UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

ARIELA VELOSO DE PAULA

**Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática
empregando lipase imobilizada: otimização das condições
reacionais e operacionais**

Lorena-SP
2011

ARIELA VELOSO DE PAULA

Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática
empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e
operacionais

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia
Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César dos Santos.

Versão Original

Lorena-SP

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Paula, Ariela Veloso de

Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. / Ariela Veloso de Paula. – 2011.

212 p: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.

Orientador: Júlio César dos Santos.

1. Lipase de *Rhizopus oryzae* 2. Óleos e gorduras 3. Reatores bioquímicos. I. Título.

577.15 CDU

Dedicatória

*A Deus, "Porque Dele e por Ele, e para Ele,
são todas as coisas..." (Romanos 11 : 36).*

*Ao meu querido e mais amado irmão Renan (in memoriam),
que partiu deixando saudade imensurável...*

*À minha mãe Laura,
por sua força e ajuda constante,
mesmo no momento mais difícil de nossas vidas...*

*Aos meus queridos avós: Sr. De Paula (in memoriam) e Dona Aracy,
por serem os grandes responsáveis pela realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por Seu amor e presença marcante em cada etapa deste trabalho. Sou grata por mais esta conquista e por todas as oportunidades e bênçãos concedidas durante a execução deste trabalho. Por ter visto Tua bondosa mão em cada etapa. Sem Ti, nada teria feito. Sem Ti, nada seria.

Ao Dr. Júlio César dos Santos, meu orientador e amigo. Obrigada por sua brilhante contribuição em minha vida profissional como orientador. Não tenho palavras para agradecer sua atenção e dedicação neste tempo todo. Sou grata por sua boa vontade independentemente da hora, louvo a Deus por seu exemplo de fé, e agradeço por nossa amizade.

À Prof^a. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro, pela valiosa co-orientação, por cada um de seus ensinamentos, por seu exemplo e apoio constante. Obrigada por ter sido a grande responsável por meu ingresso nessa carreira, pela amizade, paciência, disponibilidade, incentivo e confiança. Obrigada também por seu exemplo de garra, força e coragem.

À Prof^a. Dr^a Suzana Ferreira-Dias, pela preciosa orientação no período em que permaneci em Lisboa, no Instituto Superior de Agronomia. Obrigada por cada conversa, por seu apoio, carinho e cuidado constante. Louvo a Deus pelo tempo em que trabalhei com você, porque você contribuiu com minha vida profissional e pessoal.

À Prof^a. Natália Osório, pela valiosa ajuda e colaboração no desenvolvimento dos experimentos realizados no Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. Obrigada por seu apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Pedro Carlos de Oliveira pelo incentivo, convivência diária e amizade.

À minha mamãe, Laura, por estar sempre ao meu lado me apoiando. Sua presença me encoraja a superar os obstáculos. Louvo a Deus por sua vida, e pelo privilégio de ser sua filha. Obrigada por seu exemplo de garra, coragem e fé.

À minha querida vovó Aracy, que bem sabe o valor da conquista deste título. Obrigada porque a senhora é a grande responsável por essa conquista. Agradeço todos os dias por seu amor, carinho, cuidado e presença marcante em minha vida. Obrigada por tudo e principalmente pelo privilégio de ser sua neta.

Ao meu amado pai, Antonio Veloso, por seu, incentivo e amor dedicado durante todo esse período. Obrigada porque você acreditou que eu seria capaz, me apoiou e esteve ao meu lado, conversando quando necessário e me dando forças para prosseguir, mesmo no momento mais duro de nossas vidas.

Aos meus queridos tios Gerson e Rose, por me servirem de exemplo e estarem sempre presentes me encorajando. Obrigada porque tenho a certeza de que sem o carinho e as constantes orações de vocês não teria conseguido. Obrigada porque sei que posso contar com vocês em qualquer situação.

Aos meus queridos tios Ricardo e Arlene, pelo apoio e presença marcante. Obrigada pelo carinho e incentivo permanente durante a execução deste trabalho e em todas as outras etapas de minha vida.

Aos meus queridos e amados irmãos Matheus e Lucas, e á minha princesa Thamires, pelo incentivo, carinho e inspiração. Vocês estarão sempre em meu coração e o que nos une é maior do que tudo.

À Minha amada Tia Tereza, por seu apoio e presença marcante em cada etapa deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer o quanto sou grata a Deus por sua vida em nossas vidas.

À minha família, pela presença constante em todos os momentos de minha vida, pelo apoio moral e afetivo e por toda valorização que deram à minha formação e educação.

À minha querida amiga irmã Gisele. Obrigada por sua amizade sincera e ajuda incansável. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, por nossos almoços, conversas e acima de tudo por ser minha irmã querida. Este trabalho também é seu.

À minha querida irmã Marinei, por sua presença marcante em minha vida, seu exemplo de fé e amizade. Obrigada por nossos momentos de oração e por sua disposição sempre que precisei. Louvo a Deus por sua vida e pelo privilégio de tê-la como amiga mais chegada que uma irmã.

À minha querida amiga e irmã Grazi, sou grata a Deus pelo tempo que passamos juntas, por suas orações e ajuda constante, e por ser essa amiga querida. Obrigada porque ter você ao meu lado me dá muita segurança.

À minha querida Gislaine Ruzene, obrigada por sua sensibilidade em relação à ordem do Senhor e obrigada porque você atendeu Seu pedido....você é uma das grandes responsáveis por esta conquista. Louvo a Deus, de todo meu coração e com todas as minhas forças por você minha querida e por ter acreditado em mim.

À minha querida irmã Tina, obrigada porque neste tempo você foi essencial para em nossas vidas, obrigada pelo cuidado com minha jóia rara e por suas orações. Que Deus a recompense por isso.

Aos meus queridos irmãos Alexandre e Feliz, por me sustentarem em oração durante toda execução deste trabalho. Louvo a Deus por suas vidas e pela disposição sempre que precisei. Que Deus os recompense por tudo.

Aos amigos Bia, Juan, Denise, Maria Elisa e Wilma, que estiveram sempre presentes, me apoiando amorosa e pacientemente.

Aos meus queridos irmãos e amigos Marquinho e Priscila, obrigada por nossas conversas, orações, palavras de ânimo e incentivo. Obrigada porque nos momentos mais difíceis de minha vida, vocês me sustentaram em oração.

Aos colegas presentes e aos que já participaram do nosso grupo de trabalho: Ana Karine, Karen, Natália, Patrícia, Weriton, Larissa, Matheus, Márcio, William, Murilo, Daniel, e todos os demais que não estão mais no grupo, mas que fizeram também parte deste trabalho, pela ajuda e convivência diária.

À minha querida Marilinha, que durante a execução do trabalho no Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa esteve sempre presente. Obrigada por seu carinho, amizade e cuidado constante. Obrigada por nossas conversas e por ser tão especial, marcando minha vida.

Aos amigos do Instituto Superior de Agronomia, Carla, Claudia, Dr. Victor, Ana Rodrigues, Dona Graziella, Dona Julia e Rosarinho, pela convivência agradável e inesquecível durante a estadia em Portugal. Sou grata pelo carinho, apoio e amizade que ficarão para sempre em meu coração.

Às amigas Giulia Cesari e Anna Bessenyei, pela ótima convivência em nossa casa em Lisboa, vocês estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo carinho e amizade. Vocês são muito especiais.

A todos os funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que com paciência e dedicação, tornaram possível a existência da instituição e a concretização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pela atenção e disposição na leitura e avaliação desta tese.

À FAPESP, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro concedido.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

*“Não entre em pânico. Estou com você.
Você não precisa ter medo, porque sou seu Deus.
Vou dar forças a você. Eu o ajudarei.” Isaías 41:10*

Bíblia Sagrada

*“Quando sua perspectiva está em Deus,
seu foco está Naquele que vence qualquer tempestade que a vida pode trazer”*

Max Lucado

RESUMO

PAULA, A. V. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais.** 2011. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

As indústrias de alimentos têm procurado desenvolver novas tecnologias visando à obtenção de produtos mais saudáveis que possuam características sensoriais apreciadas pelo consumidor. Entre os produtos alimentícios, os óleos e gorduras podem ser destacados em função de sua importância nas características sensoriais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições reacionais e operacionais para reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática com óleo de soja, empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em matriz híbrida orgânico-inorgânica sílica-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA). Nas primeiras etapas do trabalho, o sistema imobilizado foi empregado na condução das reações em modo batelada em reator de tanque agitado, por 48 h. As condições reacionais que favoreceram a maximização do grau de interesterificação (GI), minimização do teor de ácidos graxos livres e obtenção de produto interesterificado com consistência na faixa ideal (200 a 800 g/cm^2) foram: 65% de gordura de leite na mistura reacional, 500 unidades de atividade por grama de meio, 10% de umidade no derivado imobilizado e temperatura de reação de 45 °C. Nessas condições, obteve-se um produto interesterificado com consistência de 385 gf/cm^2 . Em seguida, foram realizados testes de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de tanque agitado operando em batelada com a adaptação de cesta (central ou lateral) no seu interior, para isolar o sistema imobilizado do contato com as partes mecânicas do agitador. A cesta na configuração central foi selecionada, uma vez que em 4h de reação permitiu a obtenção de um produto interesterificado com adequado valor de consistência (387 gf/cm^2), mais elevado grau de interesterificação (8,01%) e mais baixo teor de ácidos graxos livres (4,61 %), além da maior facilidade no manuseio, se comparado à cesta lateral. Nos testes em reatores operando em modo contínuo, empregou-se a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA, por adsorção física. Foram efetuadas quatro reações em leito fixo, e avaliadas duas fontes comerciais distintas de gordura. A partir da interesterificação da gordura de leite oriunda de uma das marcas comerciais avaliadas, obteve-se um produto com consistência adequada (712,08 gf/cm^2), em apenas 12 minutos. Finalmente, foram realizadas duas reações em leito fluidizado empregando-se a lipase comercial Novozym® 435 e a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA. Os resultados revelaram que a lipase de *Rhizopus oryzae* representa um biocatalisador com potencial para modificação da gordura de leite, uma vez que apresentou maior redução percentual (52,31 %) da consistência dos produtos em relação à mistura reacional, comparativamente aos resultados observados empregando-se Novozym® 435 (33,97 %) como biocatalisador. Os resultados obtidos foram satisfatórios e permitiram a determinação de condições de processo em diferentes tipos de biorreatores, contribuindo com o desenvolvimento de tecnologias nacionais de processos enzimáticos em escala industrial para a fabricação de produtos de interesse econômico e social.

Palavras-chave: Lipase de *Rhizopus oryzae*. Óleos e gorduras. Reatores Bioquímicos.

ABSTRACT

PAULA, A. V. **Restructuration of milk fat by enzymatic interesterification using immobilized lipase: optimization of reaction and operational conditions.** 2011. 212 p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

The food industries have been interested to develop new technologies to obtain healthier products with sensory characteristics appreciated by the consumer. Among food products, oil and fat could be highlighted due to their importance in sensory characteristics. In this matter, the purpose of this study has been to optimize the reaction and operational conditions to restructure fat of milk by enzymatic interesterification with soybean oil, using immobilized lipase of *Rhizopus oryzae* in organic-inorganic polysiloxane-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) hybrid matrix. Firstly, the immobilized system has been used in the reactions on batch mode in stirred tank reactor for 48 hours. The reaction conditions that allowed the maximization of the interesterification degree, the minimization of the free fatty acids content and to have an interesterified product with the consistency in the target range (200 to 800 g/cm²) were: 65% milk fat in the reaction mixture, 500 units of activity per gram of medium, 10% humidity in the immobilized derivative and reaction temperature of 45 °C. Under these conditions, an interesterified product with 385 gf/cm² consistency was obtained. Following, tests of interesterification of milk fat with soybean oil were carried out in stirred tank reactor in batch mode and with a basket (central or lateral) inside the vessel aiming to isolate the immobilized system of the contact with mechanical parts of the mixer. The basket in the central configuration has been selected because, in 4 hours of reaction, it allowed to obtain an interesterified product with an adequate value of consistency (387.00 gf/cm²), the highest interesterification degree (8.01%) and the lowest free fatty acids content (4.61%), besides an easy handling compared to the lateral basket configuration. In tests on reactors operating in continuous mode, *Rhizopus oryzae* lipase immobilized by physical adsorption in SiO₂-PVA was used. Four reactions have been performed in packed bed reactor, and two different commercial sources of fat have been evaluated. In the interesterification of milk fat of one of the commercial marks evaluated, a product with adequate consistency (712.08 gf/cm²) was obtained in just 12 minutes. Finally, two reactions in fluidized bed have been performed using the commercial lipase Novozym® 435 and *Rhizopus oryzae* lipase immobilized in SiO₂-PVA. The results showed the *Rhizopus oryzae* lipase is a biocatalyst with potential for modification of milk fat, considering its use resulted in a higher percentual reduction (52.31 %) of the products consistency in relation to the reaction mixture, comparatively to the observed when Novozym® 435 (33.97 %) was used as biocatalyst. The obtained results were satisfactory and allowed the determination of process conditions in different kinds of bioreactors, besides to contribute to the development of national technologies of enzymatic processes in industrial scale for the manufacturing of products of economic and social interest.

Keywords: *Rhizopus oryzae* lipase. Oils and fats. Biochemical Reactors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Relação de alguns ácidos graxos de acordo com a saturação, número de carbonos na cadeia e principais fontes alimentares.....	37
Tabela 2.2. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) da gordura de leite	43
Tabela 2.3. Exemplos de estudos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais, empregando diferentes condições reacionais.	51
Tabela 2.4. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) do óleo de soja.	55
Tabela 2.5. Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada.....	58
Tabela 2.6. Classificação dos reatores enzimáticos multifásicos em função do regime de operação e das características hidrodinâmicas.....	65
Tabela 3.1. Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.	72
Tabela 3.2. Sequência experimental utilizada para o estabelecimento e otimização das condições reacionais da reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.....	75
Tabela 3.3. Condições reacionais das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo.	80
Tabela 3.4. Condições reacionais das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fluidizado.....	81
Tabela 3.5. Condições reacionais empregadas nos ensaios para determinação da Distribuição do Tempo de Residência.....	83
Tabela 3.6. Valores de atividade de água teóricos de cada uma das diferentes soluções salinas.....	85
Tabela 3.7. Avaliação de margarinas e “ <i>shortenings</i> ” por meio da consistência	89
Tabela 3.8. Cumprimentos de onda utilizados para determinação dos produtos de oxidação primários e secundários.	90
Tabela 4.1. Valores de consistência para as diferentes blendas NIE e produtos IE da gordura de leite e óleo de soja.....	98
Tabela 4.2. Relação entre a porcentagem mássica de enzima e a quantidade de unidades de atividades fornecidas ao meio reacional.	99
Tabela 4.3. Valores de consistência dos produtos IE em função da quantidade de enzima empregada para catálise da reação.	102

Tabela 4.4. Valores de consistência dos produtos IE em função da umidade do biocatalisador empregado na catálise da reação.	105
Tabela 4.5. Influência da temperatura de reação na consistência dos produtos IE.....	108
Tabela 4.6. Condições reacionais estabelecidas para reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.....	110
Tabela 4.7. Teor de ácidos graxos livres (%) obtido nas reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja empregando-se reator operando em regime batelada, com adaptação de cestas, em diferentes configurações.	117
Tabela 4.8. Área superficial específica, volume de poros e tamanho médio de poros e do suporte SiO ₂ -PVA antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio.....	127
Tabela 4.9. Composição elemental superficial do suporte SiO ₂ -PVA neutralizado e da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada por ADS.....	130
Tabela 4.10. Tempos espaciais teóricos e reais calculados de acordo com a vazão empregada.....	136
Tabela 4.11. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, na reação de interesterificação contínua em reator de leito fixo empregando-se diferentes tempos espaciais.	138
Tabela 4.12. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA empregada na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h.	149
Tabela 4.13. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.	152
Tabela 4.14. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.	156
Tabela 4.15. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35), em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.....	158
Tabela 4.16. Consistência das gorduras de leite e das misturas reacionais de acordo com as diferentes marcas de manteiga empregadas.....	158
Tabela 4.17. Composição em ácidos graxos (% m/m) das gorduras de leite originadas de diferentes manteigas comerciais.	160

Tabela 4.18. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.	163
Tabela 4.19. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.	166
Tabela 4.20. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20), em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.....	168
Tabela 4.21. Altura do leito de biocatalisador (cm) em função da vazão (mL/min) empregada: velocidade superficial (cm/min) e porosidade.	170
Tabela 4.22. Valores de U _{tc} e n obtidos a partir dos dados experimentais: cálculo da velocidade mínima de fluidização.....	171
Tabela 4.23. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.....	175
Tabela 4.24. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.....	177
Tabela 4.25. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.	181
Tabela 4.26. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.	184
Tabela 4.27. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) , em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.	186
Tabela 4.28. Comparação dos principais resultados obtidos com os sistemas estudados para a reação de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja, em reatores operando em modo contínuo.....	185

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação da estrutura da molécula de um triglicerídeo (TAG).	36
Figura 2.2. Representação de ácidos graxos insaturados <i>cis</i> e <i>trans</i>	36
Figura 2.3. Representação do ácido linoléico conjugado e não-conjugado.....	38
Figura 2.4. Metabolismo de formação de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, ômega-6, ômega-3.....	39
Figura 2.5. Razão LDL/HDL do colesterol, a partir da ingestão de diferentes tipos de gorduras.	40
Figura 2.6. Formação de isômero <i>trans</i> durante o processo de hidrogenação de óleos vegetais.....	41
Figura 2.7. Modelo hipotético de fixação da lipase pancreática na interface água-óleo....	45
Figura 2.8. Exemplos de reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.....	46
Figura 2.9. Esquema representativo das principais reações catalisadas por lipases	47
Figura 2.10. Produtos obtidos em uma reação de interesterificação química ou catalisada por lipases inespecíficas e 1,3-específicas. As letras P, O e S representam, respectivamente, ácidos palmítico, oléico e esteárico (ou os resíduos destes ácidos ligados à molécula de glicerol).....	49
Figura 2.11. Reações envolvidas no sítio catalítico das lipases: mecanismo de interesterificação.	49
Figura 2.12. Comparação do grau de insaturação de alguns óleos e gorduras empregados no setor de alimentos.	53
Figura 2.13. Evolução da produção brasileira de soja e participação na oferta mundial. ..	54
Figura 2.14. Relação entre as funções catalíticas e não-catalíticas de uma enzima imobilizada, de acordo com a aplicação desejada.....	57
Figura 2.15. Principais métodos de imobilização de enzimas	59
Figura 2.16. Reações de hidrólise e policondensação do silano.....	62
Figura 2.17. Considerações importantes para seleção de um biorreator.	63
Figura 2.18. Biorreatores para biocatalisadores imobilizados.....	64

Figura 2.19. Padrões de circulação em um tanque com agitação mecânica: (a) agitador de fluxo radial; (b) agitador de fluxo axial..... 66

Figura 3.1. Foto ilustrativa do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja para avaliar a influência do tempo de reação nas propriedades do produto. 76

Figura 3.2. Representação esquemática do reator de tanque agitado com adaptação de cesta lateral. 77

Figura 3.3. Representação esquemática do reator de tanque agitado com adaptação de cesta central..... 77

Figura 3.4. Foto ilustrativa da cesta lateral utilizada para retenção do derivado imobilizado: (a) vista frontal; (b) vista superior. 78

Figura 3.5. Foto ilustrativa da cesta central utilizada para retenção do derivado imobilizado: (a) vista frontal; (b) vista superior. 78

Figura 3.6. Esquema ilustrativo do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, sem recirculação: (1) resistência de aquecimento; (2) cuba com água; (3) tanque de alimentação de mistura reacional; (4) bomba peristáltica; (5) reator de coluna; (6) tanque de armazenamento de produto..... 81

Figura 3.7. Esquema ilustrativo do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, com recirculação: (1) resistência de aquecimento; (2) cuba com água; (3) tanque de alimentação de mistura; (4) tanque de recirculação; (5) e (6) bombas peristálticas; (7) reator de coluna; (8) tanque de armazenamento de produto.....82

Figura 3.8. Sensor em forma conica, acrílico, com ponta não truncada e ângulo de 45° utilizado para a análise de consistência das amostras. 88

Figura 4.1. Composição em triacilgliceróis da gordura de leite pura e das blendas reacionais NIE de gordura de leite: óleo de soja nas proporções de 50:50; 65:35; 80:20. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol). 94

Figura 4.2. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação das blendas reacionais NIE de gordura de leite: óleo de soja nas proporções (% m/m) de 50:50 (a); 65:35 (b), 80:20 (c), 100:0 (d), respectivamente. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol). 95

Figura 4.3. Grau de interesterificação (% ,) e ácidos graxos livres (% ,) em 48h, para gordura de leite pura e para as blendas de gordura de leite:óleo de soja (% m/m 50:50, 65:35, 80:20)..... 96

Figura 4.4. Perfis de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (% m/m) 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA em diferentes proporções mássicas: (a) 5%; (b) 10%; (c) 15%; (d) 20% e (e) 30%. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol). 100

Figura 4.5. Grau de interesterificação (% , ■) e ácidos graxos livres (% , ■) obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), em função das unidades de atividade empregada..... 101

Figura 4.6. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada, com diferentes teores de umidade: (a) 5%; (b) 10%; (c) 20%. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col =colesterol).....103

Figura 4.7. Grau de interesterificação (% , ■) e ácidos graxos livres (% , ■) nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), catalisadas pela lipase de *R. oryzae*, em função do teor de umidade (5%; 10%; 20%). 104

Figura 4.8. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob diferentes temperaturas: (a) 45°C; (b) 50°C e (c) 60°C. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol)..... 106

Figura 4.9. Grau de interesterificação (% , ■) e ácidos graxos livres (% , ■) obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), em função da temperatura empregada..... 108

Figura 4.10. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h(■); 6h (■); 12h (■); 18h (■); 24h (■); 36h (■), 48h (■): (a) C₂₄ a C₃₀; (b) C₃₂ a C₃₈; (c) C₄₀ a C₄₆; (d) C₄₈ a C₅₄ (Col = colesterol). 112

Figura 4.11. Grau de interesterificação (% , ■) e teor de ácidos graxos livres (% , ○) em função do tempo de reação. 113

Figura 4.12. Consistência dos produtos IE em função do tempo reacional..... 114

Figura 4.13. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais, empregando-se a cesta na configuração lateral: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h(■); 6h (■); 8h (■); 12h (■) (Col = colesterol). 116

Figura 4.14. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais, empregando-se a cesta na configuração central: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h(■); 6h (■); 8h (■); 12h (■) (Col = colesterol). 116

Figura 4.15. Grau de interesterificação (%) obtido nas reações efetuadas em regime batelada, com adaptação de cestas em diferentes configurações.....	118
Figura 4.16. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em 4h de reação, empregando-se diferentes tipos de agitação (Col = colesterol).....	119
Figura 4.17. Consistência dos produtos IE em 12h de reação, em função da velocidade de agitação empregada: cesta lateral (500 rpm) e cesta central (700 rpm).	120
Figura 4.18. Composição média em TAGs dos produtos IE obtidos nas bateladas, nos tempos de 2h (, 4h ( ) e 6h (, em comparação á composição da blenda reacional NIE ( ) : estabilidade operacional (Col = colesterol).	122
Figura 4.19. Ácidos graxos livres (%) obtidos em cada uma das bateladas efetuadas (1 —■—; 2 —◊—; 3 —▷—; 4 —▽—; 5 —◆—; 6 —▲—; 7 —□—; 8 —◊—; 9 —☆—; 10 —●—), em função do tempo reacional.	123
Figura 4.20. Grau de interesterificação (%) obtido em cada uma das bateladas repetidas: avaliação da estabilidade operacional da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	124
Figura 4.21. Consistência (barras) dos produtos IE em 6h de reação e GI (linha) em função da batelada reacional executada.	125
Figura 4.22. Espectros no infra-vermelho do suporte SiO ₂ -PVA neutralizado e da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada por adsorção física.	128
Figura 4.23. Micrografias do suporte SiO ₂ -PVA neutralizado (a) aumento de 500X (b) aumento de 1000X.	129
Figura 4.24. Micrografias da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada por adsorção física (a) aumento de 500X (b) aumento de 1000X.....	129
Figura 4.25. Concentração do traçador em mistura reacional 65:35 (% m/m, gordura de leite:óleo de soja), em função da absorbância.	132
Figura 4.26. Resposta de um escoamento uniforme à entrada de um pulso em reator ideal, onde E(t): função de Distribuição de Tempo de Residência	133
Figura 4.27. Distribuição de Tempo de Residência para o reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fixo.	134
Figura 4.28. Fotos do experimento para determinação da Distribuição de Tempo de Residência (DTR) no reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fixo: (a) tempo inicial correspondente á injeção do traçador; (b) e (c) tempos intermediários; (d) final do experimento.....	135

Figura 4.29. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais. 137

Figura 4.30. Consistência dos produtos interesterificados obtidos na reação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais. $C_{\text{média}}$ = valor médio da consistência em cada tempo espacial estudado..... 138

Figura 4.31. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de soja e mistura reacional contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja e para (b) os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais (amostra de 72h para $\tau = 4h$; amostra de 168h para $\tau = 2h$; amostra de 264h para $\tau = 1h$; amostra de 360h para $\tau = 1/2h$). 140

Figura 4.32. Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para gordura de leite, para a mistura reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja) e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais (amostra de 72h para $\tau = 4h$; amostra de 168h para $\tau = 2h$; amostra de 264h para $\tau = 1h$; amostra de 360h para $\tau = 1/2h$)...... 143

Figura 4.33. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se tempo espacial de 4h..... 145

Figura 4.34. Consistência dos produtos interesterificados obtidos na reação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se tempo espacial de 4h. 146

Figura 4.35. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para a mistura reacional contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h. 147

Figura 4.36. Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para gordura de leite, para a mistura reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja) e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h. 148

Figura 4.37. Curva de a_w versus teor de umidade (% base seca) obtida para a lipase L036P imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física..... 151

Figura 4.38. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO_2 -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min..... 152

