cristalizada da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo</i>	148
<i>Figura 45. Diâmetro dos cristais da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo</i>	148
<i>Figura 46. Curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 3 interesterificada por via química a 30 °C em função do tempo</i>	149
<i>Figura 47. Consistência do spread preparado a partir da mistura 6, de manteiga e de creme vegetal</i>	150

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Composição em ácidos graxos da gordura do leite (HUI, 1996)</i>	20
<i>Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de girassol (CODEX ALIMENTARIUS, 2005)</i>	24
<i>Tabela 3 - Composição estereoespecífica em ácidos graxos da gordura do leite (mol%)</i>	30
<i>Tabela 4 - Valores do expoente de Avrami, n, para diferentes tipos de nucleação e crescimento</i>	41
<i>Tabela 5 - Especificação dos ésteres de fitosteróis, segundo fabricante</i>	46
<i>Tabela 6 - Planejamento experimental das misturas</i>	47
<i>Tabela 7 - Programação de temperatura das amostras para microscopia de luz polarizada</i>	57
<i>Tabela 8 - Formulação empregada no preparo do spread</i>	60
<i>Tabela 9 - Acidez das misturas</i>	62
<i>Tabela 10 - Composição em ácidos graxos das misturas</i>	66
<i>Tabela 11 - Composição em ácidos graxos do óleo de girassol e dos ésteres de fitosteróis</i>	69
<i>Tabela 12 - Índice de iodo das misturas calculado a partir de sua composição em ácidos graxos</i>	72
<i>Tabela 13 - Índice de saponificação das misturas calculado a partir de sua composição em ácidos graxos</i>	74
<i>Tabela 14 - Composição em esteróis dos ésteres de fitosteróis</i>	76
<i>Tabela 15 - Ponto de amolecimento das misturas antes e após interesterificação química e enzimática</i>	77
<i>Tabela 16 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de ponto de amolecimento e coeficientes de determinação R^2</i>	78
<i>Tabela 17 - Consistência das misturas</i>	82
<i>Tabela 18 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de consistência e coeficientes de determinação R^2</i>	83
<i>Tabela 19 - Consistência das misturas após interesterificação química</i>	86
<i>Tabela 20 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de consistência e coeficientes de determinação R^2 após interesterificação química</i>	88

<i>Tabela 21 - Consistência das misturas após interesterificação enzimática</i>	92
<i>Tabela 22 - Classificação de produtos gordurosos segundo “yield value”</i>	95
<i>Tabela 23 - Conteúdo de gordura sólida das misturas</i>	97
<i>Tabela 24 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de conteúdo de gordura sólida e coeficientes de determinação R^2</i>	99
<i>Tabela 25 - Conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química</i>	101
<i>Tabela 26 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de conteúdo de gordura sólida e coeficientes de determinação R^2 após interesterificação química</i>	102
<i>Tabela 27 - Conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação enzimática</i>	106
<i>Tabela 28 - Conteúdo de gordura sólida das misturas antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo</i>	109
<i>Tabela 29 - Conteúdo de gordura sólida dos ésteres de fitosteróis antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo</i>	112
<i>Tabela 30 - Constante de Avrami, k, expoente de Avrami, n, e coeficiente de determinação, R^2, das misturas</i>	114
<i>Tabela 31 - Constante de Avrami, k, expoente de Avrami, n, e coeficiente de determinação, R^2, das misturas após interesterificação química</i>	116
<i>Tabela 32 - Constante de Avrami, k, expoente de Avrami, n, e coeficiente de determinação, R^2, das misturas após interesterificação enzimática</i>	117
<i>Tabela 33 - Diâmetro médio dos cristais das misturas antes e após interesterificação química e enzimática a 25 °C</i>	128
<i>Tabela 34 - Coeficientes de regressão linear e de determinação para curva Log-Log do diâmetro dos cristais da gordura do leite antes e após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo</i>	145
<i>Tabela 35 - Coeficientes de regressão linear e de determinação para curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 3 após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo</i>	149

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácido graxo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
CGS	Conteúdo de gordura sólida
DOU	Diário Oficial da União
DSC	Differential scanning calorimetry
EF	Ésteres de fitosteróis
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Food for Specified Health Uses
GL	Gordura do leite
HDL	High density lipoprotein
IS	Índice de saponificação
LDL	Low density lipoprotein
MS	Ministério da Saúde
OG	Óleo de girassol
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância magnética nuclear
TAG	Triacilglicerol
USFDA	United States Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	17
1.2 GORDURA DO LEITE	20
1.3 ÓLEO DE GIRASSOL	23
1.4 TECNOLOGIAS DE MODIFICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPÍDIOS PARA A PRODUÇÃO DE “SPREADS”	25
1.5 FITOSTERÓIS	30
1.6 CRISTALIZAÇÃO	32
1.7 CINÉTICA DE CRISTALIZAÇÃO	39
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO	44
3.2. MATÉRIA-PRIMA	44
3.3. MISTURAS	47
3.4. INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA	49
3.5. INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	49
3.6. ACIDEZ	50
3.7. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	50
3.8. ÍNDICE DE IODO	51
3.9. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	51
3.10. COMPOSIÇÃO EM ESTERÓIS DOS ÉSTERES DE FITOSTERÓIS	52
3.11. PONTO DE AMOLECIMENTO	52
3.12. CONSISTÊNCIA	53
3.13. CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA	54
3.14. CINÉTICA DE CRISTALIZAÇÃO	54
3.15. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	55

3.16. PREPARAÇÃO DO SPREAD	60
3.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 ACIDEZ	62
4.2 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	64
4.3 ÍNDICE DE IODO	71
4.4 ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	73
4.5 COMPOSIÇÃO EM ESTERÓIS DOS ÉSTERES DE FITOSTERÓIS	75
4.6 PONTO DE AMOLECIMENTO	76
4.7 CONSISTÊNCIA	81
4.8 CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA	96
4.9 CINÉTICA DE CRISTALIZAÇÃO	108
4.10 MICROSCOPIA SOB LUZ POLARIZADA	118
4.11 CONSISTÊNCIA DO SPREAD	150
5. CONCLUSÕES	152
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXO	166

1. Introdução

Não existe uma definição exata de lipídios que seja totalmente aceita (O'KEEFE, 2002; GUNSTONE, 1997). O'KEEFE (2002) reúne algumas definições de diferentes autores. CHRISTIE (1982) define lipídios como “uma grande variedade de produtos naturais, incluindo ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, que têm em comum fácil solubilidade em solventes orgânicos, como dietil éter, hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol”. Segundo a definição de KATES (1990), lipídios são “substâncias insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio, éter ou benzeno, contêm grupos de hidrocarbonetos de cadeia longa em suas moléculas e estão presentes ou são derivados de organismos vivos”. GURR & JAMES (1971) dizem que a definição padrão inclui “um grupo quimicamente heterogêneo de substâncias que têm em comum a insolubilidade em água, mas são solúveis em solventes apolares, como clorofórmio, hidrocarbonetos ou álcoois”. As diferentes definições se complementam e permitem melhor compreensão das propriedades e aplicações dos lipídios.

A produção anual de óleos e gorduras no mundo excedia 113 milhões de toneladas em 2001. As principais fontes incluem 4 tipos de gordura animal (manteiga, banha, sebo e peixe) e 11 óleos vegetais (soja, algodão, milho, palma, palmiste, coco, oliva, colza, girassol, amendoim e linhaça). A maior parte é consumida como alimento humano (81%) e o restante é utilizado na alimentação animal (5%) ou para a produção de oleoquímicos (14%) (GUNSTONE, 2001).

As propriedades sensoriais e nutricionais de muitos alimentos são muitas vezes atribuídas aos lipídios (MISTRY, 2003). Além disso, estes são capazes de afetar o metabolismo das lipoproteínas no organismo humano e conseqüentemente modificar o risco de algumas doenças, principalmente as cardiovasculares (HORNSTRA, 1999). Assim, a pesquisa na área de lipídios que possam evitar o surgimento de doenças e promover benefícios à saúde, ou seja, que estejam enquadrados nas definições de alimentos funcionais, tem apresentado grande desenvolvimento e boa repercussão.

1.1 Alimentos Funcionais

Nas últimas décadas, a indústria de alimentos tem enfrentado um mercado cada vez mais competitivo. Uma alternativa para ganhar forças para enfrentar esta acirrada competição é criar maneiras de agregar valor aos produtos utilizando-se do desenvolvimento tecnológico. Os alimentos funcionais são considerados um novo grupo de produtos, constituído por alimentos que por vezes são submetidos a processos que envolvem alta tecnologia e suas respectivas patentes. Estes produtos apresentam, portanto, alto valor agregado no mercado de alimentos (MARK-HERBERT, 2004).

Os alimentos funcionais não são apenas uma tendência no mundo todo, mas uma realidade que está transformando a indústria de alimentos e mudando a maneira de pensar da sociedade em relação ao consumo de alimentos e bebidas (TUNCER, 2004). A saúde e o bem estar se transformaram em critérios utilizados na decisão de compra, o que justifica a grande variedade de produtos alimentícios funcionais que tem sido desenvolvida. Além disso, tem-se mais acesso a informações sobre produtos com a evolução dos meios de comunicação (BEVINGTON & ANGUS, 2002; SAHER et al., 2004).

O mercado dos alimentos funcionais está se expandindo rapidamente. Segundo pesquisa, em 2001 o consumidor brasileiro gastou quase US\$ 950 milhões em tais alimentos, incluindo margarina para reduzir colesterol e bebidas lácteas que mantêm os níveis de bactérias do aparelho digestivo (WINNETT, 2002).

No Japão, foram comercializados os primeiros produtos que tinham como objetivo promover a saúde. Em 1984, o conceito de Alimento Funcional foi definido pela primeira vez por cientistas japoneses (MENRAD, 2003). Na época, estudos demográficos revelavam uma população que estava envelhecendo, cuja qualidade de vida dependia principalmente de cuidados médicos de alto custo (MARK-HERBERT, 2004). Em 1991, o Ministério da Saúde do país introduziu regras para a aprovação de alimentos especificamente relacionados com a saúde, chamados FOSHU (“Food for Specified Health Uses”), que incluíam o estabelecimento de alegações de saúde (health claims) específicos para este tipo de alimento. Em fevereiro de 2000, o número total de aprovações de alimentos funcionais chegou a

174, com um mercado estimado em cerca de U\$ 2 bilhões. No total, mais de 1700 alimentos funcionais foram lançados no Japão entre 1988 e 1998, com um faturamento de cerca de U\$ 14 bilhões em 1999 (MENRAD, 2003). O mercado japonês de alimentos funcionais é atualmente o mais sofisticado do mundo (TUNCER, 2004).

Apesar do crescente interesse de cientistas e consumidores pelos alimentos funcionais, na maior parte do mundo ainda não existe uma definição legalmente reconhecida (MARK-HERBERT, 2004). A definição do limite entre alimento e medicamento e o conteúdo da mensagem a ser passada ao consumidor através dos rótulos dos produtos são apontadas como as questões mais polêmicas na discussão dos alimentos funcionais (TUNCER, 2004).

Devido às diferentes definições atribuídas a esses alimentos, existe uma certa dificuldade para analisar o desenvolvimento do mercado dos alimentos funcionais, resultando em estimativas por vezes muito diferentes quando se refere ao volume de produto comercializado. Baseando-se na definição de que um alimento funcional é aquele ao qual foi adicionado algum ingrediente que ajude a melhorar a saúde e isto é comunicado ao consumidor, o mercado global de alimentos funcionais é estimado em no mínimo U\$ 33 bilhões ao ano (MENRAD, 2003).

O mercado mais dinâmico e participativo é o dos Estados Unidos, que comercializa mais de 50% dos alimentos funcionais do mundo, o que representa cerca de 2% do mercado de alimentos do país (MENRAD, 2003). Não existe nos EUA uma definição legal para alimento funcional, porém certas alegações de propriedades de saúde já são permitidas pelas regras do Nutrition Labelling and Education Act 1990. Um alimento funcional pode ser comercializado no país com alegações de saúde na embalagem ou em propagandas desde que se consiga permissão do USFDA (United States Food and Drug Administration) (KWAK & JUKES, 2001).

Na Europa, o mercado de alimentos funcionais excede U\$ 2 bilhões, o que representa menos de 1% do total de alimentos e bebidas comercializados no continente. Entre os países mais importantes na comercialização dos alimentos funcionais, estão Alemanha, França, Reino Unido e Holanda. Em geral, o interesse do consumidor por alimentos funcionais é maior no centro e norte da Europa do que nos países mediterrâneos. Do ponto de vista legal, os alimentos funcionais estão posicionados em uma zona de transição entre alimentos e medicamentos. Na

maioria dos países europeus, bem como na União Européia, estas áreas estão tradicionalmente reguladas por diferentes instituições e são sujeitas a diferentes regimes regulatórios, o que confere à definição de alimento funcional um alto grau de incerteza. O que está definido atualmente é a proibição do uso de aspectos relacionados a doenças na informação ao consumidor ou propaganda de produtos considerados funcionais (MENRAD, 2003).

O Brasil foi um dos primeiros países a possuir uma legislação específica para alimentos funcionais. Em 1999 foi proposta e aprovada pela Vigilância Sanitária a regulamentação técnica para análise de novos alimentos e ingredientes, aí incluídos os chamados “alimentos funcionais” (ANVISA, 2004). Em 1999 foi instituída a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos (BRASIL, 1999a). Assim, em 30 de abril de 1999, foram publicadas as resoluções 16, 17, 18 e 19 da ANVISA/MS (BRASIL, 1999b, 1999c, 1999d, 1999e), todas relacionadas aos conceitos, segurança, registro e rotulagem de alimentos funcionais e suas alegações de propriedades funcionais ou de saúde.

Entre os benefícios proporcionados pelos alimentos funcionais está sua atuação junto aos radicais livres em alimentos e sistemas biológicos. A presença dos radicais livres nestes meios pode resultar em doenças crônicas decorrentes do envelhecimento, como arteriosclerose, catarata, câncer, diabetes, doenças neurológicas e desordens no sistema imuno-inflamatório (FERRARI & TORRES, 2003). Grandes benefícios relacionados com o consumo de gorduras insaturadas, esteróis e estanois também são obtidos com respeito a doenças do coração e seus principais responsáveis, como pressão arterial e níveis de colesterol altos. O consumo de probióticos e prebióticos contribui na melhora de disfunções do trato gastro-intestinal. Os fitoestrógenos, dentre eles as isoflavonas ajudam a diminuir o risco de câncer de mama e amenizar os sintomas da menopausa (BENGMARK, 1998; HORNSTRA, 1999; ROCHE, 1999; THURNHAM, 1999; BLADES, 2000; MCLAREN, 2000).

1.2 Gordura do leite

Como todos os óleos e gorduras provenientes de fontes naturais, a gordura do leite é uma mistura de vários tipos de triacilgliceróis (mais de 10.000 diferentes tipos, com faixa de fusão variando de -40 a 40 °C) que contêm diferentes ácidos graxos, entre eles uma grande porcentagem de ácidos graxos saturados localizados predominantemente na posição *sn*-2 do triacilglicerol. Essa sua composição tão variada é responsável pelo sabor e propriedades físicas únicas. Quantitativamente, o ácido palmítico é o componente saturado mais abundante, enquanto o ácido oléico é o componente insaturado presente em maior proporção na gordura do leite (BALCÃO et al., 1998; GERMAN & DILLARD, 1998; ROUSSEAU et al., 1996a; GUNSTONE et al., 1986). A Tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos da gordura do leite.

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos da gordura do leite (HUI, 1996)

Ácido graxo	Porcentagem em massa
Butírico (4:0)	2,8-4,0
Capróico (6:0)	1,4-3,0
Caprílico (8:0)	0,5-1,7
Cáprico (10:0)	1,7-3,2
Decenóico (10:1)	0,1-0,3
Láurico (12:0)	2,2-4,5
Lauroléico (12:1)	0,1-0,6
Mirístico (14:0)	5,4-14,6
Miristoléico (14:1)	0,6-1,6
Palmítico (16:0)	26,0-41,0
Palmitoléico (16:1)	2,8-5,7
Esteárico (18:0)	6,1-11,2
Oléico (18:1)	18,7-33,4
Linoléico (18:2)	0,9-3,7

Na gordura do leite, os ácidos graxos de cadeia curta, embora saturados, conferem aos triacilgliceróis propriedades similares às aquelas resultantes da presença de ácidos graxos insaturados. É este efeito que explica porque a gordura do leite, com índice de iodo de 30 - 35, pode apresentar consistência similar à banha, que tem índice de iodo duas vezes maior. O efeito de diminuição do ponto de fusão de um acilglicerol pela incorporação de um ácido graxo de cadeia curta é provavelmente maior que pela inclusão de um ácido graxo insaturado (DEMAN, 1964).

A gordura do leite é naturalmente plástica, pois à temperatura ambiente é sólida e mantém seu formato. Essa plasticidade é um elemento muito importante na sua utilização como ingrediente, já que os óleos vegetais precisam ser hidrogenados para produzir a plasticidade necessária aos “spreads” ou substitutos da manteiga. A natureza dessa plasticidade, porém, é complexa. Gorduras espalháveis não são simples sólidos que se fundem a uma dada temperatura. A gordura do leite é completamente líquida acima de 40 °C e completamente sólida abaixo de -40 °C. Entre esses extremos, é uma mistura de gordura e óleo. Portanto, a gordura do leite tem larga faixa de fusão e a propriedade de gordura e óleo coexistirem e se fundirem gradualmente nessa larga faixa de temperatura oferece atributos sensoriais e de textura altamente desejáveis (GERMAN & DILLARD, 1998).

De acordo com a Portaria n. 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos, a gordura do leite deve ser a única gordura presente na manteiga. A manteiga é uma emulsão de água em óleo. A gordura, fase contínua, determina principalmente as características físicas da manteiga e corresponde à proporção de 80 a 85% de sua composição. Cerca de 52% dessa gordura é saturada, 25% monoinsaturada e 3% poliinsaturada. O restante de sua composição é formado por sólidos não-gordurosos do leite e soro, que contém proteínas e minerais. Pode ainda conter ou não sal em quantidade variável entre 0,8 e 2,0%. A manteiga possui elevado valor calórico, que oscila entre 7,0 e 7,9 Kcal/g (RICHARDS & GIOIELLI, 1999).

À temperatura de refrigeração doméstica, cerca de 10 °C, a manteiga essencialmente se comporta como sólido e tem pouca espalhabilidade, enquanto que à temperatura ambiente, na faixa de 20 a 25 °C, ocorre separação de óleo e exsudação. Sua espalhabilidade ideal ocorre por volta de 15 °C, quando apresenta

conteúdo de gordura sólida em torno de 30% (ROUSSEAU et al., 1996a; BALCÃO et al., 1998).

A espalhabilidade é significativamente influenciada pela firmeza da manteiga, que é determinada, em parte, pelo seu conteúdo de gordura sólida e pela composição em ácidos graxos. Quanto maiores forem o conteúdo de gordura sólida e o teor de ácidos graxos saturados da gordura do leite, mais firme será a manteiga, reduzindo sua espalhabilidade (KAWANARI, 1996).

Essas diferenças nas características físico-químicas da manteiga podem ser devidas à sazonalidade, ao tipo de alimentação do animal que fornece o leite, sua raça, idade ou ainda à duração da fase de lactação (HUI, 1996).

Além da grande quantidade de gordura saturada, a gordura do leite também possui teores razoáveis de colesterol. O colesterol é um lipídio precursor da produção de hormônios e vitamina D, representando um dos compostos mais importantes para o bom funcionamento do organismo. Porém, conforme os níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) no sangue aumentam, seu excesso acumula-se nas artérias, especialmente nas artérias coronárias. O colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), por outro lado, auxilia na remoção das gorduras encontradas nas paredes das artérias e as transporta ao fígado, onde são metabolizadas e eliminadas (HORNSTRA, 1999).

A hipercolesterolemia afeta um grande número de pessoas no mundo todo. As dietas pobres em gorduras saturadas sempre foram o primeiro tratamento a ser sugerido pelos médicos, principalmente para indivíduos com níveis moderadamente altos de colesterol LDL. Um perfil característico dessas dietas é restringir o consumo de manteiga e gordura do leite e substituí-los parcialmente por gorduras de origem vegetal, incluindo margarinas (ZOCK & KATAN, 1997).

Portanto, devido à presença de grande quantidade de ácidos graxos saturados e colesterol na manteiga, seu consumo tem caído no mundo todo. Apesar de seu sabor ser muito apreciado por grande parte dos consumidores, a manteiga é considerada um produto caro e o consumidor tem preferido um produto refrigerado mais espalhável (RICHARDS & GIOIELLI, 1999).

A margarina foi inicialmente desenvolvida como um substituto da manteiga (HUI, 1996). Atualmente, entretanto, é um produto de alta tecnologia, com características próprias e muitas variações. Porém, como as margarinas comuns são

ricas em ácidos graxos *trans*, os argumentos utilizados para justificar as vantagens da margarina sobre a manteiga foram derrubados (KATAN, 2000).

A relação entre o consumo de ácidos graxos *trans* presentes nas gorduras hidrogenadas e os níveis de lipídios no sangue tem sido um tema muito estudado há quase 50 anos. Os estudos em humanos, em sua maioria, sugerem que o consumo de gordura parcialmente hidrogenada resulta em níveis de colesterol sanguíneo mais altos do que os obtidos com o consumo de óleo em seu estado natural. Conseqüentemente, aumenta-se também o risco de doenças cardiovasculares (HAN et al., 2002; KOLETZCO & DECSI, 1997; LICHTENSTEIN, 1998; LICHTENSTEIN et al., 1999; 2001; 2003; MÜLLER et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003).

Os estudos mais recentes sugerem que os ácidos graxos *trans* são mais deletérios que os ácidos graxos saturados, e que seu consumo está relacionado com a incidência de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (LICHTENSTEIN et al., 2003). Todos os estudos, porém, apóiam a recomendação da FAO/WHO de que se deve substituir as gorduras mais duras pelas mais macias e por óleos para reduzir a ingestão tanto dos ácidos graxos *trans* quanto dos saturados (ZOCK & KATAN, 1997).

1.3 Óleo de girassol

Segundo definição do Codex Alimentarius (2005), o óleo de girassol é obtido a partir de sementes de girassol (*Helianthus annuus L.*) e sua composição em ácidos graxos está apresentada na Tabela 2.

O óleo de girassol é considerado um óleo saudável, pois apresenta alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, o que pode ser útil na redução dos níveis de colesterol no sangue. É uma excelente fonte de ácido linoléico e apresenta alto conteúdo de vitamina E (α -tocoferol), de 45 mg/100 g. Apresenta 3,7 - 7,3 g de fitosteróis em cada 1000 g de óleo bruto (HUI, 1996; PIIRONEN et al., 2000).

O óleo de girassol é um excelente óleo vegetal, tanto em termos de propriedades nutricionais quanto em sua variada aplicabilidade. Possui sabor suave e pode ser usado como tempero em saladas, para assados e especialmente em

frituras, devido ao seu ponto de fumaça mais alto que o de qualquer outro óleo vegetal de uso doméstico (232 °C).

Segundo previsão, a produção e comercialização mundiais do óleo de girassol serão, em 2005/06, de 10,5 milhões e 3,4 milhões de toneladas, respectivamente (AGROLINK, 2006).

Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de girassol (CODEX ALIMENTARIUS, 2005)

Ácido graxo	Porcentagem em massa
C 6:0	N.D.
C 8:0	N.D.
C 10:0	N.D.
C 12:0	N.D. - 0,1
C 14:0	N.D. - 0,2
C 16:0	5,0 - 7,6
C 16:1	N.D. - 0,3
C 17:0	N.D. - 0,2
C 17:1	N.D. - 0,1
C 18:0	2,7 - 6,5
C 18:1	14,0 - 39,4
C 18:2	48,3 - 74,0
C 18:3	N.D. - 0,3
C 20:0	0,1 - 0,5
C 20:1	N.D. - 0,3
C 20:2	N.D.
C 22:0	0,3 - 1,5
C 22:1	N.D. - 0,3
C 22:2	N.D. - 0,3
C 24:0	N.D. - 0,5
C 24:1	N.D.

N.D. = não detectado

1.4 Tecnologias de modificação industrial de lipídios para a produção de “spreads”

O termo “spread” utilizado neste trabalho engloba diversos produtos disponíveis no mercado que são utilizados para consumo juntamente com pães e biscoitos, como manteigas, margarinas, cremes vegetais e outros produtos com a mesma função.

A grande produção brasileira de sementes oleaginosas, bem como os melhoramentos na tecnologia de extração de óleos vegetais e as infinitas possibilidades de aplicação das gorduras parcialmente hidrogenadas fizeram com que as margarinas brasileiras fossem tradicionalmente fabricadas, durante muito tempo, pelo processo de hidrogenação (SEMMA, 2002).

A hidrogenação é um processo químico que consiste na adição de átomos de hidrogênio a ligações insaturadas entre carbonos formadores de cadeias de ácidos graxos. As reações são conduzidas com o aquecimento de óleos quase sempre de origem vegetal na presença de catalisador metálico (geralmente níquel) e hidrogênio. Dessa maneira, a hidrogenação reduz o número de duplas ligações da cadeia, aumentando o grau de saturação do lipídio e, conseqüentemente, seu ponto de fusão, diversificando suas possibilidades de aplicação industrial. A indústria geralmente utiliza processos de hidrogenação parcial, que promovem saturação incompleta das cadeias de ácidos graxos. Algumas duplas ligações dessas cadeias são mantidas e a saturação incompleta, juntamente com a isomerização térmica decorrente do aquecimento do óleo, podem mudar as posições das duplas ligações nos ácidos graxos e produzir diversos isômeros geométricos e de posição, incluindo os isômeros *trans* (SEMMA, 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) colocou em vigor em 2003 a resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003), que obriga indústrias instaladas no Brasil a informarem no rótulo de seus produtos a quantidade de ácidos graxos *trans* contida no alimento. Para preservar seu público consumidor e garantir um diferencial de competitividade em relação à concorrência, empresas brasileiras estão buscando alternativas ao processo de hidrogenação para reduzir os ácidos graxos *trans* em seus produtos (BRITO, 2005).

Além disso, o crescimento da demanda do consumidor por margarinas ou cremes vegetais que associem boas propriedades físicas e sensoriais, como textura, cremosidade e sabor agradável, tem servido como um impulso para a produção industrial de manteigas modificadas e produtos à base de manteiga. Muitos produtos estão comercialmente disponíveis em todo o mundo e novos produtos estão surgindo constantemente (ROUSSEAU et al., 1996a).

O primeiro registro do desenvolvimento comercial de um *spread* feito a partir da mistura de gordura do leite e óleo vegetal data do ano de 1963, na Suécia. O produto, chamado *Bregott*, continha 80% de gordura, formada por 80% de gordura do leite e 20% de óleo de soja. No início dos anos 80, misturas de manteiga e óleos vegetais surgiram no mercado americano. Estas misturas geralmente eram formadas por 40% de manteiga e 60% de óleo vegetal, para um teor de gordura de 80%. Com a crescente popularidade dos *spreads* com teor reduzido de gordura (menos de 80%), a partir de meados dos anos 80, outras misturas com teor de gordura do leite de 2 a 25% foram introduzidas no mercado (HUI, 1996). No Brasil, atualmente, existem apenas misturas manteiga-margarina, mas não existem no mercado misturas de manteiga com óleo vegetal não hidrogenado.

A mistura de manteiga com óleos vegetais que são líquidos à temperatura de refrigeração pode levar a produtos que equilibram a nutrição com as características organolépticas desejáveis e custos de produção mais baixos (ROUSSEAU et al., 1996a). A principal tendência está em incorporar o máximo possível de óleo rico em ácidos graxos monoinsaturados ou poliinsaturados a esses produtos por razões nutricionais, porém isso leva a dificuldades técnicas quanto à estabilidade de suas características de espalhabilidade e suas propriedades de textura (MARANGONI & ROUSSEAU, 1988b; 1998c).

Outra tendência na produção de *spreads* é o aumento do uso da interesterificação, que se apresenta como uma opção na indústria de gorduras para alterar propriedades de espalhabilidade, pois pode modificar substancialmente as propriedades físicas das gorduras sem, no entanto, produzir ácidos graxos *trans* (DE GREYT & KELLEN, 2001). Na indústria, é comum a substituição da hidrogenação parcial de lipídios pelos métodos combinados de fracionamento e interesterificação ou hidrogenação total e interesterificação para a fabricação de margarinas e bases gordurosas com diversas aplicações (DE GREYT & KELLEN, 2001; GIOIELLI, 2002).

A interesterificação envolve a remoção e a redistribuição dos ácidos graxos entre os triacilgliceróis, podendo ocorrer dentro da mesma molécula ou entre moléculas diferentes. O produto resultante é chamado de lipídio estruturado e apresenta a mesma composição em ácidos graxos do material inicial, mas a composição em triacilgliceróis e as propriedades físicas, como ponto de fusão, curva de sólidos, espalhabilidade e estrutura cristalina, são alteradas. Dessa maneira, a interesterificação apresenta-se como um método mais eficiente do que a simples mistura para alterar características de fusão e cristalização de óleos e gorduras (DE GREYT & KELLEN, 2001).

A interesterificação química pode ocorrer naturalmente a altas temperaturas (300 °C ou mais), mas é muito demorada e normalmente acompanhada de decomposição e polimerização. O uso de catalisadores acelera a reação e permite diminuir a temperatura de processo (GIOIELLI, 2000). Os catalisadores podem ser de natureza química ou enzimática. Dentre os catalisadores químicos, o metóxido de sódio é o mais comumente utilizado e dentre os enzimáticos, as lipases regioespecíficas oferecem uma série de vantagens (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995).

Existem dois tipos de interesterificação química: ao acaso e direcionada. As reações realizadas a temperaturas acima do ponto de fusão do triacilglicerol de maior ponto de fusão resultam em redistribuição completa dos ácidos graxos ao acaso entre todos os triacilgliceróis. Porém, se a reação de interesterificação ocorrer a temperaturas abaixo do ponto de fusão do triacilglicerol de maior ponto de fusão (geralmente um triacilglicerol triessaturado), o resultado final será uma mistura rica nesse componente. Conforme este triacilglicerol vai sendo produzido com a reação, ele vai cristalizando e se separando da solução. Por isso, a interesterificação direcionada pode ser vista como uma combinação de interesterificação e fracionamento (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995; WILLIS & MARANGONI, 1999).