Figura 4.39. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).....	154
Figura 4.40. Consistência (gf/cm ² , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.	155
Figura 4.41. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.	157
Figura 4.42. Comparação do perfil de concentração de triacilgliceróis das misturas reacionais de gordura de leite e óleo de soja (65:35) empregando-se diferentes marcas de manteiga como fonte de gordura de leite. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).....	161
Figura 4.43. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.	163
Figura 4.44. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).....	164
Figura 4.45. Consistência (gf/cm ² , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.	165
Figura 4.46. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.	167
Figura 4.47. Linearização dos dados experimentais de velocidade superficial (cm/min) em função da porosidade, para o cálculo dos parâmetros U _{tc} e n.	170
Figura 4.48. Distribuição de Tempo de Residência para o reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fluidizado.....	172

Figura 4.49. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min. 174

Figura 4.50. Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).....176

Figura 4.51. Consistência (gf/cm², ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min. 176

Figura 4.52. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min. 178

Figura 4.53. Foto do sistema reacional empregado na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min. 180

Figura 4.54. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min. 181

Figura 4.55 Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).182

Figura 4.56. Consistência (gf/cm², ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min. 183

Figura 4.57. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min..... 185

LISTA DE SIGLAS

AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ADS	Adsorção Física
AGL	Ácidos graxos livres
Col	Colesterol
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria de varredura diferencial)
GI	Grau de Interesterificação
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
IE	Interesterificado enzimaticamente
L036P	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
LC	Ligação Covalente
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
NIE	Não interesterificado enzimaticamente
PBR	Reatores de leito fixo
PEG	Polietilenoglicol
PVA	Álcool polivinílico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SiO₂-PVA	Sílica-álcool polivinílico
STR	Reatores de tanque agitado
TAG	Triacilgliceróis
TEOS	Tetraetilortossilicato
τ	Tempo espacial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	33
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1. Óleos e Gorduras	35
2.1.1. Aspectos gerais.....	35
2.1.2. Ácidos graxos trans e saúde humana	39
2.1.3. Hidrogenação.....	41
2.1.4. Gordura de leite	42
2.2. Modificação enzimática de óleos e gorduras empregando lipases	44
2.2.1. Lipases e suas aplicações	44
2.2.2. Interesterificação.....	47
2.2.3. Interesterificação da gordura de leite com óleos vegetais	50
2.2.4. Fatores que afetam a atividade das lipases e o rendimento da reação de interesterificação.....	55
2.3. Imobilização de enzimas.....	56
2.3.1. Definição e aspectos gerais	56
2.3.2. Seleção de suportes para imobilização	60
2.3.3. Sílica-álcool polivinílico (SiO ₂ -PVA).....	61
2.4. Biorreatores com enzimas imobilizadas.....	63
2.4.1. Aspectos Gerais	63
2.4.2. Tipos de Biorreatores	64
2.4.3. Reatores de tanque agitado (STR).....	65
2.4.4. Reatores de leito fixo (PBR).....	67
2.4.5. Reatores de leito fluidizado.....	68
2.4.6. Escolha do biorreator para uso com enzimas imobilizadas	69
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	71
3.1. Materiais	71
3.1.1. Enzima.....	71
3.1.2. Substratos.....	71
3.1.3. Outros materiais e reagentes	71
3.2. Equipamentos	72
3.3. Procedimento experimental.....	73
3.3.1. Separação da gordura de leite	73
3.3.2. Obtenção da matriz de imobilização	73
3.3.3. Ativação do suporte com metaperiodato de sódio	73
3.3.4. Neutralização do suporte com hidróxido de potássio	74
3.3.5. Imobilização da lipase	74

3.3.6. Estabelecimento das condições reacionais para interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: reatores operando em modo batelada	74
3.3.7. Interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: influência do tempo de reação nas propriedades do produto	75
3.3.8. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, em reator de tanque agitado tipo cesta.....	76
3.3.9. Estabilidade operacional	79
3.3.10. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reatores operando em modo contínuo.....	79
3.3.11. Distribuição de Tempo Residência (DTR)	82
3.3.12. Velocidade mínima de fluidização.....	83
3.3.13. Isotérmicas de equilíbrio do teor de água (30°C)	84

3.4. Métodos de Análise	85
3.4.1. Dosagem de Atividade Hidrolítica	85
3.4.2. Rendimento de imobilização	86
3.4.3. Teor de umidade.....	86
3.4.4. Teor de ácidos graxos livres	86
3.4.5. Cálculo do tempo espacial (τ).....	86
3.4.6. Determinação da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$).....	87
3.4.7. Quantificação dos triglicerídeos por cromatografia gasosa.....	87
3.4.8. Grau de interesterificação (GI, %).....	88
3.4.9. Consistência	88
3.4.10. Quantificação dos produtos primários e secundários de oxidação	89
3.4.11. Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	90
3.4.12. Conteúdo de gordura sólida por DSC	91
3.4.13. Conteúdo de gordura sólida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	91
3.4.14. Composição em ácidos graxos.....	91
3.4.15. Determinação da área, tamanho e volume de poros do suporte	92
3.4.16. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	92
3.4.17. Microscopia e análise elemental superficial.....	92

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 93

4.1. Avaliação da influência do teor de gordura de leite nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja	93
4.1.1. Composição em triacilgliceróis (TAGs)	93
4.1.2. Consistência dos produtos interesterificados	97

4.2. Avaliação da influência da quantidade de unidades de atividade enzimática fornecida ao meio reacional	99
---	-----------

4.3. Avaliação da influência da umidade do derivado imobilizado na catálise das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.....	102
--	------------

4.4. Avaliação da influência da temperatura na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.....	106
4.5. Condições estabelecidas.....	109
4.6. Influência do tempo de reação nas propriedades do produto obtido por interesterificação da gordura de leite com óleo de soja	111
4.6.1. Composição em triacilgliceróis.....	111
4.6.2. Consistência dos produtos interesterificados	114
4.7. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, em reator de tanque agitado com adaptação de cestas	115
4.7.1. Composição em triacilgliceróis.....	115
4.7.2. Consistência dos produtos interesterificados	120
4.8. Estabilidade operacional da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em reator batelada com adaptação de cesta central	121
4.8.1. Composição em triacilgliceróis.....	121
4.8.2. Consistência dos produtos interesterificados	124
4.9. Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização sílica-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) e da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada por adsorção física	126
4.9.1. Porosidade	127
4.9.2. Análise por espectroscopia no infravermelho.....	128
4.9.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e análise elemental superficial (EDS).....	128
4.10. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reatores operando em modo contínuo: leito fixo	130
4.10.1. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)	130
4.10.2. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca comercial Aviação.....	135
4.10.3. Interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca Mimosa e mistura inicial composta por 65% de gordura de leite	150
4.10.4. Propriedades das diferentes fontes comerciais de gordura de leite utilizadas no presente trabalho: manteigas das marcas Aviação e Mimosa	158
4.10.5. Interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca mimosa e mistura inicial composta por 80% de gordura de leite	162
4.11. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reatores operando em modo contínuo: reações em leito fluidizado.....	168
4.11.1. Testes para avaliação da velocidade mínima de fluidização a ser empregada na reação de interesterificação	169
4.11.2. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)	171

<i>4.11.3. Reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado operando em modo contínuo.</i>	173
<i>4.11.4. Reação de Interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por lipase de Rhizopus oryzae imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fluidizado operando em modo contínuo.....</i>	179
4.12. Comparação do desempenho dos sistemas estudados: leito fixo e fluidizado.....	186
5. CONCLUSÕES	189
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	193
REFERÊNCIAS	195
APÊNDICES	211

1. INTRODUÇÃO

Entre os alimentos apreciados pelo consumidor encontra-se a gordura de leite, à qual se atribui sabor e aroma peculiares e agradáveis, além de possuir características importantes e benéficas à saúde humana, como a presença de ácidos linolêicos conjugados. Este grupo de ácidos graxos desempenha importante papel em diversos processos bioquímicos e na prevenção de doenças humanas, incluindo o câncer. Entretanto, a gordura de leite possui alguns inconvenientes, como riqueza em gorduras saturadas, cujo consumo excessivo tem sido associado a doenças cardiovasculares. Além disso, para a aceitabilidade de um produto é fundamental que se considerem aspectos como as propriedades físicas e sensoriais, sendo que a gordura de leite tem como desvantagem baixa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração doméstica.

Na tentativa de solucionar estes inconvenientes, durante as últimas décadas do século XX, o processo de hidrogenação parcial foi base para a obtenção de margarinas visando à substituição da manteiga. No entanto, as margarinas comuns obtidas por este processo são ricas em ácidos graxos *trans*, os quais têm sido apontados como mais danosos à saúde que os ácidos graxos saturados presentes na gordura de leite, fazendo com que as vantagens do uso da margarina sobre a manteiga sejam diminuídas. A ingestão de gorduras *trans* tem sido correlacionada com a incidência de doenças cardiovasculares, aparecimento de asma e alergias em crianças, ocorrência de diabetes em adultos e a inibição do metabolismo de ácidos graxos essenciais, influenciando o desenvolvimento infantil.

Desta forma, nos últimos anos tem sido crescente a demanda por processos capazes de aliar a ausência da formação de isômeros *trans* à manutenção das características sensoriais desejáveis da gordura do leite. Dentre os possíveis processos, destaca-se a interesterificação desta matéria-prima com óleos vegetais, que permite a obtenção de um produto que alie o sabor da gordura de leite com características desejáveis dos óleos vegetais, ou seja, menor teor de gordura saturada e presença de ácidos graxos essenciais. Além disso, o processo de interesterificação pode resultar em um produto com melhor espalhabilidade sob temperatura de refrigeração doméstica.

A reação de interesterificação pode ser catalisada por via química ou enzimática. Os processos químicos possuem baixa especificidade, oferecendo baixo controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, além de empregarem temperaturas e pressões elevadas. Por outro lado, a via enzimática, empregando lipases, destaca-se como uma rota de produção ambientalmente segura, com as seguintes

vantagens: reogioespecificidade destas enzimas, que permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final e o emprego de condições reacionais mais suaves (temperaturas e pressões reduzidas), que podem ser menos prejudiciais às qualidades sensoriais da manteiga. No entanto, algumas limitações da via enzimática incluem o preço da enzima e a baixa estabilidade operacional das lipases. Estas limitações podem ser contornadas caso a enzima seja recuperada para reutilização e caso sua estabilidade operacional seja aumentada, por meio de técnicas de imobilização. No laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) testou-se com sucesso uma matriz híbrida (sílica-álcool polivinílico, SiO_2 -PVA) para imobilização de lipases de diferentes fontes (BRUNO et al., 2005; BRAGA, 2005; FREITAS, 2006; PAULA et al., 2007), sendo este o suporte selecionado para o desenvolvimento deste trabalho.

Entre todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. O emprego desses biocatalisadores em processos em escala laboratorial tem sido realizado em diferentes configurações de reatores. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo com enzima imobilizada em um suporte específico. A seleção do reator mais apropriado para um dado bioprocessos depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte híbrido orgânico-inorgânico sílica-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA), através da avaliação de condições reacionais e de diferentes opções de reatores e modos de operação. Este óleo foi selecionado com base em sua composição química, rica em ácidos graxos insaturados, incluindo os essenciais, linoléico e linolênico, além de sua disponibilidade comercial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos e Gorduras

2.1.1. Aspectos gerais

Óleos e gorduras são componentes essenciais da dieta humana e possuem também um amplo leque de aplicações industriais. Desempenham duas importantes funções na alimentação humana: fornecer energia e transportar agentes químicos orgânicos solúveis como os ácidos graxos essenciais, as vitaminas e os hormônios (SAMBANTHAMURTI; SHAHRUL; PARVEEZ, 2005; TRIVEDI; SINGH, 2005). A diferenciação entre óleos e gorduras baseia-se no estado físico destes compostos à temperatura ambiente (BALCÃO; MALCATA, 2002). Os óleos caracterizam-se por sua forma líquida, ao passo que as gorduras se apresentam sólidas à temperatura ambiente (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Podem ser de origem animal ou vegetal e seus principais componentes são os triglicerídeos (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009), ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos, que normalmente apresentam cadeias de hidrocarboneto não ramificadas. A Figura 2.1 representa a estrutura de uma molécula de triglicerídeo (TAG). Os grupos R_1 , R_2 e R_3 representam os diferentes ácidos graxos que podem estar ligados à molécula de glicerol.

Figura 2.1. Representação da estrutura de uma molécula de triglicerídeo (TAG).

Os ácidos graxos diferem entre si pelo comprimento da cadeia de hidrocarbonetos (4 a 24 átomos de carbono), pelo número (1 a 6) e posição de suas duplas ligações. Portanto, as propriedades físicas, químicas e nutricionais dos óleos e das gorduras dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos (HUPPERTZ; KELLY; FOX, 2009; GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002; SAMBANTHAMURTI; SHAHRUL; PARVEEZ, 2005), principais componentes dos triglicerídeos. A Tabela 2.1 apresenta uma relação de ácidos graxos de acordo com a saturação, número de carbonos na cadeia e fontes alimentares (TIRAPEGUI, 2002).

Com relação ao grau de saturação, dois tipos principais de ácidos graxos podem ser definidos: os saturados, que contém apenas ligações simples entre os átomos de carbono, e os insaturados, que contém duplas ligações entre os átomos de carbono da cadeia (HUPPERTZ; KELLY; FOX, 2009). Quando um ácido graxo contém uma dupla ligação, é chamado monoinsaturado, assim como os que apresentam mais de uma dupla ligação entre carbonos se denominam ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos insaturados podem ser classificados em *cis* ou *trans*, de acordo a configuração das duplas ligações, ou ainda, em conjugados ou não conjugados, com relação à posição das duplas ligações.

Quando os hidrogênios da dupla ligação se encontram do mesmo lado do plano, são chamados isômeros *cis*. Nesse caso, a cadeia carbônica, na região da dupla ligação é uma estrutura rígida em forma de arco constituída ao longo do ácido graxo. Ao contrário, quando os hidrogênios estão em lados opostos em relação à cadeia de hidrocarbonetos, a região da dupla ligação é denominada *trans* e o ácido graxo apresenta-se praticamente como uma cadeia linear (HUPPERTZ; KELLY; FOX, 2009; SOLOMONS; FRYHLE, 2005). A Figura 2.2 representa a configuração de ácidos graxos insaturados dos tipos *cis* e *trans*.

Figura 2.2. Representação de ácidos graxos insaturados *cis* e *trans*.

Tabela 2.1. Relação de alguns ácidos graxos de acordo com a saturação, número de carbonos na cadeia e principais fontes alimentares.

Nome comum	Saturação	Nº de Carbonos	Principais Fontes Alimentares
Butírico	Saturado	4	Gordura de leite
Capróico	Saturado	6	Gordura de leite
Caprílico	Saturado	8	Óleo de coco
Láurico	Saturado	12	Óleo de coco
Mirístico	Saturado	14	Gordura de leite, Óleo de coco, Óleo de noz-moscada
Palmítico	Saturado	16	Maioria dos óleos e gorduras
Esteárico	Saturado	18	Gordura animal, manteiga de cacau
Araquidônico	Saturado	20	Óleo de amendoim
Be-Hênico	Saturado	22	Óleo de Mostarda, Óleo de Colza
Lignocérico	Saturado	24	Óleo de amendoim, Óleo de mostarda, Óleo de gergelim, Óleo de colza, Óleo de girassol
Caproléico	Insaturado	10	Gordura de leite
Lauroléico	Insaturado	12	Gordura de leite
Miristoléico	Insaturado	14	Gordura animal
Fisetérico	Insaturado	14	Óleo de sardinha
Oléico	Insaturado	18	Gordura animal, Gordura vegetal, principalmente Óleo de oliva
Gadoléico	Insaturado	20	Óleo de peixes, Óleo de animais marinhos
Erúcico	Insaturado	22	Óleo de mostarda, Óleos de peixes, Óleo de colza
Linoléico	Insaturado	18	Óleo de amendoim, Óleos de milho, Óleo de algodão, Óleo de gergelim, Óleo de girassol
Linolênico	Insaturado	18	Óleo de soja, Óleo de canola, Óleo de gérmen de trigo, Óleo de linhaça

FONTE: TIRAPEGUI (2002)

Nos ácidos graxos insaturados denominados não-conjugados, as duplas ligações da cadeia são separadas por um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), enquanto nos conjugados, as duplas ligações separam-se somente por uma ligação simples (HUPPERTZ; KELLY; FOX, 2009). A Figura 2.3 apresenta as duas configurações do ácido linoléico.

Figura 2.3. Representação do ácido linoléico conjugado e não-conjugado.

Uma importante classe de ácidos graxos são os essenciais, aqueles que o organismo humano é incapaz de produzir, tornando-se necessária sua ingestão através da alimentação (COULTATE, 2009; SANT'ANA, 2004). Existem dois ácidos graxos essenciais: ácido linoléico (ômega-6, C18:2, ω 6) e ácido linolênico (ômega-3, C18:3, ω 3). O ácido graxo ω 3 é encontrado principalmente nos peixes e óleos de peixe. Por outro lado, as melhores fontes alimentares de ácido graxo ω 6 são os óleos vegetais convencionais (FREITAS et al, 2006b). A importância destes ácidos graxos está na sua capacidade de se transformar em ácidos poliinsaturados de cadeia longa (FREITAS et al., 2006b), que desempenham papel fundamental no crescimento, manutenção e funcionamento de processos fisiológicos.

A Figura 2.4 representa a formação dos ácidos graxos de cadeia longa a partir dos ácidos graxos essenciais e atuação de diferentes enzimas (PAVAN, 2008). A ingestão de níveis adequados destes ácidos graxos tem um importante papel na prevenção e modulação de várias doenças como: doenças coronarianas, câncer de mama, próstata e cólon e artrite reumatóide (FAGUNDES, 2002; SANT'ANA, 2004).

Figura 2.4. Metabolismo de formação de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, ômega-6, ômega-3 (ROCHE, 2000).

2.1.2. Ácidos graxos *trans* e saúde humana

Os isômeros *trans* do ácido linoléico competem no processo metabólico com ácidos graxos essenciais. Quando os ácidos graxos *trans* estão presentes em teores elevados, passam a ser um substrato alternativo das dessaturases, resultando na formação de eicosanóides sem atividade biológica, que atuam como inibidores destas enzimas (BADOLATO, 2000; PAVAN, 2008). Além disso, estudos populacionais têm mostrado que a quantidade de ácidos graxos *trans* de uma dieta está associada a um aumento de 2,5 a 10 vezes no risco de doenças do coração (PAVAN, 2008).

Assim, o consumo de ácidos graxos *trans* e os seus efeitos na alimentação humana tem sido um dos principais temas de novas pesquisas, que demonstraram que a gordura *trans* é mais nociva do que gorduras saturadas e insaturadas do tipo *cis* (AKHO, 2005). Isso porque, a gordura *trans*, além de resultar em aumento no teor de LDL no organismo,

reduz as quantidades de HDL, e facilita o depósito do colesterol no tecido adiposo e abdômen (HUNTER, 2006; NEIVA, 2006). De fato, sabe-se que o colesterol é transportado por duas lipoproteínas: *LDL* (Low Density Lipoprotein) ou *HDL* (High Density Lipoprotein). A primeira é responsável pelo transporte do colesterol do sangue até as artérias, onde este pode se acumular, quando em excesso. A segunda auxilia na remoção do colesterol presente nas paredes das artérias (HORNSTRA, 1999; HUI, 1993). A ingestão de ácidos graxos *trans* em teor maior ou igual a 4% da energia total diária ingerida é suficiente para provocar aumento da LDL. Níveis de 5 a 6% são suficientes para provocar a diminuição da HDL (HUNTER, 2006). Não há, no entanto, consenso em relação à quantidade máxima permitida na dieta, recomendando-se que a ingestão de gordura *trans* seja menor que 1% das calorias totais da dieta (MOZAFFARIAN et al., 2006).

A Figura 2.5 compara a razão LDL/HDL no sangue a partir da ingestão de diferentes tipos de gordura. Pode-se observar que o consumo de gordura *trans* resulta em maior razão LDL/HDL em comparação com as gorduras saturadas e monoinsaturadas, o que significa que sua ingestão é mais prejudicial à saúde (AKHO, 2005).

Figura 2.5. Razão LDL/HDL do colesterol, a partir da ingestão de diferentes tipos de gorduras (BARRERA-ARELLANO, 2006).

No Brasil, a Resolução RDC nº 360, de 23/12/2003 obriga a indicação do teor de ácidos graxos *trans* na rotulagem nutricional de alimentos industrializados e passou a vigorar a partir de 31 de julho de 2006. De acordo com esta legislação, são considerados alimentos *zero trans* aqueles que apresentarem teores de gorduras *trans* menor ou igual a 0,2 g/porção (ANVISA, 2003). As principais fontes de gordura *trans* são bolachas, sorvetes, pipoca de microondas, salgadinhos de pacotes, refeições fast-food, batata frita, as

massas prontas para o consumo, lanches fritos e bolos industrializados, além das margarinas obtidas pelo processo de hidrogenação.

2.1.3. Hidrogenação

Óleos e gorduras obtidas diretamente de fontes animais ou vegetais apresentam limitadas aplicações na indústria alimentícia. Assim, os métodos de modificação de óleos e gorduras permitem o desenvolvimento de produtos com diferentes propriedades (KARABULUT; TURAN; ERGIN, 2004). Dentre eles, a hidrogenação é um dos mais antigos métodos, cujas aplicações mais comuns incluem a fabricação de gorduras vegetais (“*shortenings*”), margarinas e substitutos da manteiga de cacau (GIOIELLI, 1998). Trata-se de uma reação exotérmica, que envolve três fases distintas: sólida (catalisador), líquida (óleo) e gasosa (hidrogênio). A reação ocorre dentro dos sítios ativos de um catalisador onde o hidrogênio gasoso entra em contato com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados presentes no óleo ou gordura (COULTATE, 2009), originando reações de saturação ou isomerização, elevando o ponto de fusão e aumentando sua estabilidade oxidativa (LUCCAS, 2001; TORRES, 2002). No entanto, no processo, as duplas ligações podem ser reposicionadas ou podem trocar de configuração *cis* para *trans*, mais estável termodinamicamente. A Figura 2.6 ilustra a formação de isômero *trans* durante o processo de hidrogenação. A literatura relata que o processo de hidrogenação dos óleos vegetais altera cerca de 40% de seus ácidos graxos, que passam da configuração *cis* para *trans* (QUAST, 2008).

Figura 2.6. Formação de isômero *trans* durante o processo de hidrogenação de óleos vegetais (QUAST, 2008).

Nas últimas décadas, o processo de hidrogenação de óleos vegetais foi base para a obtenção de margarinas visando à substituição da manteiga, um produto de alto valor

agregado (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). No entanto, as margarinas comuns obtidas por hidrogenação são ricas em ácidos graxos *trans*, fazendo com que as vantagens do uso da margarina sobre a manteiga sejam diminuídas (AKOH, 2005; CAPRILES; ARÊAS, 2005; KATAN, 2000). Portanto, a gordura de leite tem novamente tido destaque em diversos estudos (BRYN et al., 2006; BRYN; WIRKOWSKA; KOWALSKI, 2006; ZHANG; MU; XU, 2006).

2.1.4. Gordura de leite

Segundo Balcão e Malcata (2002), o leite tem sido descrito como um dos alimentos naturais mais próximos da perfeição, devido particularmente ao seu elevado teor de nutrientes, incluindo proteínas, gorduras, açúcares, minerais e vitaminas.

Com relação especificamente à gordura do leite, esta é a terceira maior fonte de lipídios para nutrição humana, com sabor e aroma superior a qualquer outra gordura comestível (AGUEDO et al., 2008). É constituída por uma mistura de mais de 100000 tipos diferentes de triacilgliceróis que contêm cerca de 400 diferentes ácidos graxos, com grande quantidade tanto de ácidos graxos de cadeia longa (16 a 18 átomos de carbono) como de cadeia curta (4 a 10 átomos de carbono), conforme mostrado na Tabela 2.2 (FIRESTONE, 2006). Essa composição tão variada, provavelmente a mais complexa entre os alimentos gordurosos, é responsável pelo sabor e propriedades físicas únicas (BALCÃO; MALCATA, 2002; RODRIGUES, 2002; SHIN et al., 2009), conferindo à gordura de leite qualidade superior nas diversas impressões sensoriais do alimento (SHIN et al., 2009).

A portaria n.º 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) afirma que a gordura do leite deve ser a única gordura presente na manteiga, que é uma emulsão de água em óleo. A gordura é que determina as principais características físicas da manteiga, correspondendo a cerca de 85% de sua composição. O restante é formado pelo soro e sólidos não gordurosos do leite.

Deve-se destacar que a gordura de leite possui características importantes e benéficas à saúde humana. É um dos poucos alimentos que possui ácido butírico, um potente inibidor da proliferação de células cancerígenas e indutor da diferenciação e apoptose de diferentes linhagens destas células (ORCHEL et al., 2005; WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003). É também a mais abundante fonte de ácidos linolêicos conjugados, que desempenham importante papel em diversos processos bioquímicos e

prevenção de doenças humanas, incluindo o câncer (KRITCHEVSKY et al., 2000; LEDOUX et al., 2005) e doenças coronarianas (AGUEDO et al., 2008).

Tabela 2.2. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) da gordura de leite.

Ácido Graxo	Gordura de Leite (manteiga)
Ácido butírico C4:0	2,8-4,0
Capróico C 6:0	1,4-3,0
Caprílico C 8:0	0,5-1,7
Cáprico C 10:0	1,7-3,2
Láurico C:12	2,2-4,5
Mirístico C 14:0	5,4-14,6
Miristoléico C 14:1	0,6-1,6
Palmítico C 16:0	25,0-41,0
Palmitoléico C16:1	2-6
Esteárico C 18:0	6-11
Oléico C18:1	18,7-33,4
Linoléico C18:2	0,9-3,7
Linolênico C18:3	0,5

FONTE: FIRESTONE (2006)

Apesar de possuir características desejáveis e de ser amplamente apreciada pelo consumidor, a gordura de leite possui alguns inconvenientes, como riqueza em gorduras saturadas (SHIN et al., 2009). Entre os ácidos graxos constituintes há também grande porcentagem de ácidos graxos hipercolesterolêmicos (saturados de cadeia média) localizados predominantemente na posição *sn*-2 do triacilglicerol (BALCÃO; MALCATA, 2002). O consumo excessivo deste tipo de gordura tem sido associado a doenças cardiovasculares (RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003; SHIN et al., 2009). Além disso, apesar de seu sabor apreciado por grande parte dos consumidores, a manteiga é considerada um produto caro e o fato do consumo excessivo deste tipo de gordura estar associado ao surgimento de doenças cardiovasculares tem levado o consumidor a preferir um produto refrigerado mais espalhável e saudável. Isso porque, para a aceitabilidade de um produto é fundamental que se considerem não somente suas características sensoriais, mas também as propriedades físicas. De acordo com German e Dillard (1998), a gordura do leite é plástica, sendo sólida à temperatura ambiente. Essa plasticidade é um elemento muito importante na utilização da gordura do leite como ingrediente, já que os óleos vegetais precisam ser hidrogenados para produzir a plasticidade necessária aos “spreads”, ou substitutos da manteiga. Porém, a faixa de plasticidade da gordura do leite é limitada,

comportando-se como um sólido pouco empalhável à temperatura de refrigeração (entre 0 e 10°C) (RODRIGUES, 2002), enquanto que a temperatura ambiente (20 – 25°C) há separação do óleo e exsudação. A manteiga é completamente líquida acima de 40°C e completamente sólida abaixo de -40°C. Dentro desta faixa, é uma mistura de gordura e óleo. A espalhabilidade ideal da manteiga ocorre por volta dos 15°C, temperatura na qual seu conteúdo de gordura sólida está em torno de 30% (MARANGONI; ROUSSEAU 1999; RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003).