A interesterificação química tem sido utilizada comercialmente desde a década de 40 com o objetivo de modificar as propriedades físicas da banha. Atualmente, sua aplicação está mais voltada para a produção de margarinas livres de ácidos graxos *trans* (ROUSSEAU & MARANGONI, 1998a).

Os mecanismos das reações de interesterificação química e enzimática têm muitos aspectos em comum. Ambos consistem na mudança de posição dos ácidos graxos nas cadeias de triacilgliceróis (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995). O

mecanismo da reação de interesterificação química envolve, inicialmente, a formação de um ânion diglicerinato, a partir do catalisador metóxido de sódio. Em função da polaridade, o ânion diglicerinato se aproxima da carbonila de uma ligação éster de um triacilglicerol, formando um complexo instável com cinco ácidos graxos. Este complexo, ao regenerar o triacilglicerol e o ânion diglicerinato, pode promover a troca ao acaso dos radicais acil presentes, provocando, então, a interesterificação. Este rearranjo prossegue até que seja atingido o equilíbrio químico, quando a distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis é totalmente ao acaso (BOCKISCH, 1998; MARANGONI & ROUSSEAU, 1995).

As lipases atuam na interface óleo/água de emulsões. O sítio ativo é composto por três aminoácidos: serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico. As lipases são ativas inclusive em meios de baixo teor de umidade e em solventes orgânicos. Esta propriedade permite que as lipases sejam empregadas como biocatalisadores na síntese orgânica. Em meios orgânicos, quantidades restritas de água reduzem a ação hidrolítica normal, e a enzima pode ser usada em reações de esterificação e interesterificação (KOVAC et al., 2000). Na interesterificação, a reação se processa através de uma sucessão de hidrólise e re-síntese de triacilgliceróis (GAILLE, 1999). A atividade de água da enzima na faixa de 0,3-0,5 propicia a máxima conversão nestas reações (GIOIELLI et al., 1994; WONG et al., 2000). A água deve estar presente em quantidade suficiente na estrutura protéica para garantir à enzima que sua estrutura espacial seja ativa. A secagem completa leva a uma estrutura inativa, cuja atividade catalítica pode ser restaurada pela adição de água. Esta quantidade de água necessária e suficiente deve estar associada à enzima para que seja alcançada a atividade de água termodinâmica ótima, que permite a transferência de grupos acil, minimizando a hidrólise (GAILLE, 1999). Foi constatada a presença de 230 moléculas de água na lipase de *Rhizomucor miehei*, usando métodos cristalográficos de raios-X. A camada essencial de água pode atuar como um componente primário do microambiente enzimático e como um tampão entre a enzima e o meio de reação (LEE & AKOH, 1998).

A reação catalisada por lipases tem como vantagens temperaturas mais amenas de reação e a regioespecificidade das lipases, o que pode ser menos prejudicial ao sabor do lipídio estruturado resultante. Por outro lado, na reação enzimática, muitos fatores devem ser levados em consideração, como a escolha da lipase (existem lipases com diferentes regioespecificidades), método de imobilização

e material de suporte das lipases, condições de reação (temperatura, pH e teor de umidade) e características do processo (contínuo ou descontínuo) e do biorreator (ROUSSEAU & MARANGONI, 1998a; 1998b).

Sob a perspectiva de custo e aplicação em larga escala, a interesterificação química parece ser o método mais atrativo para a produção de bases gordurosas para margarinas e produtos semelhantes. Contudo, sob a perspectiva de produzir lipídios com composições muito específicas para aplicações funcionais e medicinais, os métodos de interesterificação enzimática são mais interessantes (WILLIS et al, 1998).

As diferenças entre as propriedades físicas dos lipídios estruturados por interesterificação química ou enzimática podem residir na distribuição dos ácidos graxos na cadeia do glicerídio. A gordura do leite originalmente apresenta a distribuição estereoespecífica apresentada na Tabela 3 (GUNSTONE et al., 1986). Com a interesterificação química, a distribuição dos ácidos graxos teoricamente é uniforme, enquanto que com a utilização das lipases 1,3-específicas, a distribuição de ácidos graxos na posição *sn*-2 não se modifica. Portanto, as composições em triacilgliceróis resultantes da interesterificação química e enzimática são diferentes.

Para melhorar a plasticidade da manteiga, ROUSSEAU et al. (1996a, 1996b, 1996c) realizaram estudos de reestruturação da gordura do leite através de mistura com óleo de canola e posterior interesterificação química e enzimática, analisando o comportamento de fusão, modificações dos triacilgliceróis, microestrutura, polimorfismo e reologia das misturas. O rearranjo provocou diferenças significativas nos triacilgliceróis, que se refletiram em alterações no conteúdo de gordura sólida em alguns intervalos de temperatura.

Tabela 3 - Composição estereoespecífica em ácidos graxos da gordura do leite (mol%)

Ácido graxo	Triacilglicerol	Posição sn-1	Posição sn-2	Posição sn-3
4:0	8,8	---	---	26,4
6:0	5,0	---	0,1	14,8
8:0	2,5	0,2	2,9	4,4
10:0	5,3	1,4	7,8	6,7
12:0	5,2	3,4	8,1	4,0
14:0	13,8	12,7	23,9	4,9
14:1	1,7	1,4	2,4	1,2
15:0	1,0	1,5	1,8	0,3
15:1	0,2	0,3	0,4	---
16:0	28,0	41,2	36,7	6,1
16:1	2,3	2,7	3,3	1,0
17:0	0,6	1,0	0,5	0,2
17:1	0,2	0,3	0,2	0,2
18:0	8,3	15,2	3,0	6,7
18:1	14,1	16,2	7,2	19,0
18:2	1,1	1,2	0,6	1,6
18:3	0,9	0,7	0,3	1,7
Outros	1,0	0,6	0,8	1,4

1.5 Fitosteróis

Recentemente, fitosteróis/fitostanóis têm sido adicionados a margarinas especiais que estão comercialmente disponíveis como alimentos funcionais, com capacidade de reduzir os níveis de colesterol total e LDL. Foi provado que seu consumo como parte de uma dieta saudável implica em diminuição no risco de doenças do coração em 25%. Esta combinação pode evitar a necessidade de medicamentos para indivíduos com níveis moderadamente altos de colesterol (NTANIOS, 2001; WEBER, 2002).

Os *spreads* com capacidade de baixar os níveis de colesterol têm ganhado importância desde a introdução no mercado de margarinas funcionais contendo ésteres de fitosteróis, como a Becel Pro Activ, da Unilever. Um produto com característica similar chamado Benecol já havia sido lançado pela companhia finlandesa Rasio em alguns países escandinavos em meados dos anos 90 (MENRAD, 2003).

No organismo, os fitosteróis, dos quais os mais comuns são o campesterol, o sitosterol e o estigmasterol, atuam na diminuição da absorção de colesterol no intestino delgado por um mecanismo de competição, com consequente aumento na excreção fecal. Esta competição ocorre porque a estrutura química dos fitosteróis é semelhante à do colesterol, diferindo no tamanho da cadeia. Os fitosteróis saturados, que são os fitostanóis, parecem ser mais efetivos que os insaturados na diminuição do colesterol no organismo (HORNSTRA, 1999; DILLARD & GERMAN, 2000; PIIRONEN et al., 2000; NTANIOS, 2001). MELNIKOV et al. (2004) demonstraram que o mecanismo proposto de co-cristalização de fitosteróis e colesterol tem pequena importância na redução do colesterol, a menos que a dieta contenha quantidades relativamente pequenas de gordura.

Em óleos vegetais, os fitosteróis geralmente estão presentes como esteróis livres ou como ésteres de ácidos graxos. A fração éster é uma mistura complexa de uma variedade de fitosteróis esterificados a vários ácidos graxos. A distribuição de ácidos graxos esterificados a esteróis pode diferir consideravelmente da distribuição de ácidos graxos no triacilglicerol do óleo vegetal. Os ésteres de fitosteróis em geral contêm níveis significativamente mais altos de ácidos graxos insaturados comparados à composição em triacilgliceróis correspondente do óleo (VERLEYEN et al., 2002).

Os ésteres de estanol ou esterol, puros, em dosagens de 2g/dia, diminuem o colesterol LDL em 10% ou mais. Quando consumidas juntamente com uma dieta que visa a diminuir o colesterol, margarinas contendo ésteres de sitostanol reduzem o colesterol LDL em pelo menos mais 5%. Estes estudos utilizaram esteróis na forma de ésteres adicionados à margarina. Esteróis livres ou não esterificados também mostraram ser efetivos na redução de 17% do colesterol LDL durante tratamento com alta dose de uma suspensão de esteróis de soja (NESTEL et al., 2001).

A esterificação desses compostos pode melhorar sua eficácia, pois permite melhor 'solubilização' na margarina e ótima dispersão em micelas contendo gordura durante o metabolismo intestinal dos lipídios (NESTEL et al., 2001).

1.6 *Cristalização*

O comportamento de cristalização de lipídios tem implicações muito importantes, principalmente no processamento industrial de produtos cujas características físicas dependem em grande parte de cristais de gorduras, como chocolates e margarinas, e separação de gorduras específicas a partir de gorduras naturais através do fracionamento (SATO, 2001). A velocidade de formação dos cristais, o crescimento e as transformações polimórficas são importantes para se determinar o processo e as condições de armazenamento de óleos e gorduras (HERRERA et al., 1998).

Para o completo entendimento da reologia de gorduras plásticas, faz-se necessária a caracterização de sua microestrutura, já que gorduras plásticas consistem de uma rede cristalina em uma matriz oleosa contínua (ROUSSEAU et al., 1996b). Muitos fatores influenciam a cristalização dos lipídios, especialmente a maneira como estes são resfriados a partir de seu estado líquido, pois quando um óleo é resfriado, uma fase sólida se separa, cuja composição e quantidade dependem principalmente da taxa de resfriamento e das temperaturas inicial e final (ROUSSEAU et al., 1996b; TIMMS, 1995).

MARANGONI & ROUSSEAU (1998a) relacionaram mais detalhadamente uma série de fatores que influenciam as propriedades das redes cristalinas de gorduras plásticas, entre eles (i) tendência à cristalização, que inclui polimorfismo, tamanho, número, forma e comportamento de agregação dos cristais; (ii) composição química; (iii) proporção sólido/líquido; (iv) intersolubilidade entre os triacilgliceróis; (v) procedimento de cristalização, que inclui taxa de resfriamento, grau de superesfriamento, tratamento mecânico e temperagem; e (vi) a presença de componentes como fosfolipídios e esteróis.

As moléculas em um óleo estão em movimento caótico. A uma temperatura um pouco acima de seu ponto de fusão, acredita-se que algumas poucas moléculas

se empacotem formando pequenos aglomerados, como em um cristal, que se formam e se dissociam dinamicamente. Estes aglomerados crescem mais e mais com a diminuição da temperatura e por fim um núcleo cristalino é formado (LARSSON, 1994).

O crescimento de uma rede cristalina de gordura pode ser visualizado da seguinte maneira: os triacilgliceróis cristalizam a partir do estado líquido em formas polimórficas particulares. Estes cristais crescem a elementos microestruturais maiores (~6 μm), que então se agregam por um processo limitado de transferência de massa e calor em microestruturas maiores (~100 μm). O processo de agregação continua até que uma rede tridimensional contínua seja formada por uma “coleção” de microestruturas. A fase líquida da gordura está contida na estrutura desta rede sólida. A Figura 1 retrata a hierarquia estrutural definida durante a cristalização de uma típica rede cristalina de gordura (NARINE & MARANGONI, 1999c; 1999d).

Figura 1. Fatores que influenciam as propriedades macroscópicas de uma rede cristalina de gordura

Os triacilgliceróis são moléculas orgânicas bem conhecidas e, portanto, os ângulos e comprimentos das ligações entre os vários átomos dentro de cada molécula são facilmente estabelecidos baseando-se na química orgânica estrutural padrão. O que não é trivial é a previsão de uma estrutura cristalina particular formada por um conjunto de moléculas de triacilgliceróis de orientação estereoespecífica conhecida. A complexidade e a flexibilidade destas moléculas também permitem diferentes empacotamentos do mesmo conjunto de moléculas, levando à existência de diferentes formas polimórficas. Como a composição em triacilgliceróis da rede cristalina influencia diretamente o polimorfismo desta rede, seu comportamento de fusão está diretamente relacionado à sua composição em triacilgliceróis, porém não existe nenhum método preditivo que relacione a composição em triacilgliceróis com o perfil de fusão de uma gordura (NARINE & MARANGONI, 1999d).

O comportamento reológico de gorduras plásticas é consequência das interações entre os cristais de gordura que se encontram em uma matriz tridimensional de gordura sólido-líquida agregada. As principais forças que levam à formação dessa rede são as forças atrativas de Van der Waals. A porção líquida da gordura, a fase contínua dispersa entre a rede de gordura agregada, em conjunto com a fração sólida, são responsáveis pelo comportamento viscoelástico. Assim, a quantidade de gordura cristalizada e os tipos de cristal presentes nessa matriz gordurosa têm importância primordial no comportamento reológico da gordura (ROUSSEAU et al., 1996c).

A espalhabilidade típica da manteiga é explicada pela estrutura tridimensional da gordura sólida cristalizada que retém uma proporção muito maior de óleo líquido dentro dela. Isso é conceitualmente análogo a uma esponja, mas no caso da manteiga, a rede de suporte pode se refazer depois de ser quebrada, simplesmente por recristalização (GERMAN & DILLARD, 1998). A cristalização da gordura do leite é mais complicada do que a da maioria das outras gorduras devido à sua complexidade molecular, à formação de cristais mistos e a diferentes modificações polimórficas (METIN & HARTEL, 1998).

Os cristais de gorduras plásticas apresentam polimorfismo. Desta maneira, triacilgliceróis com ácidos graxos idênticos podem apresentar grandes diferenças no comportamento polimórfico. A nomenclatura atual classifica os cristais em três principais formas - α , β' e β - de acordo com a estrutura da sub-célula (seção

transversal do modo de empacotamento das cadeias carbônicas). O empacotamento das subcélulas na forma α é hexagonal, com espaçamento de 0,42 nm, na forma β' é ortorrômbica perpendicular, com espaçamento de 0,42-0,43 e 0,37-0,40 nm, e na forma β é triclínica paralela, com espaçamento de 0,46 nm. Dependendo da composição em ácidos graxos do triacilglicerol, outras formas polimórficas metaestáveis, chamadas γ e δ , e as sub-formas de β e β' , foram observadas em triacilgliceróis mistos. A forma polimórfica β' é a mais comum na gordura do leite, com forma de esferulito. A maioria das gorduras apresenta polimorfismo monotrópico, isto é, quando ocorre uma transição (por exemplo de β' para β), o empacotamento das cadeias moleculares do triacilglicerol se torna mais compacto, resultando em maior ponto de fusão (ROUSSEAU et al., 1996a; NARINE & MARANGONI, 1999d).

Os principais fatores estruturais utilizados para caracterizar as diferentes formas polimórficas são a estrutura da subcélula e a estrutura de camadas (NARINE & MARANGONI, 1999d). O arranjo das cadeias de hidrocarbonetos pode ser descrito pela chamada subcélula, que é a menor unidade cristalográfica em uma camada de cadeias de hidrocarboneto. Pela repetição lateral da subcélula, obtém-se toda a estrutura de uma região de cadeias. A existência de estruturas cristalinas alternativas é uma propriedade característica dos lipídios. Isto é devido às possibilidades de diferentes arranjos de empacotamento de cadeias e de variações na inclinação das cadeias que formam as camadas. Existem várias maneiras de formação das camadas, assim como de empacotamento para formação da subcélula (GUNSTONE et al., 1986).

BERGER et al. (1979) descreveram os tipos de cristais que podem ser encontrados em gorduras. Alguns deles estão representados na Figura 2. São eles:

1. Esferulitos A: cristais com núcleo compacto, cercado de agulhas longas e finas distribuídas radialmente.
2. Esferulitos B: pequenos núcleos cercados de cristais orientados aleatoriamente.
3. Cachos: grupos de cristais pequenos aproximadamente esféricos, arranjados aleatoriamente.
4. Feixes: cristais distribuídos de forma paralela, orientados aleatoriamente, formando estrutura semelhante a uma rede.
5. Aglomerados: agregados de cristais esferulitos e cachos.

Esferulito A

Esferulito B

Aglomerados

Feixes

Figura 2. Tipos de cristais de gorduras

Os ácidos graxos possuem “alto poder de cristalização” - o que significa que estes cristalizam prontamente a temperaturas abaixo de seu ponto de fusão e apresentam pouca tendência a se manterem como líquidos superesfriados ou soluções supersaturadas. Esta característica faz com que, quando a temperatura de um líquido é diminuída ou a concentração de uma solução é aumentada em níveis que não mais favoreçam o estado líquido ou dissolvido desta substância, exista grande probabilidade de que um mínimo número de moléculas se agregue em um arranjo representativo ou muito similar à sua rede cristalina (MEAD et al., 1986).

Para que ocorra cristalização, é necessário aumentar a concentração (do soluto a ser cristalizado) acima da concentração de uma solução saturada a uma dada temperatura. Na prática, isto não é suficiente para promover a cristalização e podem existir soluções com concentrações acima do nível de saturação sem que se formem cristais. Estas soluções são chamadas supersaturadas. Para qualquer sistema pode-se construir um diagrama de saturação-supersaturação (TIMMS, 1995).

O processo de cristalização é dividido em duas fases: nucleação e crescimento dos cristais. A nucleação envolve a formação de agregados de moléculas que excederam um tamanho crítico e são, portanto, estáveis. O processo de nucleação depende da supersaturação e do superesfriamento (HERRERA et al., 1998). Um núcleo é o menor cristal que pode existir em uma solução a uma dada concentração e temperatura. Agregados de moléculas menores que um núcleo são chamados de embriões e se redissolvem se forem formados (TIMMS, 1995).

Quando moléculas se unem para formar um cristal, existem duas forças opostas ou divergentes. Primeiramente, ocorre liberação de energia devido ao calor de cristalização, que favorece o processo. Em segundo lugar, a superfície do cristal aumenta conforme as moléculas se agregam. Assim como quando um balão estoura, o aumento de sua superfície requer energia para se sobrepor à tensão superficial ou à pressão. Assim, um cristal estável se formará apenas quando a energia devida ao calor de cristalização exceder a energia necessária para se sobrepor à energia superficial (TIMMS, 1995).

Três tipos de nucleação podem ocorrer. A nucleação homogênea, que ocorre a partir da fase líquida, é espontânea e raramente ocorre em gorduras. A nucleação heterogênea ocorre em partículas sólidas, como poeira, paredes de um recipiente ou moléculas estranhas, com as quais a nova fase apresenta alguma afinidade química

ou física. A cristalização em uma parede pode diminuir a energia superficial que funciona como barreira para a cristalização. Quanto menor o ângulo de contato, mais fácil se torna a nucleação. Porém, as impurezas, que geralmente também diminuem a energia superficial, quase sempre resultam em uma menor taxa de nucleação. Em muitos sistemas reais, a nucleação heterogênea ocorre antes da homogênea. A nucleação secundária ocorre quando pequenos pedaços de cristal são removidos da superfície dos cristais existentes que estão crescendo. Se estes forem menores que o tamanho crítico, eles se redissolvem. Se forem maiores, agem como novos núcleos e crescem para formar cristais. Na cristalização industrial de gorduras, a agitação é a principal causa de nucleação secundária. Quando esta é desejada, por exemplo, na produção de margarinas, um alto nível de agitação é utilizado. Quando esta não é desejada, como na cristalização fracionada, a agitação é geralmente a mínima necessária para facilitar a transferência de calor. A semeadura de cristais é uma forma de nucleação secundária que às vezes é utilizada na indústria de chocolates (HUI, 1996; TIMMS, 1995).

Uma vez que um núcleo cristalino se formou, este começa a crescer pela incorporação de outras moléculas, na configuração correta e no lugar correto, no cristal em crescimento. Estas moléculas provêm da camada de líquido adjacente, que é continuamente preenchida pelo líquido supersaturado que está ao redor do cristal. A diferença de potencial químico de uma molécula que está na solução para uma que já faz parte do cristal é o que determina sua taxa de crescimento. Esta diferença está diretamente relacionada com o superesfriamento de um óleo ou a supersaturação de uma solução. A taxa de crescimento de um cristal é diretamente proporcional ao superesfriamento e inversamente proporcional à viscosidade da solução. Quanto mais alta é a viscosidade, mais difícil se torna a troca de matéria entre a fase líquida e a superfície do cristal e mais lento será seu crescimento. Similarmente, o transporte do calor de cristalização também é afetado. A taxa de cristalização também depende de fatores internos, como forma polimórfica, morfologia do cristal e eventuais defeitos (HUI, 1996; LARSSON, 1994; TIMMS, 1995). A nucleação e o crescimento dos cristais são dois fenômenos distintos, mas podem ocorrer simultaneamente e o sistema permanece em constante evolução. Podem ocorrer outras mudanças nos cristais conforme os cristais estáveis modificam sua tendência e cristais metaestáveis sofrem transições polimórficas (HERRERA et al., 1999b).

Se um pequeno grau de superesfriamento é aplicado, a incorporação de moléculas apenas ocorrerá se uma nova molécula estiver exatamente na configuração correta, já que a molécula terá tempo suficiente para se orientar corretamente. Assim, um baixo grau de superesfriamento tende a produzir cristais mais perfeitos. Em graus mais altos de superesfriamento, as moléculas se prendem à superfície do cristal mais rapidamente. Uma nova molécula pode se prender ao cristal se a molécula vizinha não estiver na posição perfeita, podendo ocorrer um deslocamento do empacotamento regular do cristal. Como resultado, torna-se difícil obter cristais perfeitos com alto grau de superesfriamento e triacilgliceróis diferentes podem cristalizar simultaneamente se forem semelhantes quanto a seu comprimento de cadeia e ponto de fusão. Formam-se então cristais mistos e soluções sólidas instáveis (TIMMS, 1995).

Devido a interações atrativas entre os cristais, estes tendem a formar aglomerados. Os cristais muito grandes que podem ser observados durante a cristalização, são normalmente compostos por vários cristais pequenos unidos por ligações fracas. A morfologia dos cristais é determinada por condições internas e externas. A cinética de cristalização de uma gordura depende da taxa de formação de núcleos, bem como da taxa de crescimento dos cristais. O tamanho e a forma dos cristais dependem da relação entre estes dois fatores. Normalmente, o resfriamento lento resulta em cristais grandes, enquanto que o resfriamento rápido produz cristais menores (HUI, 1996).

1.7 Cinética de cristalização

Produtos com alto teor lipídico, como margarinas, cremes vegetais e similares, devem apresentar proporção adequada entre as frações sólida e líquida para que o produto tenha a textura e a funcionalidade (i.e., espalhabilidade) desejada pelos consumidores (TORO-VAZQUEZ et al., 2000).

Além da proporção sólido-líquido do produto a determinada temperatura, a velocidade de formação e crescimento de cristais, bem como sua transformação polimórfica, são importantes para determinar condições de processo e armazenamento de óleos e gorduras (HERRERA et al., 1998).

Pesquisas na área de cristalização de gorduras utilizam metodologias de DSC (*Differential Scanning Calorimetry* ou Calorimetria Diferencial de Varredura), difração de raios-X, RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e diferentes técnicas de microscopia (MARANGONI, 2005).

Estudos na área de cristalização de gorduras são importantes tanto do ponto de vista acadêmico quanto do tecnológico. A caracterização da cinética de cristalização de gorduras geralmente é feita utilizando-se o modelo de Avrami ou suas versões modificadas (HERRERA et al., 1998; HERRERA et al., 1999a; MARANGONI, 1998; METIN & HARTEL, 1998; NG & OH, 1994; TORO-VAZQUEZ et al., 2000; WRIGHT et al., 2000). Este modelo, porém, exige um período final que demonstre que o processo de cristalização tenha se estabilizado.

MARANGONI (1998) afirma que a equação de Avrami deve ser utilizada em sua forma original e que o uso da equação de Avrami modificada deve ser abandonado, pois as modificações são muito arbitrárias e criam uma dependência entre a constante de Avrami (k) e o expoente de Avrami (n). Do ponto de vista da construção das curvas não existem vantagens em se utilizar o modelo de Avrami modificado ao invés do original. O autor afirma também que as medições do aumento de volume/massa de cristais durante a cristalização devem ser realizadas microscopicamente ou por determinação do conteúdo de gordura sólida, e não por turbidimetria. A equação de Avrami dá uma indicação da natureza do processo de crescimento dos cristais e está demonstrada a seguir:

$$\frac{CGS(t)}{CGS(\infty)} = 1 - e^{-kt^n} \quad \text{Equação 1}$$

onde $CGS(t)$ descreve o conteúdo de gordura sólida (%) como função do tempo, $CGS(\infty)$ é o limite do conteúdo de gordura sólida conforme o tempo tende ao infinito, k é a constante de Avrami e n é o expoente de Avrami.

A equação foi desenvolvida para o estudo da cinética de mudança de fase e seus princípios foram aplicados pela primeira vez na cristalização de polímeros da década de 50. No estudo de gorduras, a equação descreve um evento no qual há um período lag inicial, onde a cristalização ocorre muito lentamente, e subsequentemente um rápido aumento da massa cristalina. A teoria de Avrami

considera que a cristalização ocorre tanto pela nucleação quanto pelo crescimento dos cristais e assume que as condições de transformação são isotérmicas, que a nucleação ocorre espacial e arbitrariamente e que a cinética de crescimento é linear, em que a velocidade de crescimento da nova fase depende apenas da temperatura, e não do tempo (WRIGHT et al., 2000).

Os parâmetros de Avrami fornecem informações sobre a natureza do processo de cristalização. A constante k é a constante da velocidade de cristalização. Depende principalmente da temperatura de cristalização e esta dependência é geralmente expressa pela equação de Arrhenius. A constante k leva em consideração tanto a nucleação quanto a taxa de crescimento dos cristais. O expoente de Avrami n , às vezes chamado de índice de cristalização, indica o mecanismo de crescimento dos cristais. Este parâmetro é uma função combinada da dependência do tempo por parte da nucleação e do número de dimensões em que o crescimento ocorre. A nucleação pode ser instantânea, com os núcleos surgindo todos de uma só vez no início do processo, ou esporádica, com o número de núcleos aumentando linearmente com o tempo. O crescimento ocorre tomando formas de agulhas, discos ou esferulitos, em uma, duas ou três dimensões, respectivamente. A Tabela 4 mostra o valor do expoente de Avrami, n , esperado para vários tipos de nucleação (1, 2 ou 3) e crescimento (0 ou 1) (WRIGHT et al., 2000).

Tabela 4 - Valores do expoente de Avrami, n , para diferentes tipos de nucleação e crescimento

Tipo de crescimento*	Tipo de nucleação*	n^*	Tipo de crescimento do cristal e nucleação esperados
3	1	$3+1=4$	Crescimento esferulítico a partir de núcleos esporádicos
3	0	$3+0=3$	Crescimento esferulítico a partir de núcleos instantâneos
2	1	$2+1=3$	Crescimento em forma de disco a partir de núcleos esporádicos
2	0	$2+0=2$	Crescimento em forma de disco a partir de núcleos instantâneos
1	1	$1+1=2$	Crescimento em forma de agulha a partir de núcleos esporádicos
1	0	$1+0=1$	Crescimento em forma de agulha a partir de núcleos instantâneos

* n = tipo de crescimento + tipo de nucleação.

Tipo de crescimento: 3 = crescimento esferulítico

2 = crescimento em forma de disco

1 = crescimento em forma de agulha

Tipo de nucleação: 1 = a partir de núcleos esporádicos

0 = a partir de núcleos instantâneos

Apesar de terem sido publicados inúmeros estudos sobre a cristalização da gordura do leite envolvendo dados sobre dimensão fractal, número e tamanho dos cristais, reologia e cinética de cristalização, entre outras propriedades (HERRERA et al., 1999b; METIN & HARTEL, 1998; ROUSSEAU et al., 1996b; WRIGHT et al., 2000, CAMPOS et al, 2002; BATTE & MARANGONI, 2005; LOPEZ et al., 2005), existem poucos dados quantitativos da cinética de formação e crescimento dos cristais (GRALL & HARTEL, 1992).

A velocidade de resfriamento de gorduras geralmente representa um fator de grande importância no tamanho, forma, número e forma polimórfica de cristais. LOPEZ et al. (2005) conduziram o resfriamento de gordura do leite de 1 a 3 °C/min e puderam correlacionar a velocidade de resfriamento das amostras com rearranjos estruturais das formas α , β' e β . O resfriamento a 3 °C/min, por exemplo, por ser considerado rápido, levou à formação de diferentes cristais que ainda não estão em equilíbrio, ou seja, sofrerão transição polimórfica em algum momento.

MAZZANTI et al. (2004) analisaram a gordura do leite por difração de raios-X e observaram que o resfriamento da gordura do leite a altas velocidades e baixas temperaturas finais de cristalização resultou na formação de cristais na forma α metaestável, que posteriormente resultaram na formação de uma mistura de cristais dos tipos β' e β . Ao contrário, a cristalização realizada a baixas velocidades de resfriamento e altas temperaturas finais de cristalização resultou na formação de cristais apenas do tipo β' , sem a presença de cristais dos tipos α ou β .

Alguns trabalhos recentes foram publicados apresentando, em suas versões on-line disponíveis na Internet, vídeos referentes à cristalização de óleos e gorduras (DIBILDOX-ALVARADO et al, 2004; BATTE & MARANGONI, 2005; LITWINENKO et al., 2004). Esses trabalhos, porém, não apresentaram uma análise quantitativa consistente das seqüências de imagens.

2. Objetivos

Geral:

- Desenvolver uma base lipídica para a produção de um *spread* do qual a gordura do leite seja o principal componente, que apresente melhor espalhabilidade que a manteiga e maiores teores de ácidos graxos insaturados através da adição de óleo de girassol. A adição de ésteres de fitosteróis tem como função tornar este um alimento funcional, pois o consumo destas substâncias contribui para a diminuição dos níveis de colesterol total no sangue.