A substituição da manteiga pelas margarinas ou cremes vegetais tem levado a indústria a buscar a modificação da gordura do leite, visando ao aumento das alternativas para uso desta matéria-prima (BALCÃO et al., 1998). Entre os processos considerados, a interesterificação química ou enzimática permite a alteração das propriedades de espalhabilidade, devido à modificação nas propriedades físicas da manteiga introduzida pela redistribuição dos ácidos graxos entre os triacilgliceróis (GIOIELLI, 1998; JIMÉNEZ-FLORES, 1997; ROZENAAL, 1992). No caso da interesterificação enzimática são empregadas as lipases, enzimas hidrolíticas de grande aplicação industrial.

2.2. Modificação enzimática de óleos e gorduras empregando lipases

2.2.1. Lipases e suas aplicações

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas para aplicações biotecnológicas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). São amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de microrganismos ou de fontes animais e vegetais (WILLIS; MARANGONI, 2008), com variações em suas propriedades catalíticas.

Industrialmente, as lipases mais empregadas são as de origem microbiana (FREIRE; CASTILHO, 2008; PAQUES; MACEDO, 2006;), devido à grande variedade de atividade catalítica disponível, à disponibilidade regular no mercado e por possuírem maior estabilidade que as correspondentes de origem animal ou vegetal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, do ponto de vista econômico e industrial, lipases oriundas de microrganismos são preferíveis às de fontes animais e vegetais, devido ao alto custo do isolamento destas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Estas enzimas catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula e promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SHARMA; CHISTI;

BANERJEE, 2001). Não requerem cofatores, são regioespecíficas e atuam em uma larga faixa de pH (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Além disso, deve-se destacar que estas enzimas possuem a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). As superfícies das conformações abertas e cataliticamente ativo de várias lipases têm como característica comum o fato de que a área em torno do sítio catalítico tem um caráter hidrofóbico (FREIRE; CASTILHO, 2008). A Figura 2.7 apresenta um modelo hipotético desta propriedade para a lipase pancreática (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A parte hidrofóbica da lipase se liga às gotículas do óleo, enquanto o sítio ativo se alinha a molécula de substrato (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009), a fim de catalisar a reação.

Figura 2.7. Modelo hipotético de fixação da lipase pancreática na interface água-óleo (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Conforme a classificação, as lipases são divididas da seguinte forma:

1. **Regiosseletivas**, subdivididas em:

⇒ lipases não-específicas - nesse caso, todos os ácidos graxos, independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol, são hidrolisados produzindo tanto ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (DE CASTRO et al., 2004; GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995);

⇒ *lipases 1,3-específicas* - liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regioseletivas (DE CASTRO et al., 2004; FREITAS et al, 2006a);

A Figura 2.8 representa alguns produtos possíveis (diglicerídeos) de reações catalisadas por lipases não-específicas e 1,3 específicas.

Figura 2.8. Exemplos de reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (PAQUES; MACEDO, 2006).

2. **Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ ou ao número de insaturações do grupo acila:** atuam especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função de seu tamanho de cadeia ou insaturação (DE CASTRO et al., 2004; GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003).
3. **Enantiosseletivas:** apresentam especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um tipo de isômero ótico (QUEIROZ, 2002).

A versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam selecionadas para aplicações potenciais em diversos setores, como: alimentício, de detergentes, farmacêutico, têxtil, cosmético e indústrias de papel (FREIRE; CASTILHO, 2008; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; NUNES et al., 2010; REIS et al., 2009).

Como as lipases são capazes de catalisar tanto a hidrólise quanto a reação inversa - síntese de ésteres (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009), os dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação), dependendo dos materiais de partida empregados (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995).

As reações catalisadas por lipases são mostradas na Figura 2.9 (BOURLIEU; BOUHALLAB; LOPEZ, 2009). Nestas reações, o teor de água é considerado um fator crítico (LOPEZ-HERNANDEZ; GARCIA; HILL, 2005; REIS et al., 2009), podendo afetar diretamente a velocidade de reação, extensão de reações paralelas de hidrólise, rendimentos do produto, atividade da enzima e seletividade da reação.

Figura 2.9. Esquema representativo das principais reações catalisadas por lipases.

Entre as reações catalisadas por lipases, a interesterificação é o processo mais usado para obtenção de óleos e gorduras com funções desejáveis na manufatura de produtos específicos no setor alimentício.

2.2.2. Interesterificação

Interesterificação é a troca controlada de ácidos graxos entre as distintas moléculas de éster, visando-se à obtenção de produtos com novas propriedades físicas e químicas. É o processo básico de processos como a elaboração das “gorduras feitas sob medida”

(MORETTO; FETT, 1998; RODRIGUES; GIOIELLI, 2003), os denominados *Lipídeos Estruturados* (AKOH, 2005), óleos e gorduras com propriedades nutracêuticas, que podem proporcionar, além das necessidades nutricionais básicas, efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, como a prevenção e o tratamento de doenças (SILVA et al., 2009).

A modificação de óleos e gorduras por interesterificação pode ocorrer por via química ou enzimática, um conceito relativamente novo da modificação de lipídeos (LOPEZ-HERNANDEZ; GARCIA; HILL, 2005). A rota química, em geral, utiliza como catalisador sódio metálico e metilato de sódio, conduzindo à redistribuição aleatória dos ácidos graxos nas cadeias dos triacilgliceróis (NUNES et al., 2010). Além disso, empregam temperaturas e pressões elevadas, o que exige etapas adicionais de branqueamento e desodorização do produto final. Estas etapas podem ter efeitos nutricionais prejudiciais, além de extinguirem o sabor da manteiga tão apreciado pelos consumidores (BALCÃO; MALCATA, 2002).

A via enzimática emprega lipases como biocatalisadores e tem sido preferida à via química (ALIM et al., 2008). Neste caso, os ácidos graxos podem ser redistribuídos de forma aleatória empregando-se lipases não específicas, ou em posições características, quando são utilizadas enzimas específicas (NUNES et al., 2010; O'BRIEN, 2004). Estas enzimas atuam em condições reacionais amenas (pH, temperatura e pressão), levando à redução de custos energéticos (O'BRIEN, 2009; SILVA et al., 2009), além de possuírem alta especificidade, uma ferramenta versátil para a preparação de uma ampla variedade de TAGs, minimizando a formação de sub-produtos (O'BRIEN, 2009; SILVA et al., 2009). Este fato é ilustrado na Figura 2.10 (WILLIS; MARANGONI, 2008), que mostra os produtos obtidos em uma reação de interesterificação química ou catalisada por lipases inespecíficas e 1,3-específicas.

A interesterificação de óleos e gorduras é considerada um caso especial de transferência de grupos acila, pois envolve reações sequenciais de hidrólise e esterificação (re-síntese) dos triglicerídeos (MARANGONI, 2002; WILLIS; MARANGONI, 2008). Quando catalisada por lipases, esta reação segue um mecanismo de acilação e desacilação no interior do sítio ativo das lipases (WILLIS; MARANGONI, 2008), conforme mostrado na Figura 2.11 (PAULA et al., 2010). Durante a acilação, um complexo acil-enzima, de natureza covalente, é formado pelo ataque nucleofílico da Serina à carbonila do substrato. A Serina é o agente nucleofílico, cujo poder de atuação é potencializado pela presença dos resíduos de Histidina e Ácido aspártico. Durante a reação, grupamentos acilglicerol

associam-se à tríade catalítica do sítio ativo através de ligações covalentes (MARANGONI, 2002; WILLIS; MARANGONI, 2008).

**Interesterificação química
ou catalisada por lipase inespecífica**

**Interesterificação catalisada
por lipase 1,3 específica**

Figura 2.10. Produtos obtidos em uma reação de interesterificação química ou catalisada por lipases inespecíficas e 1,3-específicas. As letras P, O e S representam, respectivamente, ácidos palmítico, oléico e esteárico (ou os resíduos destes ácidos ligados à molécula de glicerol).

Figura 2.11. Reações envolvidas no sítio catalítico das lipases: mecanismo de interesterificação (PAULA et al., 2010).

2.2.3. *Interesterificação da gordura de leite com óleos vegetais*

Conforme previamente discutido no item 2.1.3, durante as últimas décadas, o processo de hidrogenação foi base para a obtenção de margarinas visando à substituição da manteiga. Contudo, com a descoberta dos efeitos prejudiciais à saúde, causados pelo consumo excessivo de ácidos graxos *trans*, as indústrias têm buscado a modificação da gordura do leite, visando o aumento das alternativas para uso desta matéria-prima (BALCÃO; MALCATA, 2002).

Entre os processos considerados, a interesterificação da gordura de leite com óleos vegetais têm o potencial de resultar em produtos que combinem características nutricionais e sensoriais desejáveis com baixos custos de produção (MARANGONI; ROUSSEAU, 1998; RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003). Diversos trabalhos têm sido relatados na literatura com o uso de lipases em processos de interesterificação de óleos e gorduras (OSÓRIO; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2006; OSÓRIO et al., 2005; XU, 2000) ou ainda, mais especificamente, na interesterificação de gordura de leite e óleos vegetais (ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a e b; MARANGONI; ROUSSEAU, 1999; RONNE et al., 2005; BRYN et al., 2006 ; BRYN ; WIRKOWSKA; KOWALSKI, 2006).

A Tabela 2.3 relaciona alguns exemplos de estudos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais, sob diferentes condições reacionais.

Tabela 2.3. Exemplos de estudos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais, empregando diferentes condições reacionais.

Lipase	Óleo vegetal	Reator	Condições reacionais	Referência
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme)				
<i>Rhizopus delemar</i> imobilizada em Celite	Óleo de Girassol enriquecido com ácido oléico	Frascos agitados	Agitação de 100 rpm Temperatura de 60°C.	FOGLIA; PETRUSO; FEAIRHELLER, 1993
<i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em AcureLEP 100	Óleo de Soja			
<i>Rhizopus arrhizus</i> imobilizada por adsorção em polipropileno	Óleo de Canola	Frascos agitados	Temperatura de 50°C Razão molar gordura: óleo (8:2)	ROUSSEAU; MARANGONI, 1999
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM)	Estearina de Palma “mole” e “dura”	Frascos agitados	Agitação de 250 rpm, Temperatura de 60-70C Proporções reacionais conforme Planejamento de mistura com três componentes	NOR HAYATI; AMINAH; MAMOT, 2000
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus javanicus</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp <i>Candida rugosa</i> .	Estearina de palma	Frascos agitados	Agitação de 200 rpm, Meio sem solvente, Temperatura de 60°C. Razão molar gordura: óleo (6:4)	LAI et al., 2000
Todas imobilizadas em Celite				

Tabela 2.3. Exemplos de estudos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais, empregando diferentes condições reacionais (**Contin.**).

<i>Rhizomucor miehei</i> (células integras não viáveis)	Oleína de palma	Fracos agitados	Agitação de 200 rpm, Temperatura de 60°C,	LIEW et al., 2001a
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)			Razão molar óleo: gordura: (7:3), (6:4) e (5:5)	
<i>Rhizomucor miehei</i> ligada ao mycelium	Oleína de Palma	Fracos agitados	Agitação de 200 rpm, Temperatura de 60°C Razão Molar óleo: gordura (7:3)	LIEW et al., 2001b
<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Óleo de Colza	A reação em batelada foi realizada em frascos agitados e a reação contínua foi realizada em um reator de leito empacotado	Reação em batelada: agitação de 400 rpm, na temperatura de 50°C.	RONNE et al., 2005
<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> imobilizada em Accurel EP100			Reação contínua: temperatura de 60°C.	
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM- IM)			Razão Molar gordura: óleo: (7:3)	
<i>Candida antarctica</i> (Novozym® 435)				
<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i> (Lipase PS-C-I)				
<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i> (Lipase PS-D-I)				
<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Óleo de Colza	Reator de leito empacotado	Temperatura de 70°C Razão Molar gordura: óleo: (7:3)	ZHANG; MU; XU, 2006

Existem diferentes óleos vegetais disponíveis para a interesterificação com gordura do leite. A seleção do óleo a ser empregado relaciona-se as propriedades físicas, nutricionais e sensoriais desejáveis conferidas ao produto interesterificado final, que por sua vez são função da composição em ácidos graxos dos óleos vegetais. A Figura 2.12 (GREEN, 2008) mostra a composição percentual de diferentes óleos e gorduras em termos de teor de gordura saturada, monoinsaturada e ácidos graxos essenciais (linoleico e linolênico).

Figura 2.12. Comparação do grau de insaturação de alguns óleos e gorduras empregados no setor de alimentos (GREEN, 2008).

A análise da Figura 2.12 revela que o azeite de oliva e os óleos de canola, girassol, milho e soja possuem menos de 15% de gorduras saturadas em sua composição. Destes, os óleos de canola e soja apresentam quantidades significativas dos ácidos graxos essenciais, linoléico e linolênico, e gorduras insaturadas, as quais têm sido associadas com decréscimo no nível de colesterol no risco de doenças coronárias, bem como à diminuição na probabilidade de desenvolvimento de tumores (McGRADY, 1994).

No entanto, a seleção de um óleo vegetal também deve ser realizada em função do custo e de sua disponibilidade no mercado. A canola é a terceira oleaginosa mais produzida no mundo, superada apenas pela soja e palma. A introdução de cultivos de canola no Brasil aconteceu recentemente na região de Maringá, por iniciativa da Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá (COCAMAR), visando a produção de óleo desta planta (GALDIOLI et al., 2002). Portanto, para que a participação do óleo de canola no mercado seja aumentada, torna-se necessário incentivar a plantação e diminuir os custos de produção.

Com relação ao óleo de soja, este é bastante abundante no Brasil, em função do cultivo disseminado da soja. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, responsável por mais de um quarto da produção mundial e um terço das vendas globais da oleaginosa (Figura 2.13). O mercado da soja brasileira é caracterizado pela forte concentração do cultivo (90% na região centro-sul) e da comercialização (BOLETIM, 2009).

Figura 2.13. Evolução da produção brasileira de soja e participação na oferta mundial (BOLETIM, 2009).

Os maiores estados produtores de soja, em ordem decrescente, são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia e São Paulo. Somente os quatro primeiros respondem por 82% da produção nacional (SÍNTESE..., 2011). Além disso, de acordo com um estudo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sobre Projeções do Agronegócio Brasileiro (2010/11 – 2020/2021), produtos agrícolas de alto consumo interno tendem a ter aumento de produção, sobretudo por avanço tecnológico, e por ganhar mais mercado. Entre estes produtos, encontra-se a soja, cuja produção subirá cerca de 36% e a exportação em 39% (EM DEZ..., 2011).

A composição típica em ácidos graxos do óleo de soja é mostrada na Tabela 2.4 (FIRESTONE, 2006). Verifica-se que este óleo é rico em ácidos graxos insaturados, especialmente os essenciais linoléico e linolênico, ácidos graxos essenciais encontrados em folhas verdes e em sementes oleaginosas (FREITAS et al., 2006b). No óleo de soja, o ácido linoléico (ω -6) é o mais abundante. Conforme previamente discutido, estes dois ácidos possuem funções indispensáveis ao organismo humano, que é incapaz de produzi-los, tornando-se necessária a ingestão através de alimentos. Portanto, em função da

disponibilidade e do elevado teor de ácidos graxos essenciais, justifica-se a escolha do óleo de soja para a interesterificação com a gordura do leite.

Tabela 2.4. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) do óleo de soja.

Ácido Graxo	Óleo de Soja
Laurico C:12	0-0,1
Mirístico C 14:0	0-0,2
Palmítico C 16:0	9,7-13,3
Palmitoléico C16:1	0-0,2
Estearico C 18:0	3-5,4
Oléico C18:1	17,7-28,5
Linoléico C18:2	49,8-57,1
Linolênico C18:3	5,5-9,5
Araquídico C20:0	0,1-0,6
Gadoléico C20:1	0-0,3
Eicosadienóico C20:2	0-0,1
Behênico C22:0	0,3-0,7
Erúico C22:1	0-0,3
Lignocérico C24:0	0-0,4

2.2.4. Fatores que afetam a atividade das lipases e o rendimento da reação de interesterificação

Sabe-se que as condições reacionais, como tempo, quantidade de enzima, temperatura, teor de água e relação dos substratos, interferem diretamente no rendimento de uma reação enzimática. Em uma reação de interesterificação catalisada por lipases, diversos fatores devem ser considerados a fim de que a atividade do biocatalisador e o rendimento da reação sejam os melhores, sendo que os principais parâmetros são: pH, temperatura, conteúdo de água e quantidade de biocatalisador fornecida ao meio reacional (WILLIS; MARANGONI, 2008).

As lipases são cataliticamente ativas em pHs específicos, dependendo de sua origem e estado de ionização de seus sítios ativos. Em uma reação de interesterificação, se as lipases atuarem em um pH que esteja fora de sua faixa ótima de atuação, podem se tornar inativas rapidamente (WILLIS; MARANGONI, 2008).

A temperatura de reação também é importante e diferentes lipases podem ter faixas ótimas de temperatura diferentes. Em geral, o aumento da temperatura promove um

aumento do rendimento da reação. Porém, temperaturas muito elevadas podem reduzir o rendimento devido à desnaturação da enzima (WILLIS; MARANGONI, 2008).

A influência do teor de água é muito complexa na interesterificação catalisada por lipases. Sabe-se que a presença de água no meio é necessária para hidratação da proteína, a fim de que sua conformação e, conseqüentemente sua atividade, sejam mantidas (LAMBOURSAIN et al., 1996). Porém, conforme previamente discutido no item 2.2.2, a interesterificação de óleos e gorduras envolve reações seqüenciais de hidrólise e esterificação (re-síntese) dos triglicerídeos (MARANGONI, 2002; WILLIS; MARANGONI, 2008). Assim, se houver excesso de água, a interesterificação será desfavorecida em benefício da hidrólise, conduzindo à formação de mais subprodutos. Portanto, um teor ótimo de água deve ser determinado para uma determinada reação.

Outros fatores que afetam diretamente o rendimento de uma reação de interesterificação incluem razão molar do substrato, fonte e atividade da enzima, tempo de incubação e especificidade da enzima ao tipo de substrato e comprimento da cadeia (WILLIS; MARANGONI, 2008). Com relação à especificidade, as lipases apresentam diferentes comportamentos de reações na interesterificação de óleos e gorduras. Por exemplo, a síntese de lipídeos estruturados substitutos da manteiga de cacau empregam lipases 1,3-seletivas, enquanto a síntese de lipídeos estruturados enriquecidos com ácido oléico requer o uso de lipases ácido graxo específicas (GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003). Algumas limitações da interesterificação enzimática incluem o preço e a baixa estabilidade operacional das lipases (OSÓRIO; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2006). Portanto, visando-se contornar estes inconvenientes e obter reações com maior uniformidade tecnológica e viabilidade econômica, técnicas de imobilização devem ser empregadas.

2.3. Imobilização de enzimas

2.3.1. Definição e aspectos gerais

Enzimas imobilizadas são enzimas fisicamente confinadas numa certa região do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usadas repetida e continuamente, enquanto o sistema enzimático se mantiver ativo (DE CASTRO et al., 2008; ZANIN; MORAES, 2004; AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003).

O emprego de um sistema imobilizado permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador–produto, e o aumento da produtividade do processo (massa de substrato/massa de biocatalisador). Além disso, o processo de imobilização altera as propriedades catalíticas e físico-químicas da enzima em relação à sua forma solúvel, conferindo, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura (ZANIN; MORAES, 2004).

Independentemente da natureza, toda enzima imobilizada é composta por duas funções essenciais: as funções não-catalíticas, relacionadas à facilidade de separação do biocatalisador e meio reacional, e as funções catalíticas, relacionadas à conversão do substrato (CAO, 2005). A Figura 2.14 apresenta a relação entre essas funções (catalíticas e não-catalíticas) para uma enzima imobilizada, de acordo com a aplicação desejada.

Figura 2.14. Relação entre as funções catalíticas e não-catalíticas de uma enzima imobilizada, de acordo com a aplicação desejada (CAO, 2005).

A análise da figura mostra que a escolha dos parâmetros catalíticos e não-catalíticos do derivado imobilizado deve ser realizada de acordo com a aplicação que se deseja (CAO, 2005).

O desempenho de um derivado imobilizado é influenciado por diferentes fatores, os quais são apresentados na Tabela 2.5. Estes fatores influem no desempenho do suporte, na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa e de reação e, portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada (DE CASTRO et al., 2008).

Tabela 2.5. Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada.

Enzima	<p>Propriedades Bioquímicas: Massa molecular, grupos funcionais da superfície protéica, pureza (funções de inativação ou proteção das impurezas).</p> <p>Parâmetros Cinéticos: Atividade específica, perfil de pH e temperatura, parâmetros cinéticos para a ativação e inibição, estabilidade térmica, pH, solventes, contaminantes e impurezas.</p>
Suporte	<p>Características Químicas: Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química, contribuições da superfície do suporte, tais como: os micro-efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos).</p> <p>Características Mecânicas: Diâmetro do poro, comportamento de compressão, tamanho da partícula; área superficial; volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações em altas vazões para reatores de leito fixo; abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados.</p> <p>Características Morfológicas: Suportes não-porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial), estrutura de gel.</p>
Enzima Imobilizada	<p>Método de Imobilização: Fixação de proteína, eficiência da enzima ativa, parâmetros cinéticos intrínsecos.</p> <p>Efeitos de transferência de massa: Partição (diferente concentração do soluto dentro e fora das partículas do catalisador), difusão interna (poros) e externa.</p> <p>Estabilidade: operacional (expressa em tempo de meia-vida sob condições operacionais), estabilidade de estocagem.</p> <p>Desempenho: Produtividade (produto formado por unidade de atividade ou massa de enzima), consumo de enzima (e.g. unidades por kg de produto).</p>

FONTE: DE CASTRO et al. (2008)

Os principais métodos de imobilização são apresentados na Figura 2.15. Os mais utilizados são: adsorção física, ligação química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada. Apesar da grande diversidade, não há um método aplicável para todas as enzimas. Isto porque existem diferenças relacionadas às características e composição química das enzimas, diferentes propriedades de substrato e produto e à finalidade de aplicação do produto obtido (ZANIN; MORAIS, 2004). Seja qual for o método de imobilização, duas propriedades têm de ser

consideradas: a estabilidade no armazenamento e a estabilidade operacional. A estabilidade no armazenamento refere-se à capacidade de uma enzima manter a sua capacidade catalítica durante o período entre a produção e o seu uso. A estabilidade operacional descreve a manutenção da atividade catalítica da enzima durante a reação (DE CASTRO et al., 2008).

Figura 2.15. Principais métodos de imobilização de enzimas.

O método mais antigo e simples para a imobilização de biocatalisadores consiste na adsorção em suportes sólidos, sem qualquer modificação prévia da matriz ou do biocatalisador. A retenção do biocatalisador na matriz deve-se ao estabelecimento de interações fracas, do tipo forças de van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas ou pontes de hidrogênio. Para se aplicar este método de imobilização, basta se colocar o biocatalisador em contato com a matriz, em condições adequadas para a adsorção (pH, temperatura, força iônica). Este método, de custo reduzido, assegura a retenção elevada da conformação nativa da enzima e de sua atividade catalítica intrínseca. No entanto, sua aplicação é limitada devido à natureza reversível da ligação entre o biocatalisador e o suporte, que é fortemente influenciada pelas condições reacionais (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003).

Outro método de imobilização bastante estudado é o de ligação covalente entre a enzima e o suporte. Este método envolve o estabelecimento de ligações entre os resíduos dos aminoácidos das proteínas e os grupos reativos do suporte, originando biocatalisadores bastante estáveis, não se registrando qualquer remoção da enzima a partir do suporte numa vasta gama de condições operacionais. Todavia, sua aplicação é muitas vezes limitada devido ao custo elevado de algumas matérias primas, à complexidade de certos processos de imobilização e uma considerável perda de atividade catalítica. Isso porque, na formação das ligações covalentes entre a enzima e o suporte não deve haver qualquer envolvimento dos aminoácidos do sitio ativo da enzima, nem alteração da sua configuração nativa ou flexibilidade (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003).

A seleção de um procedimento de imobilização envolve a escolha do suporte e da ligação da enzima-suporte (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; MALCATA et al., 1992), uma vez que as propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte (DE CASTRO et al., 2008).

2.3.2. Seleção de suportes para imobilização

Os principais componentes de um sistema imobilizado são a enzima, o suporte e o método de imobilização. Destes, com exceção da enzima, a maior contribuição para o bom desempenho do biocatalisador é dada pelo suporte. A seleção do suporte é uma etapa essencial na implantação de um sistema reacional usando biocatalisadores imobilizados. Idealmente, a etapa de seleção da matriz de imobilização deverá considerar os dados relativos à estrutura e atividade do biocatalisador, ao método de imobilização escolhido e às condições processuais (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003). Isso porque, se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha errada pode afetar adversamente não só o tempo de meia-vida, mas o desempenho global do sistema (DE CASTRO et al., 2008).

Na seleção de um suporte para determinada aplicação devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. Um suporte sólido ideal deve possuir as seguintes propriedades: (i) contribuições da superfície do suporte como: pH, carga de superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, possibilidade de adsorver outras substâncias além das enzimas; (ii)

morfologia; (iii) composição e (iiii) resistência ao ataque microbiológico (DE CASTRO et al., 2008; ZANIN; MORAES, 2004).