Específicos:

- Realizar misturas em diversas proporções de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis;
- Efetuar interesterificação química e enzimática entre os componentes das misturas;
- Analisar as propriedades físico-químicas das misturas antes e após a interesterificação química e enzimática e compará-las;
- A partir destes resultados, tentar determinar quais proporções entre os três componentes seriam apropriadas para a produção de um *spread*;

3. Material e Métodos

3.1. Fluxograma do processo

A realização da parte experimental está esquematizada no fluxograma da Figura 3. As amostras foram analisadas após a mistura e após a realização da interesterificação química e enzimática.

Figura 3. Fluxograma do processo de preparação das misturas e dos lipídios estruturados

3.2. Matéria-prima

A gordura do leite foi obtida a partir de manteiga tipo extra sem sal (Paulista, Brasil), adquirida no varejo, por fusão completa à temperatura de 60-70 °C em forno de microondas para provocar quebra da emulsão e separação das fases gordurosa e aquosa. A fase aquosa contendo grande parte dos sólidos do leite foi descartada.

A fase gordurosa, que apresentava turbidez devido à presença de sólidos do leite e de gotículas de fase aquosa, foi filtrada em papel de filtro em estufa a 50 °C. Obteve-se, por fim, a gordura do leite pura que, quando fundida, apresentava cor amarela intensa e transparente e odor característico. Foi preparado um único lote de gordura do leite, que foi utilizado posteriormente na preparação de todas as misturas.

A manteiga foi utilizada como fonte de gordura do leite neste trabalho pela simplicidade do processo de separação da gordura, conforme descrito anteriormente, e também por representar a fonte mais rica em gordura entre todos os produtos lácteos disponíveis no mercado.

O óleo de girassol refinado Liza (Cargill, Brasil) foi adquirido no varejo e utilizado sem tratamento adicional.

Os ésteres de fitosteróis (L&P Food Ingredient Co., Ltd., Guangdong Food Industry Institute, China) foram doados pela empresa Tovani Benzaquen Representações Ltda. e sua composição, como consta na especificação do produto, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Especificação dos ésteres de fitosteróis, segundo fabricante

Item	Limite padrão	Amostra
Aparência	Lipídio amarelo claro Praticamente inodoro	Lipídio amarelo claro Praticamente inodoro
Ésteres de esteróis e esteróis livres (%)	≥94,0	98
Esteróis livres (%)	<6,0	1,7
Ésteres metílicos de ácidos graxos (%)	<0,5	0,3
Índice de peróxidos (meq/kg)	<5,0	0,1
Ácidos graxos <i>trans</i> (%)	<1,0	<0,1
Acidez (mg KOH/g)	<1,0	0,52
Ferro (ppm)	<1,0	<0,1
Água (%)	<0,1	<0,1
Cobre (ppm)	<0,5	<0,5
Perfil de esteróis (%)		
Colesterol	0,0 - 2,0	<0,1
Brassicasterol	0,0 - 9,0	8,0
Campesterol	20,0 - 32,0	28,3
Campestanol	0,0 - 6,0	<0,2
Estigmasterol	12,0 - 25,0	19,4
β-Sitosterol	40,0 - 57,0	44,0
β-Sitostanol	0,0 - 2,5	<0,2
Δ ⁵ -Avenasterol	0,0 - 4,0	<0,2
Δ ⁷ -Estigmasterol	0,0 - 2,0	<0,2
Δ ⁷ -Avenasterol	0,0 - 2,0	<0,2
Outros	0,0 - 6,0	<0,2

3.3. Misturas

Para o estudo das interações em misturas ternárias de gorduras foi realizado um planejamento de 15 experimentos, apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Planejamento experimental das misturas

Mistura	Componentes		
	x_1	x_2	x_3
1	1	0	0
2	0,875	0	0,125
3	0,750	0	0,250
4	0,900	0,100	0
5	0,787	0,088	0,125
6	0,675	0,075	0,250
7	0,800	0,200	0
8	0,700	0,175	0,125
9	0,600	0,150	0,250
10	0,700	0,300	0
11	0,613	0,262	0,125
12	0,525	0,225	0,250
13	0,600	0,400	0
14	0,525	0,350	0,125
15	0,450	0,300	0,250

x_1 = gordura do leite; x_2 = óleo de girassol; x_3 = ésteres de fitosteróis

A gordura do leite é representada por x_1 , o óleo de girassol é representado por x_2 e os ésteres de fitosteróis são representados por x_3 , sendo que $x_1 + x_2 + x_3 = 1$ ou 100%.

A Figura 4 apresenta o diagrama triangular do planejamento experimental das misturas, onde podem ser identificados pelos números os pontos correspondentes a cada uma delas.

Figura 4. Diagrama triangular do planejamento experimental das misturas

Os três vértices correspondem às gorduras puras (gordura do leite (GL), óleo de girassol (OG) e ésteres de fitosteróis (EF)). Os pontos sobre os lados do triângulo correspondem a misturas binárias. Na região interna encontram-se os pontos referentes às misturas ternárias. Os diagramas triangulares permitem encontrar uma mistura ótima ou escolher entre misturas alternativas, dependendo de considerações econômicas ou de outra ordem, como disponibilidade e propriedades de matérias-primas (HARE, 1974).

Os pontos referentes às misturas realizadas concentram-se na região do triângulo próxima ao ponto referente à gordura do leite pura (mistura 1). As misturas preparadas contêm de 45 a 100% deste componente, pois para a preparação de um *spread*, bases gordurosas que contêm grandes quantidades de óleo apresentam pouca plasticidade e não têm aplicação. As misturas foram preparadas nas proporções mencionadas, após fusão completa à temperatura de 60-70 °C e novamente solidificadas, sendo armazenadas sob resfriamento.

Os limites dos componentes gordura do leite e óleo de girassol foram estabelecidos com base nos resultados obtidos na dissertação de mestrado à qual este projeto de doutorado dá continuidade (RODRIGUES, 2002). A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, chegou-se a uma mistura ideal de gordura do leite e óleo de milho na proporção 70:30, respectivamente, que tinha o intuito de servir como base gordurosa para a produção de um *spread* (RODRIGUES et al.,

2003a; 2003b; RODRIGUES & GIOIELLI, 2003). Os limites dos teores de ésteres de fitosteróis foram baseados nos teores apresentados na composição química da margarina comercialmente disponível contendo fitosteróis.

3.4. *Interesterificação química*

Foram interesterificados 350g de cada mistura, previamente seca em balão de vidro, sob pressão reduzida, acoplado a um rotaevaporador em banho de água a aproximadamente 95 °C. A essa porção foi misturado 0,5% (m/m) de catalisador metóxido de sódio em pó (Merck, Alemanha). A reação de interesterificação foi realizada sob agitação constante, sob pressão reduzida, a 65-70 °C em balão de três bocas imerso em banho de água a 70 °C, por 1 hora. Para interromper a reação foi adicionada água destilada. Para minimizar o escurecimento decorrente da reação e para absorver a umidade foram adicionados sílica em pó (Merck, Alemanha) e sulfato de sódio anidro (Labsynth, Brasil), respectivamente. Os reagentes foram filtrados a quente utilizando-se papel filtro (RODRIGUES, 2002).

3.5. *Interesterificação enzimática*

A interesterificação enzimática foi catalisada pela lipase 1,3-específica do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* Lipozyme[®] TL IM imobilizada em sílica (Novozymes, Dinamarca), fornecida pelo fabricante. As amostras foram previamente fundidas em forno de microondas até completa dissolução dos cristais. A seguir, 200g de amostra foram colocados em balão de três bocas de 250 mL. Antes da adição da enzima, foi adicionada às amostras água destilada na proporção de 0,3%. A enzima foi utilizada na proporção de 5%. A reação foi realizada por período de 6 horas à temperatura de 65 °C, sob agitação e mantendo o sistema em atmosfera de nitrogênio. Após a reação, as partículas do catalisador foram removidas por filtração (DIAZ-GAMBOA, 2002).

3.6. Acidez

A acidez das amostras foi determinada por titulação, utilizando-se solução de NaOH 0,1 N, segundo normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO, 1995).

3.7. Composição em ácidos graxos

Os ésteres metílicos de ácidos graxos para a análise foram obtidos pela saponificação de 150-200 mg de cada mistura com 3,5 mL de solução metanólica 0,5 N de hidróxido de potássio, aquecendo-se por 3-5 min em banho de água a 75-80 °C, segundo HARTMAN & LAGO (1973). À solução quente foram adicionados 10,5 mL do reagente de esterificação. A mistura foi refluxada por cerca de 3 min e transferida para um funil de separação, adicionando-se 20 mL de éter de petróleo e 40 mL de água destilada. A camada aquosa foi descartada e a camada de éter de petróleo lavada duas vezes com 20 mL de água destilada. As camadas aquosas foram também descartadas. A camada de éter de petróleo foi transferida para um tubo de ensaio com tampa. O solvente foi evaporado em banho-maria a 40 °C sob corrente de nitrogênio. Hexano foi adicionado como solvente para a realização das análises cromatográficas. As amostras esterificadas foram armazenadas a -20 °C.

A análise de ácidos graxos foi realizada por cromatografia em fase gasosa, segundo normas da AOCS (1997), método Ce 1-62, em cromatógrafo a gás Varian GC 3400 CX (Varian, EUA) equipado com detector de ionização de chama. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida CP WAX 52CB (Chrompack, EUA), com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,25µm de espessura de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram:

- Injeção split: razão 50:1;
- Temperatura da coluna: 75 °C por 3 min, programada até 150 °C a 37,5 °C/min e novamente programada até 215 °C a 3 °C/min;
- Gás de arraste: hélio, vazão 1,5 mL/min;

- Gás make-up: hélio, vazão 30 mL/min;
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Temperatura do detector: 280 °C.

A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa.

3.8. Índice de iodo

Foi calculado a partir da composição em ácidos graxos, de acordo com o Método Cd 1c-85, segundo normas da American Oil Chemists' Society (AOCS, 1997).

3.9. Índice de saponificação

Foi calculado utilizando-se a equação abaixo, a partir da composição em ácidos graxos, segundo SINGHAL & KULKARNY (1990):

$$IS = \frac{56000}{MM_{média}} + 12,67$$

onde:

IS = índice de saponificação;

MM média = massa molar média dos ácidos graxos.

3.10. *Composição em esteróis dos ésteres de fitosteróis*

As análises foram realizadas segundo NAEEMI et al. (1995) por cromatografia em fase gasosa em cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/Class GC 10 (Shimadzu, Japão) utilizando coluna capilar de sílica fundida J&W DB-5 (J&B, EUA) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno. As condições foram:

- Injeção split: 50:1;
- Temperatura da coluna: 180 °C, programada até 280 °C a 20 °C/min;
- Gás de arraste: hélio, vazão 1,5 mL/min;
- Temperatura do injetor: 290 °C;
- Temperatura do detector: 300 °C.

A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de esteróis, com cromatogramas encontrados em literatura, catálogos e com a composição de esteróis apresentada no certificado de análise fornecido pela empresa fabricante dos ésteres de fitosteróis. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa. As análises foram feitas em triplicata.

3.11. *Ponto de amolecimento*

Foi determinado pelo método do tubo capilar aberto, imerso em água sob agitação e aquecimento, de acordo com o método oficial Cc 3-25 da AOCS (1989).

3.12. Consistência

A consistência das amostras foi determinada utilizando o equipamento analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Inglaterra), controlado pelo programa Texture Expert versão 1.22 (Stable Micro Systems, Inglaterra). As misturas foram aquecidas em forno de microondas, até a temperatura de 60-70 °C, para a fusão completa dos cristais, e acondicionadas em béqueres de 100 mL. O condicionamento foi efetuado por 24 horas em geladeira comum (5-8 °C) para a recristalização da gordura e posteriormente por 24 horas em estufa a temperatura controlada. Foi utilizado cone de acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45°. Os testes foram operados nas seguintes condições (D'AGOSTINI et al., 2000):

- Retorno ao início;
- Distância = 10 mm;
- Velocidade = 2 mm/s;
- Tempo = 5 s;
- Determinação da força em compressão (kgf);
- Triplicata.

Para o cálculo da consistência, foi utilizada a seguinte equação, proposta por HAIGHTON (1959):

$$C = K \frac{W}{p^{1,6}}$$

onde:

C = consistência (gf/cm²)

K = fator dependente do ângulo do cone

W = força em compressão (gf), para tempo de 5 s.

p = profundidade de penetração (mm/10).

A Figura 5 apresenta um exemplo da curva força-deformação obtida durante a análise de textura das amostras. A consistência (gf/cm^2) é calculada em função da força máxima exercida pelo equipamento, que corresponde ao pico positivo da curva.

Figura 5. Curva força-deformação obtida pela análise de textura das amostras

3.13. Conteúdo de gordura sólida

O conteúdo de gordura sólida foi analisado por ressonância magnética nuclear, utilizando aparelho Maran Ultra Bench Top NMR, de 20 MHz, (Universal Systems, EUA) segundo normas da AOCS (1999), método Cd 16b-93.

3.14. Cinética de cristalização

A cinética de cristalização foi realizada através da determinação do conteúdo de gordura sólida por ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando aparelho Maran Ultra Bench Top NMR, de 20 MHz (Universal Systems, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata. As misturas já acondicionadas nos tubos de RMN

foram fundidas e mantidas em banho de água a 70 °C por 30 min e então transferidas a outro banho a 10 °C. O conteúdo de gordura sólida foi medido como função do tempo, até 120 min. A equação de Avrami original (WRIGHT et al., 2000) foi linearizada segundo a dedução a seguir e aplicada aos resultados obtidos.

$$\begin{aligned}\frac{CGS(t)}{CGS(\infty)} &= 1 - e^{-kt^n} \\ 1 - \frac{CGS(t)}{CGS(\infty)} &= e^{-kt^n} \\ \ln\left[1 - \frac{CGS(t)}{CGS(\infty)}\right] &= -kt^n \\ -\ln\left[1 - \frac{CGS(t)}{CGS(\infty)}\right] &= kt^n \\ \ln\left\{-\ln\left[1 - \frac{CGS(t)}{CGS(\infty)}\right]\right\} &= \ln k + n \ln t\end{aligned}$$

Onde:

CGS(t) = conteúdo de gordura sólida no tempo t

CGS(∞) = conteúdo de gordura sólida máximo, obtido com a cristalização finalizada

k = constante de Avrami (min⁻¹)

t = tempo (min)

n = expoente de Avrami (adimensional)

A partir da equação de Avrami linearizada foram calculados a constante e o expoente de Avrami.

3.15. Microscopia de luz polarizada

Preparação das lâminas

A amostra a ser analisada foi fundida a 80 °C em forno de microondas e, utilizando-se um tubo capilar, uma gota de amostra foi colocada sobre uma lâmina

de vidro. Em seguida, a gota foi coberta com uma lamínula, resultando em uma fina película de gordura. Nos casos em que as amostras foram cristalizadas a temperatura constante, as lâminas, lamínulas e capilares foram previamente aquecidos a 80 °C. Esta temperatura foi estipulada a partir da faixa de fusão

Figura 6. Preparação de lâminas de gordura para microscopia de luz polarizada

Cristalização isotérmica

As lâminas foram resfriadas a 10 e 25 °C em estufa B.O.D. Modelo 347 CD (Fanem, Brasil) sobre placa de vidro por 5 horas e em seguida observadas ao microscópio de luz polarizada a temperaturas controladas com auxílio de equipamento controlador de temperatura Modelo TS-4 Controller (Physitemp, EUA) acoplado a banho térmico Modelo TB-85 (Shimadzu, Japão) (Figura 7).

Figura 7. Equipamento controlador de temperatura

Cristalização com velocidade controlada de resfriamento

As lâminas preparadas foram submetidas a diferentes programações de temperatura, visando o estudo de cristalização dinâmica, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Programação de temperatura das amostras para microscopia de luz polarizada

Programa	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Velocidade de resfriamento (°C/min)	Tempo do processo (min)
1	80	80	0	30
2	80	40	5,0	8
3	40	20	0,5	40
4	40	20	5,0	4
5	40	30	0,5	20
6	40	30	5,0	2

Todas as amostras passaram pelo programa 1, seguido do programa 2 e finalmente por um dos outros programas (de 3 a 6), ou seja, todas as amostras foram mantidas a 80 °C durante 30 min para apagar a memória cristalina (DIBILDOX-ALVARADO et al., 2004) e em seguida foram rapidamente resfriadas de 80 a 40 °C a 5 °C/min. Somente após este procedimento padrão as amostras foram resfriadas seguindo as programações de 3 a 6.

O equipamento utilizado é um controlador de temperatura Modelo FP90 Central Processor (Mettler Toledo, Suíça), composto de uma câmara mantida fechada durante as análises, onde é colocada a lâmina, interligada a uma central processadora de temperaturas e velocidades de aquecimento e resfriamento (Figura 8). O aquecimento da câmara se dá por resistência elétrica interna. O resfriamento foi realizado através da injeção de gás nitrogênio resfriado em serpentina de cobre localizada em caixa térmica contendo gelo seco (dióxido de carbono sólido).

Figura 8. Sistema de microscopia com controlador de temperatura

Tomada de imagens

As lâminas foram observadas com aumento de 40 e 200 vezes ao microscópio de luz polarizada Modelo BX50 (Olympus, Japão) para análise da estrutura cristalina. O microscópio está acoplado a uma câmera digital CoolSNAP-Pro cf Color (Media Cybernetics, EUA), que transmite as imagens ao vivo para o computador utilizando o software Image Pro-Plus versão 4.5.1.22 (Media Cybernetics, EUA).

No processo de cristalização a temperatura constante, foram capturadas quatro imagens de cada lâmina. Foram preparadas duas lâminas para cada amostra, totalizando oito imagens. Foram determinados os diâmetros dos cristais (SIMÕES & GIOIELLI, 1999; 2000; SOTERO-SOLIS & GIOIELLI, 2001; GIOIELLI et al., 2003).

No processo de cristalização com controle de temperatura, foram tomadas imagens desde o surgimento do primeiro núcleo cristalino em intervalos de 1 min para os programas 3 e 4 (Tabela 7), nos quais o resfriamento foi feito até 20 °C, e em intervalos de 3 min para os programas 5 e 6, nos quais o resfriamento foi feito até 30 °C. Em todos os casos, foram tomadas 100 imagens de cada processo, o que totaliza um processo de 100 min para amostras resfriadas até 20 °C e de 300 min para amostras resfriadas até 30 °C. Foram determinados a área cristalizada e o diâmetro dos cristais.

Determinação de área cristalizada e diâmetro dos cristais

Os diâmetros dos cristais e a área cristalizada das amostras foram determinados utilizando-se o software Image Pro-Plus versão 4.5.1.22 (Media Cybernetics, EUA) (SIMÕES & GIOIELLI, 1999; 2000; SOTERO-SOLIS & GIOIELLI, 2001; GIOIELLI et al., 2003). A área cristalizada corresponde à razão, em %, entre a soma das áreas de cada cristal e a área total da imagem.

No caso da cristalização com velocidade de resfriamento, foram construídas curvas de cinética de cristalização das amostras a partir da área cristalizada e dos diâmetros dos cristais das amostras em função do tempo.

A cinética de cristalização corresponde à curva referente à evolução de um determinado parâmetro de cristalização em função do tempo (WRIGHT et al., 2000). Para traçar esta curva, foram determinados a área cristalizada das amostras e o diâmetro dos cristais a partir de $t=0$, em intervalos de 10 min para as corridas de 100 min e de 30 min para as corridas de 300 min. A cinética de cristalização a partir da área cristalizada foi determinada para todas as amostras. Já a cinética de cristalização a partir do diâmetro dos cristais foi determinada apenas nos casos em que houve formação de cristais grandes, o que ocorreu apenas com as amostras resfriadas até 30 °C. No caso das amostras resfriadas até 20 °C, o crescimento dos cristais foi discreto e, portanto, foi determinada uma única faixa de diâmetro dos cristais ao longo de todo o processo.

Edição dos vídeos

Os vídeos foram elaborados com a seqüência de 100 imagens obtidas em cada processo utilizando-se o software Windows Movie Maker versão 5.1 (Microsoft, EUA).

3.16. Preparação do spread

Como forma de testar a base gordurosa que apresentasse consistência próxima à ideal para a produção de um *spread*, foi preparada uma emulsão, empregando a formulação apresentada na Tabela 8, correspondendo a 80% de fase gordurosa e 20% de fase aquosa.

Tabela 8 - Formulação empregada no preparo do spread

Fase gordurosa	(%)	Fase aquosa	(%)
Gordura	80,00	Água	17,05
Emulsificante (mono e diacilgliceróis)	0,30	Sal	1,50
Lecitina de soja	0,50	Benzoato de sódio	0,10
Corante (vitamina A com β -caroteno)	0,05	Ácido láctico	0,01
Aromatizante (manteiga)	0,04	Leite em pó desnatado	0,40
Ácido sórbico	0,05		

A fase aquosa, incluindo os aditivos e componentes hidrossolúveis, foi resfriada a 10 °C. A fase gordurosa, contendo os aditivos lipossolúveis, foi aquecida a 40 °C. A emulsificação foi realizada adicionando a fase aquosa à fase gordurosa, lentamente e sob agitação, durante cerca de 5 minutos. A cristalização foi efetuada sob agitação, em banho de gelo, até consistência adequada. O *spread* foi então acondicionado em béqueres de 100 mL, e armazenado sob resfriamento. Posteriormente, foi analisado quanto à consistência a 5 e 10°C, em paralelo com amostra comercial de manteiga Paulista tipo extra sem sal e creme vegetal Becel Pro-Activ (GIOIELLI, 1996a).

3.17. Análise estatística

Aos resultados obtidos referentes às misturas e às reações de interesterificação química foi aplicado um modelo de regressão múltipla do tipo cúbico especial, representado pela seguinte equação (BARROS NETO et. al., 2001):

$$y = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3 \quad \text{Equação 2}$$

onde:

y = resposta

β = coeficientes gerados por regressão múltipla;

x = proporção do componente.

Os resultados foram apresentados em diagramas triangulares. Foi utilizado o aplicativo Statistica versão 2.6 (Statsoft, EUA), que gerou os coeficientes para o modelo, além de apresentar seus níveis de significância e coeficientes de determinação.

A regressão múltipla não foi aplicada aos resultados referentes às amostras interesterificadas por via enzimática devido ao número reduzido de pontos e à sua distribuição no diagrama triangular.

4. Resultados e Discussão

4.1 Acidez

A Tabela 9 apresenta a média e o desvio padrão de triplicatas da acidez das misturas.

Tabela 9 - Acidez das misturas

Mistura	Acidez $\pm$ DP (g ácido oléico/100g amostra)
1 (100:0:0)	0,40 $\pm$ 0,01
2 (87,5:0:12,5)	0,42 $\pm$ 0,02
3 (75,0:0:25,0)	0,42 $\pm$ 0,00
4 (90,0:10,0:0)	0,39 $\pm$ 0,02
5 (78,7:8,8:12,5)	0,40 $\pm$ 0,01
6 (67,5:7,5:25,0)	0,35 $\pm$ 0,01
7 (80,0:20,0:0)	0,30 $\pm$ 0,01
8 (70,0:17,5:12,5)	0,30 $\pm$ 0,02
9 (60,0:15,0:25,0)	0,30 $\pm$ 0,00
10 (70,0:30,0:0)	0,27 $\pm$ 0,01
11 (61,3:26,2:12,5)	0,27 $\pm$ 0,01
12 (52,5:22,5:25,0)	0,27 $\pm$ 0,00
13 (60,0:40,0:0)	0,23 $\pm$ 0,01
14 (52,5:35,0:12,5)	0,25 $\pm$ 0,01
15 (45,0:30,0:25,0)	0,26 $\pm$ 0,00
Óleo de girassol	0,07 $\pm$ 0,01
Ésteres de fitosteróis	0,31 $\pm$ 0,01

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Os valores obtidos experimentalmente estão de acordo com os encontrados na literatura, sendo que a legislação brasileira (BRASIL, 2005) estipula acidez máxima de 0,3 % em ácido oléico para óleos vegetais comestíveis refinados. A gordura do leite, por ser um produto obtido diretamente da natureza, sem nenhum

processo de refinação, apresenta acidez mais elevada, cujo limite não é estipulado pela legislação. Os ésteres de fitosteróis apresentaram acidez próxima ao declarado pela especificação do produto, conforme apresentado na Tabela 5.

Os óleos e gorduras utilizados como matéria-prima para interesterificação devem apresentar baixa acidez, visto que os ácidos graxos livres, assim como a água e os peróxidos, atuam como veneno dos catalisadores. As concentrações de ácidos graxos livres devem ser menores que 0,05% em ácido oléico, para a utilização de 0,1-0,2% de metóxido de sódio como catalisador. Se estes níveis forem excedidos, torna-se necessária maior quantidade de catalisador, pois ele é inicialmente utilizado para a neutralização dos ácidos graxos livres (ROZENAAL, 1992). Todas as misturas analisadas apresentaram acidez adequada para que a reação de interesterificação pudesse ocorrer com 0,5% de catalisador.

A Figura 9 apresenta o diagrama triangular da acidez das misturas. Os resultados foram submetidos a regressão múltipla do tipo linear, a $p < 0,01$, e geraram a Equação 3. A acidez mostrou-se dependente da gordura do leite e dos ésteres de fitosteróis, mas não do óleo de girassol refinado, pois este apresentou os menores valores. As misturas apresentaram acidez proporcional às quantidades de seus componentes.

$$\text{Acidez} = 0,40x_1 + 0,03x_2 + 0,31x_3 \quad (\text{Equação 3})$$

Figura 9. Diagrama triangular da acidez das misturas

4.2 Composição em ácidos graxos

As Tabelas 10 e 11 apresentam a composição em ácidos graxos das misturas e seus componentes, onde estão listados seus principais ácidos graxos identificados. Os não identificados corresponderam a, no máximo, 10% do total e não foram incluídos na tabela, que foi renormalizada. As misturas foram analisadas em duplicata e a tabela apresenta as médias e os desvios-padrão obtidos. Em anexo, encontra-se um cromatograma da gordura do leite a título de exemplificação.

A gordura do leite apresentou grande variedade de ácidos graxos, com o número de átomos de carbono das cadeias variando desde ácidos graxos de cadeia curta até os de cadeia longa. Esta é uma propriedade característica da gordura do leite (JENSEN et al., 1991). A composição em ácidos graxos obtida experimentalmente difere ligeiramente da literatura consultada, principalmente em relação aos ácidos butírico (4:0) e capróico (6:0).

O ácido butírico é um ácido graxo presente exclusivamente na gordura do leite e comumente utilizado para quantificar a presença desta em alimentos (MOLKENTIN & PRECHT, 2000). De acordo com a literatura (MOLKENTIN & PRECHT, 2000; WRIGHT et al., 2000; O'BRIEN, 1998; HUI, 1996; GUNSTONE et al., 1986), esse ácido graxo corresponde a cerca de 3-4% do total de ácidos graxos da gordura do leite, porém, segundo os resultados obtidos experimentalmente, seu teor não passou de 0,1%. É provável que uma parte desse ácido graxo tenha se perdido durante os processos de obtenção da gordura do leite a partir da manteiga, realizado a quente, e de preparação dos ésteres de ácidos graxos para a cromatografia, já que o ácido butírico é um ácido muito volátil, além de ser solúvel em água. O ácido capróico também apresenta elevada volatilidade e, da mesma maneira que o butírico, pode ter sido perdido durante a preparação dos ésteres metílicos. CHIU (2006) verificou diminuição no teor de ácidos graxos de cadeia média (de 6 a 10 átomos de carbono na cadeia) ao efetuar interesterificação química a 95 °C de misturas de gorduras contendo estes ácidos graxos. A explicação sugerida para essas perdas foram as condições da reação, que foi realizada a temperatura elevada e sob pressão reduzida, provocando volatilização desses ácidos graxos.

Tabela 10 - Composição em ácidos graxos das misturas

Ácido Graxo	Tempo (min)	Teor $\pm$ DP (%)				
		Mistura 1 (100:0:0)	Mistura 2 (87,5:0:12,5)	Mistura 3 (75,0:0:25,0)	Mistura 4 (90,0:10,0:0)	Mistura 5 (78,7:8,8:12,5)
4:0	1,9	<0,1	<0,1	0,1 $\pm$ 0,0	<0,1	<0,1
6:0	2,7	0,3 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
8:0	4,6	0,8 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
10:0	6,0	2,4 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,0
12:0	7,7	3,2 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,0
14:0	10,4	12,2 $\pm$ 0,1	11,7 $\pm$ 0,0	11,5 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,1	10,4 $\pm$ 0,1
14:1	11,0	1,3 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0
15:0	12,1	1,4 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0
16:0	14,3	33,6 $\pm$ 0,1	32,4 $\pm$ 0,0	32,0 $\pm$ 0,3	30,6 $\pm$ 0,1	30,2 $\pm$ 0,1
16:1	14,7	1,9 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0
17:0	15,3	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
18:0	18,9	12,1 $\pm$ 0,0	11,8 $\pm$ 0,0	11,6 $\pm$ 0,4	11,2 $\pm$ 0,0	11,0 $\pm$ 0,1
18:1	19,4	23,7 $\pm$ 0,1	24,3 $\pm$ 0,1	24,3 $\pm$ 0,8	23,4 $\pm$ 0,0	24,2 $\pm$ 0,2
18:1 <i>trans</i>	19,5	3,2 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 0,0
18:2 (n-6)	20,4	1,6 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,0	9,5 $\pm$ 0,1
18:3	22,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
18:2 (CLA)	22,6	1,2 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
20:0	23,9	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
22:1	29,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Sat.		66,8 $\pm$ 0,0	65,2 $\pm$ 0,1	65,0 $\pm$ 0,0	60,5 $\pm$ 0,1	58,8 $\pm$ 0,2
Monoinsat.		30,1 $\pm$ 0,1	31,0 $\pm$ 0,1	31,0 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,1	30,2 $\pm$ 0,2
Poliinsat.		3,1 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,0	10,4 $\pm$ 0,1	11,0 $\pm$ 0,1
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Tabela 10 - Composição em ácidos graxos das misturas (cont.)

Ácido Graxo	Tempo (min)	Teor $\pm$ DP (%)				
		Mistura 6 (67,5:7,5:25,0)	Mistura 7 (80,0:20,0:0)	Mistura 8 (70,0:17,5:12,5)	Mistura 9 (60,0:15,0:25,0)	Mistura 10 (70,0:30,0:0)
4:0	1,9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
6:0	2,7	0,4 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
8:0	4,6	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
10:0	6,0	1,7 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
12:0	7,7	2,4 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1
14:0	10,4	10,2 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,0	9,3 $\pm$ 0,0	9,1 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1
14:1	11,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0
15:0	12,1	1,3 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0
16:0	14,3	30,0 $\pm$ 0,1	27,6 $\pm$ 0,0	26,8 $\pm$ 0,0	26,7 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 0,2
16:1	14,7	1,7 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0
17:0	15,3	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
18:0	18,9	11,1 $\pm$ 0,0	10,3 $\pm$ 0,0	10,1 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,0
18:1	19,4	24,3 $\pm$ 0,1	23,0 $\pm$ 0,0	23,3 $\pm$ 0,0	23,6 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,0
18:1 <i>trans</i>	19,5	2,9 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,2
18:2	20,4	9,5 $\pm$ 0,0	16,5 $\pm$ 0,0	16,4 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,2	23,4 $\pm$ 0,1
18:3	22,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
18:2 (CLA)	22,6	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1
20:0	23,9	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
22:1	29,6	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Sat.		58,5 $\pm$ 0,1	54,1 $\pm$ 0,0	53,6 $\pm$ 0,1	53,0 $\pm$ 0,4	48,1 $\pm$ 0,4
Monoinsat.		30,5 $\pm$ 0,1	28,2 $\pm$ 0,1	28,7 $\pm$ 0,1	29,2 $\pm$ 0,2	27,2 $\pm$ 0,3
Poliinsat.		11,0 $\pm$ 0,0	17,7 $\pm$ 0,0	17,7 $\pm$ 0,1	17,8 $\pm$ 0,2	24,7 $\pm$ 0,2
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Tabela 10 - Composição em ácidos graxos das misturas (cont.)

Ácido Graxo	Tempo (min)	Teor $\pm$ DP (%)				
		Mistura 11 (61,3:26,2:12,5)	Mistura 12 (52,5:22,5:25,0)	Mistura 13 (60,0:40,0:0)	Mistura 14 (52,5:35,0:12,5)	Mistura 15 (45,0:30,0:25,0)
4:0	1,9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1 $\pm$ 0,0
6:0	2,7	<0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
8:0	4,6	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
10:0	6,0	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,1
12:0	7,7	1,9 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,1
14:0	10,4	7,7 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,3
14:1	11,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0
15:0	12,1	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
16:0	14,3	24,4 $\pm$ 0,1	24,0 $\pm$ 0,2	22,0 $\pm$ 0,1	21,6 $\pm$ 0,0	21,5 $\pm$ 0,2
16:1	14,7	1,3 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0
17:0	15,3	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
18:0	18,9	9,5 $\pm$ 0,1	9,1 $\pm$ 0,2	8,9 $\pm$ 0,0	8,5 $\pm$ 0,0	8,3 $\pm$ 0,1
18:1	19,4	23,3 $\pm$ 0,2	23,3 $\pm$ 0,5	22,6 $\pm$ 0,0	22,4 $\pm$ 0,0	22,5 $\pm$ 0,3
18:1 <i>trans</i>	19,5	2,7 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,1
18:2	20,4	23,7 $\pm$ 0,2	23,1 $\pm$ 0,0	30,4 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,3
18:3	22,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
18:2 (CLA)	22,6	0,9 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
20:0	23,9	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
22:1	29,6	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Sat.		46,6 $\pm$ 0,4	46,9 $\pm$ 0,7	41,9 $\pm$ 0,2	42,3 $\pm$ 0,1	42,7 $\pm$ 0,7
Monoinsat.		28,4 $\pm$ 0,2	28,7 $\pm$ 0,7	26,7 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 0,0	27,1 $\pm$ 0,4
Poliinsat.		25,0 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,1	31,4 $\pm$ 0,0	31,1 $\pm$ 0,0	30,2 $\pm$ 0,3
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Tabela 11 - Composição em ácidos graxos do óleo de girassol e dos ésteres de fitosteróis

Ácido Graxo	Tempo (min)	Teor $\pm$ DP (%)	
		Óleo de girassol	Ésteres de fitosteróis
14:0	10,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1
16:0	14,3	7,9 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,1
18:0	18,9	4,2 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,0
18:1	19,4	19,6 $\pm$ 0,1	32,5 $\pm$ 0,9
18:1 <i>trans</i>	19,5	0,5 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,1
18:2	20,4	66,9 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 1,1
18:3	22,0	0,1 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1
20:0	23,9	0,3 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,5
22:0	28,9	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
22:1	29,6	0,0 $\pm$ 0,0	31,3 $\pm$ 1,2
Total		100,0	100,0
Sat.		12,9 $\pm$ 0,1	14,1 $\pm$ 0,5
Monoinsat.		20,1 $\pm$ 0,1	65,4 $\pm$ 0,4
Poliinsat.		67,0 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 1,0
Total		100,0	100,0

O teor de ácidos graxos de lipídios constituídos principalmente de triacilgliceróis, como é o caso da gordura do leite e o óleo de girassol, é maior do que o teor que contêm os ésteres de fitosteróis, pois a proporção molar destes é de 1:1 (ácido graxo:esterol). Por esse motivo, quando as misturas são transformadas em ésteres metílicos para análise por cromatografia, a proporção entre os ácidos graxos dos ésteres de fitosteróis e os das outras gorduras não corresponde à esperada, já que as misturas foram feitas por proporção em massa.

A gordura do leite é o lipídio natural mais complexo em termos de composição em ácidos graxos e triacilgliceróis. É constituída de cerca de 15 ácidos graxos principais, porém mais de 500 já foram caracterizados. Sua composição se faz ainda mais complexa em função da presença de inúmeros isômeros dos ácidos monoenóicos, dienóicos e de cadeias ramificadas (GUNSTONE et al., 1986). Os resultados mostraram que os ácidos graxos saturados constituem a grande maioria, cerca de 67% do total. Os ácidos graxos predominantes foram palmítico, oléico, mirístico e esteárico, nesta ordem, sendo que sua soma corresponde a cerca de 82% do total. Os demais estão presentes em quantidades inferiores a 4% cada.

O ácido linoléico conjugado (18:2 CLA) consiste em um grupo de ácidos graxos encontrado predominantemente no leite e na carne de animais ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos. O teor de CLA na gordura do leite geralmente se encontra entre 0,3 e 1,0%, dependendo das estações do ano, alimentação do animal e processamento do alimento. Cerca de 90% do CLA em gorduras de ruminantes é representado pelo 9cis,11trans-CLA (KÜHLSSEN et al., 2005). O CLA tem sido intensamente pesquisado por suas propriedades anticarcinogênicas e sua capacidade de reduzir a gordura corporal ao mesmo tempo em que aumenta a massa muscular. Outros benefícios conseguidos com o consumo de CLA são a proteção contra aterosclerose, caquexia e tratamento de diabetes (CAMPBELL et al., 2003). Neste experimento, foi possível detectar a presença de CLA nas amostras de gordura do leite no teor de 1,2% e nas misturas que a continham, na faixa de 0,6 a 1,2%.

A composição do óleo de girassol está em conformidade com a legislação brasileira (BRASIL, 1999f). O ácido linoléico (18:2), presente em cerca de 67% da composição do óleo, o caracteriza como um óleo do grupo do ácido linoléico. Não foram encontrados ácidos graxos de cadeia curta e os saturados aparecem em pequena quantidade, cerca de 13%, características estas típicas de óleos vegetais.

Os ácidos oléico, linoléico e erúcico somados correspondem a mais de 80% dos ácidos graxos encontrados nos ésteres de fitosteróis. Os outros ácidos graxos estão presentes em quantidades menores que 7%. Segundo a especificação do produto, a matéria-prima de onde foram extraídos os esteróis são os óleos de canola e soja. Devido à presença de mais de 30% do ácido erúcico (22:1), é provável que os fitosteróis tenham sido obtidos na forma livre e posteriormente esterificados a ácidos graxos livres de óleo de colza. De acordo com a literatura (STAUFFER, 1996), o óleo de colza contém cerca de 40% deste ácido graxo e é produzido em larga escala na China (país onde localiza-se o fabricante deste produto), além de Índia, Europa e Canadá (LACKEY, 2003). A esterificação dos esteróis com ácidos graxos visa aumentar a solubilidade do produto em óleos e gorduras (TURATTI, 2001; NESTEL et al., 2001).

A adição de óleo de girassol à gordura do leite provocou diminuição no teor de ácidos graxos saturados. A mistura 7, que contém 20% de óleo de girassol, apresentou 55,1% de ácidos graxos saturados e a mistura 13, que contém 40% de óleo de girassol, apresentou 41,9%, contra 67,7% da gordura do leite pura. Dessa maneira, o grau de saturação da gordura do leite em um *spread* pode ser diminuído pela adição de um óleo vegetal, o que contribuiria não só para melhorar as características físicas do produto, como também suas propriedades nutricionais e para menores custos de produção (ROUSSEAU et al., 1996a).

De modo geral, a adição tanto de óleo de girassol como de ésteres de fitosteróis contribuiu para o aumento do grau de insaturação das misturas, já que os fitosteróis apresentaram apenas 14% de ácidos graxos saturados.

4.3 Índice de iodo

De acordo com a literatura (HUI, 1996), o índice de iodo médio da gordura do leite é 37, podendo variar de 28 a 43 g de iodo/100g gordura. O índice de iodo do óleo de girassol, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1999f) varia entre 110 a 143. Os resultados da gordura do leite e do óleo de girassol apresentaram-se, portanto, nas faixas constantes na literatura e na legislação brasileira. Os índices de iodo das misturas e seus componentes estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Índice de iodo das misturas calculado a partir de sua composição em ácidos graxos

Mistura	Índice de iodo (g iodo/100g gordura)
1 (100:0:0)	32
2 (87,5:0:12,5)	34
3 (75,0:0:25,0)	34
4 (90,0:10,0:0)	44
5 (78,7:8,8:12,5)	46
6 (67,5:7,5:25,0)	46
7 (80,0:20,0:0)	56
8 (70,0:17,5:12,5)	56
9 (60,0:15,0:25,0)	57
10 (70,0:30,0:0)	67
11 (61,3:26,2:12,5)	69
12 (52,5:22,5:25,0)	67
13 (60,0:40,0:0)	78
14 (52,5:35,0:12,5)	77
15 (45,0:30,0:25,0)	76
Óleo de girassol	133
Ésteres de fitosteróis	91

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

A Figura 10 apresenta o diagrama triangular do índice de iodo das misturas. A regressão múltipla do tipo linear obteve coeficiente de determinação $R^2=0,9713$ a $p<0,01$ e o modelo é representado pela Equação 4.

$$\text{Índice de iodo} = 30x_1 + 138x_2 + 86x_3 \quad (\text{Equação 4})$$

O índice de iodo é uma propriedade química de óleos e gorduras que reflete seu grau de insaturação (SONNTAG, 1979). Quando a propriedade tomada como resposta define um modelo perfeito de mistura, este se apresenta linear, com as linhas dos diagramas triangulares retas, paralelas e eqüidistantes, para os mesmos

intervalos de variação. Isto significa que a propriedade é proporcional à quantidade de cada componente da mistura (D'AGOSTINI, 2000).

Figura 10. Diagrama triangular do índice de iodo das misturas

4.4 Índice de saponificação

A Tabela 13 mostra os valores experimentais dos índices de saponificação das misturas.

De acordo com a literatura (O'BRIEN, 1998; HUI, 1996) e com a legislação brasileira (BRASIL, 1999f), o índice de saponificação da gordura do leite apresenta valores que variam de 210 a 250, enquanto o do óleo de girassol varia de 188 a 194, respectivamente.

O valor obtido para a gordura do leite está abaixo da faixa mencionada na literatura. Os baixos teores dos ácidos butírico e capríco, decorrentes de suas possíveis perdas na obtenção da gordura do leite e na esterificação dos ácidos graxos para cromatografia podem ter contribuído para este fato, já que o índice de saponificação foi calculado a partir da composição em ácidos graxos das misturas. O índice de saponificação do óleo de girassol está de acordo com a legislação e o dos ésteres de fitosteróis não consta na literatura.

Tabela 13 - Índice de saponificação das misturas calculado a partir de sua composição em ácidos graxos

Mistura	Índice de saponificação (mg KOH/g)
1 (100:0:0)	202
2 (87,5:0:12,5)	202
3 (75,0:0:25,0)	202
4 (90,0:10,0:0)	201
5 (78,7:8,8:12,5)	200
6 (67,5:7,5:25,0)	199
7 (80,0:20,0:0)	199
8 (70,0:17,5:12,5)	199
9 (60,0:15,0:25,0)	199
10 (70,0:30,0:0)	197
11 (61,3:26,2:12,5)	197
12 (52,5:22,5:25,0)	197
13 (60,0:40,0:0)	196
14 (52,5:35,0:12,5)	196
15 (45,0:30,0:25,0)	197
Óleo de girassol	189
Ésteres de fitosteróis	188

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

A Figura 11 apresenta o diagrama triangular do índice de saponificação das misturas, que é representado pela Equação 5. Esta foi obtida a partir de regressão múltipla do tipo linear, a $p < 0,01$. O coeficiente de determinação para esta correlação é de 0,9038.

$$\text{Índice de saponificação} = 203x_1 + 188x_2 + 190x_3$$

Equação 5

Figura 11. Diagrama triangular do índice de saponificação das misturas

4.5 Composição em esteróis dos ésteres de fitosteróis

A Tabela 14 apresenta média e desvio padrão de três repetições de análises da composição em esteróis dos ésteres de fitosteróis. O β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol são os esteróis mais abundantes, assim como na natureza estes são os mais comumente encontrados (PIIRONEN et al., 2000). Comparando os resultados obtidos com a especificação do produto apresentada na Tabela 5, dentre os principais esteróis, apenas o sitosterol não se encontrou na faixa estipulada pelo fabricante, além de ter sido identificado maior número de esteróis.

Tabela 14 - Composição em esteróis dos ésteres de fitosteróis

Esteróis	Teor $\pm$ DP (%)
Colesterol	0,3 $\pm$ 0,2
Brassicasterol	9,0 $\pm$ 2,1
Campesterol	23,6 $\pm$ 3,2
Campestanol	1,3 $\pm$ 0,6
Estigmasterol	14,9 $\pm$ 2,6
Clerosterol	3,6 $\pm$ 1,5
β -Sitosterol	33,4 $\pm$ 5,0
β -Sitostanol	3,2 $\pm$ 1,7
Δ^5 -Avenasterol	0,1 $\pm$ 0,1
$\Delta^{5,24}$ -Estigmastadienol	5,0 $\pm$ 2,1
Δ^7 -Estigmasterol	2,0 $\pm$ 1,3
Δ^7 -Avenasterol	3,6 $\pm$ 1,5

4.6 Ponto de amolecimento

A Tabela 15 apresenta a média e o desvio padrão do ponto de amolecimento das misturas, antes e após interesterificação química e enzimática. As amostras foram analisadas em triplicata.

A gordura do leite (mistura 1) apresentou ponto de amolecimento de 33,1 °C, valor semelhante ao encontrado por ROUSSEAU & MARANGONI (1999), que determinaram o ponto de amolecimento da gordura do leite como sendo de 33,4 °C. A mesma referência apresenta o ponto de amolecimento de uma mistura de proporção 80:20 (gordura do leite: óleo de canola), que era de 31,1 °C, sendo que a mistura 6, contendo 80% de gordura do leite e 20% de óleo de girassol, apresentou ponto de amolecimento também semelhante, de 31,3 °C.

De acordo com a literatura (O'BRIEN, 1998; BOCKISCH, 1998), o ponto de fusão do óleo de girassol está na faixa de -10 a -12 °C. O método utilizado não permite trabalhar nesta faixa de temperatura, já que é realizado em banho de água.

Na literatura não foram encontradas referências sobre o ponto de amolecimento de ésteres de fitosteróis. Experimentalmente, o valor encontrado foi

de 24,3 °C e pôde-se observar sua contribuição para a diminuição do ponto de amolecimento da gordura do leite nas misturas que o contêm.

Tabela 15 - Ponto de amolecimento das misturas antes e após interesterificação química e enzimática

Mistura	Ponto de amolecimento $\pm$ DP (°C)		
	Antes	Após IQ	Após IE
1 (100:0:0)	33,1 $\pm$ 0,2	37,1 $\pm$ 0,2	33,9 $\pm$ 0,6
2 (87,5:0:12,5)	31,5 $\pm$ 0,5	35,5 $\pm$ 0,1	---
3 (75,0:0:25,0)	31,1 $\pm$ 0,1	34,2 $\pm$ 0,1	31,9 $\pm$ 0,7
4 (90,0:10,0:0)	31,8 $\pm$ 0,2	34,1 $\pm$ 0,1	---
5 (78,7:8,8:12,5)	30,8 $\pm$ 0,3	34,5 $\pm$ 0,2	---
6 (67,5:7,5:25,0)	27,7 $\pm$ 0,9	34,3 $\pm$ 0,3	30,9 $\pm$ 0,8
7 (80,0:20,0:0)	31,3 $\pm$ 0,2	33,5 $\pm$ 0,2	---
8 (70,0:17,5:12,5)	30,0 $\pm$ 0,2	32,5 $\pm$ 0,2	---
9 (60,0:15,0:25,0)	27,5 $\pm$ 0,4	31,8 $\pm$ 0,2	28,8 $\pm$ 0,2
10 (70,0:30,0:0)	31,3 $\pm$ 0,4	32,0 $\pm$ 0,1	---
11 (61,3:26,2:12,5)	30,0 $\pm$ 0,4	31,0 $\pm$ 0,2	---
12 (52,5:22,5:25,0)	29,1 $\pm$ 0,0	29,8 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 0,3
13 (60,0:40,0:0)	30,7 $\pm$ 0,2	31,0 $\pm$ 0,2	---
14 (52,5:35,0:12,5)	27,4 $\pm$ 1,8	29,3 $\pm$ 0,5	---
15 (45,0:30,0:25,0)	26,0 $\pm$ 0,2	29,3 $\pm$ 0,7	26,3 $\pm$ 0,1
Óleo de girassol	-10 a -12 (Literatura)	---	---
Ésteres de fitosteróis	24,3 $\pm$ 0,0	28,9 $\pm$ 0,0	26,3 $\pm$ 0,2

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

IQ = Interesterificação química; IE = Interesterificação enzimática

O ponto de amolecimento das misturas decresce com o aumento na proporção de óleo de girassol, assim como com o aumento da proporção de ésteres de fitosteróis. A Figura 12 apresenta o diagrama triangular do ponto de amolecimento das misturas antes da interesterificação.

Figura 12. Diagrama triangular do ponto de amolecimento das misturas

A diminuição do ponto de amolecimento da gordura do leite em função da adição dos outros componentes das misturas obedece a um modelo de regressão múltipla do tipo cúbico especial. Os coeficientes da regressão e os coeficientes de determinação estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de ponto de amolecimento e coeficientes de determinação R^2

	Coeficientes							R^2
	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{23}	β_{13}	β_{123}	
Antes	31,9	-11,8	24,3	61,3	118,1	---	-215,9	0,9879
Após IQ	36,0	-11,8	29,0	51,5	95,1	---	-145,7	0,9937

IQ = Interesterificação química

Segundo o modelo aplicado, o ponto de amolecimento das misturas apresentou valores diferentes dos esperados por interpolação linear, o que revela que houve algum tipo de interação entre os componentes. As mudanças ocorridas no ponto de amolecimentos das misturas foram dependentes da presença da gordura do leite, dos ésteres de fitosteróis e do óleo de girassol. As interações binárias entre a gordura do leite e o óleo de girassol e entre o óleo de girassol e os

ésteres de fitosteróis foram significativas e com coeficientes positivos. A interação entre os três componentes foi negativa.

A ocorrência de coeficientes de interação positivos e negativos na mesma regressão reflete diferentes tipos de interação em função da proporção entre os componentes das misturas.

Os pontos do triângulo correspondentes às misturas analisadas encontram-se todos dentro de apenas duas faixas de ponto de amolecimento, que correspondem a valores maiores que 25 °C. Estes valores são próximos aos pontos de amolecimento dos dois componentes que apresentaram coeficientes positivos sobre esta propriedade, que são a gordura do leite e os ésteres de fitosteróis. Isto indica que na região do triângulo analisada, o óleo de girassol exerceu pouca influência no ponto de amolecimento das misturas.

O ponto de amolecimento das misturas após interesterificação química está apresentado na Tabela 15. A reação provocou aumento no ponto de amolecimento da gordura do leite e das misturas. O óleo de girassol interesterificado também apresentou ponto de amolecimento abaixo de 0 °C, não podendo ser determinado pelo método do tubo capilar. Como não foi encontrada referência para este óleo interesterificado na literatura, o valor de -12 °C foi utilizado como uma estimativa do ponto de amolecimento do óleo de girassol rearranjado quimicamente para fins de análise estatística.

Os ésteres de fitosteróis apresentaram aumento no ponto de amolecimento de 24,3 para 28,9 °C após interesterificação química. Segundo PIIRONEN et al. (2000) e VU et al. (2004), os fitosteróis são sólidos, o que dificulta sua solubilização em óleos e gorduras. Como exemplos, são citados os pontos de fusão do sitosterol, campesterol e estigmasterol como sendo 140, 157-158 e 170 °C, respectivamente. Por essa razão, eles são esterificados a ácidos graxos, o que diminui seu ponto de fusão para faixas de temperaturas de processo normalmente utilizadas na indústria e aumenta sua solubilidade em óleos e gorduras. Com a interesterificação química realizada neste trabalho, os esteróis são separados dos ácidos graxos através do rompimento da ligação éster que os une e se ligam a outros ácidos graxos, promovendo redistribuição entre esteróis e ácidos graxos, caracterizando a reação. Alguns esteróis podem não ter voltado a se ligar com ácidos graxos após sua separação durante a interesterificação química, permanecendo livres na mistura e contribuindo assim para o endurecimento dos ésteres de fitosteróis.

O aumento no ponto de amolecimento de misturas contendo gordura do leite interesterificadas quimicamente também foi observado por ROUSSEAU & MARANGONI (1999). Segundo estes autores, existe uma relação diretamente proporcional entre o teor de triacilgliceróis trissaturados e o ponto de amolecimento. Esta relação também foi estabelecida por RODRIGUES & GIOIELLI (2003). A interesterificação química distribui aleatoriamente os ácidos graxos saturados presentes em grande quantidade na gordura do leite, formando mais triacilgliceróis trissaturados do que existiam com a tendência natural de distribuição. Na natureza, os ácidos graxos saturados da gordura do leite tendem a estar esterificados na posição *sn*-2, enquanto que os insaturados tendem a ficar nas posições *sn*-1 e *sn*-3.

A Figura 13 apresenta o diagrama triangular das misturas após interesterificação química.

Figura 13. Diagrama triangular do ponto de amolecimento das misturas após interesterificação química

As misturas após interesterificação química também seguiram o modelo de regressão múltipla do tipo cúbico especial. Os coeficientes foram significativos a $p < 0,05$ e estão apresentados na Tabela 16.

Os diagramas triangulares das misturas antes e após a interesterificação química apresentam semelhança no que diz respeito à distribuição das faixas de ponto de amolecimento. Os pontos relativos às misturas analisadas também se

encontram apenas em duas faixas, acima de 27,9 °C, próximas aos pontos de amolecimento da gordura do leite e dos ésteres de fitosteróis interesterificados. A diferença reside apenas em maiores valores de ponto de amolecimento encontrados após a reação.

O ponto de amolecimento da gordura do leite original foi de 33,1 °C e após interesterificação enzimática o valor obtido foi de 33,9 °C. Segundo ROUSSEAU & MARANGONI (1999), o ponto de amolecimento da gordura do leite original é de 33,4 °C e da interesterificada enzimaticamente é de 32,7 °C. Nesse caso, a interesterificação enzimática provocou diminuição de 0,7 °C no ponto de amolecimento da gordura do leite. Nestes experimentos, ao contrário da literatura, o ponto de amolecimento da gordura do leite sofreu aumento de 0,8 °C após interesterificação enzimática. De qualquer maneira, em ambos os casos a diferença no ponto de amolecimento antes e após a reação é pequena, ou seja, a interesterificação enzimática provocou apenas uma pequena alteração desta propriedade física da gordura do leite.

Em todas as amostras analisadas, tanto antes quanto após a interesterificação química e enzimática, observou-se que a adição de até 55% de outros componentes à gordura do leite produziu pequena alteração no ponto de amolecimento. Isto ocorreu porque o ponto de amolecimento depende da passagem para o estado líquido dos triacilgliceróis de maior ponto de fusão, que ainda estão presentes em maior proporção quando o teor de gordura do leite é maior que 45%.

4.7 Consistência

A Tabela 17 apresenta a consistência das misturas em temperaturas de 5 a 30 °C, com intervalos de 5 °C.

Entre todas as misturas, a gordura do leite pura (mistura 1) apresentou o maior valor de consistência em cada temperatura de análise, que variou de 12647,8 gf/cm² a 5 °C até 224 gf/cm² a 25 °C. O valor 0 de consistência significa que o produto em análise apresenta consistência muito baixa, de modo que o equipamento não possui sensibilidade suficiente para detectá-la. Este produto geralmente apresenta-se como um fluido viscoso.

Tabela 17 - Consistência das misturas

Mistura	Consistência $\pm$ DP (gf/cm ²)					
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1 (100:0:0)	12647,8 $\pm$ 320,0	11681,6 $\pm$ 820,6	4701,2 $\pm$ 64,4	922,2 $\pm$ 14,2	224,0 $\pm$ 7,2	0,0 $\pm$ 0,0
2 (87,5:0:12,5)	7623,4 $\pm$ 255,4	6442,8 $\pm$ 353,4	2484,7 $\pm$ 62,7	407,3 $\pm$ 17,2	0,0 $\pm$ 0,0	---
3 (75,0:0:25,0)	4592,3 $\pm$ 138,3	3697,0 $\pm$ 45,5	1210,0 $\pm$ 52,4	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
4 (90,0:10,0:0)	7231,9 $\pm$ 125,7	6682,4 $\pm$ 294,4	3018,8 $\pm$ 235,5	576,9 $\pm$ 10,1	0,0 $\pm$ 0,0	---
5 (78,7:8,8:12,5)	4682,1 $\pm$ 410,4	4133,3 $\pm$ 53,0	1313,0 $\pm$ 177,7	248,5 $\pm$ 12,6	0,0 $\pm$ 0,0	---
6 (67,5:7,5:25,0)	2809,3 $\pm$ 184,0	2480,0 $\pm$ 193,0	787,8 $\pm$ 11,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
7 (80,0:20,0:0)	5167,8 $\pm$ 244,9	4759,3 $\pm$ 299,6	1669,3 $\pm$ 72,7	377,8 $\pm$ 10,6	0,0 $\pm$ 0,0	---
8 (70,0:17,5:12,5)	3735,7 $\pm$ 230,1	2894,5 $\pm$ 112,0	789,3 $\pm$ 2,6	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
9 (60,0:15,0:25,0)	1790,5 $\pm$ 112,4	1692,2 $\pm$ 152,3	300,3 $\pm$ 25,0	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
10 (70,0:30,0:0)	3497,6 $\pm$ 110,5	2992,4 $\pm$ 114,9	930,5 $\pm$ 45,0	207,5 $\pm$ 4,9	0,0 $\pm$ 0,0	---
11 (61,3:26,2:12,5)	2012,0 $\pm$ 127,8	1455,8 $\pm$ 42,6	447,7 $\pm$ 14,4	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
12 (52,5:22,5:25,0)	1445,2 $\pm$ 226,7	896,0 $\pm$ 22,4	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
13 (60,0:40,0:0)	2194,1 $\pm$ 106,6	1520,6 $\pm$ 47,7	513,0 $\pm$ 6,4	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
14 (52,5:35,0:12,5)	935,2 $\pm$ 162,9	774,0 $\pm$ 48,3	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
15 (45,0:30,0:25,0)	427,1 $\pm$ 35,1	359,0 $\pm$ 22,2	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
Ésteres de fitosteróis	405,2 $\pm$ 121,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---	---

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

A consistência da gordura do leite diminuiu em função do aumento de temperatura. Todas as outras misturas apresentaram o mesmo comportamento. Esse fenômeno pode ser explicado pela fusão gradual dos cristais em decorrência do aumento de temperatura e a conseqüente destruição da rede cristalina, que confere plasticidade à gordura (DEMAN, 1983). Nenhuma das misturas apresentou textura suficiente para determinação a 30 °C e apenas a gordura do leite pura se mostrou plástica a 25 °C.

Da mesma maneira, a adição de óleo de girassol provocou diminuição na consistência da gordura do leite. O óleo de girassol é líquido nas temperaturas analisadas, o que provocou a diluição da rede cristalina da gordura do leite. A adição de 20% de óleo de girassol (mistura 7) provocou diminuição da consistência da gordura do leite de 12647,8 para 5167,8 gf/cm² a 5 °C, o que corresponde a uma queda de quase 60% na consistência da gordura do leite. Essa diminuição é devida a uma rede cristalina estruturalmente mais frágil com a adição de apenas 20% de óleo de girassol (ROUSSEAU et al., 1996c).

A consistência dos ésteres de fitosteróis apenas puderam ser determinadas a 5 °C. Nas outras temperaturas em que foi analisado, o produto parecia apresentar

alto grau de cristalização devido à sua cor opaca, porém supõe-se que os cristais não formavam uma rede cristalina estruturalmente semelhante às encontradas nas gorduras plásticas (RODRIGUES et al., 2004). Esta estrutura cristalina é frágil em função das diferenças estruturais entre os esteróis e os ácidos graxos. Dessa maneira, o produto não apresentou estrutura suficiente para permitir a análise de consistência; apenas uma alta viscosidade pôde ser visualmente observada.

A adição dos ésteres de fitosteróis à gordura do leite, assim como ocorreu com o óleo de girassol, também provocou diminuição de sua consistência. Para a mistura 3, que corresponde à adição de 25% de ésteres de fitosteróis à gordura do leite, a consistência a 5 °C diminuiu de 12647,8 para 4592,3 gf/cm², o que corresponde a uma queda de quase 64% em sua consistência.