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação. A resistência mecânica deve permitir o uso de filtração, centrifugação e agitação, pois o processo de imobilização e o uso repetido e contínuo, algumas vezes, requerem o emprego dessas operações. A estabilidade térmica é outra característica importante. Suportes com grande coeficiente de expansão podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetidos a variações de temperatura. Estas situações podem ocorrer quando se utiliza a imobilização em várias temperaturas, ou quando a enzima imobilizada é levada da situação de estocagem (normalmente em baixas temperaturas) diretamente às condições operacionais, ou vice versa (DE CASTRO et al., 2008).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido investigado para efetuar imobilização de lipases (VILLENEUVE et al., 2000). Alguns materiais citados na literatura como suportes para a imobilização de lipases são: polímeros polares como metacrilato de metila (BASRI et al., 1996), polímeros sintéticos anfifílicos como polietilenoglicol (HERNÁIZ; SÁNCHEZ-MONTERO; SINISTERRA, 1999) ou hidrofóbicos como o Accurel (AL-DURI; YONG, 1997) e suportes inorgânicos, como sílica de porosidade controlada (SOARES et al., 1999).

2.3.3. *Sílica-álcool polivinílico (SiO₂-PVA)*

Recentemente tem sido investigado o desenvolvimento de suportes híbridos orgânico-inorgânicos para imobilização de moléculas biológicas (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). De acordo com José e Prado (2005), híbridos orgânico-inorgânicos são materiais de grande interesse em aplicações comerciais devido às suas propriedades mecânicas, ópticas e térmicas, que combinam a estabilidade térmica e química dos materiais inorgânicos, com a processabilidade e a flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos. Esta combinação de propriedades pode ser variada pela modificação na proporção entre a parte orgânica e inorgânica no híbrido.

O processo sol-gel é a principal técnica de obtenção de matrizes híbridas para imobilização de moléculas biológicas. Este processo permite a síntese de uma rede

inorgânica e amorfa por uma reação química em solução e à baixa temperatura. Segundo Gill e Ballesteros (2000), consiste na hidrólise de um precursor, um alcóxido, por exemplo, seguida de polimerização e separação de fase para formar um óxido hidrogel hidratado. A secagem ou extração de água leva à remoção da fase líquida, produzindo um óxido xerogel poroso e seco. As reações de hidrólise e condensação são mostradas na Figura 2.16, na qual a etapa (1) corresponde à hidrólise e a (2) corresponde à policondensação do silano.

Figura 2.16. Reações de hidrólise e policondensação do silano (COELHO et al., 2003).

As vantagens desta técnica são a homogeneidade e pureza dos géis formados e temperatura de síntese relativamente baixa. A técnica sol-gel também é um excelente método para preparação de materiais híbridos. A baixa temperatura da síntese possibilita que espécies orgânicas ou inorgânicas sejam incorporadas em uma matriz rígida de óxido de silício sem que ocorra degradação. O composto resultante combina as propriedades físicas e químicas do material “hóspede” com uma excelente estabilidade óptica, térmica e química da matriz “hospedeira” de óxido de silício (LIMA-BARROS et al., 2002).

No Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) testou-se com sucesso uma nova matriz híbrida (sílica-álcool polivinílico, SiO₂-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO et al., 2005), *Candida rugosa* (BRAGA, 2005), *Candida antarctica* (FREITAS, 2006) e Pancreática (PAULA et al., 2007). Essa matriz combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliicidade e hidrofobicidade, capacidade tamponante, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (GILL; BALLESTEROS, 1998), bem como elevada atividade e estabilidade. Considerando esses resultados promissores, neste trabalho, utilizou-se como suporte o SiO₂-PVA para imobilização das lipases. É importante salientar ainda que, entre todas as

possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. O emprego desses biocatalisadores em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores.

2.4. Biorreatores com enzimas imobilizadas

2.4.1. Aspectos Gerais

Um reator ou biorreator enzimático pode ser definido como o equipamento no qual as enzimas imobilizadas são colocadas em contato com o substrato. Embora haja uma grande variedade de biorreatores, os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (KENNEDY; CABRAL, 1983; KENNEDY; ROIG, 1995). A seleção do reator mais apropriado para um dado bioprocessamento depende das características da conversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que irão determinar o modo de operação e as características do fluxo (Figura 2.17).

As características da bioconversão incluem as propriedades dos substratos/produtos (pontos de fusão e ebulição, solubilidade em água, estabilidade ao pH e temperatura); as características reacionais incluem pH, temperatura e controle da atividade da água, enquanto as características do biocatalisador incluem a localização da atividade enzimática (normalmente na fase aquosa, exceto para as lipases que são ativadas por interfaces) e os requisitos em água por parte do biocatalisador para manutenção da sua atividade catalítica.

Figura 2.17. Considerações importantes para seleção de um biorreator (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

2.4.2. Tipos de Biorreatores

Diversos são os tipos de reatores que têm sido relatados para uso com enzimas imobilizadas: reator de tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, do tipo “air-lift” (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009; WILLIS; MARANGONI, 2008) e de membranas (WILLIS; MARANGONI, 2008). Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo, sendo os principais representados na Figura 2.18.

Figura 2.18. Biorreatores para biocatalisadores imobilizados (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009).

A Tabela 2.6 apresenta uma classificação dos reatores com base em seu modo de operação e em suas características hidrodinâmicas (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

Tabela 2.6. Classificação dos reatores enzimáticos multifásicos em função do regime de operação e das características hidrodinâmicas (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

Modo de operação	Hidrodinâmica	Tipo de reator
Descontínuo	Mistura total	<i>Reator descontínuo com agitação</i>
	Fluxo tipo pistão	<i>Reator descontínuo com recirculação total</i>
Contínuo	Mistura total	<i>Reator contínuo com agitação</i>
		<i>Reator contínuo com agitação e com membrana de ultrafiltração</i>
	Fluxo tipo pistão	<i>Reator de leito fixo</i>
		<i>Reator de leito fluidizado</i>
		<i>Reator tubular</i>
		<i>Reator de membranas de fibras ocas</i>
		<i>Reator agitado com uma fase líquida</i>

Independentemente do biorreator, duas ou mais fases estão invariavelmente presentes - uma fase sólida (isto é, o suporte no qual a enzima está imobilizada) e uma ou duas fases líquidas, podendo haver fase gasosa. A seguir, são apresentadas as características de algumas configurações dos principais biorreatores.

2.4.3. Reatores de tanque agitado (STR)

Reatores de tanque agitado são os mais empregados em processos industriais (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007) e processos em que os biocatalisadores são imobilizados em hidrogéis ou em superfícies sólidas porosas (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). Além disso, este é o sistema mais comumente empregado em experimentos de laboratório com enzimas imobilizadas para interesterificação devido à simplicidade e baixo custo (WILLIS; MARANGONI, 2008), sendo responsável por mais de 75% dos sistemas descritos na literatura (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Podem ser operados em modo descontínuo, semi-contínuo ou contínuo (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007), podendo ser alcançadas boas condições de mistura (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). Neste tipo de reator, o agitador desempenha várias funções: auxilia a transferência de massa e de calor, agita e homogeniza o meio e as suspensões (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007).

A força aplicada pelo agitador produz movimento ao meio reacional e consequentemente a circulação, distribuição e mistura de todos os componentes. Os padrões de circulação provocados pelo agitador são de dois tipos fundamentais

dependendo do sentido radial ou axial impresso ao líquido pelo impulsor (Figura 2.19). No primeiro caso o padrão de circulação do líquido é compartimentado, enquanto no segundo caso, o líquido segue um circuito mais longo e não compartimentado (ALVES et al., 2007).

Figura 2.19. Padrões de circulação em um tanque com agitação mecânica: (a) agitador de fluxo radial; (b) agitador de fluxo axial (ALVES et al., 2007).

Reatores STR são constituídos de um vaso no qual a mistura dos reagentes é efetuada por meio de agitação mecânica (barra magnética, pás de agitação) de tal forma que são evitados a formação de gradientes de temperatura e concentração (Figura 2.18). A lipase imobilizada é separada do meio reacional no final da reação por filtração ou centrifugação. Tais processos de separação geralmente provocam perdas das partículas de catalisadores, bem como a desativação parcial da enzima imobilizada. Quando operados em modo batelada - BSTR, nenhuma adição ou remoção de reagentes ou produtos é feita, exceto nos estágios iniciais e finais da reação (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). Neste caso, as principais desvantagens incluem a existência de tempos mortos de operação, relativos à carga, descarga e limpeza do sistema (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; ZANIN, 1989), além de tornar alguns suportes susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (SANTOS et al., 2003; SANTOS, 2005; WATANABE et al., 2004), desvantagem esta que ocorre também quando o reator é operado em modo contínuo - CSTR (WILLIS; MARANGONI, 2008). Este último inconveniente pode ter seus efeitos diminuídos com o isolamento do sistema imobilizado em uma cesta adaptada no interior do reator de tanque agitado (ABELYAN e ABELYAN, 1996, CARVALHO et al., 2003), ou mesmo em um cesto formando as pás do agitador ou chicanas do reator (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

2.4.4. Reatores de leito fixo (PBR)

O leito fixo é o tipo de reator mais utilizado quando estão envolvidas enzimas imobilizadas (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007) e operam principalmente em modo contínuo (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003): o biocatalisador é mantido no interior do reator, enquanto substrato e produto são bombeados, respectivamente, para dentro e fora do reator (WILLIS; MARANGONI, 2008). Neste caso, uma bomba é requerida para manter o fluxo constante através do leito, além de uma camisa de aquecimento, para manutenção da temperatura de reação (WILLIS; MARANGONI, 2008).

Têm sido tradicionalmente usados para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido ao baixo custo, facilidade de construção e operação (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; WILLIS; MARANGONI, 2008) e alta produtividade volumétrica (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). Estes reatores requerem um mínimo de equipamentos auxiliares e são muito eficientes. Neste caso, as tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado seriam menores e, segundo Zanin (1989), um reator ideal deste tipo operaria, ao contrário do STR, como um reator tubular. Isto, mesmo em reatores não ideais, resulta em altas taxas de conversão no reator. Além disso, a interesterificação em reatores de leito fixo pode levar ao aumento da formação de produtos através do aumento do tempo espacial no reator.

Estes reatores são mais eficientes do que reatores do tipo STR, porém são mais propensos a problemas de entupimento e compressão. Sua aplicação é limitada pelo tipo de substrato (viscoso, coloidal, partículas sólidas em suspensão) e a forma do biocatalisador imobilizado (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003). Muitas vezes torna-se necessária a dissolução da matéria-prima em um solvente orgânico, visando-se reduzir sua viscosidade, para o fluxo no interior do reator seja mantido (WILLIS; MARANGONI, 2008). Isso porque, devido à baixa velocidade de circulação de fluido, a resistência à transferência de massa e calor é elevada (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007).

De acordo com Willis e Marangoni (2008), o tempo espacial (τ) de um PBR pode ser calculado de acordo com a Equação 2.1:

$$\tau = \frac{V_{\text{tot}} \cdot P}{Q} \quad (2.1)$$

em que: V_{tot} = volume do reator; P = porosidade do leito; Q = taxa de fluxo do substrato

Uma observação adicional é que a porosidade do derivado imobilizado empregado em um reator de leito fixo pode promover limitações internas de transferência (WILLIS; MARANGONI, 2008).

2.4.5. *Reatores de leito fluidizado*

Reatores de leito fluidizado constituem uma tentativa de se atenuar os problemas apresentados pelo leito fixo, relacionados à dificuldade de se obter uma boa mistura. De fato, como se pode efetuar a fluidização do leito com um líquido, gás ou uma mistura de ambos, os reatores de leito fluidizado apresentam melhores condições de mistura e características de transferência de massa e calor, com quedas de pressão mínimas (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007).

Esse tipo de reator é uma modificação do PBR, na qual a enzima imobilizada é mantida suspensa por um fluxo ascendente de substrato, sob alta vazão (WILLIS; MARANGONI, 2008), conforme previamente mostrado na Figura 2.18. Neste caso, a taxa de cisalhamento é bastante reduzida se comparada aos reatores com agitação mecânica (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). As vantagens do leito fluidizado incluem a eliminação da formação de caminhos preferenciais, menor alteração da pressão quando altas vazões de alimentação são empregadas, e não formação de gradientes de concentração (WILLIS; MARANGONI, 2008). Além disso, a diferença de densidade entre as fases sólida e fluida deve ser a maior possível de forma a permitir velocidades elevadas de circulação de fluido que, por sua vez, vão melhorar as condições de mistura, transferência de calor e massa no interior do reator (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007).

A maior desvantagem dos reatores de leito fluidizado é a menor quantidade de enzima que pode ser empregada em relação ao PBR, uma vez que um grande volume livre é requerido para manter enzima e suporte suspensos (WILLIS; MARANGONI, 2008). No entanto, o desempenho destes biorreatores é melhor do que os do tipo PBR. Isso porque,

provavelmente, parte da atividade enzimática disponível no leito fixo não está em contato com o substrato devido à formação dos caminhos preferenciais e à oclusão da superfície do leito pelo contato partícula-partícula ou partícula-parede do reator (OSÓRIO et al., 2009).

Outras configurações de reatores que podem ser empregados com enzimas imobilizadas incluem os de membrana, que são bastante atraentes para reações de interesterificação (WILLIS; MARANGONI, 2008). As vantagens desta configuração incluem a redução dos níveis de pressão, alto efeito difusional, alta estabilidade química e alta área superficial da membrana, por volume de meio (WILLIS; MARANGONI, 2008). As membranas são comumente produzidas na forma de feixe de fibras, podendo ser de natureza hidrofílica ou hidrofóbica. Os materiais mais utilizados para confecção destas membranas incluem: polipropileno, polietileno, náilon e resinas acrílicas (WILLIS; MARANGONI, 2008).

2.4.6. Escolha do biorreator para uso com enzimas imobilizadas

A escolha do tipo de reator a ser empregado em determinado processo esta relacionada à forma e as características do derivado imobilizado, além de determinados requisitos operacionais. A agitação por meios mecânicos torna os reatores de tanque agitado particularmente adequados ao processamento de substratos coloidais ou insolúveis e de fluidos viscosos que são incompatíveis com a operação em reatores de leito fixo, que apresentam problemas de transferência de massa em tais situações (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003). Reatores de tanque agitado têm a desvantagem de desintegrar o suporte devido à agitação mecânica e, portanto apenas preparações mecanicamente resistentes podem ser empregadas em reatores agitados. Quando suportes de imobilização possuem dimensões muito pequenas (por exemplo: diâmetro inferior a 300 μm), não podem ser empregados em reatores de leito fixo, uma vez que a perda de carga ao longo do reator é muito elevada e, particularmente quando se opera em fluxo descendente, pode ocorrer a compactação do leito (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

Vários dos problemas que ocorrem com leito fixo podem ser solucionados empregando-se reatores de leito fluidizado, que proporciona um grau de mistura intermediário entre os reatores agitados e os de leito fixo. Num reator de leito fluidizado, o fluxo ascendente do meio reacional passa através do leito de partículas com velocidades suficientemente elevadas, de modo que as partículas ficam suspensas no meio do líquido

sem serem arrastadas para fora do reator. As velocidades lineares de fluido que são atingidas permitem minimizar os efeitos de transferência de massa externos que podem se fazer presentes em reatores de leito fixo ou em casos em que se utiliza agitação suave (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

Para desenvolvimento deste trabalho selecionou-se o estudo das seguintes configurações de reator: tanque agitado, coluna com leito fixo e leito fluidizado. No caso do uso do STR, foram desenvolvidos experimentos de otimização das condições operacionais para geração de dados comparativos com os obtidos no reator de coluna. Avaliou-se ainda o emprego de cestas no interior do reator de tanque agitado, como estratégia para o isolamento do sistema imobilizado de possíveis efeitos danosos devidos ao contato com as partes mecânicas do agitador. Fez-se uma comparação dos resultados obtidos empregando-se cada uma das configurações de reatores avaliadas.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Enzima

Todos os experimentos foram efetuados com a lipase microbiana de *Rhizopus oryzae* (Lipase L036P, Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra). A estabilização da lipase foi efetuada por imobilização em suporte híbrido (sílica-álcool polivinílico; SiO₂-PVA). Também foi utilizada a lipase comercial Novozym® 435 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark).

3.1.2. Substratos

Azeite de oliva comercial (baixa acidez) foi utilizado para determinação da atividade hidrolítica. Como matérias-primas foram utilizadas: gordura de leite obtida a partir de fusão completa de manteiga comercial (Aviação, sem sal; Mimosa, sem sal), adquirida no mercado brasileiro ou em Portugal; óleo de soja comercial (Liza Tipo 1 Extra; Óleo de soja refinado, Sovena Portugal Consumer Goods, S. A), adquirido no mercado brasileiro ou em Portugal.

3.1.3. Outros materiais e reagentes

O suporte foi preparado pela técnica sol-gel, empregando como precursor Tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). Os outros reagentes utilizados foram: Heptano p.a. e Hexano p.a. (Reagen Chemical Co, São Paulo, Brasil); Acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha); Etanol comercial; corante lipossolúvel azul CI 61554 (Fortinbras Comercial e Industrial Ltda., Jaguariuna, SP); goma arábica em pó pura e Polietilenoglicol – PEG-1500 ambos da marca Synth, metaperiodato de sódio p.a. (Nuclear, Brasil) e, como padrão cromatográfico, a manteiga padrão CRM-519 adquirida da empresa SOVEREIGN (Sovereign Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.2. Equipamentos

A Tabela 3.1 apresenta os equipamentos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos descritos.

Tabela 3.1. Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Medidas de pH	pHmetro	Modelo TEC 2 (TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil)
Imobilização das lipases	Banho termostatizado com agitação	Modelo 145, Marconi (MARCONI, Piracicaba/SP, Brasil)
Atividade hidrolítica	Titulador automático	Modelo 794 BASIC TITRINO, Metrohm (Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo/SP, Brasil)
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí / MG, Brasil)
Atividade de água	Aparelho de A_w	Rotronic HygrosKop DT (Rotronic Instrument Co., Switzerland)
Agitação	Agitador magnético	Modelo 735, FISATON, (FISATON Equipamentos Científicos Ltda.)
Separação da gordura de leite	Centrífuga	Excelsa II Modelo 206 BL, FANEM (FANEM Ltda., São Paulo, Brasil)
Composição em TAGs	Cromatógrafo a gás	Hermle Z383K (Labortechnik, Germany) Modelo GC-3800 VARIAN (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA);
Condicionalmento das amostras para análise de textura	Estufa de temperatura controlada	Tipo B.D.O. (Adamo Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
Textura (Consistência)	Analizador de Textura	WTC-Binder KB 115 (BINDER GmbH Tuttlingen, Germany) Modelo QTS-25 Brookfield (Brookfield Engineering Laboratories, Inc, Middleboro, MA, USA)
Aquecimento	Cabeça de aquecimento	TA XT Plus, Texture Analyser (Dias de Souza LTDA, Instrumental - Analítica e Científica, Porto, Portugal)
Análises colorimétricas	Espectrofotômetro	Julabo, MODELO ED (Julabo Labortechnik, Germany) UV-Visível modelo Modelo Cary 50 Conc. Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA)
Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	Calorímetro Exploratório Diferencial	Unicam UV-VIS Spectrometer UV 4 (ATA UNICAM, Cambridge, UK)
Análises de reologia	Reômetro	SII Nanotechnology - Seiko, Modelo 6220 (SII NanoTechnology USA Inc., Northridge, U.S.A) RS 75 Rheostress Haake (Dias de Souza LTDA, Instrumental - Analítica e Científica, Porto, Portugal)

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Separação da gordura de leite

Para a separação da gordura de leite, a manteiga comercial foi fundida em forno micro-ondas (50-60°C). Durante a fusão, a amostra foi homogeneizada a cada 10s e a temperatura foi medida para não ultrapassar a faixa desejada. Em seguida a amostra foi mantida em banho de glicerina (50°C), para a decantação da fase aquosa (parte inferior branca). A amostra foi então centrifugada a 2136g por 10 min, sendo o sobrenadante (fase gordurosa) separado. A gordura de leite obtida foi armazenada em frascos de vidro com tampa, sob -18°C, para posterior utilização.

3.3.2. Obtenção da matriz de imobilização

O suporte (sílica-álcool polivinílico; SiO₂-PVA) foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2010), pela mistura de 50 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 50 mL de etanol e 60 mL de uma solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição de 1 mL de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a temperatura ambiente por 48 h até a completa solidificação (formação da rede interpenetrada SiO₂-PVA). O suporte obtido foi então triturado e peneirado até que passasse em peneira padrão série Tyler de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH.

3.3.3. Ativação do suporte com metaperiodato de sódio

Para a imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* por ligação covalente, o suporte foi ativado de acordo com a metodologia descrita por Paula et al. (2010), conforme segue: o suporte (SiO₂-PVA) foi suspenso numa solução aquosa 0,5 M de metaperiodato de sódio, na proporção de 1 g de suporte: 10 mL NaIO₄. A mistura foi mantida sob agitação durante 90 min a temperatura ambiente, na ausência de luz. Em seguida, o suporte foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada e tampão fosfato pH 8,0. Após a lavagem, o sólido foi levado à estufa (60°C) por 24 h, para então ser utilizado no procedimento de imobilização.

3.3.4. Neutralização do suporte com hidróxido de potássio

Para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* por adsorção física, o suporte (sílica-álcool polivinílico; SiO₂-PVA) foi previamente neutralizado, conforme segue: o sólido foi suspenso numa solução aquosa 0,1 M de hidróxido de potássio, sendo em seguida filtrado sob vácuo e lavado com tampão fosfato (pH 7,0) e água destilada, medindo-se o pH da água de lavagem até pH neutro. Após a lavagem, o suporte foi levado à estufa (60°C) por 24 h, para então ser utilizado no procedimento de imobilização.

3.3.5. Imobilização da lipase

O suporte (ativado ou neutralizado) foi embebido em hexano (1 g:10 mL), sendo mantido sob agitação em temperatura ambiente durante 2h. Após este período, ao suporte foi então adicionado PEG 1500 e lipase de *R. oryzae* na proporção de 250 mg de enzima:1g suporte: 200 µL de solução aquosa de PEG (0,5 mg/mL). A lipase imobilizada foi mantida em geladeira por 24h e após este período foi recuperada por filtração à vácuo, com posterior lavagem com hexano. Na sequência, os derivados imobilizados foram submetidos a condição de alto vácuo, em um dessecador, sob a presença de pentóxido de fósforo, com o objetivo de reduzir a umidade. A atividade hidrolítica e umidade de todos os derivados imobilizados foram determinadas utilizando as técnicas descritas nos itens 3.4.1 e 3.4.3, respectivamente. Os valores médios da atividade hidrolítica (em azeite de oliva), teor de umidade e rendimento de imobilização obtidos para os derivados imobilizados por ligação covalente ou adsorção física encontram-se no APÊNDICE A.

3.3.6. Estabelecimento das condições reacionais para interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: reatores operando em modo batelada

Foi avaliada a influência das seguintes variáveis: teor de gordura de leite (%), quantidade de enzima imobilizada (% m/m) por grama de meio reacional, umidade do sistema imobilizado (%) e temperatura da reação. Todas as reações foram catalisadas por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente. As reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja foram realizadas em reatores encamisados cilíndricos de vidro (80 mL), carregados com 40 g de meio reacional. Os

reatores foram mantidos sob agitação magnética (500 rpm), em atmosfera inerte de nitrogênio, ao abrigo da luz, por um período máximo de 48h. A Tabela 3.2 apresenta a sequência experimental utilizada para o estabelecimento das condições reacionais da reação de interesterificação.

Tabela 3.2. Sequência experimental utilizada para o estabelecimento e otimização das condições reacionais da reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.

Condição reacional empregada Condição reacional avaliada	Teor de gordura de leite (%)	*Porcentagem de enzima imobilizada (%)	Umidade do derivado imobilizado (%)	Temperatura (°C)
1. Teor de gordura de leite (%)	50 65 80 100	20	10	45
2. Porcentagem (%) de enzima imobilizada *	Selecionado em 1	5 10 15 20 30	10	45
3. Umidade do derivado imobilizado (%)	Selecionado em 1	Selecionado em 2	5 10 20	45
4. Temperatura (°C)	Selecionado em 1	Selecionado em 2	Selecionado em 3	45 50 60

* em relação à massa total de meio reacional

O progresso das reações foi acompanhado pela determinação do teor de ácidos graxos livres, da composição em triacilgliceróis (TAGs) e da consistência dos produtos interesterificados.

3.3.7. Interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: influência do tempo de reação nas propriedades do produto

As reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja foram realizadas em reatores encamisados cilíndricos de vidro (80 mL), carregados com 40 g de meio reacional. Os reatores foram mantidos sob agitação magnética (500 rpm), em atmosfera inerte de nitrogênio, ao abrigo da luz, por 48h. As condições experimentais

empregadas nesta etapa do trabalho foram 65% (m/m) de gordura de leite, 35% (m/m) de óleo de soja, 500 unidades de atividade por grama de meio reacional, 10% de umidade no sistema imobilizado e temperatura reacional de 45 °C. Todas as reações foram catalisadas por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente. O progresso das reações foi acompanhado pela determinação do teor de ácidos graxos livres, da composição em triacilgliceróis (TAGs) e da consistência dos produtos interesterificados. Uma foto ilustrativa da montagem do sistema é apresentada na Figura 3.1.

Figura 3.1. Foto ilustrativa do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja para avaliar a influência do tempo de reação nas propriedades do produto.

3.3.8. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, em reator de tanque agitado tipo cesta

As reações de interesterificação da gordura de leite (65%) com óleo de soja (35%) foram conduzidas em um reator encamisado, cilíndrico, de vidro (300 mL, diâmetro de 7 cm e altura de 8 cm), carregado com 200 g de meio reacional, sob atmosfera inerte (N₂), ao abrigo da luz, por 12h, na temperatura de 45 °C. Foram adaptadas cestas ao reator, sendo um sistema com cesta lateral, conforme representado esquematicamente na Figura 3.2, e um sistema com cesta central, conforme representado esquematicamente na Figura 3.3. As cestas foram construídas em aço inox, possuindo em seu interior redes de 200 Mesh para a retenção do derivado imobilizado. Nas Figuras 3.4 e 3.5 são apresentadas fotos das cestas lateral e central, respectivamente, a fim de facilitar a compreensão da configuração do sistema reacional.

Figura 3.2. Representação esquemática do reator de tanque agitado com adaptação de cesta lateral.

Figura 3.3. Representação esquemática do reator de tanque agitado com adaptação de cesta central.

Figura 3.4. Foto ilustrativa da cesta lateral utilizada para retenção do derivado imobilizado: (a) vista frontal; (b) vista superior.

Figura 3.5. Foto ilustrativa da cesta central utilizada para retenção do derivado imobilizado: (a) vista frontal; (b) vista superior.

Durante o processo, o meio foi submetido à agitação mecânica de 500 rpm para o sistema com cesta lateral, no qual o tipo de agitador empregado foi turbina com pá plana, sendo que uma agitação de 700 rpm foi utilizada na configuração com cesta central, na qual o agitador foi do tipo hélice. Foram fornecidas 500 unidades de atividade por grama de meio reacional e o teor de umidade do derivado imobilizado foi de 10%. As reações foram catalisadas por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente. O progresso das reações foi acompanhado pela determinação do teor de ácidos graxos livres, da composição em triacilgliceróis (TAGs) e da consistência dos produtos interesterificados

3.3.9. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado, por ligação covalente, foi verificada em reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, de acordo com metodologia descrita anteriormente (item 3.3.8), com um tempo de 6 h para cada batelada. Todas as reações foram efetuadas empregando-se a cesta na configuração central. Entre as bateladas, o derivado imobilizado foi inicialmente mergulhado em um béquer com hexano (150 mL), sendo em seguida lavado por 3 vezes consecutivas com 50 mL deste mesmo solvente, a fim de remover completamente os resíduos do meio reacional provenientes de bateladas anteriores. Após a lavagem, a cesta central contendo o derivado imobilizado foi mantida sob vácuo por 30 min, permanecendo no dessecador até o início da próxima batelada.

3.3.10. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reatores operando em modo contínuo

3.3.10.1. Reações em Leito Fixo

Foi realizado um total de quatro reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, operando em modo contínuo. As reações foram catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae*, imobilizada em suporte SiO₂-PVA por adsorção física. A Tabela 3.3 apresenta as principais condições reacionais empregadas em cada uma

das reações. As reações 1 e 2 foram realizadas no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), enquanto as reações 3 e 4 foram realizadas nos laboratórios do Centro de Engenharia de Biosistemas-CEER, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. Todas as reações foram efetuadas na temperatura de 45 °C e a umidade dos derivados imobilizados de 10%.

Tabela 3.3. Condições reacionais das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo.

Reação	Gordura de leite:óleo de soja (% m/m)	Tempo de operação (dias)	Tempo espacial	Dimensões do Reator de coluna	Fonte de gordura	Massa de biocatalisador (g)
1	65:35	16	4h, 2h, 1h, ½ h	Altura (cm): 20	Manteiga da marca Aviação	23,4
2	65:35	14	4h	Diâmetro interno (cm): 1,5	Manteiga da marca Aviação	23,4
3	65:35	21	12 min	Altura (cm): 20	Manteiga da marca Mimosa	7,6
4	80:20	14	37 min	Diâmetro interno (cm): 2,0	Manteiga da marca Mimosa	25,0

3.3.10.2. Reações em Leito Fluidizado

Foram realizadas duas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fluidizado, operando em modo contínuo. A Tabela 3.4 apresenta as principais condições reacionais empregadas em cada uma delas, que foram efetuadas nos laboratórios do Centro de Engenharia de Biosistemas-CEER, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. Nesta etapa do trabalho, o meio reacional foi composto de 65% (m/m) de gordura de leite, 35% (m/m) de óleo de soja e a temperatura empregada foi 45 °C. A reação catalisada por lipase comercial Novozym® 435 foi efetuada sem recirculação. Empregando-se a lipase L036P imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, utilizou-se uma vazão de recirculação de 6,8 mL/min. Um esquema de ambos os procedimentos é apresentado nas Figuras 3.6 (sem recirculação, Novozym® 435) e 3.7 (com recirculação, L036P imobilizada em SiO₂-PVA). O progresso

das reações foi acompanhado pela determinação do teor de ácidos graxos livres, da composição em triacilgliceróis (TAGs), dos produtos de oxidação, do conteúdo de gordura sólida e da consistência dos produtos interesterificados.

Tabela 3.4. Condições reacionais das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fluidizado.

Reação	Lipase	Tempo de operação (dias)	Tempo espacial (min)	Dimensões do Reator de coluna	Fonte de gordura	Massa de biocatalisador (g)
1	Novozym® 435	7	37	Altura (cm): 20	Manteiga da marca Mimosa	7,6
2	L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA	7	50	Diâmetro interno (cm): 2,0	Manteiga da marca Mimosa	24,5

Figura 3.6. Esquema ilustrativo do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, sem recirculação: (1) resistência de aquecimento; (2) cuba com água; (3) tanque de alimentação de mistura reacional; (4) bomba peristáltica; (5) reator de coluna; (6) tanque de armazenamento de produto.

Figura 3.7. Esquema ilustrativo do sistema reacional empregado nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja: sistema contínuo, com recirculação: (1) resistência de aquecimento; (2) cuba com água; (3) tanque de alimentação de mistura; (4) tanque de recirculação; (5) e (6) bombas peristálticas; (7) reator de coluna; (8) tanque de armazenamento de produto.

3.3.11. Distribuição de Tempo Residência (DTR)

A Distribuição do Tempo de Residência foi determinada através da concentração no fluxo de saída, para teste de traçador tipo pulso. Este teste foi realizado nos reatores de leito fixo e fluidizado, empregando-se lipase *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em SiO₂-PVA, por adsorção física, previamente desnaturada em estufa (100 °C, 2h). A Tabela 3.5 apresenta os valores da massa de biocatalisador utilizado em cada teste, a vazão empregada e o respectivo tempo espacial. Como traçador utilizou-se corante lipossolúvel azul CI 61554 (Fortinbras Comercial e Industrial Ltda., Jaguariuna, SP) na concentração de 8,5% em mistura reacional (65 % gordura de leite, 35% óleo de soja), sendo que este foi injetado com o auxílio de uma seringa contendo 1mL da mistura. O reator foi alimentado meio reacional (65 % gordura de leite, 35% óleo de soja), sendo retiradas amostras na saída do mesmo em intervalos de tempos determinados, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção de traçador. A concentração do corante presente foi dosada através da leitura da absorbância a 650 nm. Os resultados obtidos foram plotados como concentração de traçador (mg/mL) em função do tempo (segundos) e usados para a determinação da DTR.

Tabela 3.5. Condições reacionais empregadas nos ensaios para determinação da Distribuição do Tempo de Residência.

Reator	Meio reacional (gordura de leite: óleo de soja)	Massa de biocatalisador (g)	Vazão empregada (mL/min)	Tempo espacial (min)
Leito Fixo	65:35	23,5	0,1893	124,2
Leito Fluidizado	65:35	14,6	0,8108	87,0

3.3.12. Velocidade mínima de fluidização

A velocidade mínima de fluidização foi obtida conforme Zanin (1989). Os ensaios foram conduzidos pelo preenchimento do reator de leito fluidizado (descrito a seguir) com meio reacional 65:35 (gordura de leite: óleo de soja) empacotado com suporte sílica-álcool polivinílico neutralizado (sem enzima imobilizada). A vazão da bomba de recirculação foi gradativamente aumentada até seu máximo valor e, em seguida, gradativamente diminuída, sendo anotados os valores de altura de leito correspondentes a cada vazão. A vazão de recirculação foi medida por método direto, ou seja, cronometrando-se o tempo necessário para que a bomba preenchesse um determinado volume em uma proveta. A altura de leito foi medida usando-se uma escala graduada em mm. A velocidade mínima de fluidização foi calculada a partir de dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do líquido, aos quais ajustou-se a correlação de Richardson e Zaki (1954), citados por Zanin (1989), Equação 3.1.

$$\frac{U}{U_{tc}} = \varepsilon^n \quad (3.1)$$

em que: U... velocidade superficial do fluido; U_{tc} ... velocidade terminal corrigida da partícula, sendo $\log(U_{tc}) = \log(U_t) - dp/di$, onde U_t é a velocidade terminal da partícula, dp é o diâmetro médio da partícula e di é o diâmetro interno da coluna; n... coeficiente de expansão; ε ... porosidade do leito

A porosidade do leito foi calculada através da Equação 3.2.

$$\varepsilon = \frac{(V_t - V_s)}{V_t} = 1 - \frac{M_s}{(\rho_c \cdot A \cdot H)} \quad (3.2)$$

em que: V_t ... volume total do reator; V_s ... volume do leito de partículas sólidas; M_s ... massa de partículas sólidas; ρ_c ... densidade cristalina da partícula; A ... área do reator atravessada pelo fluido; H ... altura do leito.

A área (A) utilizada para o cálculo da porosidade do leito foi correspondente à área da seção transversal do reator atravessada pelo fluxo ascendente de líquido na região ocupada pelo leito. Considerou-se como velocidade mínima de fluidização a velocidade superficial do fluido na equação de Richardson e Zaki (1954) para a qual a porosidade do leito corresponde à altura do leito com velocidade superficial de fluido nula.

A densidade cristalina foi determinada em balão volumétrico de 10 ou 5 mL. Em uma primeira etapa, calibrou-se o balão o qual, previamente tarado, foi preenchido com água destilada, medindo-se a massa do sistema. Em seguida, mediu-se a temperatura da água e com valores tabelados da densidade (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004), calculou-se o volume real de líquido no balão. Na segunda etapa, visando-se a determinação da densidade, esvaziou-se o balão volumétrico, colocou-se uma massa conhecida de partículas em seu interior e adicionou-se água destilada. O sistema foi mantido sob vácuo, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O volume do balão foi completado com água destilada, medindo-se a massa do sistema. Novamente, com os dados de temperatura de densidade da água, calculou-se o volume real. Fazendo-se a diferença entre os volumes do balão com água destilada e do balão com água e enzima imobilizada, obteve-se o volume de sólido. A densidade pôde então ser calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos.

3.3.13. Isotérmicas de equilíbrio do teor de água (30°C)

As isotérmicas de equilíbrio foram obtidas para a Novozym® 435 e para a lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em SiO₂-PVA, por adsorção física. Para tal, se pré-equilibraram os biocatalisadores com a fase vapor de soluções supersaturadas de sais com

diferentes valores de a_w (Tabela 3.6). Cada solução foi mantida em estufa de vácuo, a 30°C, por um período de 48h, medindo-se então o valor de A_w das lipases imobilizadas em um sensor de umidade (ROTRONIC HYGROSCOPIC DT). Em seguida, foram determinados os teores de umidade residual por secagem em estufa, a 101°C, até massa constante. Com os valores obtidos, traçaram-se as isotérmicas em base seca e base úmida para cada biocatalisador.

Tabela 3.6. Valores de atividade de água teóricos de cada uma das diferentes soluções salinas.

Solução salina saturada	A_w teórica
Cloreto de Lítio	0,1128
Cloreto de Magnésio	0,3244
Carbonato de potássio	0,4317
Nitrato de magnésio	0,5140
Brometo de Potássio	0,5603
Cloreto de Sódio	0,7509
Sulfato de amonio	0,8063
Nitrato de potássio	0,9231

3.4. Métodos de Análise

3.4.1. Dosagem de Atividade Hidrolítica

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite : água) e 4 mL de pH tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, a 37°C por 10 minutos, em banho termostatizado com agitação (150 rpm). Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática (0,5 mg/mL, preparada em solução tampão pH 7,0) ou 0,05 g do derivado imobilizado, mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) e 20 mL de uma solução de KOH 0,05N. O excesso de KOH foi titulado com HCl 0,05N até pH 10, utilizando-se um titulador automático. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 3.3. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

$$A(U / g) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 10^6}{t \times m} \quad (3.3)$$

em que: V_b = volume do branco (L); V_a = volume da amostra (L); M = molaridade da solução de HCl; t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

3.4.2. *Rendimento de imobilização*

O rendimento de imobilização da lipase no suporte foi calculado usando-se a Equação 3.4:

$$\eta (\%) = \frac{U \times 100}{U_0} \quad (3.4)$$

em que: U_0 = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização; U = unidades de atividade hidrolítica total presente no derivado imobilizado.

3.4.3. *Teor de umidade*

O teor de água presente no suporte e nos derivados imobilizados foi medido diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (MARTE ID 50).

3.4.4. *Teor de ácidos graxos livres*

O teor de ácidos graxos livres foi determinado de acordo com método Ca 5a-40 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.4.5. *Cálculo do tempo espacial (τ)*

O tempo espacial (τ) foi calculado de acordo com a Equação 3.5:

$$\tau = \frac{V_{util}}{Q} \quad (3.5)$$

em que: V_{util} = volume do leito – volume de enzima; Q = vazão empregada (mL/min)

3.4.6. Determinação da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$)

A determinação da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, foi efetuada empregando-se as equações 3.6 e 3.7, respectivamente.

$$-\ln \frac{A}{A_o} = K_d * t \quad (3.6)$$

em que: A_o = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após catálise da reação de interesterificação durante um certo período de tempo (t).

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_d} \quad (3.7)$$

em que: K_d = constante de desativação.

A quantificação da atividade hidrolítica do biocatalisador antes e após a catálise das reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, foi efetuada de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.1. Após a retirada do biocatalisador da reação de interesterificação, este foi lavado por 3 vezes consecutivas com 30 mL de hexano, a fim de remover completamente os resíduos do meio reacional, sendo em seguida filtrado sob vácuo. Após a lavagem, dosou-se a atividade hidrolítica residual.

3.4.7. Quantificação dos triglicerídeos por cromatografia gasosa

Para a análise de triacilgliceróis quanto ao número de carbonos foi utilizado um método cromatográfico previamente estabelecido (NUNES et al., 2011) que tem por base a metodologia da comunidade européia desenvolvida para gordura de leite (PRECHT; MOKKENTIN, 1997). Para esta determinação foi utilizado um cromatógrafo (Varian - Modelo 3800), com uma coluna empacotada 3% OV-1 SILPT-WBM 100/120 MESH 0,5 m x 1/8" OD x 2,0 mm ID em Silco Var marca Restek (adquirido da Frankel Comércio de Instrumentos Analíticos Ltda., São Paulo, SP), operando nas seguintes condições: temperatura do injetor: 350°C; temperatura do detector: 350°C; temperatura da coluna: 80°C no momento da injeção, sendo após um minuto elevada a 210°C à taxa de 25°C/min, mantendo-se constante por 1 min e em seguida sendo elevada novamente a 340°C a taxa de

6°C/min, mantendo-se constante por 4 min. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio em um fluxo constante de 40 mL/min. Cada pico cromatográfico correspondeu a um grupo de triacilgliceróis que foi representado por seu número de carbonos (CN: número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes nos triglicerídeos) (LIPP, 1995). Um exemplo do cromatograma obtido nesta análise está ilustrado no APÊNDICE B.

3.4.8. Grau de interesterificação (GI, %)

O grau de interesterificação das reações entre gordura de leite e óleo de soja foi calculado de acordo com a equação 3.8:

$$GI(\%) = \frac{\sum(TAG_I)_t - \sum(TAG_I)_0}{\sum(TAG_D)_0} \cdot 100 \quad (3.8)$$

em que: TAG_I = concentração (mM) dos triacilgliceróis cuja concentração aumentou durante a reação; TAG_D = concentração (mM) dos triacilgliceróis cuja concentração diminuiu durante a reação. Os índices “t” e (0) representam as concentrações de TAG em um tempo qualquer de reação e na mistura reacional inicial, respectivamente.

3.4.9. Consistência

A consistência das amostras foi determinada utilizando texturômetro (QTS-25 Brookfield), controlado pelo programa Texture Pro. As amostras foram aquecidas em forno microondas (45 – 50 °C) para fusão completa dos cristais e condicionadas em formas cúbicas de silicone (aresta de 25mm). O condicionamento foi efetuado por 48h em estufa a temperatura controlada (10°C) para recristalização da gordura. Foi utilizada a sonda TA15, correspondente a um cone acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45° (Figura 3.8).

Figura 3.8. Sensor em forma conica, acrílico, com ponta não truncada e ângulo de 45° utilizado para a análise de consistência das amostras.

Os testes foram conduzidos nas seguintes condições: retorno ao início, distância: 10mm, velocidade: 120mm/min, tempo: 5s, determinação da força em compressão (gf), em duplicata. As amostras foram analisadas quanto ao “yield value” que foi calculado pela Equação 3.9, proposta por Haighton (1959):

$$C = K \cdot \frac{W}{p^{1.6}} \quad (3.9)$$

em que: C = consistência (“yield value”; gf/cm²), K = fator dependente do ângulo do cone (para 45°, 4700), W = força máxima em compressão (gf), para tempo de 5s, p = profundidade de penetração (0,1mm).

Haighton (1959) estabeleceu critérios correlacionando consistência e espalhabilidade, conforme listado na Tabela 3.7. Esses critérios foram usados, neste trabalho, para avaliar a espalhabilidade das amostras interesterificadas. No caso específico deste trabalho, a faixa de consistência ente 200-800 gf/cm² foi adotada como parâmetro referencial (Satisfatória plasticidade e espalhabilidade).

Tabela 3.7. Avaliação de margarinas e “shortenings” por meio da consistência (Haighton, 1959).

Consistência (gf/cm ²)	Avaliação
< 50	Muito macia,
50 – 100	Muito macia, não espalhável
100 – 200	Macia, mas já espalhável
200 – 800	Satisfatória plasticidade e espalhabilidade
800 – 1000	Dura, mas satisfatoriamente espalhável
1000 – 1500	Muito dura, limite de espalhabilidade
> 1500	Muito dura

3.4.10. Quantificação dos produtos primários e secundários de oxidação

A determinação dos produtos primários e secundários de oxidação foi realizada por espectroscopia, de acordo com a norma portuguesa NP-970 (1986). Em um balão volumétrico (25 mL), pesou-se 0,25g de amostra, completando-se o volume com iso-octano. Em seguida, realizaram-se as leituras de absorbância em diferentes comprimentos de onda. A Tabela 3.8 apresenta os comprimentos de onda utilizados para a determinação dos produtos primários e secundários. Com relação aos produtos secundários, escolheu-se o máximo das três leituras de absorbância.

Tabela 3.8. Comprimentos de onda utilizados para determinação dos produtos de oxidação primários e secundários.

Produtos Primários	Produtos secundários
232 nm	268 nm
	270 nm
	272 nm

O coeficiente de absorção foi calculado de acordo com a equação 3.10:

$$E = \frac{A}{C * L} \quad (3.10)$$

em que: E = coeficiente de absorção; A = absorbância no respectivo comprimento de onda; C = concentração da amostra expressa em g/100 mL; L = caminho óptico (espessura da cubeta) em cm.

3.4.11. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As análises térmicas foram realizadas em calorímetro exploratório diferencial (*SII Nanotechnology - Seiko*, Modelo 6220; Northridge, U.S.A) tendo por base o método oficial Cj 1-94 da American Oil Chemist's Society (AOCS, 2004). As gorduras foram previamente fundidas (50°C) e aproximadamente 5 mg de amostra foram medidos em balança analítica dentro de um cadinho de alumínio hermeticamente fechado. A amostra foi então alocada dentro do aparelho e aquecida rapidamente a 80°C (taxa de 30 °C/min), sendo mantida nesta temperatura por 10 min para garantir que toda sua estrutura cristalina prévia fosse destruída (KIM; AKOH, 2005). Em seguida, sob atmosfera de nitrogênio (N₂), a amostra foi resfriada a uma taxa de 5°C /min até -60°C. Posteriormente, o material foi mantido por 10 min nesta temperatura para garantir sua total cristalização. Por fim, este foi aquecido a uma taxa de 5°C/ min até 80°C, obtendo-se seu perfil de fusão. A análise dos termogramas permitiu calcular o conteúdo de gordura sólida das gorduras em diferentes temperaturas. Os dados obtidos foram tratados empregando-se os softwares Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington, EUA) e Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Massachusetts, EUA).

3.4.12. Conteúdo de gordura sólida por DSC

O conteúdo de gordura sólida foi calculado para cada temperatura, de acordo com a Equação 3.11, que representa a razão entre, a diferença da área total (entre T_0 e T_f) e área parcial (entre T_0 e T) obtidas pela integração da curva de calor específico em função da temperatura, dividido pela área total (NASSU; GONÇALVES, 1995).

$$CGS(T) = \frac{\int_{T_0}^{T_f} C_p(T) dT - \int_{T_0}^T C_p(T) dT}{\int_{T_0}^{T_f} C_p(T) dT} \quad (3.11)$$

em que: T_0 é a temperatura em que começa a fusão; T_f é a temperatura na qual a amostra está completamente fundida; T é uma temperatura intermediária entre T_0 e T_f considerada para o cálculo da área parcial; C_p é o calor específico.

3.4.13. Conteúdo de gordura sólida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de conteúdo de gordura sólida das reações realizadas nos laboratórios do Centro de Engenharia de Biosistemas-CEER, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade Técnica de Lisboa, foram efetuadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), de acordo com a metodologia descrita por Osório et al. (2009).

3.4.14. Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada de acordo método Ce 2-66 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004). Para esta determinação foi utilizada cromatógrafo (CGC Agilent 68650 Series GC System), equipado com uma coluna capilar DB-23 Agilent (50% cianopropil) - metilpolisiloxano, dimensões 60m, diâmetro interno: 0,25mm, 0,25 μ m filme; operando nas seguintes condições: fluxo coluna: 1,00 mL/ min.; velocidade linear: 24 cm/seg; temperatura do detector: 280°C; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura do forno: 110°C, mantendo-se constante por 5min e em seguida sendo elevada a 215°C a taxa de 5°C/min, mantendo-se constante por 24 min; como gás de arraste

foi utilizado hélio. Esta análise foi realizada no laboratório de Óleos e Gorduras da UNICAMP.

3.4.15. Determinação da área, tamanho e volume de poros do suporte

As medidas de área superficial do suporte (SiO₂-PVA) neutralizado e da lipase L036P imobilizada por adsorção física foram realizadas por adsorção, usando nitrogênio como adsorbato. As amostras foram previamente degaseificadas abaixo de 50 mmHg a 100 °C por 2 horas e as análises foram realizadas a 77 K, usando nitrogênio líquido. A área superficial foi calculada pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller). O volume do poro e a área superficial específica com base no cálculo de BJH (Barrett, Joyner e Halenda) foram avaliados pelo software BET (NOVA Quantachrome 1200) (SANTOS et al., 2008a).

3.4.16. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras do suporte (SiO₂-PVA) neutralizado e da lipase L036P imobilizada por adsorção física foram preparadas com pastilhas de KBr e submetidas à análise no infravermelho, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹, empregando-se espectrofotometro Spectrum One, Perkin Elmer (Waltham, USA).

3.4.17. Microscopia e análise elemental superficial

As amostras do suporte neutralizado (SiO₂-PVA) e da lipase L036P imobilizada por adsorção física foram micrografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), e analisadas com relação à composição elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X utilizando um sistema EDS Oxford Inca Energy.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando o estabelecimento das condições reacionais para interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, inicialmente foi conduzida uma série de testes para verificar possíveis influências das variáveis mais importantes do processo, incluindo: teor de gordura de leite no meio reacional, quantidade de catalisador, teor de umidade do biocatalisador e temperatura de reação. Nestes testes, as reações de interesterificação foram efetuadas em reator de tanque agitado empregando a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA ativado com metaperiodato de sódio.

Lipases deste microrganismo, também denominado *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. niveus* e *R. delemar* (UHLIG, 1998), possuem massa molar de 28-67 kDa e são compostas por diferentes isoformas com pontos isoelétricos distintos. Além disso, a literatura relata que esta lipase mostra identidade com a lipase de *Rhizomucor miehei* (UYTTENBROECK et al., 1993; SAXENA et al., 2003). Tipicamente usada como suplemento alimentar, as lipases de *Rhizopus oryzae* apresentam boa estabilidade entre valores de pH de 3 a 8 e aplicações biotecnológicas em setores industriais, tais como: processamento de óleos, produção de surfactantes e produção de fármacos enantiomericamente puros (ODA et al., 2003).

Especificamente neste trabalho, foi empregada a lipase comercial de *R. oryzae* L036, produzida pela empresa Biocatalysts, da Inglaterra. Uma caracterização mais específica sobre esta preparação comercial foi apresentada por Paula (2008). A sequência dos testes iniciais de condições reacionais foi efetuada conforme disposto na Tabela 3.2 e os resultados obtidos são descritos e discutidos a seguir.

4.1. Avaliação da influência do teor de gordura de leite nas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja

4.1.1. Composição em triacilgliceróis (TAGs)

A Figura 4.1 apresenta a composição em triacilgliceróis (TAGs) das diferentes blendas de gordura de leite e óleo de soja não interesterificadas (NIE) em relação à gordura de leite pura. Cada TAG foi representado pelo número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula.

Os dados da Figura 4.1 revelam que, após a adição do óleo de soja, ocorreu uma diminuição na concentração dos TAGs de C₂₄-C₅₀ e um aumento na dos TAGs C₅₂ e C₅₄.

Esta variação pode ser explicada considerando-se a composição do óleo de soja em TAGs. De acordo com a literatura (FIRESTONE, 2006), é possível que este óleo apresente no mínimo 15% e 64% da sua composição em TAGs C_{52} e C_{54} , respectivamente.

Figura 4.1. Composição em triacilgliceróis da gordura de leite pura e das blendas reacionais NIE de gordura de leite: óleo de soja nas proporções de 50:50; 65:35; 80:20. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

Após o início das reações, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise das composições em TAGs dos meios reacionais. Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, foi plotado, para cada mistura, um gráfico com os valores de concentração dos TAGs na blenda reacional inicial e nos respectivos produtos obtidos nas reações catalisadas pela lipase L036P imobilizada em SiO_2 -PVA, em 48h. Estes resultados são apresentados na Figura 4.2.

Figura 4.2. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação das blendas reacionais NIE de gordura de leite: óleo de soja nas proporções (% m/m) de 50:50 (a); 65:35 (b), 80:20 (c), 100:0 (d), respectivamente. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

De maneira geral, independentemente da composição da blenda empregada, a concentração do TAG C₅₄ diminuiu. Com exceção da blenda 50:50 (Figura 4.2a), as concentrações dos TAGs C₃₄-C₄₂ diminuíram enquanto a dos TAGs C₄₆-C₅₂ aumentaram. Para a blenda 50:50 observou-se um aumento no teor dos TAGs C₄₀-C₅₂.