A proporção de diminuição da consistência é, de maneira geral, maior que a proporção de adição de outros componentes à gordura do leite. Os coeficientes obtidos a partir da regressão múltipla aplicada ao comportamento da consistência das misturas comprovam estatisticamente esse fenômeno. A Tabela 18 apresenta os coeficientes de regressão múltipla para a consistência das misturas, bem como seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Tabela 18 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de consistência e coeficientes de determinação R^2

T (°C)	Coeficientes							R^2
	β_1	β_2	β_3	B_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	
5	11278,1	---	---	-21069,6	-20571,4	---	---	0,9694
10	10341,0	---	---	-20632,1	-20236,8	---	---	0,9652
15	4405,1	---	---	-10237,3	-12235,9	---	16337,0	0,9763
20	890,7	---	---	-2271,7	-3591,7	---	7700,2	0,9657

--- Coeficientes não significativos a $p < 0,05$.

Em todas as temperaturas em que foi possível aplicar a regressão, a gordura do leite exerceu influência significativa a $p < 0,05$ sobre a consistência das misturas. O óleo de girassol e os ésteres de fitosteróis não tiveram influência significativa na consistência das misturas.

As interações binárias entre a gordura do leite e o óleo de girassol e entre a gordura do leite e os ésteres de fitosteróis, representadas pelos coeficientes β_{12} e

β_{13} , respectivamente, foram negativas, o que indica que houve interação monotética entre esses componentes, dois a dois. A interação monotética ocorre entre componentes com pontos de fusão, massas molares ou formas polimórficas muito diferentes (TIMMS, 1984; ROSSELL, 1973). A interação entre o óleo de girassol e os ésteres de fitosteróis (β_{23}) não foi significativa. A interação entre os três componentes das misturas foi significativa a 15 e 20 °C e não foi significativa a 5 e 10 °C. Todas as regressões apresentaram bons coeficientes de determinação (R^2), que variaram de 0,9652 até 0,9763. Nas temperaturas em que as interações ternárias foram significativas, pode-se afirmar que a influência negativa das interações binárias sobre a consistência das misturas foi maior do que a influência positiva das interações ternárias.

Em todos os casos, os coeficientes de regressão (em módulo) diminuíram com o aumento da temperatura, o que indica que a influência dos componentes das misturas, bem como as interações entre eles, exercem menor influência sobre a consistência conforme a temperatura de análise aumenta. Essa relação é justificada pelo fato de a consistência também diminuir em função do aumento de temperatura, conforme discutido anteriormente.

A temperaturas mais altas, apenas os triacilgliceróis contendo maiores teores de ácidos graxos saturados de cadeia longa cristalizam, formando a rede cristalina responsável pela consistência (i.e., plasticidade) da gordura. A temperaturas mais baixas, maior quantidade de triacilgliceróis participa do processo de cristalização, incluindo os que apresentam ácidos graxos insaturados e saturados de cadeia média e curta.

As interações entre os componentes definidas pelos coeficientes de regressão múltipla podem ser visualizadas nos diagramas triangulares da consistência das misturas, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Diagramas triangulares da consistência das misturas a 5 (A), 10 (B), 15 (C) e 20°C (D)

A Tabela 19 apresenta a consistência das misturas após interesterificação química.

Tabela 19 - Consistência das misturas após interesterificação química

Mistura	Consistência $\pm$ DP (gf/cm ²)						
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
1 (100:0:0)	11150,8 $\pm$ 342,1	8873,5 $\pm$ 145,8	5997,9 $\pm$ 43,1	3717,1 $\pm$ 236,4	1479,2 $\pm$ 48,2	463,7 $\pm$ 18,6	0,0 $\pm$ 0,0
2 (87,5:0:12,5)	7087,4 $\pm$ 32,2	5089,9 $\pm$ 97,9	3226,0 $\pm$ 48,0	2338,9 $\pm$ 9,1	1399,5 $\pm$ 33,2	339,0 $\pm$ 23,6	0,0 $\pm$ 0,0
3 (75,0:0:25,0)	4198,0 $\pm$ 10,1	3164,6 $\pm$ 57,4	1594,7 $\pm$ 65,9	1011,6 $\pm$ 33,2	466,8 $\pm$ 14,6	0,0 $\pm$ 0,0	---
4 (90,0:10,0:0)	6995,7 $\pm$ 97,6	4851,6 $\pm$ 140,3	2742,2 $\pm$ 35,1	1448,9 $\pm$ 111,8	552,6 $\pm$ 20,0	0,0 $\pm$ 0,0	---
5 (78,7:8,8:12,5)	4586,5 $\pm$ 120,9	4091,8 $\pm$ 38,7	1986,1 $\pm$ 76,4	1207,0 $\pm$ 18,8	539,8 $\pm$ 32,7	0,0 $\pm$ 0,0	---
6 (67,5:7,5:25,0)	2751,9 $\pm$ 108,9	2455,1 $\pm$ 20,5	1191,7 $\pm$ 17,3	724,2 $\pm$ 39,4	444,6 $\pm$ 40,9	0,0 $\pm$ 0,0	---
7 (80,0:20,0:0)	6639,5 $\pm$ 126,3	4449,5 $\pm$ 133,1	1902,4 $\pm$ 57,0	964,5 $\pm$ 9,2	483,6 $\pm$ 20,5	0,0 $\pm$ 0,0	---
8 (70,0:17,5:12,5)	3056,1 $\pm$ 51,2	2459,9 $\pm$ 106,2	1014,3 $\pm$ 43,9	563,4 $\pm$ 3,9	271,4 $\pm$ 4,2	0,0 $\pm$ 0,0	---
9 (60,0:15,0:25,0)	1748,0 $\pm$ 36,6	1311,0 $\pm$ 24,3	608,5 $\pm$ 14,3	363,4 $\pm$ 10,4	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
10 (70,0:30,0:0)	3216,8 $\pm$ 58,2	2187,7 $\pm$ 86,2	1146,2 $\pm$ 45,5	509,1 $\pm$ 24,3	122,8 $\pm$ 8,6	0,0 $\pm$ 0,0	---
11 (61,3:26,2:12,5)	2033,1 $\pm$ 160,6	1185,5 $\pm$ 13,6	538,7 $\pm$ 43,2	269,2 $\pm$ 3,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
12 (52,5:22,5:25,0)	701,7 $\pm$ 69,2	327,7 $\pm$ 12,5	224,7 $\pm$ 15,0	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
13 (60,0:40,0:0)	1191,2 $\pm$ 123,1	549,9 $\pm$ 13,6	278,1 $\pm$ 13,0	176,5 $\pm$ 2,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
14 (52,5:35,0:12,5)	478,0 $\pm$ 20,5	261,4 $\pm$ 8,4	165,2 $\pm$ 2,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
15 (45,0:30,0:25,0)	235,5 $\pm$ 6,6	222,5 $\pm$ 15,0	175,8 $\pm$ 5,7	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---
Ésteres de fitosteróis	4308,2 $\pm$ 26,3	1064,4 $\pm$ 11,3	588,7 $\pm$ 2,9	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

As misturas mantiveram o mesmo comportamento após a reação no que diz respeito à adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis, ou seja, a adição desses componentes à gordura do leite provocou diminuição de sua consistência. O mesmo é válido para a diminuição da consistência em função do aumento de temperatura.

Os ésteres de fitosteróis apresentaram aumento na consistência após a reação, sendo que esta pôde ser medida até 15 °C, enquanto que antes da reação, os ésteres de fitosteróis apenas apresentaram consistência a 5 °C. A justificativa para este fenômeno pode ser a mesma discutida para o aumento do ponto de amolecimento dos ésteres de fitosteróis após interesterificação química.

A consistência em geral diminuiu após a reação quando analisada a 5 e 10 °C. A partir de 20 °C até a fusão completa, a interesterificação química provocou aumento da consistência para todas as misturas. Esta diferença de comportamento

das misturas interesterificadas em função da temperatura pode ser explicada pela incorporação dos ácidos graxos insaturados do óleo de girassol e dos ésteres de fitosteróis pelos triacilgliceróis da gordura do leite, diminuindo a inclinação das curvas de consistência das misturas em função da temperatura (ROUSSEAU et al., 1996c). A estrutura da rede cristalina das gorduras pode se apresentar em diferentes formas polimórficas, dependendo do tratamento térmico a que são submetidas, ou simplesmente da temperatura de cristalização (SIMÕES & GIOIELLI, 1999).

A mistura e a interesterificação química alteraram o comportamento reológico da gordura do leite por diferentes mecanismos. A simples mistura resultou apenas em diluição da rede cristalina da gordura do leite. ROUSSEAU et al. (1996c) realizaram mistura e interesterificação química entre gordura do leite e óleo de canola e determinaram o índice de dureza das misturas por penetração de cone a 5 °C. Segundo os autores, a incorporação de 10% de óleo de canola (equivalente à mistura 4 neste trabalho, que contém 10% de óleo de girassol) não diminuiu substancialmente o índice de dureza da gordura do leite a 5 °C, indicando que a gordura do leite foi capaz de acomodar maior proporção de óleo sem, no entanto, perder sua integridade estrutural. A adição de 20% de óleo de canola (equivalente à mistura 7) resultou em maior queda do índice de dureza, o que foi interpretado como sendo consequência do enfraquecimento da estrutura cristalina. Para as misturas interesterificadas, o efeito de diluição das misturas foi intensificado pela incorporação dos ácidos graxos insaturados do óleo de canola pelos triacilgliceróis da gordura do leite, resultando em menor índice de dureza.

No presente trabalho, foi observado efeito semelhante, porém em diferentes proporções de gordura do leite e óleo de girassol. A gordura do leite interesterificada apresentou diminuição da consistência a 5°C de 11150,8 gf/cm² para 6995,7 gf/cm² com a adição de 10% de óleo de girassol e para 6639,5 gf/cm² com a adição de 20% de óleo de girassol, evidenciando a capacidade da gordura do leite de acomodar diferentes quantidades de óleo sem modificar sua integridade estrutural entre 10 e 20% de óleo de girassol (equivalente às misturas 4 e 7, respectivamente). Mesmo havendo queda tão acentuada na consistência, estas misturas interesterificadas ainda apresentam baixa plasticidade.

A Tabela 20 apresenta os coeficientes de regressão múltipla para a consistência das amostras após interesterificação química, bem como os coeficientes de determinação R².

Tabela 20 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de consistência e coeficientes de determinação R^2 após interesterificação química

T (°C)	Coeficientes							R^2
	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	
5	10885,4	---	4321,8	-20679,9	-27507,2	---	---	0,9779
10	8256,1	---	1085,9	-17173,5	-16258,6	---	---	0,9787
15	5302,5	---	600,7	-13381,5	-13899,5	---	23926,3	0,9579
20	3269,4	---	---	-9021,2	-7633,5	---	14106,1	0,9247
25	1326,0	---	---	-3660,2	-2282,9	---	---	0,8958

--- Coeficientes não significativos a $p < 0,05$.

Os coeficientes de regressão β_1 foram significativos em todas as temperaturas analisadas, o que significa que a consistência das misturas interesterificadas dependeu da gordura do leite. Ao contrário, a influência do óleo de girassol não foi significativa. Os ésteres de fitosteróis influenciaram a consistência das misturas às temperaturas de 5 a 15 °C. A 20 e 25 °C, os coeficientes β_3 não foram significativos, já que os ésteres de fitosteróis não apresentaram consistência nessas temperaturas.

As interações entre a gordura do leite e o óleo de girassol e entre a gordura do leite e os ésteres de fitosteróis foram significativas e negativas em todas as temperaturas. As interações negativas revelam a ocorrência de sistema monotético, que apresenta consistência menor do que a esperada por interpolação linear. Apenas as misturas analisadas a 15 e 20 °C apresentaram interação significativa e positiva entre os três componentes.

Em todos os casos, os coeficientes apresentaram diminuição (em módulo) em função do aumento de temperatura.

A Figura 15 apresenta os diagramas triangulares da consistência das misturas após interesterificação química.

Figura 15. Diagramas triangulares da consistência das misturas após interesterificação química a 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D) e 25 °C (E)

O comportamento da consistência das misturas antes e depois da interesterificação química mostrou-se semelhante, de acordo com os diagramas triangulares obtidos.

As interações binárias entre os componentes podem ser melhor observadas através das curvas de consistência para as misturas binárias de gordura do leite e óleo de girassol (misturas 4, 7, 10 e 13, contendo 10, 20, 30 e 40 % de óleo de girassol, respectivamente) e de gordura do leite e ésteres de fitosteróis (misturas 2 e 3, contendo 12,5 e 25,0% de ésteres de fitosteróis, respectivamente), apresentadas na Figura 16. As depressões presentes em quase todas as curvas revelam a interação antagônica entre os componentes. Observa-se, ainda, que a adição de 10% de óleo de girassol ou de 12,5% de ésteres de fitosteróis provoca diminuição mais acentuada na consistência da gordura do leite. Acima destes valores o abaixamento da consistência é menos intenso.

Figura 16. Consistência das misturas binárias a 5, 10, 15 e 20 °C

A Tabela 21 apresenta a consistência das misturas após interesterificação enzimática. Todas as misturas, exceto a mistura 1, que corresponde à gordura do leite pura, e os ésteres de fitosteróis puros, contêm 25% de ésteres de fitosteróis.

Tabela 21 - Consistência das misturas após interesterificação enzimática

Mistura	Consistência $\pm$ DP (gf/cm ²)					
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1 (100:0:0)	8594,6 $\pm$ 638,7	7328,2 $\pm$ 766,2	4914,0 $\pm$ 369,5	2720,9 $\pm$ 318,2	991,1 $\pm$ 12,1	0,0 $\pm$ 0,0
3 (75,0:0:25,0)	6509,5 $\pm$ 318,3	3784,4 $\pm$ 270,2	1966,6 $\pm$ 114,8	837,0 $\pm$ 51,2	397,4 $\pm$ 47,3	---
6 (67,5:7,5:25,0)	4432,4 $\pm$ 313,7	2266,5 $\pm$ 45,1	1006,5 $\pm$ 24,2	435,7 $\pm$ 25,3	0,0 $\pm$ 0,0	---
9 (60,0:15,0:25,0)	3020,1 $\pm$ 171,1	1429,7 $\pm$ 56,6	617,5 $\pm$ 22,5	0,0 $\pm$ 0,0	---	---
12 (52,5:22,5:25,0)	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---	---	---
15 (45,0:30,0:25,0)	---	---	---	---	---	---
Ésteres de fitosteróis	3442,9 $\pm$ 203,6	653,4 $\pm$ 88,6	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

A consistência das misturas interesterificadas enzimaticamente seguiu o comportamento das misturas antes da reação com relação à sua diminuição em função do aumento de temperatura e da adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis à gordura do leite.

A interesterificação enzimática, assim como a química, provocou diminuição da consistência da gordura do leite pura (mistura 1) às temperaturas de 5 e 10 °C e passou a contribuir para seu aumento a partir de 15 °C. Desse modo, a reação enzimática diminuiu a inclinação da curva de consistência da gordura do leite, conforme discutido anteriormente para a interesterificação química.

O aumento da consistência dos ésteres de fitosteróis após interesterificação enzimática pode ser devido aos mesmos fatores discutidos com a interesterificação química, ou seja, a presença de esteróis livres, que apresentam alto ponto de fusão, após a reação.

No caso das misturas 6 e 9, que apresentam 7,5 e 15% de óleo de girassol, respectivamente, a reação enzimática em geral aumentou sua consistência. Já para as misturas 12 e 15 (22,5 e 30% de óleo de girassol) a interesterificação enzimática provocou diminuição da consistência. Antes da reação, as misturas 12 e 15 apresentaram consistência a 5 e 10 °C e após a interesterificação enzimática, não

apresentaram consistência em nenhuma temperatura analisada. Assim, pode-se afirmar que as misturas interesterificadas por via enzimática de gordura do leite com 25% de ésteres de fitosteróis não se apresentam como gorduras plásticas com teores de óleo de girassol iguais ou maiores que 22,5%.

ROUSSEAU & MARANGONI (1998a; 1998b) submeteram misturas de gordura do leite com óleo de canola na proporção de 80:20 a interesterificação enzimática por 6h com lipase 1,3 específica do microrganismo *Rhizopus arrhizus* e encontraram importantes variações no perfil de triacilgliceróis das amostras que provocaram diminuição no índice de dureza. Originalmente, os triacilgliceróis da gordura do leite podem ser divididos em dois grupos principais, em função do número de átomos de carbonos da molécula: 34-42 e 46-54. Com a ocorrência da redistribuição de ácidos graxos em função da reação, os grupos 34-42 e os TAGs com 54 átomos de carbono apresentaram diminuição em sua proporção relativa, enquanto que os grupos 46-52 aumentaram em proporção. O grupo de 44 átomos de carbono representava o ponto central e não mudou substancialmente em função da reação. Quanto maior era a proporção de óleo de canola na mistura, mais aparentes eram as modificações na composição em triacilgliceróis. Ainda segundo os autores, de maneira geral, uma queda acentuada na proporção de triacilgliceróis com 54 átomos de carbono levava a maior aumento na proporção do grupo 48-52. Essa queda acentuada do teor de TAGs com 54 átomos de carbono é atribuída à perda de triacilgliceróis contendo ácidos graxos insaturados de 18 átomos de carbono provenientes do óleo de canola, que representam a maioria de seus ácidos graxos. O óleo de girassol e os ésteres de fitosteróis também são fontes ricas nesses ácidos graxos, o que pode ter levado as misturas interesterificadas por via enzimática de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis a apresentar o mesmo comportamento de diminuição da consistência.

A Figura 17 apresenta as curvas de consistência das misturas 1, 3, 6 e 9 antes e após interesterificação química e enzimática. Comparando-se as três curvas de cada gráfico, pôde-se observar o efeito da interesterificação sobre a gordura do leite (mistura 1) e sobre as misturas 3, 6 e 9, que apresentam 25 % de ésteres de fitosteróis.

Figura 17. Curvas de consistência das misturas 1, 3, 6 e 9, respectivamente

A gordura do leite (mistura 1) apresentou curva de consistência menos inclinada após interesterificação química e enzimática, o que indica que os dois tipos de rearranjo provocaram melhora em sua plasticidade. Seu comportamento após a reação enzimática foi semelhante ao observado após a reação química, apresentando, contudo, menores valores de consistência. Uma possível explicação para isso pode residir na migração acil em processos descontínuos catalisados por lipases, como o caso do presente trabalho.

A migração acil é um sério problema na interesterificação catalisada por lipases. A razão para esta migração é a existência de acilgliceróis parciais, especialmente diacilgliceróis, que são intermediários necessários e inevitáveis. Ela ocorre pela formação de um intermediário cíclico instável, sendo iniciada pelo ataque nucleofílico de um par de elétrons e resultando em anel intermediário de cinco membros. Este anel abre e resulta em dois produtos, o diacilglicerol original e um que apresentou migração. A migração acil da posição *sn-2* para as posições *sn-1* ou *sn-3*, ou o oposto, ocorre do mesmo modo e continua até que o equilíbrio dinâmico seja alcançado (KIM et al., 2004; XU et al., 1998). Em reatores contínuos, como o

substrato entra em contato com grande quantidade de enzima, o tempo de reação é menor quando comparado com o reator descontínuo, resultando em menor migração acil. A migração acil é o principal problema em reatores descontínuos, o que resulta em menor pureza dos lipídios estruturados específicos, mesmo que a lipase seja *sn*-1,3 específica. A alta relação entre o substrato e a enzima exige longo tempo para a reação alcançar o equilíbrio, o que resulta consequentemente em migração acil. O processamento contínuo também permite a reutilização da enzima imobilizada e a redução do custo (MU et al., 1998; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

No caso das misturas 3, 6 e 9, a interesterificação enzimática provocou aumento da consistência a temperaturas na faixa de 5 °C, consequentemente aumentando a inclinação das curvas de consistência. Esse aumento pode ser devido à presença de esteróis na forma livre que não foram reesterificados a ácidos graxos durante o rearranjo enzimático, já que um certo grau de hidrólise é necessário neste tipo de reação (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995). A partir de 15 °C, porém, as misturas interesterificadas por via enzimática passaram a apresentar consistência, o que representa um efeito desejado.

De maneira geral, a interesterificação química mostrou-se mais eficiente que a enzimática para diminuir a consistência das misturas em temperaturas mais baixas, quando estas se apresentam duras demais, e aumentar a consistência em temperaturas em que as misturas se apresentavam excessivamente macias.

Segundo HAIGHTON (1959), as gorduras podem ser classificadas quanto à sua espalhabilidade em função de seu “yield value”, como apresentado na Tabela 22.

Tabela 22 - Classificação de produtos gordurosos segundo “yield value”

“Yield value” (gf/cm ²)	Consistência
<50	Muito macia, quase fluida
50-100	Muito macia, não espalhável
100-200	Macia, já espalhável
200-800	Plástica e espalhável
800-1000	Dura, satisfatoriamente espalhável
1000-1500	Muito dura, limite de espalhabilidade
>1500	Muito dura

Neste trabalho, o termo “yield value” é tratado como consistência. Uma gordura pode ser considerada espalhável na faixa entre 100 e 1000 gf/cm², mas os valores ideais de “yield value” estão compreendidos na faixa de 200 a 800 gf/cm². A gordura do leite demonstrou ser muito dura até 15 °C, apresentando-se espalhável de 20 até 25 °C. Pela adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis, as misturas tornaram-se mais espalháveis a temperaturas mais baixas. Assim sendo, do ponto de vista exclusivo da consistência, à temperatura de refrigeração doméstica, cerca de 10 °C, apenas as misturas contendo de 45,0 até 61,3% de gordura do leite, de 22,5 a 35,0% de óleo de girassol e de 12,5 a 25,0% de ésteres de fitosteróis, faixa encontrada nas misturas 11, 12, 14 e 15, seriam indicadas para o preparo de um *spread*. Contudo, existem outros fatores que influenciariam na escolha da mistura ideal, como conteúdo de gordura sólida, método de resfriamento, tratamento térmico após o resfriamento (temperagem), tempo e grau de trabalho mecânico, tamanho e forma dos cristais (estrutura cristalina) e estado de emulsão (MARANGONI & ROUSSEAU, 1998a).

Após interesterificação química, uma gama maior de possibilidades de formulação da base gordurosa estaria disponível. As misturas 9, 11, 12, 14 e 15 apresentaram consistência dentro da faixa de espalhabilidade estabelecida por HAIGHTON (1959), variando de 45,0 até 61,3% de gordura do leite, de 15,0 a 35% de óleo de girassol e de 12,5 a 25,0% de ésteres de fitosteróis. Ao contrário, a interesterificação enzimática diminuiu a faixa de plasticidade das misturas a 10 °C.

4.8 Conteúdo de gordura sólida

A Tabela 23 apresenta o conteúdo de gordura sólida das amostras de 10 a 40 °C, quando houve fusão completa de todas as misturas.

Assim como ocorreu com a consistência, o conteúdo de gordura sólida das misturas diminuiu com a adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis e com o aumento de temperatura. ROUSSEAU et al. (1996a) determinaram o conteúdo de gordura sólida da gordura do leite de 5 °C a 40 °C, sendo que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a gordura do leite apresentou maiores teores de sólidos a baixas temperaturas. É importante observar que, embora a consistência da

gordura do leite e de algumas misturas que a contêm apresentem correlação linear com o conteúdo de gordura sólida (RODRIGUES, 2002), em temperaturas mais elevadas as gorduras não apresentam consistência, porque o baixo teor de gordura sólida, geralmente inferior a 10%, não é suficiente para formar a estrutura cristalina. A gordura do leite pura, por exemplo, já não apresentava consistência a 30 °C, apesar de nesta temperatura ainda conter cerca de 6% de sólidos.

Tabela 23 - Conteúdo de gordura sólida das misturas

Mistura	Conteúdo de gordura sólida $\pm$ DP (%)						
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1 (100:0:0)	47,8 $\pm$ 0,4	34,7 $\pm$ 0,6	19,0 $\pm$ 0,0	10,9 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
2 (87,5:0:12,5)	37,3 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 0,3	14,4 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	---
3 (75,0:0:25,0)	28,9 $\pm$ 0,3	20,5 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,6	2,9 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	---
4 (90,0:10,0:0)	42,7 $\pm$ 0,0	29,2 $\pm$ 0,7	16,1 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0
5 (78,7:8,8:12,5)	32,0 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 1,7	11,5 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	---
6 (67,5:7,5:25,0)	25,9 $\pm$ 0,2	18,3 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0	---
7 (80,0:20,0:0)	35,9 $\pm$ 0,6	22,9 $\pm$ 0,8	12,8 $\pm$ 0,6	8,7 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	---
8 (70,0:17,5:12,5)	27,6 $\pm$ 0,8	17,7 $\pm$ 0,9	9,2 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	---
9 (60,0:15,0:25,0)	22,0 $\pm$ 0,1	13,4 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	---
10 (70,0:30,0:0)	29,3 $\pm$ 0,2	18,4 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	---
11 (61,3:26,2:12,5)	23,2 $\pm$ 0,6	14,2 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	---
12 (52,5:22,5:25,0)	18,4 $\pm$ 0,5	11,3 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0	---
13 (60,0:40,0:0)	24,5 $\pm$ 0,4	14,3 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	---
14 (52,5:35,0:12,5)	18,4 $\pm$ 1,0	11,3 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	---
15 (45,0:30,0:25,0)	14,3 $\pm$ 0,6	9,1 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	---
Óleo de girassol	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---	---	---	---
Ésteres de fitosteróis	65,8 $\pm$ 0,6	63,4 $\pm$ 0,5	56,0 $\pm$ 0,6	14,4 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 1,3	0,0 $\pm$ 0,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

O óleo de girassol não apresentou conteúdo de gordura sólida em nenhuma das temperaturas analisadas. Os ésteres de fitosteróis apresentaram alto teor de sólidos a 10 °C, cerca de 66%, que diminuiu em função da temperatura, apresentando queda acentuada entre 20 e 25 °C, faixa onde se encontra seu ponto de amolecimento (24,3 °C). A fusão total desse componente ocorreu a 40 °C.

No caso dos ésteres de fitosteróis, não foi possível estabelecer uma correlação entre os resultados de consistência e de conteúdo de gordura sólida. A

10 °C, os ésteres de fitosteróis apresentaram 65,8% de gordura sólida e nenhuma consistência. À mesma temperatura, a gordura do leite apresentava 47,8% de gordura sólida e consistência de quase 12.000,0 gf/cm², ou seja, uma gordura extremamente dura, com baixa plasticidade. Essa diferença de comportamento pode ser devida à composição química dos ésteres de fitosteróis, diferente da maioria dos lipídios comestíveis, compostos principalmente de triacilgliceróis. Essa composição química diferente dificulta a formação de uma estrutura cristalina, porque as moléculas apresentam estruturas químicas diferentes, dificultando o empacotamento, apresentando comportamento semelhante ao dos inibidores ou modificadores de cristalização.

Diversos modificadores de cristalização de gorduras influenciam a tendência de cristalização antes do fracionamento ou retardam a cristalização no produto final. Entre eles, podem ser citados lecitina, ésteres de ácidos graxos de poligliceróis, sorbitol ou outros álcoois polihídricos, estearato de alumínio e oxiestearina. A ação do inibidor de cristalização de gorduras pode ser explicada considerando que os cristais crescem pela deposição de moléculas em padrão altamente ordenado. A orientação das primeiras moléculas resulta no núcleo cristalino. A deposição de uma molécula similar, mas de dimensões maiores, interrompe o crescimento cristalino, uma vez que novas moléculas de triacilgliceróis não seguirão a orientação espacial ordenada necessária para o crescimento. Com o tempo, a molécula inibidora dissolve o núcleo cristalino em função do movimento molecular. Entretanto, mais triacilgliceróis se depositarão e o cristal retoma o crescimento. Assim, as moléculas do inibidor estão continuamente se depositando e se dissolvendo, mas como resultado final, a gordura acabará cristalizando. A quantidade de material cristalizado será a mesma independente da presença ou não do inibidor. Contudo, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é aumentado pela presença do inibidor (APPLEWHITE, 1985; SCRIMGEOUR, 2005; ANDERSON, 2005).

A Tabela 24 apresenta os coeficientes de regressão múltipla e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e a Figura 18 apresenta os diagramas triangulares do conteúdo de gordura sólida das misturas.

Tabela 24 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de conteúdo de gordura sólida e coeficientes de determinação R^2

T (°C)	Coeficientes							
	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	R^2
10	48,4	0,0*	65,7	-19,1	-126,4	-170,2	167,0	0,9988
15	35,0	0,0*	63,3	-27,7	-112,4	-79,1	0,0*	0,9972
20	19,0	0,0*	55,9	-12,2	-90,0	-60,9	0,0*	0,9968
25	11,6	0,0*	14,3	-8,8	-31,5	0,0*	0,0*	0,9644
30	6,0	0,0*	6,3	-6,0	-20,5	0,0*	0,0*	0,9019
35	0,3	0,0*	5,1	0,0*	-9,2	0,0*	0,0*	0,9295

* não significativo a $p < 0,05$

Figura 18. Diagramas triangulares do conteúdo de gordura sólida das misturas a 10 (A), 15 (B), 20 (C), 25 (D), 30 (E) e 35 °C (F)

As depressões nas curvas dos diagramas revelam a ocorrência de interações entre os componentes das misturas. As interações binárias entre os componentes foram significativas em quase todas as temperaturas e os sinais negativos dos coeficientes relativos a essas interações (β_{12} , β_{13} e β_{23}) mostram que estas foram antagônicas, ou seja, as misturas binárias apresentaram conteúdo de gordura sólida menor do que o esperado por interpolação linear. Quanto mais acentuada é a depressão das curvas dos diagramas, mais intenso é este efeito. No caso de interações entre um componente sólido e um líquido, como representam os coeficientes β_{12} e β_{23} , a interação é monotética, um tipo particular de efeito eutético (RODRIGUES & GIOIELLI, 2003). A interação entre os três componentes das misturas apenas foi significativa a 10 °C.

A Tabela 25 apresenta o conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química.