A Figura 4.3 apresenta os valores do grau de interesterificação e o teor de ácidos graxos livres (%) para cada uma das reações de interesterificação. O emprego das blendas contendo 50, 65 e 80% de gordura de leite forneceu elevados valores de grau de interesterificação. No entanto, empregando-se apenas gordura de leite na blenda inicial (100:0) NIE, constatou-se uma queda no grau de interesterificação, provavelmente como resultado de limitações reacionais impostas pela diminuição no teor de TAGs contendo

ácidos graxos com 18 átomos de carbono, presentes no óleo de soja. A enzima utilizada neste trabalho, lipase de *R. oryzae*, faz distinção entre ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia. De acordo com a literatura, esta enzima possui preferência por ácidos graxos C18 (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2008). Portanto, blendas reacionais contendo maior proporção de óleo de soja favoreceriam a reação.

Figura 4.3. Grau de interesterificação (%), (■) e ácidos graxos livres (%), (■) em 48h, para gordura de leite pura e para as blendas de gordura de leite:óleo de soja (% m/m 50:50, 65:35, 80:20).

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), as blendas 65:35 e 80:20 forneceram os valores mais elevados (aproximadamente 11,57 e 15,31%, respectivamente), enquanto valores inferiores a 3% foram obtidos com o emprego da blenda 50:50 e gordura de leite pura. A presença de produtos de hidrólise é função da quantidade de água presente na fase líquida, da quantidade de água adsorvida no derivado imobilizado, da concentração inicial em TAGs das blendas reacionais e dos produtos IE, que afeta a polaridade do meio reacional. Nesse sentido, a presença de ácidos graxos livres, oriundos da hidrólise, pode ser justificada tomando por base o mecanismo enzimático da reação de interesterificação. A reação de interesterificação é um caso especial de transferência de ácidos graxos, que envolve, a nível molecular, reações subsequentes de hidrólise e síntese (MARANGONI, 2002). A primeira etapa envolve a hidrólise de TAGs produzindo diglicerídeos,

monoglicerídeos e ácidos graxos. O acúmulo dos produtos de hidrólise ocorre durante toda a interesterificação até que o equilíbrio seja restabelecido (MARANGONI, 2002). Quando a água não está presente em grande quantidade, a re-esterificação ocorre e a interesterificação é favorecida.

4.1.2. Consistência dos produtos interesterificados

A consistência é um aspecto funcional importante de gorduras plásticas, constituídas de cristais de gordura sólida e óleo líquido. A relação entre as duas fases e o caráter cristalino da fase sólida determina consistência da amostra (RIBEIRO et al., 2009a). Além disso, a consistência é um fator crítico para determinação da funcionalidade e aceitação do consumidor por gorduras interesterificadas (SILVA et al., 2009).

A Tabela 4.1 apresenta os valores de consistência (gf/cm^2) das blendas NIE e dos produtos IE. Os resultados mostraram que, para todas as blendas, a consistência diminuiu em relação à gordura de leite pura. Resultados semelhantes são descritos na literatura para blendas de gordura de leite e diferentes óleos vegetais, tais como óleo de canola, linhaça e colza (AGUEDO et al., 2008; MARANGONI; ROUSSEAU, 1999).

Para as blendas NIE, o aumento de conteúdo de óleo de soja influenciou de maneira acentuada na consistência, devido à diluição da rede cristalina e à formação de uma estrutura mais fraca (ROUSSEAU et al., 1996). A menor adição de óleo de soja (blenda NIE 80:20) resultou em grande queda na consistência da mistura NIE (47%) em relação à gordura de leite pura ($6074 \pm 406,8 \text{ gf/cm}^2$). A maior adição de óleo (blenda NIE 50:50) interferiu ainda mais no resultado de consistência, fornecendo valor final de $138 \pm 2,5 \text{ gf/cm}^2$ para a blenda NIE (diminuição de 98% em comparação a gordura de leite). No entanto, é importante notar que este valor está fora da faixa de valores de consistência (200 a 800 gf/cm^2) estabelecida por Haighton (1959), como adequada para uma gordura com satisfatória plasticidade e espalhabilidade.

Tabela 4.1. Valores de consistência para as diferentes blendas NIE e produtos IE da gordura de leite e óleo de soja.

Proporção gordura de leite: óleo de soja	Consistência* (gf/cm²)	
50:50	Blenda NIE	138 ± 2,5
	Produto IE	48 ± 18,0
65:35	Blenda NIE	1159 ± 169,8
	Produto IE	276 ± 108,6
80:20	Blenda NIE	3246 ± 137,1
	Produto IE	1953 ± 378,7
Gordura de leite pura	Blenda NIE	6074 ± 406,8
	Produto IE	4260 ± 341,8

*Valor médio ± desvio padrão

Após a interesterificação, todos os produtos IE exibiram menores valores de consistência em comparação as misturas NIE correspondentes. As maiores alterações foram observadas para as blendas 65:35 e 80:20 (gordura de leite: óleo de soja). As misturas originais NIE forneceram consistências de 1159 ± 169,8 e 3246 ± 137,1 gf/cm²; após a interesterificação, estes valores foram diminuídos a 276 ± 108,6 e 1953 ± 378,7 gf/cm², respectivamente, correspondendo à redução de 76 e 40%.

Estes resultados mostram que a reação de interesterificação enzimática pode modular a consistência da gordura de leite por meio da incorporação de ácidos graxos insaturados presentes nos TAGs do óleo de soja. Além disso, a literatura também relata que a interesterificação é importante, pois influencia nas propriedades sensoriais das gorduras, direcionando sua aplicação em produtos alimentícios (PISKA et al., 2006).

De todos os experimentos realizados, somente o produto IE da blenda 65:35 resultou em valor de consistência dentro da faixa de 200 a 800 gf/cm², com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade para uso em temperaturas de refrigeração, de acordo com o critério estabelecido por Haighton (1959) e usado neste trabalho como parâmetro referencial.

Desta forma, entre as proporções mássicas estudadas, a mistura 65:35 gordura de leite: óleo de soja foi a mais adequada, uma vez que resultou na maior redução percentual da consistência (76%) e em elevado grau de interesterificação (28,33%). Portanto, selecionou-se a blenda 65:35 para continuidade dos experimentos propostos.

4.2. Avaliação da influência da quantidade de unidades de atividade enzimática fornecida ao meio reacional

Após a definição do teor de gordura de leite na blenda, foi determinada a porcentagem mássica de biocatalisador a ser fornecido ao meio reacional (unidades de atividade por grama de meio reacional), mantendo-se constantes as demais variáveis (Tabela 3.2).

A Tabela 4.2 mostra a porcentagem mássica de enzima por grama de meio reacional, e a respectiva quantidade de unidades de atividades fornecidas em cada reação.

Tabela 4.2. Relação entre a porcentagem mássica de enzima e a quantidade de unidades de atividades fornecidas ao meio reacional.

Porcentagem mássica* (%)	Massa de derivado imobilizado (g)	Unidades de atividade (U)	Unidades de atividade por grama de meio reacional (U/g)
5	2	8748	219
10	4	17496	439
15	6	26244	655
20	8	34992	875
30	12	52488	1313

* em relação à massa total do meio reacional (40g)

As modificações observadas durante as reações de interesterificação empregando diferentes proporções mássicas do derivado imobilizado em SiO₂-PVA podem ser observadas na Figura 4.4 (a-e), que permite a comparação da composição em TAG das blendas NIE e os respectivos produtos IE, após 48 h de reação. Os resultados de grau de interesterificação (GI) e ácidos graxos livres (%) são apresentados na Figura 4.5.

Independentemente da quantidade de unidades de atividade fornecida ao meio reacional, as concentrações dos TAGs C₃₂-C₄₂ e C₅₄ diminuíram e a dos TAGs C₄₆-C₅₂ aumentaram. Em todos os experimentos, a maior variação de concentração ocorreu no TAG C₅₀, enquanto quase nenhuma mudança foi observada no TAG C₄₄.

Figura 4.4. Perfis de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (% m/m) 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA em diferentes proporções mássicas: (a) 5%; (b) 10%; (c) 15%; (d) 20% e (e) 30%. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

Figura 4.5. Grau de interesterificação (% , ■) e ácidos graxos livres (% , ■) obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), em função das unidades de atividade empregada.

O grau interesterificação (GI) variou entre 10,8 e 31,4%, enquanto o teor de ácidos graxos livres variou entre 2,66 e 11,57 %, em função da quantidade de enzima fornecida ao meio reacional. O emprego de 5% de derivado imobilizado resultou no mais baixo valor de GI (10,8%). Quando se dobrou a quantidade de enzima (10%), o valor de GI obtido foi aproximadamente 2,5 vezes superior (25,6%). O emprego de quantidades superiores a 10% em massa de biocatalisador, no entanto, não promoveu aumento considerável no grau de interesterificação. Embora o mais alto valor de GI (31,4%) tenha sido obtido empregando-se 30% de sistema imobilizado, correspondente a 52488 U, este resultado representa um aumento de apenas 22% no GI em relação ao grau obtido empregando-se 10% de biocatalisador (Figura 4.5).

Visando-se avaliar as alterações promovidas nas propriedades de textura, determinou-se a consistência (gf/cm^2) dos produtos IE. Na Tabela 4.3 são apresentados os valores obtidos para cada um dos produtos IE, em função das unidades de atividade (U) fornecida ao meio reacional.

A análise dos resultados da Tabela 4.3 revela que a consistência das amostras diminuiu, dependendo da quantidade de biocatalisador empregado na reação. O maior valor de consistência foi obtido com 10% em massa do derivado imobilizado. Por outro lado, o menor valor de consistência (Tabela 4.3) foi obtido empregando-se 30% em massa

de derivado imobilizado. Entretanto, este experimento não resultou em valor de consistência dentro da faixa de 200 a 800 gf/cm², com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade para uso em temperaturas de refrigeração, de acordo com o critério estabelecido por Haighton (1959).

Tabela 4.3. Valores de consistência dos produtos IE em função da quantidade de enzima empregada para catálise da reação.

Porcentagem mássica* (%)	U/g de meio reacional	Consistência** (gf/cm ²)
5	219	361 ± 16,8
10	439	385 ± 86,4
15	655	239 ± 102,9
20	875	276 ± 108,6
30	1313	166 ± 21,8

*em relação à massa total do meio reacional

** Valor médio ± desvio padrão

Com o emprego de maiores quantidades de derivado imobilizado (acima de 10%), os produtos apresentaram valores de consistência muito próximos ao limite inferior da faixa adequada (~ 200gf/cm²). Assim, entre as diferentes quantidades de unidades de atividade fornecidas ao meio reacional, foi selecionada para continuidade dos experimentos, a proporção de 500 U por grama de meio reacional, uma vez que os resultados indicaram a obtenção de alto grau de interesterificação e boa redução da consistência (Tabela 4.3). Esses resultados são similares aos obtidos para outras reações catalisadas por lipase imobilizada em SiO₂-PVA, conforme relatado por Da Rós (2009).

4.3. Avaliação da influência da umidade do derivado imobilizado na catálise das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja

Após a definição das unidades de atividades a serem fornecidas ao meio reacional, foi avaliada a influência da umidade do derivado imobilizado. A reação de interesterificação envolve a hidrólise das ligações ésteres, seguida da re-esterificação. Portanto, dependendo da quantidade de água no meio reacional, o acúmulo de ácidos graxos livres no meio reacional pode ser favorecido (OSÓRIO et al., 2009). Assim, a avaliação da influência do teor de água no derivado imobilizado deve ser considerada de grande importância.

As modificações observadas durante as reações de interesterificação empregando o biocatalisador imobilizado com diferentes teores de umidade podem ser observadas na Figura 4.6 (a-c), que compara a composição em TAG das blends NIE e os respectivos produtos IE, após 48 h de reação. De maneira geral, independentemente da umidade dos derivados imobilizados, os teores dos TAGs C_{24} - C_{28} e C_{46} - C_{52} aumentaram e os dos TAGs C_{32} - C_{42} diminuíram. Nas Figuras 4.6a e 4.6b (5 e 10% de umidade, respectivamente), constata-se a redução do TAG C_{54} , enquanto na Figura 4.6c (20% de umidade) nenhuma alteração foi verificada na concentração deste TAG, entretanto foi constatada, neste ensaio, a maior elevação na concentração do TAG C_{24} .

Figura 4.6. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada, com diferentes teores de umidade: (a) 5%; (b) 10%; (c) 20%. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

Os resultados referentes ao grau de interesterificação (GI) e ácidos graxos livres (%), obtidos em 48h de reação, são apresentados na Figura 4.7 em função do teor de umidade do derivado imobilizado. A análise da Figura 4.7 revela que, empregando-se derivados imobilizados contendo 20% e 5% de umidade, foram obtidos respectivamente o mais elevado (8,5%) e o menor teor de ácidos graxos livres (5,58%).

Figura 4.7. Grau de interesterificação (%), (■) e ácidos graxos livres (%), (■) nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), catalisadas pela lipase de *R. oryzae*, em função do teor de umidade (5%; 10%; 20%).

Com relação ao grau de interesterificação (GI), observou-se variação nos valores obtidos em função do teor de água no derivado imobilizado. O menor valor de GI (22,8%) foi obtido na reação com o derivado imobilizado contendo 5% de umidade (Figura 4.7). Este resultado pode ser melhor compreendido avaliando-se a importância da água em reações catalisadas por lipases. Conforme anteriormente discutido, a água desempenha um papel fundamental em reações de interesterificação, uma vez que é responsável pelo equilíbrio entre a hidrólise e a esterificação. Além disso, a água é necessária para a manutenção da função catalítica destas enzimas, pois participa, diretamente ou indiretamente, de todas as interações que mantêm a conformação do sítio ativo, e consequentemente a função catalítica destes biocatalisadores (BÓDALO et al., 2009). Portanto, com 5% de umidade, provavelmente a quantidade de água presente no meio reacional não tenha sido suficiente para manutenção da atividade catalítica da lipase. Por

outro lado, na reação catalisada pelo derivado imobilizado contendo 20% de umidade, a quantidade de água presente no meio reacional foi provavelmente excessiva, favorecendo a reação de hidrólise, conforme confirmado pelo elevado teor de ácidos livres. Além disso, um grande aumento na concentração do TAG C₂₄ pode ser observado na Figura 4.6c, enquanto o TAG C₅₄ manteve-se constante.

Na reação catalisada com derivado imobilizado contendo 10% de umidade (Figura 4.7), elevado valor de GI (27,6%) foi obtido. Nesse caso, o teor de água no meio reacional parece ter sido ideal: a atividade catalítica do biocatalisador foi mantida e a hidrólise não foi favorecida. Ressalta-se que um teor de umidade em torno de 10% é a especificação de uma particular preparação comercial de lipase imobilizada (Lipozyme), considerada como uma das lipases mais efetiva para mediar reações de interesterificação.

Como nas etapas anteriores, visando-se avaliar as alterações promovidas nas propriedades de textura dos produtos IE, foram determinados os valores de consistência (gf/cm²). Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos para cada um dos produtos IE, em função do teor de água presente no biocatalisador.

Tabela 4.4. Valores de consistência dos produtos IE em função da umidade do biocatalisador empregado na catálise da reação.

Umidade do derivado imobilizado (%)	Consistência* (gf/cm ²)
5	227 ± 18,0
10	385 ± 86,4
20	193 ± 44,3

* Valor médio ± desvio padrão

A análise dos resultados da Tabela 4.4 revela que a consistência de todos os produtos IE diminuiu, em relação à blenda 65:35 NIE (1159 ± 169,8 gf/cm²). No entanto, o produto IE obtido da reação catalisada por L036P com 20% de umidade forneceu valor de consistência fora da faixa de valores (200 a 800 gf/cm²) estabelecida por Haighton (1959), para uma gordura com satisfatória plasticidade e propriedades de espalhabilidade.

Assim, entre os teores de umidade dos derivados imobilizados testados, a umidade de 10% foi a mais conveniente, uma vez que resultou em valor adequado de consistência e em elevado grau de interesterificação (27,6%). Portanto, para os experimentos subsequentes selecionou-se a umidade de 10%.

4.4. Avaliação da influência da temperatura na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja

Após a definição do teor de umidade do derivado imobilizado a ser empregado na catálise das reações de interesterificação, foi estudada a influência da temperatura de reação. As reações foram efetuadas em três diferentes temperaturas: 45, 50 e 60°C. Maiores valores não foram avaliados uma vez que elevadas temperaturas podem contribuir para oxidação das matérias-primas da reação.

Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações de interesterificação, foram plotados os valores de concentração dos TAGs na blenda reacional 65:35 NIE e nos produtos IE das reações empregando a lipase L036P imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob diferentes temperaturas. Os resultados, obtidos após 48 h de reação, são apresentados na Figura 4.8.

Figura 4.8. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja 65:35, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob diferentes temperaturas: (a) 45°C; (b) 50°C e (c) 60°C. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

De maneira geral, independentemente da temperatura reacional empregada, os teores dos TAGs C₂₆-C₃₀ e C₄₆-C₅₂ aumentaram, enquanto os dos TAGs C₃₂-C₄₂ e C₅₄ diminuíram. Além disso, na reação efetuada a 60°C (Figura 4.8c) pode-se observar que a concentração do TAG C₂₄ no produto IE foi nula, enquanto nas demais reações este TAG sofreu aumento considerável.

A partir da concentração de TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação (GI), que são apresentados na Figura 4.9, com os respectivos teores de ácidos graxos livres (%), em 48h de reação.

Com relação aos ácidos graxos, o maior valor foi obtido na reação catalisada pela lipase L036P, sob temperatura de 60°C (8,63%). Por outro lado, empregando-se a temperatura de 50°C, o menor valor foi alcançado (6,98%), resultado bastante semelhante ao obtido empregando-se a temperatura de 45°C (7,1%).

Com relação ao grau de interesterificação (GI), observou-se variação nos valores obtidos em função da temperatura reacional empregada. A análise da Figura 4.9 revela que o mais elevado valor de GI foi obtido na reação conduzida a 50°C (25,98%). Entretanto, é importante ressaltar que, a temperatura de 45°C forneceu resultado bastante semelhante (23,94%), enquanto o emprego da temperatura de 60°C resultou no menor resultado de GI (22,7%).

Estes resultados podem ser mais bem compreendidos avaliando-se a importância da temperatura em reações enzimáticas. A maioria das reações químicas se processa numa velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Isso porque, um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas apresentam comportamento semelhante às reações catalisadas quimicamente. Porém, as enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica provém da necessidade de que sua estrutura terciária seja mantida, principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas. Se a molécula absorve excesso de energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima ficará desnaturada, perdendo sua atividade catalítica (SILVA; CONTESSINI; CARVALHO, 2009). Logo, à medida que a temperatura se eleva, o esperado aumento na velocidade é contraposto pelo aumento da velocidade de desnaturação do biocatalisador.

Figura 4.9. Grau de interesterificação (%), e ácidos graxos livres (%), obtidos nas reações de interesterificação da gordura de leite: óleo de soja (65:35), em função da temperatura empregada.

Além do GI e da porcentagem de ácidos graxos livres, foram também determinados os valores de consistência (gf/cm^2). Na Tabela 4.5 são apresentados os valores obtidos para cada um dos produtos IE, em função da temperatura de reação.

Tabela 4.5. Influência da temperatura de reação na consistência dos produtos IE.

Temperatura (°C)	Consistência* (gf/cm^2)
45	$385 \pm 86,4$
50	$103,4 \pm 9,6$
60	$123,2 \pm 6,0$

* Valor médio $\pm$ desvio padrão

A análise dos resultados da Tabela 4.5 revela que a consistência de todos os produtos IE diminuiu, em relação à blenda 65:35 NIE ($1159 \pm 169,8 \text{ gf/cm}^2$). Analisando-se os resultados em termos de grau de interesterificação e teor de ácidos graxos livres, verificou-se que, embora a temperatura de 50 °C tenha fornecido valores mais adequados para o processo, ou seja: grau de interesterificação mais elevado (25,98%) e menor teor de ácidos livres (6,98%), redução acentuada da consistência do produto interesterificado foi constatada. Apenas o produto IE obtido da reação catalisada na temperatura de 45°C

forneceu resultado de consistência dentro da faixa de valores (200 a 800 gf/cm²) estabelecida por Haighton (1959), para uma gordura com satisfatória plasticidade e propriedades de espalhabilidade.

Portanto, verificou-se que, com o uso de temperatura de 45°C, obteve-se um valor adequado de consistência, satisfatório valor de GI (23,94%) e baixo teor de ácidos graxos livres (7,10%). Desta forma, para os experimentos subsequentes selecionou-se a temperatura de 45°C. De fato, temperaturas elevadas podem favorecer a desnaturação das enzimas, gerar maiores gastos de energia, além de favorecer a oxidação dos produtos alterando suas características sensoriais.

4.5. Condições estabelecidas

A Tabela 4.6 apresenta a sequência experimental, bem como os resultados obtidos em termos de grau de interesterificação (GI), teor de ácidos graxos livres (AGL) e consistência. As condições estabelecidas estão destacadas na tabela. Deve-se ressaltar que a escolha das condições reacionais não se baseou somente na reação que forneceu o mais alto grau de interesterificação e o mais baixo teor de ácidos livres. A consistência do produto final também foi avaliada, devendo fornecer valor dentro da faixa (200 a 800 gf/cm²) estabelecida por Haighton (1959), como adequada para uma gordura com satisfatória plasticidade e espalhabilidade.

Tabela 4.6. Condições reacionais estabelecidas para reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja.

	Condição reacional empregada				Resultados experimentais obtidos		
Condição reacional avaliada	Teor de gordura de leite (%)	*Porcentagem de enzima imobilizada (%)	Umidade do derivado imobilizado (%)	Temperatura (°C)	GI (%)	AGL (%)	Consistência (gf/cm ²)**
1. Teor de gordura de leite (%)	50	20	10	45	32,10	2,08	48 ± 18,0
	65				28,33	11,57	276 ± 108,6
	80				34,86	15,31	1953 ± 378,7
	100				20,00	2,18	4260 ± 341,8
2. Porcentagem (%) de enzima imobilizada*	Selecionado em 1 (65% de gordura de leite)	5	10	45	10,83	3,36	361 ± 16,8
		10			25,60	8,74	385 ± 86,4
		15			29,10	2,66	239 ± 102,9
		20			28,33	11,57	276 ± 108,6
		30			31,36	9,33	166 ± 21,8
3. Umidade do derivado imobilizado (%)	Selecionado em 1 (65% de gordura de leite)	Selecionado em 2 (500 U/g meio)	5	45	22,88	5,57	227 ± 18,0
			10		27,61	6,97	385 ± 86,4
			20		27,51	8,49	193 ± 44,3
4. Temperatura (°C)	Selecionado em 1 (65% de gordura de leite)	Selecionado em 2 (500 U/g meio)	Selecionado em 3 (10% de umidade)	45	23,94	7,10	385 ± 86,4
				50	25,98	6,98	103,4 ± 9,6
				60	22,66	8,63	123,2 ± 6,0

*em relação à massa total de meio reacional

**Valor médio ± desvio padrão

Condição Reacional Selecionada

4.6. Influência do tempo de reação nas propriedades do produto obtido por interesterificação da gordura de leite com óleo de soja

De acordo com a literatura, a interesterificação é descrita como sendo a troca controlada de ácidos graxos entre as distintas moléculas de éster, visando-se à obtenção de produtos com novas propriedades físicas e químicas (OSÓRIO et al., 2009). Portanto, nesta reação, os ácidos graxos permanecem inalterados, ocorrendo apenas uma redistribuição destes nas moléculas dos triacilgliceróis, resultando na modificação da composição triacilglicerídica (RIBEIRO et. al., 2007). A interesterificação de óleos e gorduras pode ser aplicada por diversas razões: para influenciar o comportamento na fusão, fornecendo consistência desejada em temperatura ambiente e de refrigeração; para melhorar ou modificar o comportamento cristalino, de forma a facilitar os processos de produção e, para diminuir a tendência à recristalização durante a vida útil do produto (RIBEIRO et. al., 2007). Ao longo do tempo reacional, diferentes composições em triacilgliceróis podem ser obtidas, resultando em produtos interesterificados com propriedades físicas distintas.

Visando-se avaliar a relação entre o tempo de reação e a consistência dos produtos, foram efetuadas reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.7. O progresso das reações foi acompanhado pela determinação da composição em triacilgliceróis (TAGs), do teor de ácidos graxos livres (%) e da consistência dos produtos interesterificados. Os resultados são apresentados a seguir.

4.6.1. Composição em triacilgliceróis

Os gráficos das Figuras 4.10 (a-d) apresentam a composição em triacilgliceróis (TAGs) dos produtos interesterificados (IE) obtidos em diferentes tempos de reação, em comparação a blenda de gordura de leite e óleo de soja não interesterificada (NIE). Cada triacilglicerol foi representado pelo número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula.

Figura 4.10. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h (■); 6h (■); 12h (■); 18h (■); 24h (■); 36h (■), 48h (■): (a) C₂₄ a C₃₀; (b) C₃₂ a C₃₈; (c) C₄₀ a C₄₆; (d) C₄₈ a C₅₄ (Col = colesterol).

A análise dos gráficos da Figura 4.10 revela que a concentração dos triacilgliceróis C₂₄-C₃₄ manteve-se praticamente inalterada, em relação à blenda reacional NIE, até 4 h de reação (Figuras 4.10 a e b), aumentando levemente a concentração após este período (Figuras 4.10 a e b). O mesmo comportamento pode ser observado para os TAGs C₄₆ a C₅₀ (Figuras 4.10 c e d). No entanto, neste caso, o aumento na concentração a partir de 4 horas foi superior ao observado pelos TAGs menores (Figura 4.10 c e d). Com relação à concentração dos TAGs C₃₆ a C₄₄, observou-se uma diminuição até 4 h de reação (Figuras 4.10 b e c), e aumento após este período (Figura 4.10 b e c). A maior variação pode ser observada na concentração dos TAG C₅₄ que aumentou nas primeiras 4 h de reação, diminuindo a concentração após este período (Figura 4.10 d).

A partir da concentração dos TAGs foi possível calcular o grau de interesterificação, conforme descrito no item 3.4.8. Os resultados de grau de interesterificação e ácidos graxos livres (%), obtidos em cada uma das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, nos diferentes tempos reacionais estão apresentados na Figura 4.11.

Figura 4.11. Grau de interesterificação (% ■) e teor de ácidos graxos livres (% ○) em função do tempo de reação.