Tabela 25 - Conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química

Mistura	Conteúdo de gordura sólida $\pm$ DP (%)						
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1 (100:0:0)	39,1 $\pm$ 0,6	29,2 $\pm$ 0,4	21,3 $\pm$ 0,6	16,5 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0
2 (87,5:0:12,5)	46,6 $\pm$ 0,4	35,2 $\pm$ 0,1	25,6 $\pm$ 1,6	18,8 $\pm$ 0,4	12,7 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
3 (75,0:0:25,0)	33,5 $\pm$ 0,6	24,5 $\pm$ 0,8	17,5 $\pm$ 0,5	13,5 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
4 (90,0:10,0:0)	41,2 $\pm$ 0,2	29,7 $\pm$ 0,8	21,2 $\pm$ 0,6	14,6 $\pm$ 0,5	8,8 $\pm$ 1,8	5,3 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0
5 (78,7:8,8:12,5)	34,2 $\pm$ 0,6	23,6 $\pm$ 0,4	16,8 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0
6 (67,5:7,5:25,0)	28,5 $\pm$ 0,6	21,1 $\pm$ 1,2	15,5 $\pm$ 0,6	11,4 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0
7 (80,0:20,0:0)	34,8 $\pm$ 0,7	24,0 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 2,4	0,0 $\pm$ 0,0
8 (70,0:17,5:12,5)	28,3 $\pm$ 0,3	19,6 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
9 (60,0:15,0:25,0)	22,8 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,5	11,8 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 0,9	5,5 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 1,0	0,0 $\pm$ 0,0
10 (70,0:30,0:0)	28,0 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
11 (61,3:26,2:12,5)	23,1 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0
12 (52,5:22,5:25,0)	18,6 $\pm$ 0,2	13,8 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
13 (60,0:40,0:0)	22,0 $\pm$ 0,4	14,0 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 1,1	4,2 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0
14 (52,5:35,0:12,5)	18,5 $\pm$ 0,2	11,4 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
15 (45,0:30,0:25,0)	15,8 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0
Óleo de girassol	0,0 $\pm$ 0,0	---	---	---	---	---	---
Ésteres de fitosteróis	65,5 $\pm$ 0,1	63,7 $\pm$ 0,1	59,7 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 1,3	4,5 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

As misturas após interesterificação química apresentaram, de modo geral, diminuição do conteúdo de gordura sólida em função do aumento de temperatura e da adição dos outros componentes, assim como ocorreu antes da reação.

Em geral, a interesterificação química provocou aumento do conteúdo de gordura sólida das misturas nas diferentes temperaturas analisadas. Apenas as misturas 1 (gordura do leite), 3 e 4 apresentaram menor conteúdo de gordura sólida a 10 e 15 °C após a reação. Os ésteres de fitosteróis não apresentaram diferença no conteúdo de gordura sólida antes e após a interesterificação química.

A Tabela 26 apresenta os coeficientes de regressão múltipla para o conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química, bem como seus coeficientes de determinação.

Tabela 26 - Coeficientes de regressão múltipla dos resultados de conteúdo de gordura sólida e coeficientes de determinação R^2 após interesterificação química

T (°C)	Coeficientes							
	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	R^2
10	40,8	0,0*	65,4	0,0*	-71,1	-153,4	0,0*	0,9899
15	30,2	0,0*	63,7	-13,2	-72,3	-123,5	0,0*	0,9956
20	22,1	0,0*	59,6	-16,1	-72,1	-90,3	0,0*	0,9959
25	16,7	0,0*	13,5	-22,5	-12,0	-27,6	0,0*	0,9897
30	9,1	0,0*	8,2	-11,6	0,0*	75,1	-196,4	0,9525

* não significativo a $p < 0,05$

Os coeficientes β_1 e β_3 , referentes à gordura do leite e aos ésteres de fitosteróis, respectivamente, foram significativos, o que demonstra que a presença desses componentes contribui para o conteúdo de gordura sólida das misturas. O coeficiente relativo ao óleo de girassol, β_2 , não foi significativo a $p < 0,05$. As interações binárias foram negativas, com exceção do β_{23} a 30 °C, o que indica efeito eutético nas diferentes combinações binárias, assim como ocorreu antes da interesterificação química. A interação entre os três componentes (β_{123}) apenas foi significativa a 30 °C.

A Figura 19 apresenta os diagramas triangulares de conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química.

Figura 19. Diagramas triangulares do conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação química a 10 (A), 15 (B), 20 (C), 25 (D) e 30 °C (E)

Assim como ocorreu antes da interesterificação química, os diagramas triangulares das misturas rearranjadas apresentaram curvas mais pronunciadas em função do aumento da temperatura de 10 a 20 °C.

As interações binárias entre os componentes das misturas podem ser melhor visualizadas a partir das curvas de conteúdo de gordura sólida em função da adição de óleo de girassol ou de ésteres de fitosteróis separadamente à gordura do leite, conforme mostra a Figura 20.

As curvas de conteúdo de gordura sólida das misturas antes da interesterificação química em função da adição isolada de óleo de girassol apresentaram comportamento próximo ao linear, o que também foi observado por RODRIGUES (2002) com a adição de óleo de milho à gordura do leite. No caso da consistência, a adição de pequenas quantidades de óleo de girassol provocava grande diminuição desta propriedade, enquanto que a diminuição do conteúdo de gordura sólida, ao contrário da consistência, ocorreu em proporções semelhantes às esperadas por interpolação linear. Após interesterificação química, as misturas também apresentaram tendência linear de variação do conteúdo de gordura sólida em função da adição de óleo de girassol, porém as curvas se apresentaram mais inclinadas, especialmente acima de 10 °C.

A adição de ésteres de fitosteróis isoladamente à gordura do leite, de maneira geral, provocou diminuição no conteúdo de gordura, com comportamento próximo ao linear, apesar de ser esperado aumento no conteúdo de gordura sólida porque os ésteres de fitosteróis apresentam maiores valores que os da gordura do leite para esta propriedade em todas as temperaturas. Portanto, algum efeito antagônico entre os triacilgliceróis da gordura do leite e os ésteres de fitosteróis provoca este fenômeno, característico de interação eutética. Por outro lado, após a interesterificação química, ocorreu aumento no conteúdo de gordura sólida com a adição de 12,5% de ésteres de fitosteróis e posterior diminuição com a presença de 25% de ésteres de fitosteróis, demonstrando, nesta proporção, forte efeito antagônico.

Figura 20. Conteúdo de gordura sólida das misturas binárias a 10, 15, 20, 25 e 30 °C

A Tabela 27 apresenta o conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação enzimática.

Tabela 27 - Conteúdo de gordura sólida das misturas após interesterificação enzimática

Mistura	Conteúdo de gordura sólida $\pm$ DP (%)						
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1 (100:0:0)	48,6 $\pm$ 0,3	36,0 $\pm$ 1,3	23,4 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 1,1	9,3 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 1,7	0,0 $\pm$ 0,0
3 (75,0:0:25,0)	27,4 $\pm$ 0,5	22,1 $\pm$ 0,4	13,6 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	---
6 (67,5:7,5:25,0)	23,0 $\pm$ 1,1	17,5 $\pm$ 1,2	10,9 $\pm$ 1,1	6,8 $\pm$ 0,8	4,1 $\pm$ 0,2	---	---
9 (60,0:15,0:25,0)	19,3 $\pm$ 0,0	14,4 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 1,4	1,0 $\pm$ 0,1	---	---
12 (52,5:22,5:25,0)	15,7 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	---	---
15 (45,0:30,0:25,0)	12,0 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 0,1	---	---
Ésteres de fitosteróis	65,8 $\pm$ 0,1	63,1 $\pm$ 0,5	49,5 $\pm$ 0,3	10,7 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

A adição de ésteres de fitosteróis e de óleo de girassol, assim como o aumento de temperatura, provocaram diminuição do conteúdo de gordura sólida das misturas interesterificadas por via enzimática, assim como ocorreu antes e após interesterificação química.

A Figura 21 apresenta as curvas de conteúdo de gordura sólida das misturas 1, 3, 6 e 9 antes e após interesterificação química e enzimática.

As mudanças no conteúdo de gordura sólida induzidas pela interesterificação química ou enzimática podem ser diferentes (ROUSSEAU & MARANGONI, 1998b). A gordura do leite apresentava maior inclinação na curva de conteúdo de gordura sólida entre 15 e 20 °C antes da interesterificação, pois uma grande proporção de seus triacilgliceróis se funde e se solubiliza nesta faixa de temperatura (ROUSSEAU et al., 1996a). Contudo, conforme aumenta a proporção de ésteres de fitosteróis e de óleo de girassol das misturas, esta inclinação torna-se menos pronunciada. A interesterificação química também provocou efeito de linearização da curva de conteúdo de gordura sólida da gordura do leite devido à maior variedade de triacilgliceróis formada durante a interesterificação química (ROUSSEAU et al., 1996a). As misturas interesterificadas por via química apresentaram, de modo geral, maiores valores de conteúdo de gordura sólida do que antes da reação, porém as curvas se mostraram menos inclinadas, aumentando a plasticidade.

Figura 21. Curvas de conteúdo de gordura sólida das misturas 1, 3, 6 e 9 antes e após interesterificação química e enzimática

Com a interesterificação enzimática, porém, não foram observadas grandes modificações nas curvas de sólidos das misturas. MARANGONI & ROUSSEAU (1998a) observaram diminuição do conteúdo de gordura sólida da gordura do leite após interesterificação enzimática em temperaturas inferiores a 35 °C, o que também foi verificado neste trabalho. Ao contrário do que ocorreu com a interesterificação química, as curvas de conteúdo de gordura sólida antes e após a interesterificação enzimática não se cruzaram no diagrama, fato também observado pelos autores.

MU & PORSGAARD (2005) publicaram uma revisão sobre o metabolismo de lipídios estruturados e um dos estudos comentados investigou os efeitos da substituição de manteiga natural por manteiga interesterificada por via química ou enzimática sobre os níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticos em homens saudáveis. A interesterificação enzimática da manteiga resultou em diminuição considerável dos níveis de ácidos graxos que contribuem para o aumento do

colesterol no sangue, entre eles 12:0, 14:0 e 16:0, com aumento concomitante nos ácidos graxos 18:0 e 18:1 na posição *sn*-2. Quando a manteiga interesterificada por via química foi substituída pela manteiga original, foi observada diminuição do colesterol sérico, mas quando a substituição foi feita por manteiga interesterificada enzimaticamente, por razões desconhecidas, os níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticos não foram afetados.

4.9 Cinética de cristalização

As Tabelas 28 e 29 apresentam o conteúdo de gordura sólida da gordura do leite (mistura 1), das misturas 3, 6, 9, 12 e 15 e dos ésteres de fitosteróis, antes e após interesterificação química e enzimática, em função do tempo de resfriamento a 10 °C. A partir destes dados foram construídas as curvas de cinética de cristalização, representadas nas Figuras 22, 23 e 24. As misturas selecionadas para a cinética de cristalização contêm 25% de ésteres de fitosteróis e, portanto, o que as diferencia são os teores de gordura do leite e óleo de girassol, que são inversamente proporcionais.

Em geral, as curvas apresentaram duas fases de aumento rápido no conteúdo de gordura sólida, o que pode ser observado mais claramente com a mistura 1 (gordura do leite): uma no início, seguida de um período de lentidão, que pode ser devido à liberação de calor proveniente da cristalização de grande parte dos triacilgliceróis da gordura do leite, outra fase de aumento rápido no conteúdo de gordura sólida e por fim o equilíbrio atingido no ponto máximo de cristalização.

As misturas apresentaram o mesmo comportamento da gordura do leite, porém os conteúdos de gordura sólida atingidos no equilíbrio foram menores. O conteúdo de gordura sólida da gordura do leite chegou a 37,8% a 10 °C, enquanto o das misturas 3, 6, 9, 12 e 15 chegou a 20,3%, 18,0%, 14,3%, 10,0% e 7,5%, respectivamente. Como todas as misturas apresentavam o mesmo teor de ésteres de fitosteróis, pode-se dizer que o conteúdo de gordura sólida no equilíbrio é menor quanto maior for o teor de óleo de girassol. A adição de 25% de ésteres de fitosteróis e de quantidades que chegam a 30% de óleo de girassol não modificou o formato das curvas de cristalização da gordura do leite, apenas diminuiu seu

conteúdo de gordura sólida durante o período da análise. METIN & HARTEL (1998) afirmaram que diferenças no mecanismo de cristalização e na geometria dos cristais podem estar relacionadas com diferenças nas composições químicas das amostras.

Tabela 28 - Conteúdo de gordura sólida das misturas antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo

Tempo (min)	Conteúdo de Gordura Sólida (%)					
	Mistura 1 (100:0:0)			Mistura 3 (75,0:0:25,0)		
	Antes	Após IQ	Após IE	Antes	Após IQ	Após IE
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2	10,2 ± 1,3	13,4 ± 0,2	15,1 ± 0,1	5,6 ± 1,3	9,8 ± 0,4	11,6 ± 0,4
5	17,4 ± 0,1	14,8 ± 0,6	19,2 ± 0,6	7,2 ± 1,0	11,0 ± 0,8	11,7 ± 1,6
10	18,5 ± 0,2	15,7 ± 0,5	21,2 ± 0,8	7,4 ± 0,3	13,2 ± 0,1	12,4 ± 0,2
15	19,9 ± 0,0	19,4 ± 0,4	21,6 ± 0,4	8,1 ± 0,3	14,6 ± 0,6	11,9 ± 1,5
20	20,5 ± 0,8	22,3 ± 0,4	26,7 ± 0,1	8,0 ± 0,7	15,1 ± 0,4	12,0 ± 0,7
30	26,1 ± 0,5	25,4 ± 0,1	31,2 ± 0,5	9,9 ± 1,0	19,4 ± 0,6	13,0 ± 0,4
45	35,6 ± 0,0	29,0 ± 0,5	34,6 ± 1,1	9,7 ± 0,6	23,4 ± 1,3	14,5 ± 0,6
60	37,3 ± 0,4	30,4 ± 0,7	35,8 ± 0,9	15,1 ± 0,1	26,4 ± 0,2	15,5 ± 0,8
75	37,3 ± 0,4	31,6 ± 1,3	36,8 ± 1,1	19,2 ± 0,8	28,3 ± 0,3	17,7 ± 0,3
90	36,3 ± 1,9	31,6 ± 0,4	36,9 ± 1,2	20,0 ± 0,3	28,6 ± 0,2	18,5 ± 1,1
105	37,6 ± 0,3	31,6 ± 0,4	37,4 ± 0,0	20,9 ± 0,8	28,3 ± 0,6	19,3 ± 0,3
120	37,8 ± 1,8	32,6 ± 0,0	38,7 ± 0,8	20,3 ± 0,9	28,4 ± 1,0	20,9 ± 0,2

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

IQ = Interesterificação química; IE = Interesterificação enzimática.

Tabela 28 - Conteúdo de gordura sólida das misturas antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo

Tempo (min)	Conteúdo de Gordura Sólida (%)					
	Mistura 6 (67,5:7,5:25,0)			Mistura 9 (60,0:15,0:25,0)		
	Antes	Após IQ	Após IE	Antes	Após IQ	Após IE
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2	4,9 ± 0,6	7,7 ± 0,1	8,9 ± 1,3	2,9 ± 0,1	5,0 ± 0,2	7,4 ± 1,3
5	5,9 ± 0,4	10,4 ± 0,8	9,8 ± 1,1	4,9 ± 0,1	6,3 ± 1,4	8,4 ± 0,0
10	5,7 ± 0,1	12,3 ± 0,3	9,9 ± 1,3	4,7 ± 0,6	8,7 ± 0,4	7,7 ± 1,0
15	5,5 ± 1,3	12,8 ± 0,2	10,9 ± 0,9	5,7 ± 0,5	10,0 ± 0,2	7,7 ± 0,9
20	7,4 ± 0,3	13,7 ± 0,3	10,0 ± 1,8	5,8 ± 0,8	11,0 ± 0,6	7,8 ± 0,4
30	6,8 ± 0,1	18,8 ± 0,4	10,5 ± 0,1	5,7 ± 0,3	14,2 ± 0,9	7,8 ± 0,5
45	7,6 ± 0,6	22,6 ± 0,1	9,7 ± 0,2	6,8 ± 0,1	17,7 ± 0,4	8,4 ± 1,2
60	10,6 ± 0,4	24,1 ± 0,8	10,5 ± 0,7	9,3 ± 1,4	19,3 ± 0,9	8,7 ± 0,4
75	14,4 ± 0,8	24,6 ± 0,8	11,9 ± 0,1	11,5 ± 0,9	18,8 ± 0,8	9,4 ± 0,1
90	16,1 ± 0,4	24,2 ± 0,3	14,9 ± 0,9	12,2 ± 1,4	18,7 ± 1,1	13,3 ± 0,4
105	16,4 ± 0,2	24,9 ± 0,8	14,1 ± 0,4	12,1 ± 2,1	19,9 ± 0,4	13,2 ± 0,9
120	18,0 ± 0,1	24,4 ± 0,5	13,9 ± 0,9	14,3 ± 0,0	19,2 ± 0,4	14,6 ± 0,4

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

IQ = Interesterificação química; IE = Interesterificação enzimática.

Tabela 28 - Conteúdo de gordura sólida das misturas antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo (cont.)

Tempo (min)	Conteúdo de Gordura Sólida (%)					
	Mistura 12 (52,5:22,5:25,0)			Mistura 15 (45,0:30,0:25,0)		
	Antes	Após IQ	Após IE	Antes	Após IQ	Após IE
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2	3,4 ± 0,8	3,1 ± 1,2	4,3 ± 0,9	2,5 ± 0,0	2,1 ± 0,7	4,3 ± 0,1
5	4,0 ± 0,1	7,1 ± 0,4	7,4 ± 0,1	3,2 ± 0,5	2,8 ± 0,2	4,7 ± 0,1
10	3,9 ± 0,5	8,1 ± 0,4	6,0 ± 0,6	2,8 ± 0,4	5,4 ± 0,9	3,9 ± 0,5
15	3,2 ± 0,1	8,7 ± 0,3	5,9 ± 0,6	3,9 ± 0,4	6,0 ± 0,6	3,4 ± 0,1
20	4,9 ± 0,1	10,0 ± 0,6	5,5 ± 0,6	3,5 ± 0,8	6,5 ± 0,0	3,9 ± 0,7
30	4,9 ± 0,0	13,2 ± 0,5	5,5 ± 0,7	4,6 ± 0,1	9,0 ± 0,0	3,9 ± 0,6
45	5,7 ± 0,4	14,7 ± 1,1	6,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	11,5 ± 0,0	4,6 ± 0,4
60	7,7 ± 0,1	14,9 ± 0,4	7,6 ± 0,1	6,6 ± 1,6	11,9 ± 0,6	5,0 ± 0,1
75	9,2 ± 0,4	15,1 ± 0,9	8,9 ± 0,1	6,6 ± 1,4	12,8 ± 0,4	6,3 ± 1,1
90	9,2 ± 0,1	16,0 ± 0,8	10,1 ± 0,4	7,3 ± 0,5	12,6 ± 0,8	5,8 ± 0,6
105	9,7 ± 0,5	15,8 ± 0,2	10,3 ± 0,9	6,6 ± 1,4	12,2 ± 0,3	8,3 ± 0,1
120	10,0 ± 0,2	16,7 ± 0,1	10,8 ± 0,6	7,5 ± 1,0	12,2 ± 1,5	9,2 ± 0,8

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

IQ = Interesterificação química; IE = Interesterificação enzimática.

Tabela 29 - Conteúdo de gordura sólida dos ésteres de fitosteróis antes e após interesterificação química e enzimática em função do tempo

Tempo (min)	Conteúdo de Gordura Sólida (%)		
	Ésteres de fitosteróis		
	Antes	Após IQ	Após IE
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,5	31,0 ± 0,9	26,4 ± 0,9	32,9 ± 0,4
1	55,3 ± 0,2	58,4 ± 0,6	53,9 ± 0,6
1,5	63,8 ± 0,7	62,8 ± 0,4	62,8 ± 1,0
2	64,5 ± 0,6	63,8 ± 0,7	64,7 ± 0,4
5	64,7 ± 0,6	65,0 ± 0,4	64,7 ± 0,8
10	65,1 ± 0,2	64,9 ± 0,7	64,5 ± 0,8
15	64,9 ± 0,0	64,7 ± 0,4	64,2 ± 1,2
20	64,8 ± 0,5	65,0 ± 0,1	64,5 ± 0,5
30	64,8 ± 0,4	64,5 ± 0,1	64,5 ± 0,9
45	64,3 ± 0,8	65,1 ± 0,1	64,5 ± 0,7
60	64,3 ± 0,3	64,5 ± 0,1	64,6 ± 0,8
75	65,3 ± 0,3	64,8 ± 0,5	64,4 ± 0,9
90	64,5 ± 0,1	65,2 ± 0,1	64,4 ± 1,1
105	64,9 ± 0,4	65,5 ± 0,2	64,6 ± 1,1
120	65,1 ± 0,5	64,8 ± 0,1	64,2 ± 1,1

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

IQ = Interesterificação química; IE = Interesterificação enzimática.

Figura 22. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C

Figura 23. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C após interesterificação química

Figura 24. Cinética de cristalização das misturas a 10 °C após interesterificação enzimática

A Tabela 30 apresenta a constante de Avrami (k), o expoente de Avrami (n) e os coeficientes de determinação das misturas.

Tabela 30 - Constante de Avrami, k , expoente de Avrami, n , e coeficiente de determinação, R^2 , das misturas

Mistura	n	k (min^{-1})	R^2
1 (100:0:0)	0,58	0,20	0,8084
3 (75,0:0:25,0)	0,22	0,28	0,9214
6 (67,5:7,5:25,0)	0,24	0,26	0,6894
9 (60,0:15,0:25,0)	0,52	0,13	0,8514
12 (52,5:22,5:25,0)	0,31	0,29	0,6144
15 (45,0:30,0:25,0)	0,36	0,31	0,7736
Ésteres de fitosteróis	1,69	2,05	0,9964

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Conforme a Tabela 4, valores de n até 1 significam crescimento em forma de agulha a partir de núcleos instantâneos, comportamento característico de gorduras

cristalizadas a baixas temperaturas. Neste caso, onde as amostras foram cristalizadas a 10 °C, todas as misturas apresentaram valores de n inferiores a 1. Os valores de k , que refletem a velocidade de cristalização das misturas, não apresentaram uma seqüência de aumento ou diminuição em função da adição de outros componentes, mas apresentaram-se todos dentro de uma pequena faixa, entre 0,13 e 0,31 min^{-1} . CAMPOS et al (2002) obtiveram valores de 0,035 min^{-1} e de 2,83 min^{-1} para cristalização lenta e rápida de gordura do leite a 5 °C, respectivamente. Desse modo, os valores de k encontrados podem ser considerados intermediários. Na temperatura analisada, portanto, o comportamento de cristalização das misturas não sofreu influência dos teores de seus componentes.

Por outro lado, os ésteres de fitosteróis apresentaram n próximo de 2 e k de 2,05 min^{-1} , que indicam cristais em forma de agulha com núcleos que surgiram esporadicamente e maior velocidade de cristalização que todas as misturas.

HERRERA et al. (1998; 1999a) estudaram a cinética de cristalização isotérmica a 10 °C de óleo de girassol hidrogenado sob diferentes condições e obtiveram valores de n igual a 1, indicando também a formação de cristais na forma de agulha. Os valores de k encontrados variaram de 0,29 a 0,31 min^{-1} , valores próximos aos encontrados para a gordura do leite e suas misturas. Os autores utilizaram a equação de Avrami modificada para a determinação desses coeficientes.

Em outro estudo, HERRERA et al. (1999b) observaram a cinética de cristalização da gordura do leite a 10 °C durante 120 minutos e a curva obtida foi muito semelhante à encontrada neste trabalho, já que as condições de análise foram as mesmas. Os autores afirmaram que a esta temperatura houve alto grau de superesfriamento e a cristalização ocorreu de forma rápida. No início do processo, as curvas revelaram alta velocidade de cristalização, apresentando estabilização após aproximadamente 1 h de análise. Os valores de k encontrados pelos autores foram de 0,14 min^{-1} .

METIN & HARTEL (1998) também realizaram a cristalização isotérmica da gordura do leite, mas nesse caso, a temperatura utilizada foi de 15 °C. Foi encontrado valor 3 para o expoente de Avrami (n), que indica a formação de esferulitos, e $1,63 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ para a constante de Avrami (k). Como a temperatura de cristalização utilizada pelos autores foi maior que a utilizada neste trabalho (10 °C), valores de n maiores e de k menores são resultados coerentes. Ainda segundo

esses autores, conforme aumenta o grau de superesfriamento, os valores de n diminuem, o que pode estar relacionado com diferentes mecanismos de cristalização. O crescimento de cristais na forma de esferulitos inicia-se a partir de pequenos cristais que originalmente podem apresentar formas de agulha, disco ou esfera. Se a densidade da solução é muito alta, situação encontrada quando se trabalha a baixas temperaturas, o desenvolvimento de esferulitos pode não ser conseguido e os cristais apresentam formas menos complexas, como discos ou agulhas.

A interesterificação química não modificou o formato das curvas das misturas, porém provocou diminuição do conteúdo de gordura sólida da gordura do leite no equilíbrio de 37,8 para 32,6%. No caso das misturas, o conteúdo de gordura sólida aumentou após interesterificação química para 28,4%, 24,4%, 19,2%, 16,7% e 12,2%, para as misturas 3, 6, 9, 12 e 15, respectivamente. Esse aumento do conteúdo de gordura sólida após a interesterificação química também foi observado quando da utilização da metodologia oficial de determinação dessa propriedade na mesma temperatura, conforme resultados apresentados nas Tabelas 21 e 23, considerando que as gorduras passam por diferentes tratamentos térmicos nas duas análises.

A Tabela 31 apresenta a constante e o expoente de Avrami e seus coeficientes de determinação após interesterificação química.

Tabela 31 - Constante de Avrami, k , expoente de Avrami, n , e coeficiente de determinação, R^2 , das misturas após interesterificação química

Mistura	n	k (min^{-1})	R^2
1 (100:0:0)	0,53	0,28	0,8807
3 (75,0:0:25,0)	0,65	0,17	0,7954
6 (67,5:7,5:25,0)	0,55	0,22	0,8548
9 (60,0:15,0:25,0)	0,64	0,15	0,9122
12 (52,5:22,5:25,0)	0,70	0,14	0,9653
15 (45,0:30,0:25,0)	0,86	0,08	0,9487
Ésteres de fitosteróis	1,76	1,90	0,9712

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

Os valores de n das misturas apresentaram-se em geral mais altos que os de antes da reação, porém ainda menores que 1, o que indica que a interesterificação química não provocou mudanças nos tipos de cristal das misturas a 10 °C. Os valores de k , de maneira geral, diminuíram em função da adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis à gordura do leite após a interesterificação química, diferentemente do que ocorreu antes da reação. Quanto maior a presença de óleo de girassol e menor a presença de gordura do leite, mais lentamente se deu o processo de cristalização após interesterificação química. RODRIGUES et al. (2003a) observaram o mesmo efeito quando da adição de óleo de milho à gordura do leite.

A Tabela 32 apresenta a constante e o expoente de Avrami e seus coeficientes de determinação após interesterificação enzimática.

Tabela 32 - Constante de Avrami, k , expoente de Avrami, n , e coeficiente de determinação, R^2 , das misturas após interesterificação enzimática

Mistura	n	k (min ⁻¹)	R^2
1 (100:0:0)	0,50 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,8774
3 (75,0:0:25,0)	0,22 ± 0,04	0,63 ± 0,10	0,7859
6 (67,5:7,5:25,0)	0,58 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,6017
9 (60,0:15,0:25,0)	0,08 ± 0,04	0,74 ± 0,15	0,4476
12 (52,5:22,5:25,0)	0,20 ± 0,04	0,55 ± 0,15	0,3767
15 (45,0:30,0:25,0)	0,14 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,3020
Ésteres de fitosteróis	1,48 ± 0,02	1,93 ± 0,01	0,9949

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

As misturas interesterificadas por via enzimática também apresentaram expoentes de Avrami inferiores a 1, indicando formação de cristais do tipo agulha. A velocidade de cristalização das misturas, representada pela constante de Avrami (k) não apresentou relação com a adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis à gordura do leite e os valores obtidos estiveram na faixa de 0,21 a 0,74 min⁻¹, com exceção dos ésteres de fitosteróis. Os ésteres de fitosteróis apresentaram n próximo de 1 e k de 1,93 min⁻¹, que indicam cristais em forma de agulha e maior velocidade de cristalização que todas as misturas.

4.10 Microscopia sob luz polarizada

A Figura 25 apresenta imagens digitalizadas das amostras cristalizadas à temperatura constante de 10 °C. A adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis não provocou diferenças morfológicas na estrutura cristalina da gordura do leite a esta temperatura. Todas as amostras apresentaram estrutura cristalina granular semelhante, composta por cristais em grande quantidade e diâmetro pequeno, em torno de 10 μm (CAMPOS et al, 2002). Como a velocidade de nucleação aumenta exponencialmente com o aumento da supersaturação e a velocidade de crescimento dos cristais aumenta apenas proporcionalmente à supersaturação, o número de cristais aumenta e o tamanho dos cristais diminui quando a cristalização ocorre a baixas temperaturas. O resfriamento rápido a baixa temperatura seguido de agitação intensa leva à formação dos cristais pequenos encontrados na margarina, na faixa de 0,1 a 20 μm (TIMMS, 1995; GIOIELLI, 1996a). Os processos industriais de fabricação de manteiga e de *spreads* em geral utilizam a cristalização rápida das gorduras (RICHARDS & GIOIELLI, 1999).

A Figura 26 apresenta as imagens obtidas a 10 °C das misturas interesterificadas por via química. Nesta temperatura, a estrutura cristalina formada após o rearranjo foi semelhante à estrutura das misturas antes da reação. Da mesma maneira, os cristais apresentaram, em sua maioria, diâmetros de até 10 μm e não sofreram influência da adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis.

A Figura 27 apresenta as imagens das misturas interesterificadas enzimaticamente resfriadas a 10 °C. O rearranjo enzimático também não provocou modificações na estrutura cristalina das misturas, porém foi observado menor número de cristais, provavelmente devido ao menor conteúdo de gordura sólida presente nas misturas após interesterificação enzimática, conforme Tabelas 21 e 25.