A análise dos resultados da Figura 4.11 revela que o teor de ácidos graxos livres aumentou nas primeiras 6 h de reação, atingindo valor aproximado de 7% e mantendo-se estável até 18 h. Após o tempo de 6h, os ácidos graxos livres aumentaram lentamente até um máximo de 11% ao final de reação (48h).

Com relação ao grau de interesterificação, em apenas 6 h obteve-se GI de 9%. Posteriormente, o GI aumentou lentamente atingindo valor máximo de 16,8%. De maneira geral, os resultados parecem mostrar que a maior parte das modificações composicionais ocorreu nas primeiras 6 h de reação. Isso porque, embora o grau de interesterificação tenha praticamente dobrado de valor após este tempo, este aumento só ocorreu em 48 h de reação. Resultados semelhantes são descritos na literatura. Aguedo et al. (2008) estudaram a interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de linhaça, catalisada por lipase comercial Lipozyme. A reação foi mantida por 24 h, mas os autores observaram que as maiores modificações na composição em TAGs ocorreram nas primeiras 6 h de reação.

É importante observar que as modificações composicionais são responsáveis por mudanças nas propriedades reológicas do produto, resultando em diferenças na textura. Desta forma, acompanhou-se a modificação na consistência ao longo da reação, conforme descrito a seguir.

4.6.2. Consistência dos produtos interesterificados

As análises de consistência foram efetuadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.9. Os valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio $\pm$ desvio padrão) obtidos em diferentes tempos reacionais estão apresentados na Figura 4.12.

Figura 4.12. Consistência dos produtos IE em função do tempo reacional.

A mistura reacional inicial (65% gordura de leite: 35% óleo de soja) não interesterificada também foi submetida à análise de consistência, apresentando valor de 1228 ± 78 gf/cm². Comparando-se os valores de consistência dos produtos IE (Figura 4.12) com o resultado da blenda inicial, é possível observar que após a reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, obteve-se redução nos valores de consistência dos produtos ao longo do tempo reacional. A análise dos resultados revela ainda que, após 6 h de reação, não ocorreram alterações significativas na consistência, comprovando assim os resultados previamente discutidos no item 4.6.1, com relação ao grau de interesterificação. Tempos inferiores a 4 h de reação forneceram valores acima de

800 gf/cm², indicando que estes tempos não foram suficientes para promover as alterações desejadas na composição de TAGs e, conseqüentemente, nas propriedades físicas dos produtos interesterificados. Os tempos de 4 e 6 h permitiram obter um produto com consistência dentro da faixa considerada ideal (200-800 gf/cm²), com satisfatórias propriedades de espalhabilidade. Observa-se, no entanto, que em 6 h de reação, a consistência do produto IE (251 ± 44 gf/cm²) já está próxima ao limite inferior (200 gf/cm²). O tempo de 4 h foi o mais adequado, obtendo-se um produto IE com consistência de 539 ± 38 gf/cm².

Os resultados obtidos nesta etapa revelaram que o tempo reacional necessário para obtenção de um produto IE com satisfatórias propriedades de espalhabilidade e plasticidade é de 4h. Este resultado é bastante satisfatório considerando-se a possibilidade de transferência do processo da escala de laboratório para reatores susceptíveis de operação em maior escala. Nesse sentido, na próxima etapa, as reações de interesterificação foram realizadas em reatores de tanque agitado, operados em regime batelada, com adaptação de cestas no interior. Os resultados são apresentados a seguir.

4.7. Reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, em reator de tanque agitado com adaptação de cestas

Nesta etapa do trabalho, o reator foi operado em modo batelada, agitado mecanicamente, com adaptação de cesta no seu interior, para isolamento do derivado imobilizado de possíveis contatos com partes mecânicas do agitador. Foram empregadas cestas em duas diferentes configurações, lateral e central (item 3.3.8), e as reações foram conduzidas por 12h. Os resultados obtidos com cada configuração são discutidos nesta seção. Como na etapa anterior, o progresso das reações foi acompanhado pela determinação da composição em triacilgliceróis (TAGs), do teor de ácidos graxos livres (%) e da consistência dos produtos interesterificados.

4.7.1. Composição em triacilgliceróis

Os gráficos das Figuras 4.13 e 4.14 apresentam a composição em triacilgliceróis (TAGs) dos produtos interesterificados (IE) obtidos em diferentes tempos de reação, empregando-se um reator operado em modo batelada, com adaptação de cestas lateral e central, respectivamente. A composição em TAGs foi comparada à blenda de gordura de

leite e óleo de soja não interesterificadas (NIE) e cada triacilglicerol foi representado pelo número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula.

Figura 4.13. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais, empregando-se a cesta na configuração lateral: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h (■); 6h (■); 8h (■); 12h (■) (Col = colesterol).

Figura 4.14. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em diferentes tempos reacionais, empregando-se a cesta na configuração central: mistura reacional NIE 0h (■); 30 min (■); 1h (■); 90 min (■); 2h (■); 3h (■); 4h (■); 6h (■); 8h (■); 12h (■) (Col = colesterol).

A análise do gráfico da Figura 4.13 (cesta lateral) revela que a concentração dos TAGs C_{24} a C_{30} aumentou levemente até 6 h de reação, diminuindo após este período. Empregando-se a cesta central (Figura 4.14), observa-se que estes mesmos TAGs tiveram sua concentração aumentada até o final da reação. Com a cesta lateral observou-se que a concentração dos TAGs C_{36} a C_{50} diminuiu até as primeiras 3 horas de reação, aumentando até o final do processo. Com o emprego da cesta central, o mesmo comportamento foi observado, porém o aumento da concentração foi iniciado a partir de 6 horas de reação. Além disso, com esta cesta (Figura 4.14), observou-se que praticamente nenhum dos TAGs sofreu variação, até os primeiros 90 min de reação. Finalmente, independente da configuração da cesta empregada, a concentração do TAG C_{54} diminuiu a partir de 4h de reação (Figuras 4.13 e 4.14).

A variação da concentração de TAGs durante o processo é um fenômeno complexo, que depende não apenas das trocas de resíduos de ácidos graxos entre as moléculas, mas também da ocorrência de reações paralelas de hidrólise. Estas reações paralelas, no entanto, ocorreram em pequena extensão, conforme verificado pela quantificação do conteúdo de ácidos graxos livres. Os resultados obtidos, empregando-se as diferentes cestas, são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Teor de ácidos graxos livres (%) obtido nas reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja empregando-se reator operando em regime batelada, com adaptação de cestas, em diferentes configurações.

Teor de ácidos graxos livres (%)		
Tempo (h)	Cesta Lateral	Cesta Central
0,5	0,66	0,92
1	0,94	1,25
1,5	1,35	1,54
2	1,69	1,92
3	2,36	2,56
4	3,19	2,82
6	3,77	3,58
8	4,69	3,97
12	5,92	4,61

A análise dos resultados da Tabela 4.7 revela que o teor de ácidos livres aumentou até o final da reação, independentemente da cesta empregada. O valor máximo (5,92%) foi obtido em 12h, na configuração lateral. Conforme previamente discutido, de acordo com a

literatura, o acúmulo dos produtos de hidrólise ocorre durante toda a interesterificação até que o equilíbrio seja restabelecido (MARANGONI, 2002).

A partir da concentração dos TAGs calculou-se o grau de interesterificação e os resultados estão apresentados na Figura 4.15, que permite a comparação das duas configurações de cestas avaliadas. A análise dos resultados revela que inicialmente, a reação empregando-se a cesta lateral ocorreu mais rapidamente até 3h de reação, uma vez que, neste período, os valores de GI foram superiores aos obtidos na cesta central. Em 4h de reação, o máximo valor de GI (9,61%) foi alcançado no reator operado com a cesta central, sendo pouca a variação observada no GI, após este período. Além disso, a análise da Figura 4.15 revela ainda que na cesta lateral o máximo GI (8,58%) foi obtido em 3h de reação, mas em 12 h, este valor sofreu uma queda (5,66%).

Figura 4.15. Grau de interesterificação (%) obtido nas reações efetuadas em regime batelada, com adaptação de cestas em diferentes configurações.

É importante salientar que estas variações nos resultados de ácidos graxos livres e GI podem estar relacionadas à agitação dos sistemas. Conforme descrito no item 3.3.8, na cesta lateral, empregou-se agitador do tipo turbina com pás planas, com fluxo radial e axial, enquanto na cesta central utilizou-se um agitador do tipo hélice, que impõe um fluxo longitudinal ao meio, com diferentes velocidades de agitação de acordo com a cesta empregada, a fim de garantir a homogeneização do meio reacional. Sabe-se que, muitos

são os fatores que influenciam a atividade e estabilidade destas enzimas, dentre eles, a agitação, que provavelmente tenha influenciado na atividade dos derivados imobilizados empregados na catálise da reação de interesterificação. Para facilitar a visualização da influência do tipo e da velocidade de agitação na reação de interesterificação, a composição em triacilgliceróis (TAGs) dos produtos IE obtidos em 4h, empregando-se diferentes tipos de agitação, está apresentada na Figura 4.16, em relação à composição da blenda reacional inicial NIE. Este tempo reacional foi escolhido para esta comparação, uma vez que resultou no máximo valor de GI obtido.

Figura 4.16. Composição em TAGs dos produtos IE obtidos em 4h de reação, empregando-se diferentes tipos de agitação (Col = colesterol).

A análise da Figura 4.16 revela que, a concentração dos TAGs C_{30} - C_{32} e C_{48} aumentou, empregando-se agitação magnética e diminuiu empregando-se agitação mecânica. Além disso, observa-se que a concentração dos TAGs C_{34} - C_{46} diminuiu e a dos TAGs C_{52} - C_{54} aumentou independentemente do tipo de agitação. No entanto, esta diminuição ou aumento foi maior empregando-se agitação mecânica. As diferenças observadas demonstram claramente que a configuração do reator influencia não apenas na

cinética do processo, mas também no tipo de modificação efetuada nos TAGs presentes no meio durante o processo. Esta modificação qualitativa no produto pode estar associada a efeitos de transferência de massa, uma vez que distintos TAGs e ácidos graxos terão diferentes taxas de migração entre o meio reacional e o biocatalisador.

4.7.2. Consistência dos produtos interesterificados

As análises de consistência foram efetuadas para os produtos IE obtidos em 12h de reação. Os valores obtidos (valor médio $\pm$ desvio padrão) estão apresentados na Figura 4.17, que permite comparar a consistência dos produtos IE e da mistura NIE.

Os resultados revelam que, independente da velocidade de agitação empregada, a consistência dos produtos IE decresceu, e este decréscimo foi maior empregando-se a cesta central (700 rpm): 68% em relação à consistência da blenda NIE. Ambos os produtos IE apresentaram valores de consistência dentro da faixa considerada ideal (200-800 gf/cm²), com satisfatórias propriedades de espalhabilidade (HAIGHTON, 1959). Vale ressaltar que, de acordo com os resultados obtidos, o mais elevado valor de GI (9,61%) foi alcançado em 4 horas de reação, e neste tempo, provavelmente maior diminuição na consistência do produto IE poderia ser alcançada.

Figura 4.17. Consistência dos produtos IE em 12h de reação, em função da velocidade de agitação empregada: cesta lateral (500 rpm) e cesta central (700 rpm).

Considerando-se os resultados obtidos, para a próxima etapa do trabalho, selecionou-se a cesta na configuração central, uma vez que resultou em um produto IE com

adequado valor de consistência ($387 \pm 105,83 \text{ gf/cm}^2$), no mais elevado grau de interesterificação (8,01%) e no mais baixo teor de ácidos graxos livres (4,61 %), além da maior facilidade no manuseio, se comparado à cesta lateral.

4.8. Estabilidade operacional da lipase de *Rhizopus oryzae* em reator batelada com adaptação de cesta central

Atualmente, o custo de lipases comerciais, imobilizadas ou não, e a baixa estabilidade operacional, têm sido considerados como a maior restrição para seu uso industrial. Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de investigar a possibilidade de se realizar as reações de interesterificação enzimática em reatores contínuos, o que resultaria em uma diminuição do custo do processo, tornando esta biocatálise competitiva com os métodos atuais (OSÓRIO et al., 2009; XU, 2000).

A estabilidade operacional das lipases imobilizadas depende de vários parâmetros, como por exemplo: o próprio biocatalisador, conteúdo de água nas matérias primas, presença de produtos de oxidação, grau de refino destas matérias primas e também da configuração do biorreator. De acordo com a literatura, reatores do tipo PBR são preferíveis quando há inibição por produto, enquanto os do tipo STR são mais adequados quando há inibição por substrato ou ativação por produto (OSÓRIO et al., 2009).

No presente trabalho, a estabilidade operacional da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA ativado com metaperiodato de sódio, foi avaliada de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.9. Foram efetuadas um total de 10 bateladas consecutivas, sendo cada uma delas constituída de um tempo de 6 h. Como nas etapas anteriores, foi analisada a composição em TAGs, calculando-se o grau de interesterificação e o teor de ácidos graxos livres. Além disso, a análise da consistência do produto IE final também foi efetuada. Os resultados são apresentados a seguir.

4.8.1. Composição em triacilgliceróis

A Figura 4.18 apresenta a composição em triacilgliceróis (TAGs) dos produtos interesterificados (IE) obtidos em diferentes tempos de reação (2, 4 e 6 h), empregando-se o reator batelada, com adaptação de cesta central. Na Figura 4.18 é representada a concentração média de TAGs ao longo do tempo em todas as bateladas, uma vez que o comportamento observado em cada uma foi bastante similar. A composição em TAGs foi comparada à blenda de gordura de leite e óleo de soja não interesterificadas (NIE) e cada

triacilglicerol foi representado pelo número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula.

A análise da Figura 4.18 mostra que a concentração dos TAGs C₂₈ a C₃₂ manteve-se praticamente constante até 4 horas de reação, aumentando após este período. Comportamento semelhante foi observado para os TAGs C₄₄ a C₅₀. Neste caso, a concentração destes TAGs diminuiu levemente nas primeiras 2 h de processo, mantendo-se praticamente inalterada até 4h e aumentando ao final da reação. Com relação ao TAG C₅₄, este aumentou em 2h de reação, diminuindo após este período. Estes resultados estão de acordo com o anteriormente observado, quando a reação foi realizada pela primeira vez (item 4.7.1).

Figura 4.18. Composição média em TAGs dos produtos IE obtidos nas bateladas, nos tempos de 2h (), 4h () e 6h (), em comparação á composição da blenda reacional NIE (): estabilidade operacional (Col = colesterol).

Foi realizada a quantificação dos ácidos graxos livres e os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.19. De maneira geral, o teor de ácidos livres foi semelhante em todas as bateladas, sendo o máximo valor (3,16%) obtido na primeira batelada. Provavelmente, o conteúdo de água oriundo do derivado imobilizado, influenciou neste

resultado, favorecendo a hidrólise. Nas bateladas seguintes, o teor de água presente no meio reacional parece ter sido menor, uma vez que o teor de ácidos livres apresentou valor abaixo de 3%.

Figura 4.19. Ácidos graxos livres (%) obtidos em cada uma das bateladas efetuadas (1 —■—; 2 —○—; 3 —▷—; 4 —▽—; 5 —◆—; 6 —▲—; 7 —◻—; 8 —◊—; 9 —☆—; 10 —●—), em função do tempo reacional.

A partir da concentração dos TAGs calculou-se o grau de interesterificação e os valores obtidos estão apresentados na Figura 4.20, que permite comparar os valores de GI obtidos nos diferentes tempos reacionais para cada batelada.

Excetuando-se as bateladas 1 e 10, os máximos valores de GI foram obtidos em 4 horas de reação, sofrendo um decréscimo após este período. As bateladas 3 e 5 forneceram os mais elevados valores de GI (6,8 e 7,6 %, respectivamente). De maneira geral, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, uma vez que pouca variação foi observada nos valores de GI, mostrando que a enzima manteve-se ativa até a última batelada efetuada.

Conforme previamente discutido, sabe-se que a estabilidade operacional das lipases imobilizadas depende de vários parâmetros (OSÓRIO et al., 2009). Assim, é importante ressaltar que a realização desta etapa experimental foi realizada cuidadosamente, a fim de minimizar a influência das outras variáveis experimentais do processo. Não foi observada perda de massa do biocatalisador durante a realização dos experimentos. No entanto, as

variações experimentais resultantes da preparação do meio reacional e lavagem do biocatalisador podem ter influenciado nos resultados obtidos.

Figura 4.20. Grau de interesterificação (%) obtido em cada uma das bateladas repetidas: avaliação da estabilidade operacional da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

Osório et. al (2009), por exemplo, avaliaram a estabilidade operacional da lipase imobilizada de *Candida parapsilosis* em reações de interesterificação de blendas contendo ácidos graxos poliinsaturados. As reações foram conduzidas em reatores operando em regime batelada, e os autores obtiveram um tempo de meia-vida de 10 h. Portanto, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, indicando que o biocatalisador manteve-se estável até a última batelada, ou seja, durante 60 h de reação.

4.8.2. Consistência dos produtos interesterificados

As análises de consistência (gf/cm²) também foram efetuadas para os produtos IE obtidos ao final de cada batelada. Os valores obtidos (valor médio $\pm$ desvio padrão) estão apresentados na Figura 4.21, que permite comparar a consistência dos produtos IE oriundos das diferentes bateladas reacionais. Neste mesmo gráfico, são apresentados ainda

os valores de GI, a fim de facilitar a comparação da propriedade física (consistência) e do GI.

Figura 4.21. Consistência (barras) dos produtos IE em 6h de reação e GI (linha) em função da batelada reacional executada.

A análise dos resultados revela que a consistência de todos os produtos IE diminuiu, em relação à blenda 65:35 NIE. A maioria dos produtos interesterificados apresentaram valores de consistências dentro da faixa ideal ($200\text{-}800 \text{ gf/cm}^2$), estabelecida por Haighton (1959), para uma gordura com satisfatória plasticidade e propriedades de espalhabilidade. É importante ressaltar que o GI apresentado na Figura 4.21 é o obtido em 6h de reação, uma vez que a análise de consistência dos produtos foi efetuada somente neste tempo experimental.

Portanto, os resultados estão de acordo com as conclusões anteriores (item 4.8.1) relacionadas à estabilidade operacional do biocatalisador, que se manteve estável por 60 h de reação, sendo este tempo bastante satisfatório.

4.9. Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização sílica-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) e da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada por adsorção física

Todas as reações descritas nas seções anteriores foram catalisadas por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente. No entanto, considerando-se que este método emprega agentes químicos de modificação e que o produto obtido no presente trabalho é destinado à indústria alimentícia, julgou-se conveniente a substituição deste pelo método de imobilização por adsorção física, uma vez que se trata de um procedimento simples, de baixo custo, que consiste na adsorção da enzima no suporte sólido, sem qualquer modificação prévia da matriz ou do biocatalisador. De acordo com a literatura, a adsorção física assegura uma retenção elevada da conformação nativa da enzima e de sua atividade catalítica intrínseca (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003).

Nunes et al. (2009) avaliaram qual seria o procedimento de imobilização mais efetivo da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) em SiO₂-PVA para mediar a reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de canola. Os autores compararam o potencial catalítico da lipase imobilizada por adsorção física no suporte não ativado e por ligação covalente no suporte ativado com metaperiodato de sódio. As reações foram realizadas em regime de batelada e os resultados obtidos foram bem promissores. Os autores selecionaram como procedimento de imobilização mais efetivo o adsorção física, uma vez que o emprego do derivado imobilizado por este método resultou em maior redução na consistência da mistura (84%, enquanto o derivado preparado por ligação covalente reduziu apenas 76%), além de ser uma técnica de fácil execução.

A literatura relata também que a aplicação do método de imobilização por adsorção física é limitada devido à natureza reversível da ligação entre o biocatalisador e a matriz, a qual é influenciada pelas condições operacionais. Deste modo, pode-se observar a dessorção do biocatalisador, uma vez que sua ocorrência está relacionada às alterações conformacionais da proteína e às condições hidrodinâmicas do sistema reacional (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003). Em estudo recente (PAULA et al., 2011), no entanto, o potencial da lipase de *R. oryzae* (L036P) imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física foi avaliado na catálise da reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, em reator de leito fixo operando em modo contínuo, por 35 dias. Neste trabalho, não foi observada nenhuma queda na atividade catalítica da lipase durante os primeiros 12 dias de operação do reator, sugerindo que a dessorção não ocorreu. Os resultados obtidos

permitiram avaliar a estabilidade operacional do derivado imobilizado, que forneceu um tempo de meia vida de 34 dias, sendo este um resultado bastante satisfatório. Desta forma, o método de imobilização por adsorção física foi selecionado para a continuidade deste trabalho.

Considerando-se que o composto SiO₂-PVA foi selecionado como matriz de imobilização da lipase de *R. oryzae*, foram determinadas as propriedades físicas, químicas e morfológicas do mesmo. As análises efetuadas incluíram porosimetria, espectroscopia no infra-vermelho, microscopia eletrônica de varredura e análise elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X. Estas análises possibilitaram a aquisição de informações importantes sobre o suporte de imobilização e servirão de base a estudos futuros.

4.9.1. Porosidade

Foram determinados os valores de área superficial específica, tamanho e volume de poros do suporte neutralizado (item 3.3.4), o qual foi empregado no procedimento de imobilização, e da lipase L036P imobilizada por adsorção física. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Área superficial específica, volume de poros e tamanho médio de poros e do suporte SiO₂-PVA antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio.

Propriedade	SiO ₂ -PVA neutralizado	L036P imobilizada em SiO ₂ -PVA
Área superficial específica (m ² /g)	252	192
Volume de poro (cm ³ /g)	0,27	0,19
Tamanho médio dos poros (Å)	42,87	40,81

Analisando-se a Tabela 4.8, verifica-se que a imobilização promoveu uma redução aproximada de 24% e 30% da área superficial específica e do volume de poro, respectivamente. Estas mudanças estão relacionadas à introdução de lipase livre nos poros do suporte SiO₂-PVA neutralizado, confirmando assim a eficiência do processo de imobilização. Por outro lado, o tamanho médio dos poros manteve-se praticamente constante após a imobilização.

4.9.2. Análise por espectroscopia no infravermelho

A Figura 4.22 compara os espectros no infravermelho do suporte SiO₂-PVA neutralizado e da lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física.

Figura 4.22. Espectros no infra-vermelho do suporte SiO₂-PVA neutralizado e da lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física.

A análise dos resultados revela que o espectro do suporte SiO₂-PVA não ativado apresentou bandas na faixa de 3200-3600 cm⁻¹ referentes aos grupos hidroxilas. Outras bandas características podem ser também observadas na faixa de 1100-1000 cm⁻¹, correspondente à ligação Si-O-R, em 950 cm⁻¹ e 810 cm⁻¹ referentes à deformação axial Si-O-Si, e em 600 cm⁻¹ referentes à deformação angular Si-O-Si (SANTOS et al., 2008b; STUART; GEORGE; McINTYRE, 1996). Com relação ao derivado imobilizado, a análise da Figura 4.22 revela que a etapa de imobilização parece não ter alterado significativamente o perfil dos espectros. O surgimento de duas bandas adicionais nas faixas de 600-700 cm⁻¹ e 1800-1900 cm⁻¹, pode ser observado no espectro da Figura 4.22, que provavelmente sejam característicos da lipase livre.

4.9.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e análise elemental superficial (EDS)

As Figuras 4.23 e 4.24 apresentam, respectivamente, as micrografias do suporte SiO₂-PVA neutralizado e da lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física, enquanto

a Tabela 4.9 apresenta a composição elemental superficial do suporte SiO₂-PVA neutralizado e da lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física. Conforme pode ser verificado, o suporte SiO₂-PVA neutralizado (Figura 4.23) apresenta uma superfície menos irregular em comparação à superfície do derivado imobilizado (Figura 4.24).

Figura 4.23. Micrografias do suporte SiO₂-PVA neutralizado (a) aumento de 500X (b) aumento de 1000X.

Figura 4.24. Micrografias da lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física (a) aumento de 500X (b) aumento de 1000X.

Além disso, em sua composição superficial (Tabela 4.9) foram encontrados, conforme esperado, os elementos carbono, silício e oxigênio. Após a imobilização, ocorreu aumento tanto da quantidade de carbono superficial, bem como a diminuição dos teores de silício e oxigênio. Este resultado já era esperado, uma vez no processo de imobilização a superfície do suporte é recoberta por lipase na forma livre. A observação das Figuras 4.23 e 4.24 permite inferir ainda que o procedimento de imobilização, além das mudanças

químicas, resultou também em alterações físicas na superfície do suporte neutralizado, já que o derivado imobilizado parece apresentar superfície mais porosa.

Tabela 4.9. Composição elemental superficial do suporte SiO₂-PVA neutralizado e da lipase de *R. oryzae* imobilizada por ADS.

Elemento	Suporte SiO ₂ -PVA neutralizado	lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada por ADS
Carbono	20,29	57,74
Oxigênio	40,23	32,24
Silício	39,48	10,03

4.10. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reatores operando em modo contínuo: leito fixo

De acordo com a literatura, o tempo que as partículas permanecem no interior do reator é chamado tempo de residência (FOGLER, 2009). Os reatores ideais de escoamento empistonado e em batelada são as únicas classes de reatores em que todos os átomos no interior do reator têm o mesmo tempo de residência. Em todos os outros tipos de reatores, os vários átomos da alimentação permanecem tempos diferentes no interior do reator, isto é, existe uma distribuição do tempo de residência das partículas no interior do reator (FOGLER, 2009).

Portanto, antes de se iniciar as reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo, fez-se a determinação da Distribuição do Tempo Residência (DTR), uma característica da mistura que ocorre no reator (FOGLER, 2009), sendo uma das formas de caracterização mais informativas. Os resultados são mostrados a seguir.

4.10.1. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Experimentalmente, a Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é determinada injetando-se no reator no tempo zero, um composto, denominado traçador, e então medindo-se a concentração do mesmo no efluente do reator em função do tempo. O traçador deve ser uma espécie não reagente, facilmente detectável, com propriedades físicas similares às daquelas da mistura reagente, além de ser completamente solúvel na mistura (FOGLER, 2009). Neste trabalho, empregou-se como traçador o corante

lipossolúvel CI 61554, uma substância de coloração azul escura, que facilitou sua visualização ao longo do deslocamento no interior do reator. A determinação da DTR foi efetuada de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.11 e o cálculo da função de distribuição de tempo de residência $E(t)$, foi realizado de acordo com a Equação 4.1 (FOGLER, 2009).