As imagens obtidas por microscopia apresentaram relação com o expoente de Avrami (n), calculado através da cinética de cristalização. As imagens capturadas para todas as misturas, tanto antes como após interesterificação química ou enzimática, mostraram estruturas cristalinas granulares, de tamanho pequeno, como núcleos que apresentaram pouco crescimento. A rapidez com que ocorreu a cristalização não permitiu a formação de estruturas mais complexas, como

esferulitos. Os expoentes de Avrami (n) para todas as misturas apresentaram valores próximos a 1, o que indica a não formação de esferulitos (WRIGHT et al., 2000).

Figura 25. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, com aumento de 40X. A barra representa 250 μm

Figura 26. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X. A barra representa 250 μ m

Figura 27. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 10 °C, após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X. A barra representa 250 μ m

A Figura 28 apresenta as imagens digitalizadas das misturas mantidas a 25 °C. Com a adição de óleo de girassol e de ésteres de fitosteróis, as amostras passaram a apresentar cristais maiores e em menor quantidade. A velocidade de crescimento de um cristal é inversamente proporcional à viscosidade da solução. Quanto menor a viscosidade, mais fácil se torna a troca de matéria entre a fase líquida e a superfície do cristal e mais rápido será seu crescimento (TIMMS, 1995). Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos. O óleo de girassol não cristaliza em temperaturas acima de -10 °C e portanto não está diretamente envolvido com a cristalização da gordura do leite. Devido ao fato do óleo de girassol apresentar cerca de 91% de ácidos graxos com 18 átomos de carbono, ele pode ter hidrofobicidade ligeiramente maior que a gordura do leite. As diferenças no tamanho médio das cadeias de ácidos graxos da gordura do leite e do óleo de girassol possivelmente podem explicar as estruturas observadas. Durante a cristalização, os triacilgliceróis do óleo de girassol teriam dificuldade em se dispersar entre as moléculas de gordura do leite que estão em fase de cristalização. Portanto, a formação de esferulitos seria mais provável (ROUSSEAU et al., 1996b).

Em algumas imagens, como as das misturas 2, 3 e 7, nota-se mais facilmente a presença de pequenos cristais dispersos entre grandes esferulitos, o que pode ser evidência da ocorrência de sinterização, que corresponde à formação de pontes sólidas em espaços entre estruturas maiores e mais complexas de uma rede cristalina. A sinterização é uma forte forma de adesão criada pela cristalização de uma fase gordurosa com ponto de fusão entre o da fase líquida e o da fase cristalina (ROUSSEAU et al., 1996b).

Após a interesterificação química o comportamento da estrutura cristalina das amostras contendo até 20% de óleo de girassol e 25% de ésteres de fitosteróis (misturas 1 a 9) sofreu influência decorrente do rearranjo ao acaso, conforme apresentado na Figura 29. A tendência observada foi de aumento do tamanho dos cristais, atingindo valores da ordem de 240 µm, já que a interesterificação química intensifica o efeito de diluição provocado pela adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis, através da incorporação de ácidos graxos insaturados pelos triacilgliceróis da gordura do leite (ROUSSEAU et al., 1996c). Por outro lado, a interesterificação enzimática promoveu, de modo geral, diminuição no tamanho dos cristais e maior grau de cristalização (Figura 30). ROUSSEAU & MARANGONI (1998b) sugeriram que as diferenças entre a estrutura cristalina da gordura do leite

decorrentes da interesterificação enzimática podem ser devidas à diferenças na cinética de recristalização ou agregação dos cristais. O menor grau de cristalização observado nas misturas interesterificadas por via enzimática, quando comparado à interesterificação química, pode ser justificado pelos menores valores de consistência a 25 °C e ponto de amolecimento.

Figura 28. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C com aumento de 40X. A barra representa 250 μm

Figura 29. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C, após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X. A barra representa 250 μ m

Figura 30. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina das misturas a 25 °C, após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X. A barra representa 250 μ m

A Tabela 33 apresenta o diâmetro médio dos cristais das misturas antes e após a interesterificação a 25 °C.

Tabela 33 - Diâmetro médio dos cristais das misturas antes e após interesterificação química e enzimática a 25 °C

Mistura	Diâmetro médio (µm)		
	Antes	IQ	IE
1 (100:0:0)	57,4	238,8	6,3
2 (87,5:0:12,5)	52,7	138,8	---
3 (75,0:0:25,0)	78,6	84,3	6,2
4 (90,0:10,0:0)	55,0	133,3	---
5 (78,7:8,8:12,5)	49,6	74,6	---
6 (67,5:7,5:25,0)	62,4	132,1	15,0
7 (80,0:20,0:0)	19,2	76,0	---
8 (70,0:17,5:12,5)	44,1	49,1	---
9 (60,0:15,0:25,0)	89,9	106,1	21,0
10 (70,0:30,0:0)	30,7	60,4	---
11 (61,3:26,2:12,5)	90,8	98,4	---
12 (52,5:22,5:25,0)	66,2	64,4	14,9
13 (60,0:40,0:0)	108,3	103,8	---
14 (52,5:35,0:12,5)	109,9	85,6	---
15 (45,0:30,0:25,0)	71,1	65,4	4,5

Proporções das misturas: (gordura do leite: óleo de girassol: ésteres de fitosteróis)

As Figuras 31, 32 e 33 apresentam imagens dos ésteres de fitosteróis antes e após interesterificação química e enzimática, respectivamente, obtidas a diferentes temperaturas e com diferentes aumentos. Os ésteres de fitosteróis são um tipo de lipídio, porém apresentam características de cristalização muito diferentes dos óleos e gorduras comestíveis. Estes são constituídos principalmente de triacilgliceróis e pequenas quantidades de componentes menores (GUNSTONE et al., 1986). Já os ésteres de fitosteróis constituem uma mistura complexa de vários tipos de esteróis e ácidos graxos diferentes, a maioria esterificados entre si (LEESON & FLOTTER, 2002). Esta estrutura complexa dificulta a cristalização, pois moléculas assimétricas

têm maior dificuldade para o empacotamento no estado cristalino (NARINE & MARANGONI, 1999a).

Os ésteres de fitosteróis formaram uma rede cristalina sólida e densa, com cristais disformes e de tamanhos variados, diferentes dos esferulitos normalmente observados em óleos e gorduras. A interesterificação química e enzimática não alteraram substancialmente este comportamento de cristalização.

Figura 31. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF) com aumento de 40X (a barra representa 250 μm) e 200X (a barra representa 50 μm)

Figura 32. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF), após interesterificação química (IQ), com aumento de 40X (a barra representa 250 μm) e 200X (a barra representa 50 μm)

Figura 33. Imagens digitalizadas da estrutura cristalina dos ésteres de fitosteróis (EF), após interesterificação enzimática (IE), com aumento de 40X (a barra representa 250 μm) e 200X (a barra representa 50 μm)

A utilização de vídeos ou seqüências de imagens para o estudo da cinética de cristalização de lipídios consiste em uma metodologia que ainda não está totalmente estabelecida e, portanto, fazem-se necessárias algumas observações a respeito do comportamento das amostras durante os experimentos.

Todos os tratamentos térmicos empregados às lâminas contendo as amostras apresentavam uma fase inicial comum, que consistia de 30 min de isoterma a 80 °C para eliminação da memória cristalina, seguida de resfriamento rápido a 5 °C/min de 80 para 40 °C. Apenas ao final desse processo é que foram aplicados os diferentes tratamentos de resfriamento.

No período inicial da isoterma a 80 °C/min, as amostras não apresentavam nenhum sinal de cristalização, o que confirmava que elas haviam sido completamente fundidas nesta temperatura. Porém, em alguns casos, após algum tempo a 80 °C, algumas possíveis estruturas cristalinas pareciam haver sido novamente formadas. O surgimento dessas estruturas pode ser atribuído ao fato de que talvez a memória cristalina das amostras não tenha sido totalmente apagada. A memória cristalina, que representa a organização espacial das moléculas do cristal agora no estado líquido, pode interferir no processo de cristalização, levando à formação de cristais iguais ou semelhantes aos que haviam se formado antes da fusão (MARANGONI, 2005).

De acordo com MARANGONI (2005), para a maioria dos óleos e gorduras comestíveis, 30 minutos a 80 °C são suficientes para apagar a memória cristalina de gorduras. Porém, a experiência prática mostrou que a agitação vigorosa das amostras após fusão completa é um procedimento complementar que garante a total desorganização das moléculas que se apresentavam organizadas formando cristais (MARANGONI, 2005). No caso das lâminas, como estas se encontravam à temperatura ambiente no momento de sua preparação, pode ter havido um certo grau de cristalização das amostras, ainda que baixo, de modo que estas não puderam ter sua memória completamente apagada, apesar do aquecimento a 80 °C por 30 min, pela impossibilidade de sua agitação após preparação da lâmina.

Desse modo, a preparação de lâminas de gordura para microscopia deve ser feita utilizando-se todo o material necessário (lâminas, lamínulas e capilares) previamente aquecido a temperaturas o mais próximo possível de 80 °C (NARINE & MARANGONI, 1999a; ROUSSEAU et al., 1998; CAMPOS et al., 2002). Assim, é possível evitar a cristalização das amostras após agitação no frasco no momento do

contato com o material de preparação, garantindo que sua memória estará completamente apagada no início do processo de cristalização.

Outro fenômeno que pôde ser observado durante os experimentos foi a cristalização das amostras apenas após o término das rampas de temperatura, ou seja, as amostras não iniciaram seu processo de cristalização enquanto estavam sendo resfriadas. Quando a temperatura final de cristalização era de 20 °C, os primeiros cristais surgiam alguns minutos depois que as amostras haviam atingido esta temperatura. Quando a temperatura final era de 30 °C, as amostras levavam, às vezes, até 3 h para iniciar seu processo de cristalização.

LOPEZ et al. (2005) realizaram o resfriamento da gordura do leite a 3 °C/min e observaram, por difração de raios-X, que na faixa de temperatura $60 \geq T \geq 19$ °C, a gordura do leite se encontrava na forma líquida. Em outro estudo, BATTE & MARANGONI (2005) resfriaram lâminas de gordura do leite a partir de 80 até 21 °C a velocidade de 5 °C/min e também não puderam iniciar a tomada dos resultados antes de estar finalizado o processo de resfriamento, ou seja, antes da amostra atingir 21 °C.

Uma possível justificativa para o fenômeno em questão está no fato de que a gordura do leite possui uma das composições em ácidos graxos mais complexas dentre as conhecidas até o momento (HERRERA et al., 1999b). Devido à grande diversidade de ácidos graxos presentes na gordura do leite, o crescimento dos cristais é dificultado pela competição de triacilgliceróis similares, porém incompatíveis, que se incorporam em uma rede que não se empacota adequadamente ou voltam a se difundir na fase líquida. Em ambos os casos, o crescimento de cristais já existentes é retardado devido à presença de muitos triacilgliceróis diferentes (GRALL & HARTEL, 1992). Assim, a cristalização da gordura do leite é mais complicada do que a maioria das outras gorduras devido à sua complexidade molecular, à formação de cristais mistos e às diferentes modificações polimórficas (METIN & HARTEL, 1998). Além disso, a gordura do leite não é um produto refinado e contém, naturalmente, fosfolípidios e esteróis que podem influenciar sua estrutura cristalina (HUI, 1996).

Essa característica da gordura do leite pode contribuir também para a dificuldade encontrada na replicação das análises. A Figura 34 apresenta a última imagem de cada seqüência de 100 imagens em duplicata. Os resultados das

duplicatas foram apresentados em função das diferenças encontradas entre elas. Os vídeos correspondentes a cada seqüência estão disponíveis no CD anexo.

Nessas imagens, pode-se observar as diferentes formas cristalinas obtidas com as mesmas amostras submetidas às mesmas condições de tratamento térmico. Além da complexa composição em ácidos graxos e triacilgliceróis, a cristalização da gordura do leite a partir do estado líquido pode ser afetada por vários parâmetros experimentais, incluindo a velocidade de agitação, a escala de operação, a temperatura final e a velocidade de resfriamento (GRALL & HARTEL, 1992).

Em alguns vídeos, principalmente nos casos em que a temperatura final de cristalização era de 20 °C (ver vídeos “01IQ Video 40 20 0,5Cmin 1”, “01IQ Video 40 20 0,5Cmin 2”, por exemplo), pôde ser observado um fenômeno denominado recristalização. A recristalização é uma transição entre formas polimórficas diferentes com ou sem fusão da forma anterior. No caso da cristalização, que é um processo exotérmico, a liberação de calor pode ser demonstrada por estudos que utilizam a metodologia de DSC (LOPEZ et al., 2005). Estas alterações são acompanhadas de diminuição da intensidade de luz observada pela microscopia sob luz polarizada decorrente da modificação da estrutura cristalina durante a cristalização rápida das amostras. Com a manutenção da baixa temperatura, os cristais podem voltar a se formar em formas polimórficas diferentes.

A gordura do leite pode cristalizar em 4 formas distintas, dependendo das condições de resfriamento: sub- α , α , β' e β , sendo que a transição sub- $\alpha \rightarrow \alpha$ é reversível e as transições $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$ (em ordem crescente de estabilidade) são irreversíveis. De qualquer maneira, independentemente da velocidade de resfriamento, várias organizações cristalinas diferentes são encontradas simultaneamente na gordura do leite. As formas α e β' são as mais comumente encontradas e a forma β já foi encontrada em traços, principalmente em processos muito lentos de resfriamento e na presença de grande fração líquida, características que favorecem a formação de cristais mais estáveis (LOPEZ et al., 2005).

Figura 34. Estrutura cristalina das amostras observada na última imagem dos vídeos, com aumento de 40X. A barra representa 100 μm

Algumas amostras resfriadas até 20 °C apresentaram migração de cristais (ver vídeos “01 Video 40 20 5Cmin 1” e “01 Video 40 20 5Cmin 2”, por exemplo). A literatura menciona a migração de moléculas no estado líquido que se prendem a núcleos ou cristais pré-existentes, levando ao crescimento do cristal (TIMMS, 1995).

DIBILDOX-ALVARADO et al. (2004) verificaram a migração de pequenos cristais para a formação de cristais maiores e agregados de cristais (ver vídeos “Dibildox-Alvarado et al 2004” 1 e 2). As amostras eram constituídas de misturas de óleo de amendoim com estearina de óleo de palma hidrogenada e interesterificada. Com os experimentos realizados no presente trabalho, este fenômeno também pôde ser observado. LITWINENKO et al. (2004) também fizeram uso de vídeos para estudar o desenvolvimento da estrutura cristalina de gorduras (ver vídeo “Litwinenko et al 2004”).

BATTE e MARANGONI (2005) estudaram a cristalização de gordura do leite por microscopia de luz polarizada através do resfriamento das lâminas a 5 °C/min a partir de 80 até 21 °C. O processo foi registrado através da obtenção de seqüências de imagens, onde também pôde ser observada a migração de cristais (ver vídeos “Batte e Marangoni 2005” 1 e 2). Pelos vídeos, pode-se notar também a aparência semelhante dos cristais observados por esses pesquisadores e dos apresentados neste trabalho.

As principais forças que levam à formação de redes cristalinas de gorduras são as forças atrativas de Van der Waals (ROUSSEAU et al., 1996c). A migração dos cristais observada pode ser devida a essas forças. Uma segunda possível explicação para este fato é a diferença de densidade, e conseqüentemente de volume, entre lipídios no estado sólido e no estado líquido. Quando uma gordura passa do estado líquido para o sólido, ela se torna mais densa e seu volume, portanto, diminui (GERMAN & SIMONEAU, 1998). Essas mudanças de volume decorrentes das mudanças de fase poderiam causar movimentação da fração líquida existente, que acaba por arrastar pequenos cristais durante sua movimentação.

Portanto, a técnica de captura de imagens em seqüência durante a cristalização de gorduras permite acompanhar as transformações dinâmicas que estão ocorrendo no processo, o que não pode ser obtido quando se realiza o estudo por microscopia sob luz polarizada após um tempo pré-determinado de cristalização.

A Figura 35 apresenta a cinética da área cristalizada da mistura 1 (gordura do leite) resfriada até 20 °C a velocidades de 0,5 e 5 °C/min, em duplicata. De acordo com as curvas observadas no gráfico, os processos de cristalização tiveram comportamentos semelhantes, o que pode ser confirmado com a visualização dos vídeos correspondentes (ver vídeos “01 Video 40 20 0,5Cmin” 1 e 2; 01 “Video 40 20 5Cmin” 1 e 2).

Figura 35. Área cristalizada da mistura 1 resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo

A cristalização ocorreu rapidamente no início do processo, atingindo um ponto máximo, seguido por diminuição da área cristalizada e estabilização no final do processo. Esta diminuição pode ser devida à fusão de parte dos cristais, redissolução dos cristais formados no meio líquido ou transição polimórfica. Em alguns casos, pôde ser observado o fenômeno de recristalização, conforme já discutido anteriormente.

As curvas de cinética de cristalização por ressonância magnética nuclear (RODRIGUES et al., 2003a) têm comportamento semelhante ao observado por microscopia de luz polarizada. A redissolução dos cristais na fase líquida pode ser notada através de períodos de lentidão no processo de cristalização que geralmente

se apresentam logo após aumentos rápidos no conteúdo de gordura sólida. Nesses trabalhos, os períodos de lentidão no processo de cristalização foram justificados pela fusão dos cristais resultante da reação exotérmica de sua formação.

De maneira geral, a estabilização do processo de cristalização se deu no intervalo de 40 a 60 min após seu início. Os cristais formados sob essas condições apresentaram diâmetro médio de cerca de 10 μm , podendo chegar até 50 μm . A distribuição dos cristais na área visualizada se mostrou homogênea, apresentando cristais de tamanho pequeno e em grande quantidade, características típicas de processos rápidos de cristalização (TIMMS, 1995).

A velocidade de resfriamento teve pouca influência no processo de cristalização da gordura do leite. A 0,5 e 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, o grau máximo de cristalização esteve na faixa de 7 a 9% e a estabilização do processo ocorreu na faixa de 4 a 7% de área cristalizada. Esta pequena influência da velocidade de resfriamento na área cristalizada pode ser consequência do início da cristalização ter ocorrido no máximo cinco minutos depois que a temperatura final de cristalização já havia sido atingida.

As Figuras 36 e 37 apresentam as cinéticas de cristalização a partir da área cristalizada e do diâmetro dos cristais da mistura 1 (gordura do leite), respectivamente, resfriada até 30 $^{\circ}\text{C}$ a 0,5 e 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em duplicata.

A cristalização da gordura do leite resfriada até 30 $^{\circ}\text{C}$ apresentou comportamento diferente do processo observado a 20 $^{\circ}\text{C}$. Os cristais atingiram tamanhos maiores, até 224 μm em média, e estavam presentes em menor quantidade (ver vídeos “01 Video 40 30 0,5Cmin” 1 e 2; “01 Video 40 30 5Cmin” 1 e 2). Para aplicação em alimentos, cristais de gordura devem apresentar diâmetro inferior a 30 μm para evitar a sensação de areiosidade na boca (HERRERA et al., 1998), contudo no processo de fracionamento é importante obter cristais desta ordem de grandeza para permitir boa separação da fase líquida. A temperatura de cristalização influencia na formação de várias formas polimórficas, no tamanho dos cristais, na composição da fração sólida e nas propriedades físicas das frações (GRALL & HARTEL, 1992).

Figura 36. Área cristalizada da mistura 1 resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

Figura 37. Diâmetro dos cristais da mistura 1 resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

Segundo TIMMS (1995), um baixo grau de superesfriamento, observado a 30°C, tende a produzir cristais mais perfeitos e estáveis. Em graus mais altos de superesfriamento, como o observado a 20°C, as moléculas se prendem à superfície do cristal mais rapidamente, formando cristais menores e menos estáveis. Uma nova molécula pode se prender ao cristal se a molécula vizinha não estiver na posição perfeita, podendo ocorrer um deslocamento do empacotamento regular do cristal. Como resultado, torna-se difícil obter cristais perfeitos com alto grau de superesfriamento e triacilgliceróis diferentes podem cristalizar simultaneamente se forem semelhantes quanto a seu comprimento de cadeia e ponto de fusão. Formam-se então cristais mistos e soluções sólidas instáveis.

De maneira geral, observando-se as curvas de cinética de cristalização a 30 °C, a cristalização da gordura do leite apresentou um período inicial de lentidão, seguido por um aumento mais rápido da área cristalizada, e por fim nota-se uma tendência à estabilização. Com relação ao diâmetro médio dos cristais, o crescimento mostrou-se praticamente linear, até o início de tendência à estabilização, mais ao final do processo.

O processo de cristalização não atingiu a estabilidade durante o período total analisado. Após 100 e 300 min de análise, a área cristalizada chegou a cerca de 2 e 9%, respectivamente, enquanto o diâmetro dos cristais atingiu de 70 a 100 e de 150 a 220 µm, respectivamente.

Portanto, a área cristalizada das amostras resfriadas durante 100 min até 20 e até 30 °C apresentou valores diferentes, ocorrendo maior grau de cristalização em amostras resfriadas a temperaturas mais baixas.

A Figura 38 apresenta a cinética de cristalização da área cristalizada da gordura do leite interesterificada resfriada a 0,5 e 5 °C/min até 20 °C, em duplicata.

O comportamento observado é semelhante ao da mistura 1 (gordura do leite) antes da interesterificação, que corresponde aos seguintes eventos: rápida cristalização no início, diminuição do grau de cristalização, ligeira recristalização e estabilidade. A área cristalizada das amostras chegou a cerca de 17% no ponto máximo de cristalização e o processo se estabilizou após atingir aproximadamente 9%. Da mesma maneira que ocorreu antes da interesterificação química, a velocidade de resfriamento não provocou forte influência na área cristalizada, nem no comportamento de cristalização das amostras (ver vídeos “01IQ Vídeo 40 20 0,5Cmin” 1 e 2; “01IQ Vídeo 40 20 5Cmin” 1 e 2).

A interesterificação química, por sua vez, aumentou a porcentagem de área cristalizada da gordura do leite resfriada até 20 °C e acelerou o processo de cristalização, que se estabilizou antes, na faixa de 20 a 30 min após seu início. Os resultados de conteúdo de gordura sólida apresentados nas Tabelas 21 e 23 podem servir como referência para os resultados obtidos aqui. De acordo com essas tabelas, o conteúdo de gordura sólida da gordura do leite era de 19,0% antes e de 21,3% após a interesterificação química, ou seja, a 20 °C, o grau de cristalização da gordura do leite foi maior após a interesterificação química. A gordura do leite interesterificada passou a resistir melhor à temperatura após a reação, tornando a gordura do leite mais plástica, fazendo com que a fusão ocorra mais lentamente na faixa dos 20 °C (ROUSSEAU et al., 1996a).

Figura 38. Área cristalizada da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo

As Figuras 39 e 40 apresentam a cinética de cristalização da gordura do leite interesterificada a partir da área cristalizada e do diâmetro dos cristais, respectivamente. Essas amostras foram resfriadas a 0,5 e 5 °C/min até 30 °C e as curvas são apresentadas em duplicata.

Figura 39. Área cristalizada da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

Figura 40. Diâmetro dos cristais da mistura 1 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

O comportamento de cristalização da gordura do leite interesterificada resfriada até 30 °C mostrou-se semelhante ao da gordura antes da reação nas mesmas condições. Os cristais atingiram, porém, tamanhos maiores, até 485 µm em média, e em menor quantidade (ver vídeos “01IQ Vídeo 40 30 0,5Cmin” 1 e 2; “01IQ Vídeo 40 30 5Cmin” 1 e 2). Da mesma forma que ocorreu com a gordura antes da reação, a cristalização da gordura do leite interesterificada apresentou um período inicial de lentidão, seguido por um aumento mais rápido da área cristalizada, e por fim apresentando tendência à estabilização.

À velocidade de 0,5 °C/min, a área cristalizada chegou a 15% após 5 h de processo e os diâmetros chegaram a quase 400 µm, em média. Já a 5 °C/min, a área cristalizada atingiu cerca de 11% e os diâmetros dos cristais chegaram a 485 µm em média.

A Figura 41 apresenta a curva Log-Log do diâmetro dos cristais de gordura do leite antes e após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo. A inclinação das curvas, que corresponde ao coeficiente angular, foi calculada através de regressão linear simples e os respectivos coeficientes estão apresentados na Tabela 34.

Figura 41. Curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 1 antes (A) e após interesterificação química (B) a 30 °C em função do tempo

Tabela 34 - Coeficientes de regressão linear e de determinação para curva Log-Log do diâmetro dos cristais da gordura do leite antes e após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo

Amostra 01	Coeficiente angular	Coeficiente de determinação R ²
0,5 °C/min 1	0,80	0,9702
0,5 °C/min 2	0,72	0,9328
5 °C/min 1	0,67	0,9709
5 °C/min 2	0,48	0,9220
0,5 °C/min 1 (IQ)	1,73	0,6337
0,5 °C/min 2 (IQ)	3,57	0,8219
5 °C/min 1 (IQ)	4,49	0,9320
5 °C/min 2 (IQ)	3,74	0,8782

IQ = Após interesterificação química

Os valores de R² entre 0,9220 e 0,9709 para a gordura do leite antes da interesterificação mostram que o crescimento do diâmetro dos cristais é linear em função do tempo a $p < 0,01$. A inclinação da curva, na faixa de 0,48 a 0,80, apresenta valores semelhantes aos obtidos por BATTE & MARANGONI (2005), que encontraram valores na faixa de 0,67 a 0,72. No estudo citado, a gordura do leite foi resfriada a 5 °C/min até 21 °C. Após a interesterificação química, a faixa dos valores de inclinação da reta mostrou-se maior, de 1,73 a 4,49. Os coeficientes de determinação R², embora sejam estatisticamente significativos para relação linear a $p < 0,05$, foram mais baixos, de 0,6337 a 0,9320. Valores maiores de inclinação da curva após a reação refletem maior velocidade de formação dos cristais, como observado na Figura 40.

A Figura 42 apresenta a cinética de cristalização da mistura 3 (composta de 75% de gordura do leite e 25% de ésteres de fitosteróis) a partir da área cristalizada a 0,5 e 5 °C/min, em duplicata.

O resfriamento até 20 °C/min da mistura 3 resultou em dois tipos de comportamento de cristalização, dependendo da velocidade de resfriamento. Em oposição à gordura do leite, a mistura 3 sofreu influência da velocidade de resfriamento. A 0,5 °C/min, a cristalização inicia-se lentamente, devido à baixa

velocidade de resfriamento, e vai aumentando gradativamente sua velocidade, sem atingir, em 100 min, a estabilidade. Já a 5 °C/min, a cristalização é rápida nos primeiros 20-30 min, acompanhando a alta velocidade de resfriamento, e praticamente atinge a estabilidade a partir de então até o final do processo.

Figura 42. Área cristalizada da mistura 3 resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo

Nos dois casos, a área cristalizada chegou a cerca de 16%, mais do que o dobro observado para a gordura do leite resfriada nas mesmas condições. Os ésteres de fitosteróis, por não apresentarem triacilgliceróis em sua composição química, têm comportamento diferente da maioria dos óleos e gorduras comestíveis. Os ésteres de fitosteróis apresentaram alto conteúdo de gordura sólida, cerca de 56% a 20 °C, e não apresentaram consistência, apesar de aparentarem ter estrutura resistente. Esta falta de consistência, apesar do alto conteúdo de gordura sólida, pode ser explicada por sua estrutura cristalina, que apresenta alto grau de cristalização, mas é formada por uma rede fraca.

A mistura 3 resfriada até 30 °C não apresentou cristalização em nenhuma das velocidades de resfriamento aplicadas. Por esse motivo, não constam no CD os vídeos correspondentes a esses processos.

A Figura 43 apresenta a cinética de cristalização da mistura 3 interesterificada a partir da área cristalizada. O resfriamento foi realizado às velocidades de 0,5 e 5 °C/min até a temperatura final de 20 °C.

Figura 43. Área cristalizada da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 20 °C em função do tempo

Nas duas velocidades de resfriamento, puderam ser observados comportamentos semelhantes. Houve rápida cristalização no início do processo, seguida de diminuição da área cristalizada, atingindo estabilidade a partir de 30 – 40 min após o início do processo de cristalização.

As Figuras 44 e 45 apresentam a cinética de cristalização da mistura 3 interesterificada a partir da área cristalizada e do diâmetro dos cristais, respectivamente. As amostras foram resfriadas a 0,5 e 5 °C/min até 30 °C.

A mistura 3 interesterificada apresentou aumento de área cristalizada aparentemente linear com relação ao tempo de análise, chegando a pouco mais de 3%. Os diâmetros atingiram dimensões de cerca de 300 µm.

Figura 44. Área cristalizada da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

Figura 45. Diâmetro dos cristais da mistura 3 interesterificada por via química resfriada de 40 a 30 °C em função do tempo

A Figura 46 apresenta a curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 3 após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo. A inclinação das curvas foi calculada através de regressão linear simples e os respectivos coeficientes estão apresentados na Tabela 35.

Figura 46. Curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 3 interesterificada por via química a 30 °C em função do tempo

Tabela 35 - Coeficientes de regressão linear e de determinação para curva Log-Log do diâmetro dos cristais da mistura 3 após interesterificação química formados a 30 °C em função do tempo

Amostra 03 após interesterificação química	Coeficiente angular	Coeficiente de determinação R^2
0,5 °C/min 1	0,39	0,8594
0,5 °C/min 2	0,67	0,9609
5 °C/min 1	0,90	0,9286
5 °C/min 2	0,72	0,8986

A regressão linear mostrou-se estatisticamente significativa a $p < 0,01$ para todas as amostras, o que significa que os cristais crescem linearmente em função do tempo. A inclinação das curvas situou-se na faixa de 0,39 a 0,90, com R^2 de 0,8594 a 0,9609. As inclinações das curvas da amostra 3 depois da interesterificação química apresentam valores na mesma faixa da gordura do leite antes da reação, mostrando que os cristais crescem em velocidades semelhantes nos dois casos citados.

4.11 Consistência do spread

Foi preparado um *spread* utilizando como base gordurosa a mistura 6, contendo 67,5% de gordura do leite, 7,5% de óleo de girassol e 25,0% de ésteres de fitosteróis. Esta mistura foi escolhida com base no seu perfil de consistência, já que apresentava menor consistência em comparação com a gordura do leite pura (mistura 1) a baixas temperaturas, mas também apresentava plasticidade a temperaturas mais elevadas.

A Figura 47 apresenta a consistência do *spread* da mistura 6 em comparação com a mistura 1 (gordura do leite pura), manteiga tipo extra sem sal, mistura 6 e creme vegetal Becel Pro-Activ a 5 e 10 °C.

Figura 47. Consistência do *spread* preparado a partir da mistura 6, de manteiga e de creme vegetal

As emulsões apresentaram consistência de 28 a 50% menores do que as bases gordurosas com as quais foram preparadas a 5 e 10 °C, com exceção da Becel Pro Activ. Esta última apresentou consistência maior que a da sua gordura, provavelmente como resultado da ação de emulsificantes, estabilizantes de emulsão

e condições de processamento. O *spread* da mistura 6 apresentou 61 e 74% de diminuição da consistência em comparação com a manteiga a 5 e 10 °C, respectivamente. A consistência desse *spread*, porém, ainda não se encontra na faixa de 200 a 800 gf/cm² sugerida por HAIGHTON (1979) como sendo a melhor faixa de espalhabilidade de *spreads*. O creme vegetal Becel Pro Activ, por sua vez, apresentou-se nessa faixa de espalhabilidade ideal, porém devem ser levados em consideração os teores de gordura empregados nessas emulsões. A manteiga e o *spread* da mistura 6 contêm cerca de 80% de gordura, enquanto a Becel Pro Activ contém apenas 50% de gordura (RODRIGUES et al., 2004).

Para adequação da consistência do *spread* preparado com a mistura 6, sugere-se a utilização de menor teor de gordura na emulsão. Outra alternativa seria a utilização de outra proporção entre gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis. O ajuste poderia ser feito aumentando-se o teor de óleo de girassol e diminuindo o teor de gordura do leite, já que esta última é o componente que apresenta maior consistência.

Os experimentos realizados neste trabalho utilizaram como matéria-prima a gordura do leite obtida diretamente a partir da manteiga. Em um processamento industrial, porém, sugere-se a extração da gordura a partir do leite integral, fazendo uso dos métodos tradicionalmente utilizados em laticínios, como a centrifugação do leite, batimento do creme de leite até sua transformação em manteiga, fusão da manteiga e separação da gordura por decantação e filtração. Com relação à adição dos outros componentes, o mesmo procedimento poderia ser adotado, sendo possível a substituição do óleo de girassol por outros óleos vegetais, em função dos objetivos de custo e propriedades físicas e nutricionais desejadas pelo fabricante.

5. Conclusões

Com relação à modificação no perfil de ácidos graxos da gordura do leite proposta neste trabalho, foram obtidas misturas contendo teores de até quase 60% de ácidos graxos insaturados pela adição de até 40% de óleo de girassol à gordura do leite, que originalmente possuía apenas cerca de 33% destes ácidos graxos. A adição de ésteres de fitosteróis também colaborou para o aumento do teor de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, o que tornaria mais saudável uma emulsão que os contivesse, além de sua propriedade de diminuir o nível de colesterol sanguíneo.

A adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis à gordura do leite provocou diminuição de sua consistência em todas as temperaturas analisadas. A interesterificação química, por sua vez, provocou diminuição da consistência das misturas a temperaturas mais baixas e aumento dessa propriedade a temperaturas mais elevadas. Desse modo, a curva de consistência das misturas apresentou diminuição de sua inclinação, mostrando que a interesterificação química melhorou a plasticidade das misturas. Isso revela que a simples mistura não foi suficiente para promover a modificação desejada no perfil de textura das misturas e que a interesterificação química foi indispensável, aumentando as possibilidades de sua aplicação na produção de *spreads*. A interesterificação enzimática, por sua vez, provocou o mesmo efeito de aumento da plasticidade para a gordura do leite pura, porém não modificou de maneira expressiva a consistência das misturas de gordura do leite com óleo de girassol e ésteres de fitosteróis.

A adição de pequenas quantidades de óleo de girassol à gordura do leite provocou grande diminuição da consistência das misturas, enquanto que a diminuição do conteúdo de gordura sólida, ao contrário, ocorreu em proporções semelhantes às esperadas por interpolação linear. A interesterificação química também provocou linearização das curvas de conteúdo de gordura sólida das misturas, confirmando a melhora na plasticidade observada com a consistência. A interesterificação enzimática, porém, provocou apenas pequena diminuição do conteúdo de gordura sólida das misturas.

A adição de óleo de girassol e ésteres de fitosteróis à gordura do leite não provocou mudanças substanciais na estrutura de sua rede cristalina a 10 °C, tanto

antes como após a interesterificação química e enzimática. A microscopia sob luz polarizada mostrou que os diâmetros dos cristais dessas amostras estiveram na faixa de 10 μm . A 25 °C, porém, as misturas passaram a apresentar cristais maiores e em menor quantidade com a adição dos outros componentes. Foi verificada tendência de aumento dos cristais das misturas após a interesterificação química e de diminuição após a reação enzimática. Os ésteres de fitosteróis apresentaram estrutura cristalina muito diferente dos óleos e gorduras comestíveis por serem constituídos por grande variedade de esteróis e ácidos graxos, e não por triacilgliceróis. Em geral, formaram uma rede cristalina sólida e densa, com cristais disformes e de tamanhos variados.

A cinética de cristalização por RMN mostrou que os cristais não apresentaram estruturas tão complexas como esferulitos quando cristalizados a 10 °C e que a velocidade de cristalização é menor quanto maior for o teor de óleo de girassol adicionado às misturas. A edição de vídeos que permitam a observação da formação da estrutura cristalina de gorduras mostrou ser uma ferramenta de grande utilidade no estudo da cristalização de óleos e gorduras.

A emulsão da mistura 6 apresentou 61 e 74% de diminuição da consistência em comparação com a manteiga a 5 e 10 °C, respectivamente, mostrando que a adição de 7,5% de óleo de girassol e 25,0% de ésteres de fitosteróis foi capaz de provocar grande melhora na consistência deste alimento funcional, em comparação com a manteiga.

6. Referências Bibliográficas

AGROLINK. **Cotações: soja**. Disponível em:

http://www.agrolink.com.br/cotacoes/pg_analise.asp?cod=3504. Acesso em: 11 janeiro 2006.

ANDERSON, D. A primer on oils processing technology. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products**. 6.ed. New York: Wiley-Interscience, 2005. v.5, p.1-56.

ANVISA, Comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2004.

APPLEWHITE, T.H., ed. *Bailey's industrial oil and fat products*. 4.ed. New York: Wiley-Interscience, 1985. v.3,. p.1-39.

AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 4a. ed. Champaign, 1989; 1990; 1997; 1999.

BALCÃO, V.M., KEMPPINEM, A., MALCATA, F.X., KALO, P.J. Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign. v.75, n.10, p.1347-1358, 1998.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. cap.7, p.301-347.

BATTE, H.D., MARANGONI, A.G. Fractal growth of milk fat crystals is unaffected by microstructural confinement. *Cryst. Growth Des.*, Washington, v.5, n.5, p.1703-1705, 2005.

BENGMARK, S. Ecimmunonutrition: a challenge for the third millennium. *Nutrition*, New York, v.14, n.7-8, p.563-572, 1998.

BERGER, K.G., JEWELL, G.G., POLLITT, R.J.M. Oils and fats. In: VAUGHAN, J. G. **Food microscopy**. London: Academic Press, 1979. p. 445-497.

BEVINGTON, J., ANGUS, F. Functional bakery products - current directions and future opportunities. Disponível em:

http://www.bsb.org.uk/members/library/conferences/2002autumn/paper_470.htm. Acesso em: 13 janeiro 2004.

BLADES, M. Functional foods or nutraceuticals. *Nut. Food Sci.*, Bradford, v.30, n.2, p.73-75, 2000.

- BOCKISCH, M. Fats and oils handbook. Champaign: AOCS Press, 1998. p. 296; p. 446-612.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Portaria n.15, de 30 de abril de 1999a. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária institui a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_99.htm. Acesso em: 15 janeiro 2004.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Portaria n.146 de 07 de março de 1996. [O Ministério da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos]. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#>. Acesso em: 31 janeiro 2006.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Resolução n.16, de 30 de abril de 1999b. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/16_99.htm. Acesso em: 15 janeiro 2004.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Resolução n.17, de 30 de abril de 1999c. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/17_99.htm. Acesso em: 15 janeiro 2004.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Resolução n.18, de 30 de abril de 1999d. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm. Acesso em: 15 janeiro 2004.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Resolução n.19, de 30 de abril de 1999e. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/19_99.htm. Acesso em: 15 janeiro 2004.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n.270 de 22 de setembro de 2005. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o "Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal"]. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word=> Acesso em: 31 janeiro 2006.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Resolução n.360 de 23 de dezembro de 2003. [A Agência Nacional de Vigilância sanitária aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional]. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 16 fevereiro 2006.
- BRITO, M. Indústria alimentícia. Disponível em: <http://www.uai.com.br/dt/opiniaio/071602.htm>. Acesso em: 29 julho 2005.

- CAMPBELL, W., DRAKE, M.A., LARICK, D.K. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.86, n.1, p.43-51, 2003.
- CHIU, M.C. Síntese de lipídios estruturados por interesterificação de gordura de frango e triacilgliceróis de cadeia média. 177p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 2006.
- CHRISTIE, W.W. Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. 2.ed. New York : Pergamon Press, 1982. 207p.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Standard for Named Vegetable Oils. Codex-Stan 210, 2005. Disponível em:
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/336/CXS_210e.pdf.
Acesso em: 15 junho 2006.
- D'AGOSTINI, D. Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. 147 p. Monografia para exame geral de qualificação. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 2000.
- D'AGOSTINI, D., FERRAZ, R.C., GIOIELLI, L.A. Consistência de misturas binárias e ternárias de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.36, n.1, p.147-155, 2000.
- DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.4, p.623-630, 2004.
- DE GREYT, W.F.J., KELLEN, M.J. Improvement of the nutritional and physicochemical properties of milk fat. In: GUNSTONE, F.D. Structured and modified lipids. Marcel Dekker: New York, 2001. p.285-312.
- DEMAN, J.M. Consistency of fats: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.60, n.1, p.82-87, 1983.
- DEMAN, J.M. Physical properties of milk fat. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.47, p.1194-1200, 1964.
- DIAZ-GAMBOA, O.W. Obtenção de lipídios estruturados a partir de mistura de óleo de peixe e gordura de palmiste. 133p. Dissertação de Mestrado [Faculdade de Ciências Farmacêuticas]. 2002.
- DIBILDOX-ALVARADO, E., RODRIGUES, J.N., GIOIELLI, L.A., TORO-VAZQUEZ, J.F., MARANGONI, A.G. Effects of crystalline microstructure on oil migration in a semisolid fat matrix. *Cryst. Growth Des.*, Washington, v.4, n.4, p.731-736, 2004.
- DILLARD, C.J., GERMAN, B. Review - Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food and Agriculture*, W. Sussex, v.80, n.12, p.1744-1756, 2000.

- FERRARI, C.K.B., TORRES, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Paris, v.57, n.5-6, p.251-260, 2003.
- GERMAN, J.B., DILLARD, C.J. Fractionated milk fat: Composition, structure, and functional properties. *Food Technol.*, Chicago, v.52, n.2, p.33-38, 1998.
- GERMAN, J.B., SIMONEAU, C. Phase transitions of edible fats and triglycerides: Theory and applications. In: RAO, M.A., HARTEL, R.W. **Phase/State transitions foods**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.187-216.
- GIOIELLI, L.A. Margarinas e cremes vegetais: composição e tecnologia. *Óleos e Grãos*, São Caetano do Sul, v.7, n.33, p.21-27, 1996a.
- GIOIELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C.K., PROCÓPIO, J., eds. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. São Paulo: Manole, 2002. p.457-465.
- GIOIELLI, L.A. Misturas binárias e ternárias de gorduras hidrogenadas na formulação de margarinas. 253 p. Tese de Livre-Docência. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 1996b.
- GIOIELLI, L.A. Modificação industrial de óleos e gorduras. 253 p. Apostila do curso de pós-graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 2000.
- GIOIELLI, L.A., PITOMBO, R.N.M., VITOLO, M., BARUFFALDI, R., OLIVEIRA, M.N., AUGUSTO, M.S. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.71, n.6, p.579-582, 1994.
- GIOIELLI, L.A., SIMÕES, I.S., RODRIGUES, J.N. Crystal morphology and interactions of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats. *J. Food Eng.*, Oxford, v.57, n.4, p.347-355, 2003.
- GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. *Oleagineux Corps Gras Lipides*, Montrouge, v.6, n.5, p.365-372, 1999.
- GRALL, D.S., HARTEL, R.W. Kinetics of butterfat crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.69, n.8, p.741-747, 1992.
- GUNSTONE, F.D. Fatty acids and lipids structure. In: GUNSTONE, F.D., PADLEY, F.B. **Lipid technologies and applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. cap.1, p.1-17.
- GUNSTONE, F.D., HARWOOD, J.L., PADLEY, F.B. *The lipid handbook*. Londres: Chapman and Hall, 1986. 896p.

- GUNSTONE, F.D. Why are structured lipids and new lipid sources required? In: _____. **Structured and modified lipids**. New York: Marcel Dekker, 2001. cap.1, p.1-9.
- GURR, M.I., JAMES, A.T. Lipid biochemistry: an introduction. London: Chapman and Hall, 1971. 231p.
- HAIGHTON, A. J. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.36, n.8, p.345-348, 1959.
- HAN, S.N., LEKA, L.S., LICHTENSTEIN, A.H., AUSMAN, L.M., SCHAEFER, E.J., MEYDANI, S.N. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J. Lipid. Res.* Bethesda, v.43, n.3, p.445-452, 2002.
- HARE, L.B. Mixture designs applied to food formulation. *Food Technology*, Chicago, v.28, n.3, p.50-56, 62, 1974.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.*, London, v.22, p.475-476, 494, 1973.
- HERRERA, M.L., FALABELLA, C., MELGAREJO, M., AÑÓN, M.C. Isothermal crystallization of hydrogenated sunflower oil. 1.Nucleation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.10, p.1273-1280, 1998.
- HERRERA, M.L., FALABELLA, C., MELGAREJO, M., AÑÓN, M.C. Isothermal crystallization of hydrogenated sunflower oil. 2. Growth and solid fat content. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.11, p.1617-1624, 1999a.
- HERRERA, M.L., GATTI, M.L., HARTEL, R.W. A kinetic analysis of crystallization of a milkfat model system. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.32, n.4, p.289-298, 1999b.
- HORNSTRA, G. Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Fett/Lipid*, Berlin, v.101, n.12, p.456-466, 1999.
- HUI, Y.H. *Bailey's industrial oil and fat products*. 5. ed., New York: Wiley-Interscience, 1996. v.2: p.603-654; v.3: p.1-63, p.65-114.
- JENSEN, R.G., FERRIS, A.M., LAMMI-KEEFE, C.J. Milk fat composition, function, and potential for change - The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.74, p.3228-3243, 1991.
- KATAN, M.B. *Trans* fatty acids and plasma lipoproteins. *Nut. Reviews*, Lawrence, v.58, n.6, p.188-191, 2000.
- KATES, M. Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids. New York : Plenum Press, 1990. 520p.

- KAWANARI, M. Butter's characteristics: effect of processing. *INFORM*, Champaign, v.7, n.10, p.1104-1110, 1996.
- KIM, I.H., KO, S.N., LEE, S.M., CHUNG, S.H., KIM, H., LEE, K.T., HA, T.Y. Production of structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis in supercritical carbon dioxide: effect on acyl migration. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.81, n.6, p. 537-541, 2004.
- KOLETZCO, B., DECSI, T. Metabolic aspects of *trans* fatty acids. *Clin. Nutr.* Edinburgh, v.16, n.5, p.229-237, 1997.
- KOVAC, A., SCHEIB, H., PLEISS, J., SCHMID, R.D., PALTAUF, F. Molecular basis of lipase stereoselectivity. *Eur. J. Lipid Sci. Techn.*, Berlim, v.102, n.1, p.61-67, 2000.
- KÜHLEN, N., PFEUFFER, M., SOUSTRE, Y., MACGIBBON, A., LINDMARK-MANSSON, H., SCHREZENMEIR, J. Trans fatty acids: scientific progress and labeling. *Bul. Int. Dairy Fed.*, Bruxelas, v.393, p.1-13, 2005.
- KWAK, N.S., JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, Oxford, v.12, n.2, p.99-107, 2001.
- LACKEY, J. Agricultural biotechnology: Rapeseed. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/ppq/biotech/rapeseed.html>. Acesso em: 05 maio 2003.
- LARSSON, K.A. Lipids: molecular organization, physical functions and technical applications. Dundee: The Oily Press, 1994. 237p.
- LEE, K.T., AKOH, C.C. Structured lipids: synthesis and applications. *Food Rev. Int.*, New York, v.14, n.1, p.17-34, 1998.
- LEESON, P., FLOTER, E. Solidification behaviour of binary sitosteryl esters mixtures. *Food Res. Int.* Amsterdam, v.35, n.10, p.983-991, 2002.
- LICHTENSTEIN, A.H., AUSMAN, L.M., JALBERT, S.M., SCHAFER, E.J. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *New England J. Med.*, Waltham, v.340, n.25, p.1933-1940, 1999.
- LICHTENSTEIN, A.H., ERKKILA, A.T., LAMARCHE, B., SCHWAB, U.S., JALBERT, S.M., AUSMAN, L.M. Influence of hydrogenated fat and butter CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis*, Clare, v.171, n.1, p.97-107, 2003.
- LICHTENSTEIN, A.H., JAUHIANEN, M., MCGLADDERY, S., AUSMAN, L.M., JALBERT, S.M., VILELLA-BACH, M., EHNHOLM, C., FROHLICH, J., SCHAEFER, E.J. Impact of hydrogenated fat on high density lipoprotein subfractions and metabolism. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.42, n.4, p.597-604, 2001.

- LICHTENSTEIN, A.H. *Trans* fatty acids and blood lipid levels, Lp(a), parameters of cholesterol metabolism, and hemostatic factors. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.9, n.5, p.244-248, 1998.
- LITWINENKO, J.W. SINGH, A.P., MARANGONI, A.G. Effects of glycerol and Tween 60 on the crystallization behavior, mechanical properties, and microstructure of a plastic fat. *Cryst. Growth Des.*, Washington, v.4, n.1, p.161-168, 2004.
- LOPEZ, C., LESIEUR, P., BOURGAUX, C., OLLIVON, M. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.88, n.2, p.511-526, 2005.
- MACLAREN, D.S. A trawl through the current nutritional literature. *Nutrition*, New York, v.16, p.396-398, 2000.
- MARANGONI, A.G. Fat crystal networks. New York: Marcel Dekker, 2005. 854p.
- MARANGONI, A.G. On the use and misuse of the Avrami equation in characterization of the kinetics of fat crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.10, p.1465-1467, 1998.
- MARANGONI, A.G., ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends Food Sci. Technol.*, Oxford, v.6, n.10, p.329-335, 1995.
- MARANGONI, A.G., ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Res. Int.* Amsterdam, v.31, n.8, p.595-599, 1998a.
- MARANGONI, A.G., ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 1 Melting and crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.10, p.1265-1271, 1998b.
- MARANGONI, A.G., ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 3. Rheology and fractality of the crystal network. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.11, p.1633-1636, 1998c.
- MARK-HERBERT, C. Innovation of a new product category - functional foods. *Technovation*, Oxford, v.24, n.9, p.713-719, 2004.
- MAZZANTI, G., GUTHRIE, S.E., SIROTA, E.B., MARANGONI, A.G., IDZIAK, S.H.J. Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat. *Cryst. Growth Des.*, Washington, v.4, n.6, p.1303-1309, 2004.
- MEAD, J.F., ALFIN-SLATER, R.B., HOWTON, D.R., POPJÁK, G. Lipids: Chemistry, biochemistry, and nutrition. New York; Plenum Press, 1986. p.49-68.

- MELNIKOV, S.M., TEN HOORN, JWMS, BERTRAND, B. Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytosterols via a cocrystallization mechanism? *Chem. Phys. Lipids*, Clare, v.127, n.1, p.15-33, 2004.
- MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.*, Oxford, v.56, n.2-3, p.181-188, 2003.
- METIN, S., HARTEL, R.W. Thermal analysis of isothermal crystallization kinetics in blends of cocoa butter with milk fat or milk fat fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.11, p.1617-1624, 1998.
- MISTRY, J., KENNEDY, J.F. Book review: chemical and functional properties of food lipids. *Carbohydrate Polymers*, Oxford, v.54, n.4, p.533, 2003.
- MOLKENTIN, J., PRECHT, D. Validation of a gas-chromatographic method for the determination of milk fat contents in mixed fats by butyric acid analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Berlin, v.102, n.3, p.194-201, 2000.
- MU, H., PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.*, Oxford, v.44, n.6, p.430-448, 2005.
- MU, H., XU, X., HOY, C.E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.9, p.1187-1193, 1998.
- MÜLLER, H., KIRKHUS, B., PEDERSEN, J.I. Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on *trans* and saturated fatty acids. An analysis from designed controlled studies. *Lipids*, Champaign, v.36, n.8, p.783-791, 2001.
- NAEEMI, E.D., AHMAD, N., AL-SHARRAH, T.K., BEHBAHANI, M. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. *J. AOAC Int.*, v.78, n.6, p.1522-1525, 1995.
- NARINE, S.S., MARANGONI, A.G. Factors affecting the texture of plastic fats. *INFORM*, Champaign, v.10, n.6, p.565-570, 1999a.
- NARINE, S.S., MARANGONI, A.G. Fractal nature of fat crystal networks. *Physical Review E*, Lancaster, v.59, n.2-B, p.1908-1920, 1999b.
- NARINE, S. S., MARANGONI, A. G. Microscopic and rheological studies of fat crystal networks. *Journal of Crystal Growth*, Amsterdam, v. 198/199, n. 2, p. 1315-1319, 1999c.
- NARINE, S. S., MARANGONI, A. G. Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. *Food Research International*, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 227-248, 1999d.
- NESTEL, P., CEHUN, M., POMEROY, S., ABBEY, M., WELDON, G. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine,

- butter and low-fat foods. *Eur. J. Clin. Nutrition*, Basingstoke, v.55, n.12, p.1084-1090, 2001.
- NG, W.L., OH, C.H. A kinetic study on isothermal crystallization of palm oil by solid fat content measurements. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.71, n.10, p.1135-1139, 1994.
- NTANIOS, F. Plant sterol-ester-enriched spreads as an example of a new functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, Berlin, v.103, n.2, p.102-106, 2001.
- O'BRIEN, R.D. Fats and oils: formulating and processing for applications. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998. p.14-15.
- O'KEEFE, S.F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.C., MIN, D.B. eds. **Food lipids**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. cap.1, p.1-40.
- OLIVEIRA, M.A.L., SOTERO SOLIS, V.E., GIOIELLI, L.A., POLAKIEWICZ, B., TAVARES, M.F.M. Method development for the analysis of *trans*-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, Berlin, v.24, n.10, p.1641-1647, 2003.
- PIIRONEN, V., LINDSAY, D.G., MIETTINEN, T.A., TOIVO, J., LAMPI, A.M. Review - Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food and Agriculture*, W. Sussex, v.80, n.7, p.939-966, 2000.
- PREGNOLATTO, W. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.
- RICHARDS, N.S.P.S., GIOIELLI, L.A. Características de identidade de manteigas comerciais e misturas manteiga-margarina disponíveis no mercado brasileiro. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.204-210, 1999.
- ROCHE, H. Unsaturated fatty acids. *Proc. Nut. Soc.*, Wallingford, v.58, n.2, p.397-401, 1999.
- RODRIGUES, J.N., ANTON, C., GIOIELLI, L.A. Cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de milho. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.39, n.1, p.93-103, 2003a.
- RODRIGUES, J.N., GIOIELLI, L.A., ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.23, n.2, p.226-233, 2003b.
- RODRIGUES, J.N., GIOIELLI, L.A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.36, n.2, p.149-159, 2003.
- RODRIGUES, J.N., MANCINI-FILHO, J., TORRES, R.P., GIOIELLI, L.A. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitosteróis. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.40, n.4, p.505-520, 2004.

- RODRIGUES, J.N. Reestruturação da gordura do leite por mistura e interesterificação com óleo de milho. 119p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 2002.
- ROSSELL, J.B. Interactions of triglycerides and of fats containing them. *Chem. Ind.*, London, n.9, p.832-835, 1973.
- ROUSSEAU, D., FORESTIERE, K., HILL, A.R., MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.73, n.8, p.963-972, 1996a.
- ROUSSEAU, D., HILL, A. R., MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 2. Microstructure and polymorphism. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.73, n.8, p.973-981, 1996b.
- ROUSSEAU, D., HILL, A. R., MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 3. Rheology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.73, n.8, p.983-989, 1996c.
- ROUSSEAU, D., MARANGONI, A.G., JEFFREY, K.R. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 2. Morphology and polymorphism. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, n.12, p.1833-1839, 1998.
- ROUSSEAU, D., MARANGONI, A.G. Tailoring the textural attributes of butter fa/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 1. Compositional modifications. *J. Agr. Food Chem.*, Washington, v.46, n.6, p.2368-2374, 1998a.
- ROUSSEAU, D., MARANGONI, A.G. Tailoring the textural attributes of butter fa/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 2. Modifications of physical properties. *J. Agr. Food Chem.*, Washington, v.46, n.6, p.2375-2381, 1998b.
- ROUSSEAU, D., MARANGONI, A.G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.31, n.5, p.381-388, 1999.
- ROZENAAL, A. Interesterification of oils and fats. *INFORM*, Champaign, v.3, n.11, p.1232-1237, 1992.
- SAHER, M., ARVOLA, A., LINDEMAN, M., LAHTENMAKI, L. Impressions of functional food consumers. *Appetite*, London, v.42, n.1, p.79-89, 2004.
- SATO, K. Crystallization behaviour of fats and lipids - a review. *Chem. Eng. Sci.*, Oxford, v.56, n.7, p.2255-2265, 2001.

- SCRIMGEOUR, C. Chemistry of fatty acids. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products**. 6.ed. New York: Wiley-Interscience, 2005. v.1, p.1-43.
- SEMMA, M. *Trans* fatty acids: properties, benefits and risks. *J. Health Sci.*, Tokyo, v.48, n.1, p.7-13, 2002.
- SIMÕES, I.S., GIOIELLI, L.A. Crystal morphology of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats and soybean oil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, v.43, p.241-248, 2000.
- SIMÕES, I. S., GIOIELLI, L. A. Microscopia da cristalização parcial de misturas de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.35, p.259-266, 1999.
- SINGHAL, R.S., KULKARNY, P.R. Effect of puffing on oil characteristics of amaranth (Rajgeera) seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.67, n.12, p.952-954, 1990.
- SONNTAG, N.O.V. Reactions of fats and fatty acids. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4.ed. New York: Wiley-Interscience, 1979. v.1, p.115.
- SOTERO-SOLIS, V. E., GIOIELLI, L. A. Estrutura cristalina de las grasas hidrogenadas del aceite de castaña de Brasil (*Bertholletia excelsa*). *Alimentaria*, Madrid, v.38, n.322, p.131-137, 2001.
- STAUFFER, C.E. Fats and oils. St. Paul: Eagan Press. 1996. p.131.
- THURNHAM, D.I. Functional foods: cholesterol-lowering benefits of plant sterols. *Brit. J. Nut.*, Wallingford, v.82, n.4, p.255-256, 1999.
- TIMMS, R.E. Crystallisation of fats. In: HAMILTON, R.J. **Developments in oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995. p.204-223.
- TIMMS, R.E. Phase behaviour of fats and their mixtures. *Prog. Lipid Res.*, Oxford, v.23, n.1, p.1-38, 1984.
- TUNCER, B. Book review: the functional foods revolution: healthy people, healthy profits?, *J. Cleaner Production*, Oxford, v.12, n.5, p.527-529, 2004.
- TORO-VAZQUEZ, J.F., BRICEÑO-MONTELONGO, M., DIBILDOX-ALVARADO, E., CHORÓ-ALONSO, M., REYES-HERNÁNDEZ, J. Crystallization kinetics of palm stearin in blends with sesame seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.77, n.3, p.297-310, 2000.
- TURATTI, J.M. Efeito dos ácidos graxos ω -3 e fitosteróis. *Food Ingredients*, São Paulo, v.3, n.15, p.54-58, 2001.

- VERLEYEN, T., FORCADES, M., VERHE, R., DEWETTINCK, K., HUYGHEBAERT, A., GREYT, W. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.79, n.2, p.117-122, 2002.
- VU, P.L., SHIN, J.A., LIM, C.H., LEE, K.T. Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.37, n.2, p.175-180, 2004.
- WEBER, N., WEITKAMP, P., MUKHERJEE, K.D. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.35, n.2-3, p.177-181, 2002.
- WILLIS, W.M., LENCKI, R.W., MARANGONI, A.G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Critical Rev. Food Sci. Nutrition*, Boca Raton, v.38, n.8, p.639-674, 1998.
- WILLIS, W.M., MARANGONI, A.G. Assessment of lipase and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.76, n.4, p.443-450, 1999.
- WINNETT, R. "Alimentos estéticos", nova moda para 2003. Publicado em 23 julho 2002. Disponível em: <http://www.estado.estadao.com.br/jornal/02/07/23/news180.html>. Acesso em: 08 janeiro 2003.
- WONG, W.C., BASRI, M., RAZAK, C.N.A., SALLEH, A.B. Synthesis of medium-chain glycerides using lipase from *Candida rugosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.77, n.1, p.85-88, 2000.
- WRIGHT, A.J., HARTEL, R.W., NARINE, S.S., MARANGONI, A.G. The effect of minor components on milk fat crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.77, n.5, p.463-475, 2000.
- XU, X., BALCHEN, S., HOY, C.E., ADLER-NISSEN, J. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.75, n.2, p.301-308, 1998.
- ZOCK, P.L., KATAN, M.B. Butter, margarine and serum lipoproteins. *Atherosclerosis*, Clare, v.131, n.1, p.7-16, 1997.

Anexo

Exemplo de cromatograma: gordura do leite