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (4.1)$$

em que: $C(t)$ corresponde à concentração do traçador em um determinado tempo (t) e o denominador da equação corresponde à área sob curva $C(t) \times t$.

Inicialmente, fez-se o estabelecimento da curva de concentração de traçador no meio reacional. Os experimentos foram realizados com o corante lipossolúvel CI 61554 na concentração de 8,5% em mistura reacional 65:35 (% m/m, gordura de leite:óleo de soja), permitindo a obtenção da curva “concentração X absorbância”, e conseqüentemente a determinação da concentração de traçador na saída do reator durante a determinação da distribuição de tempo de residência (DTR). A varredura inicial feita no espectrofotômetro na faixa da luz visível mostrou que a maior absorbância para esse corante foi observada no comprimento de onda de 650 nm. Desta forma, neste comprimento de onda, foram feitas as leituras subseqüentes sob diferentes concentrações de solução de traçador na mistura reacional, a qual foi diluída em t-butanol. O experimento foi realizado em duplicata a fim de se calcular o desvio padrão. Os dados experimentais são apresentados no APÊNDICE C, enquanto os valores médios de concentração do traçador em função da absorbância, bem como o desvio padrão são apresentados na Figura 4.25. A reta que ajusta os dados experimentais é apresentada na Equação 4.2.

Figura 4.25. Concentração do traçador em mistura reacional 65:35 (% m/m, gordura de leite:óleo de soja), em função da absorbância.

$$[A] = 1,00984.[Concentração] \quad (4.2)$$

$$\text{Coeficiente de correlação } (R^2) = 0,99 \quad 9$$

em que: [A]: Absorbância; [Concentração]: concentração de traçador em mistura reacional 65:35 (% m/m, gordura de leite:óleo de soja).

Fez-se também a determinação da densidade cristalina da lipase L036P imobilizada em suporte SiO₂-PVA por adsorção física (item 3.3.12). O resultado obtido ($2,5168 \pm 0,0521$ g/ml) corresponde à densidade do sólido (valor médio $\pm$ desvio padrão), desconsiderando-se os espaços inter e intra-particulares. Após o carregamento do reator com o derivado imobilizado, o mesmo foi preenchido com meio reacional e mantido sob vácuo até que todo o ar fosse retirado dos poros das partículas. Assim, o valor da densidade cristalina foi considerado adequado para a determinação do volume de líquido no reator e, conseqüentemente, do tempo espacial.

Os dois métodos mais utilizados para injeção do traçador são o de entrada do tipo degrau e tipo pulso, sendo este último empregado neste trabalho. Em reatores tubulares ideais todos os componentes que saem do reator permanecem exatamente o mesmo tempo

em seu interior e, neste caso, a DTR é um pico de altura infinita e largura zero, cuja área é igual a 1 (FOGLER, 2009), conforme ilustrado na Figura 4.26.

Figura 4.26. Resposta de um escoamento uniforme à entrada de um pulso em reator ideal, onde $E(t)$: função de Distribuição de Tempo de Residência.

Em reatores ideais, sem caminho preferencial ou zonas mortas, o tempo médio de residência, calculado de acordo com a equação 4.3 (FOGLER, 2009) com base na função de distribuição de tempo de residência, deve coincidir com o tempo espacial (τ - tempo necessário para se processar um volume de reator, calculado conforme equação 4.4) para sistemas fechados (FOGLER, 2009). Quanto maior for o número de caminhos preferenciais e de zonas mortas no empacotamento maior será a diferença entre os valores de tempo médio de residência (t_m) o tempo espacial (τ). Na Figura 4.27. é mostrada a curva de DTR obtida para o reator em estudo.

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (4.3)$$

em que: V ... Volume do reator; v ... vazão volumétrica; τ ... tempo espacial

$$t_m = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (4.4)$$

em que: t_m ... Tempo médio de residência; t ... Tempo; $E(t)$... Função de distribuição de tempo de residência.

Figura 4.27. Distribuição de Tempo de Residência para o reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fixo.

O tempo médio de residência calculado foi de 135,0 minutos, indicando que a maior parcela de moléculas de traçador injetado permaneceu por 135,0 minutos dentro do reator. Conhecendo-se o volume de líquido do reator, obtido através da diferença entre o volume total e o ocupado pelo derivado imobilizado no empacotamento, e a vazão volumétrica empregada (0,1893 mL/min), obteve-se tempo de espacial de 124,2 minutos. Comparando-se este tempo com o correspondente ao tempo de residência médio (124,2 minutos), tem-se uma diferença de 10,8 minutos (erro de 8,74%), considerada aceitável neste tipo de ensaio em função dos erros experimentais envolvidos. Conforme mostrado na Figura 4.27, o reator de coluna com leito fixo empregado não apresenta comportamento de reator tubular ideal. Pode-se observar um relativo espalhamento da curva de DTR, apesar desta ter apresentado apenas um pico. A relativa coincidência entre o tempo espacial e o tempo médio de residência foi um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou retromistura no leito, demonstrando boa qualidade do empacotamento. Isto pode ser comprovado observando-se a Figura 4.28 (a-d), que apresenta fotos do experimento, ao longo do tempo, a partir da injeção do traçador na base do reator.

Figura 4.28. Fotos do experimento para determinação da Distribuição de Tempo de Residência (DTR) no reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fixo: (a) tempo inicial correspondente á injeção do traçador; (b) e (c) tempos intermediários; (d) final do experimento.

4.10.2. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca comercial Aviação

Conforme previamente descrito no item 3.3.10.1, foi realizado um total de quatro reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, operando em modo contínuo. De acordo com a Tabela 3.3, apenas as reações 1 e 2 foram efetuadas empregando-se manteiga da marca comercial Aviação como fonte de gordura de leite, tendo sido estas reações conduzidas no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Portanto, nesta seção serão discutidos os resultados obtidos nas reações 1 e 2 (Tabela 3.3), que foram acompanhadas pela determinação do teor de ácidos graxos livres (%), da consistência dos produtos interesterificados e do conteúdo de gordura sólida por DSC.

De acordo com os resultados obtidos quando a reação foi efetuada em batelada (item 4.6), o melhor tempo reacional foi 4h, uma vez que permitiu a obtenção de produtos interesterificados com consistência dentro da faixa ideal (HAIGHTON, 1959). Assim, este tempo (4h) foi selecionado como valor inicial para o tempo espacial empregado nesta etapa do trabalho. Além disso, de acordo com a literatura, reatores de leito fixo são os mais utilizados quando se trata de enzimas imobilizadas e caracterizam-se por um movimento constante do substrato através do leito contendo as enzimas imobilizadas, o que permite a obtenção de maiores velocidades de reação (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007). Portanto, espera-se que a reação de interesterificação em leito fixo ocorra mais rapidamente, justificando-se o estudo de menores tempos espaciais.

A Tabela 4.10 apresenta os valores teóricos e reais dos tempos espaciais empregados nesta primeira reação com variação da vazão (Tabela 3.3). Os tempos espaciais foram calculados de acordo com a equação 3.5 e o experimento foi mantido por um total de 16 dias, permanecendo 4 dias em cada uma das vazões estudadas.

Tabela 4.10. Tempos espaciais teóricos e reais calculados de acordo com a vazão empregada.

Tempo espacial teórico (h)	Massa (g) de derivado imobilizado (L036P)	Volume de biocatalisador (mL)*	Altura do leito (cm)	Vazão empregada (mL/min)	Tempo espacial calculado (h)
4	23,33	9,27	16,60	0,08	4,20
2			16,60	0,15	2,19
1			16,60	0,35	0,94
0,5			18,80	0,79	0,51

*Calculado com o valor da densidade cristalina ($2,5168 \pm 0,0521$ g/ml)

Como nas etapas anteriores, realizou-se a quantificação dos ácidos graxos livres, sendo os resultados apresentados na Figura 4.29. Os resultados mostraram que, inicialmente, o teor de ácidos livres atingiu valores de 25% nas primeiras horas de reação, diminuindo de forma acentuada após este período. A partir de 72h, o teor de ácidos livres manteve-se praticamente estável ($1,12 \pm 0,31\%$, valor médio $\pm$ desvio padrão, após 72h) até o final da reação. Provavelmente, o conteúdo de água oriundo do derivado imobilizado (10,3%), influenciou neste resultado, favorecendo a hidrólise no início da reação de interesterificação.

Figura 4.29. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais.

Além do teor de ácidos graxos livres, a consistência dos produtos interesterificados também foi avaliada. Os resultados são apresentados na Figura 4.30, que mostra, além dos dados experimentais, os valores de consistência (valor médio $\pm$ desvio padrão) obtidos em cada tempo espacial estudado.

Os resultados obtidos revelaram que apenas o tempo espacial de 4h parece ter sido adequado para permitir a obtenção de um produto interesterificado com consistência dentro da faixa de 200-800 gf/cm², considerada por Haighton (1959) como ideal para um produto com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade. Isso porque os demais tempos espaciais avaliados (2h, 1h e 1/2 h), resultaram em produtos interesterificados com consistência acima do limite superior (800 gf/cm²). Observa-se ainda que tempos inferiores a 4h acarretaram valores de consistência semelhantes.

Figura 4.30. Consistência dos produtos interesterificados obtidos na reação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais. $C_{média}$ = valor médio da consistência em cada tempo espacial estudado.

Estes resultados podem ser melhor visualizados na Tabela 4.11, que apresenta a redução percentual dos valores médios das consistências obtidas empregando-se diferentes tempos espaciais, em relação à consistência da mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja).

Tabela 4.11. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, na reação de interesterificação contínua em reator de leito fixo empregando-se diferentes tempos espaciais.

Tempo espacial (h)	Consistência (gf/cm ²)**	% Redução
Mistura 65:35*	1431,15 ± 41,9	---
4	412,3 ± 134,2	71,19
2	1086,6 ± 152,9	24,08
1	1198,0 ± 272,8	16,29
0,5	1182,4 ± 115,3	17,38

*gordura de leite:óleo de soja

** Valor médio ± desvio padrão

A análise da Tabela 4.11 revela que a maior redução percentual da consistência ocorreu empregando-se o tempo espacial de 4h (71,19%). A redução do tempo espacial

para 2h resultou em redução de 24% na consistência, enquanto que os valores obtidos usando-se 1h ou 0,5h foram de 16-17%.

A semelhança nos valores de consistência obtidos com tempos espaciais inferiores a 4h mostrou que as transformações decorrentes da reação de interesterificação, embora possam ter sido diferentes para os tempos de 2h, 1h e 0,5 h, não foram suficientes para resultar em diferenças na consistência.

Outro parâmetro importante na caracterização de óleos e gorduras é o perfil térmico (AGUEDO et al. 2009; RIBEIRO et al. 2009b; RIBEIRO et al. 2009c) e, dentre as metodologias empregadas investigação deste parâmetro, destaca-se a análise por calorimetria de varredura diferencial (DSC—“*Diferencial Scanning Calorimetry*”), uma técnica termo analítica que tem sido amplamente utilizada para avaliar óleos e gorduras (RIBEIRO et al., 2009c). Através da técnica de DSC, os fenômenos térmicos observados para estas matérias-primas podem ser verificados através do monitoramento da entalpia e da transição de fase dos vários triacilgliceróis das misturas (RIBEIRO et al., 2009c), sendo esta uma vantagem desta técnica perante outras técnicas calorimétricas (TAN; CHE MAN, 2000).

A Figura 4.31a mostra o termograma de fusão em função da temperatura, obtido por DSC, para as matérias-primas gordura de leite e óleo de soja, comparativamente ao termograma obtido para a mistura reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja) antes da interesterificação. A Figura 4.31b, por sua vez, mostra o efeito da reação enzimática sobre o perfil térmico dos produtos dos produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais. Destaca-se que esta análise foi realizada apenas para um tempo reacional de cada um dos tempos espaciais estudados (72h para $\tau = 4h$; 168h para $\tau = 2h$; 264h para $\tau = 1h$; 360h para $\tau = 1/2h$), quando o estado estacionário já havia sido alcançado.

(a)

(b)

Figura 4.31. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de soja e mistura reacional contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja e para (b) os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais (amostra de 72h para $\tau = 4h$; amostra de 168h para $\tau = 2h$; amostra de 264h para $\tau = 1h$; amostra de 360h para $\tau = 1/2h$).

É possível observar os distintos comportamentos térmicos destas gorduras em face dos diferentes triacilgliceróis que as compõem. A fusão de uma gordura contribui para a expansão de seu volume, caracterizando a presença de picos endotérmicos. Em geral, óleos e gorduras podem apresentar comportamento térmico extremamente complexo, o que dependerá de sua composição química e dos procedimentos da análise de DSC (RIBEIRO et al., 2009c).

Verifica-se para a gordura de leite (Figura 4.31a) a presença de três regiões endotérmicas, a primeira de -40 a 7°C, a segunda de 7 ao 20°C, na qual está presente o pico “E” a 15°C, e a terceira de 20 a 40°C. Este resultado está de acordo com o relatado por Hunt e Buckin (2000), que relacionam a interpretação das medidas obtidas por DSC para a gordura de leite à existência de três espécies de fusão predominantes de baixa fusão (em torno de 8°C), de média fusão (entre 8 e 20°C) e de alta fusão (acima de 20°C). Para o óleo de soja é possível notar a presença de um evento endotérmico principal, o pico “B” a -27°C. A gordura de leite apresentou ampla faixa de fusão de -35°C a 36°C, enquanto que o óleo de soja possui faixa de fusão mais restrita de -42°C a 7°C, o que está diretamente relacionado a mais complexa composição em TAGs da gordura comparativamente ao óleo de soja. Para a mistura 65:35, observa-se que o evento endotérmico na região do pico “A” foi intensificado, em comparação ao observado no termograma da gordura de leite. Além disso, os eventos endotérmicos na região dos picos “B” e “C” não puderam ser observados no termograma da mistura, enquanto o pico “D” teve sua amplitude intensificada, sofrendo um leve deslocamento para temperaturas mais baixas, em comparação ao observado no termograma da gordura de leite. Este comportamento de diminuição da temperatura também foi observado para o evento endotérmico na região do pico “E”. No entanto, neste caso, observa-se que este pico teve sua amplitude diminuída, devido à adição do óleo à gordura.

A análise dos termogramas presentes na Figura 4.31b revela que, após 72h ($\tau = 4h$) de reação, houve uma diminuição do pico endotérmico “E” (característico da gordura de leite), promovendo a formação de um pico levemente mais alargado. Além disso, a análise da Figura 4.31b revela ainda que para os demais tempos espaciais estudados, apenas pequenas variações podem ser observadas comparando-se os termogramas obtidos e a mistura reacional inicial (65:35).

Além do perfil térmico, outro parâmetro importante na caracterização de óleos e gorduras é o conteúdo de gordura sólida (CGS), que indica o percentual de gordura que se

encontra no estado sólido a uma determinada temperatura (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007). Esta propriedade é responsável por muitos atributos importantes das gorduras, por exemplo, aparência física, características sensoriais, espalhabilidade, características de fusão, e plasticidade ou consistência de um produto alimentício. A variação do conteúdo de gordura sólida e a faixa de temperaturas de fusão, junto com outros fatores, tais como, morfologia de cristais, determinam os limites de temperaturas em que a gordura pode ser considerada plástica (OTERO et al., 2006).

O método mais empregado para determinação do conteúdo de gordura sólida é a técnica de ressonância nuclear magnética (NMR), devido em grande parte aos trabalhos da AOCS (COUPLAND, 2001). Outra alternativa para determinação do CGS é a técnica de DSC, que apresenta a vantagem de ser um método rápido e conveniente para qualquer consistência de gordura (COUPLAND, 2001). Nos termogramas de fusão obtidos por DSC, o valor da área parcial, identificado sob o pico de fusão (endotérmico), é equivalente à porcentagem de sólidos remanescentes na temperatura selecionada, e alguns autores têm utilizado esta técnica para a obtenção do conteúdo de gordura sólida da gordura de leite e de seus produtos interesterificados (LEE; SWAISGOOD, 1997; SELLPPAN; AKOH, 2001; SHEN et al., 2001). Nesta etapa do trabalho, empregou-se a técnica de DSC para determinação do CGS.

Através dos termogramas de fusão de DSC (Figura 4.31) obteve-se o conteúdo de gordura sólida (CGS) para os produtos interesterificados e os resultados são apresentados na Figura 4.32, em função da temperatura, comparativamente aos valores obtidos para a mistura reacional não interesterificada e para gordura de leite. Características especiais das gorduras são obtidas em diferentes faixas de temperaturas (GRIMALDI; GONÇALVES; ESTEVES, 2000).

O conteúdo de gordura sólida entre 4 e 10°C determina a espalhabilidade do produto na temperatura de refrigeração. CGS não superior a 32% à temperatura de 10°C, é indicado para garantir boa espalhabilidade nesta temperatura. O CGS do produto entre 20 e 22°C determina sua estabilidade e resistência à exsudação do óleo. Neste caso, o teor ideal não deve ser inferior a 10% (LIDA; ALI, 1998; O'BRIEN 2004; RIBEIRO et al., 2009a). O conteúdo CGS entre 33 e 38°C influencia as impressões e sensações de areosidade do alimento na boca (O'BRIEN, 2004; OTERO et al., 2006). Em alimentos como margarinas é desejável alto teor de gordura sólida para propiciar estrutura cristalina adequada à

temperatura ambiente, e baixo conteúdo de gordura sólida em altas temperaturas, de modo que a fusão ocorra facilmente na boca (GRIMALDI et al., 2001).

Figura 4.32. Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para gordura de leite, para a mistura reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja) e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se diferentes tempos espaciais (amostra de 72h para $\tau = 4h$; amostra de 168h para $\tau = 2h$; amostra de 264h para $\tau = 1h$; amostra de 360h para $\tau = 1/2h$).

Os resultados encontrados para conteúdo de gordura sólida indicam que tanto a gordura de leite, quanto a mistura não interesterificada e os produtos de reação apresentaram menores valores em função do aumento da temperatura de análise. Para a gordura de leite foi observado alto teor de gordura sólida a 10°C (73%), resultado que justifica o valor elevado da consistência da gordura pura observado na Tabela 4.1 ($6074 \pm 406,8 \text{ gf/cm}^2$), sendo portanto classificada segundo os critérios de Haighon (1959), como “muito dura” (Tabela 3.7). A 20°C, a gordura de leite apresentou conteúdo de gordura sólida de 34%, tendo boa resistência a migração de óleo a temperatura ambiente. Já a 30°C, esta gordura apresentou 8,5% de sólidos, mostrando certa arenosidade em temperaturas próximas à corporal ($\sim 35^\circ\text{C}$). Comparando-se o conteúdo de gordura sólida da gordura de leite ao da mistura reacional não interesterificada, pode-se observar que apenas a adição de óleo de soja à gordura de leite, conduziu a diminuição deste parâmetro para todas as temperaturas de análise. Ainda assim, a mistura 65:35 apresentou elevado teor de gordura

sólida a 10°C (49%), o que justifica o valor elevado da consistência ($1431,15 \pm 41,9$ gf/cm²; Tabela 4.11) nesta temperatura.

Após a reação observou-se que em todas as temperaturas estudadas os produtos apresentaram menor conteúdo de gordura sólida em comparação à mistura não interesterificada. Essa diminuição pôde ser melhor observada para o produto obtido em 72h ($\tau = 4$ h), enquanto os demais produtos resultaram em pouca ou praticamente nenhuma diminuição do CGS em relação à mistura 65:35. De maneira geral, verifica-se que de acordo com os critérios estabelecidos por O'Brien (2004), o produto que apresentou melhor plasticidade foi obtido em 72h de reação, ou seja, com o uso de tempo espacial de 4h, em função dos teores de sólido considerados ideais para um “*spread*” a 10°C (mais próximo de 30% em comparação aos demais), apresentar boa resistência à migração do óleo a 20°C (sólidos > 10%) e teor de gordura sólida próximos a zero a 30°C (sólidos < 3%), mostrando ser adequado para aplicações nesta temperatura, já que neste caso não apresentam arenosidade na boca. Novamente, os resultados de CGS mostraram que os tempos espaciais de 2, 1 e ½ h não foram eficientes e nem suficientes para promover um rearranjo dos TAGs envolvidos na reação, originando um produto com satisfatórias propriedades de espalhabilidade.

Portanto, o tempo espacial de 4h foi selecionado como adequado para ser empregado na próxima reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja (Reação 2; Tabela 3.3). A reação foi mantida por 15 dias e o objetivo foi verificar a estabilidade operacional do derivado imobilizado através do cálculo do tempo de meia vida, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6. Como na reação anterior, foram quantificados os teores de ácidos graxos livres (%), a consistência dos produtos interesterificados e o conteúdo de gordura sólida por DSC.

Com relação ao teor de ácidos graxos, os resultados são apresentados na Figura 4.33, e a análise dos resultados revela que, a partir de 48h, o teor de ácidos livres manteve-se praticamente estável ($1,16 \pm 0,22$ %; valor médio $\pm$ desvio padrão, após 48h) até o final da reação. No entanto, observa-se que este parâmetro atingiu valores de 12% nas primeiras horas de reação, diminuindo após este período. Além disso, comparando-se os valores iniciais de ácidos graxos livres desta reação com a anterior, observa-se que a reação com variação dos tempos espaciais atingiu valores de 25% (Figura 4.29). Essa diferença relaciona-se ao teor de água nos derivados imobilizados. Na reação anterior a umidade inicial do biocatalisador foi de 10,3%, enquanto nesta foi de 7,4%. O teor de água mais

elevado provavelmente tenha favorecido a hidrólise no início da reação, resultando em maior teor de ácidos graxos livres. Conforme previamente discutido, a interesterificação de óleos e gorduras envolve, em nível molecular, reações sequenciais de hidrólise e esterificação (re-síntese) dos triacilgliceróis (MARANGONI, 2002; WILLIS; MARANGONI, 2008). Como a água atua como substrato nas reações de hidrólise, essa reação é favorecida com o aumento da quantidade de água (AIRES-BARROS; GAMA, 2003).

Figura 4.33. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se tempo espacial de 4h.

Além do teor de ácidos graxos livres, a consistência dos produtos interesterificados foi avaliada. Os resultados são apresentados na Figura 4.34, que mostra, além dos dados experimentais com respectivos desvios padrão, o valor da consistência da mistura inicial (tempo 0h) empregada na reação de interesterificação.

Figura 4.34. Consistência dos produtos interesterificados obtidos na reação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se tempo espacial de 4h.

A análise da Figura 4.34 revela que nas primeiras 24h de reação, a consistência do produto atingiu valor próximo ao limite inferior (200 gf/cm^2). Este resultado pode ser compreendido considerando-se os ácidos livres obtidos nesta reação que, de acordo com Figura 4.33, atingiu valores máximos neste tempo reacional. Este teor de ácidos graxos indica que houve hidrólise dos triacilgliceróis presentes a qual, quando parcial, resulta em monoglicerídeos e diglicerídeos, responsáveis pela baixa consistência dos produtos. Realmente, a presença de pequenas quantidades de produtos de hidrólise parcial, como mono e di-glicerídeos, pode modificar a textura do material, uma vez que essas substâncias atuam como emulsificantes (KAEWTHONG et al., 2005).

Após 48h, os valores de consistência dos produtos interesterificados foram semelhantes entre si e próximos ao limite superior (800 gf/cm^2). O valor médio da consistência dos produtos a partir de 48h foi de $799,8 \pm 62,6 \text{ gf/cm}^2$, representando uma diminuição de $39,00 \pm 4,78$ em relação ao valor da consistência da mistura inicial ($1310,5 \pm 29,8 \text{ gf/cm}^2$, valor médio $\pm$ desvio padrão). A redução percentual da consistência nesta reação foi menor do que a obtida na reação anterior empregando-se o mesmo tempo espacial (Tabela 4.11), mas este resultado também pode ser atribuído à umidade dos

derivados imobilizados empregados nas reações e aos teores de ácidos graxos livres obtidos em cada uma delas, indicativos da presença de produtos de hidrólise parcial do triacilgliceróis.

Além da consistência, a análise de DSC também foi efetuada para os produtos interesterificados desta reação contínua em reator de leito fixo, com tempo espacial de 4h. A Figura 4.35 mostra o efeito da reação enzimática sobre o perfil térmico dos produtos dos produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo.

Figura 4.35. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para a mistura reacional contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h.

A análise dos termogramas revela que, após a reação de interesterificação, houve um deslocamento dos picos endotérmicos “A” e “B” para temperaturas levemente superiores. Além disso, quase nenhuma variação pode ser observada comparando-se os termogramas dos produtos interesterificados nos diferentes tempos reacionais, o que já era esperado considerando-se tratar de um processo contínuo. Através dos termogramas de fusão de DSC (Figura 4.35) obteve-se o conteúdo de gordura sólida (CGS) para os produtos interesterificados e os resultados são apresentados na Figura 4.36, em função da temperatura, comparativamente aos valores obtidos para a mistura reacional não interesterificada.

Figura 4.36. Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para gordura de leite, para a mistura reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja) e para os produtos obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h.

Os resultados de conteúdo de gordura sólida indicam que tanto a mistura não interesterificada quanto os produtos de reação apresentaram menores valores em função do aumento da temperatura de análise. Após a reação observou-se que em todas as temperaturas estudadas, os produtos apresentaram menor conteúdo de gordura sólida em comparação à mistura não interesterificada. Além disso, os resultados obtidos em ambos os tempos reacionais foram bastante semelhantes, devido a tratar-se de o processo contínuo.

De maneira geral, verifica-se que de acordo com os critérios estabelecidos por O'Brien (2004), os produtos interesterificados apresentaram boa resistência à migração do óleo a 20°C (sólidos > 10%) e teor de gordura sólida próximos a zero a 30°C (sólidos < 4%), mostrando ser adequado para aplicações nesta temperatura, já que neste caso não apresentam arenosidade na boca. Com relação à plasticidade, os produtos apresentaram CGS em torno de 48%, valor inferior ao obtido para a mistura reacional (54%), mas superior ao ideal (próximo de 30%) para um “spread” a 10°C.

Um parâmetro de fundamental importância quando se trabalha com enzimas imobilizadas é a estabilidade operacional que, quando elevada, pode tornar o processo de

interesterificação contínua mais atraente industrialmente, devido à compensação do alto custo das lipases pelo uso prolongado destas (PAULA et al., 2011). Nesse sentido, a reação foi mantida por 14 dias e após o término, efetuou-se a dosagem da atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada, para se calcular o tempo de meia vida e avaliar sua estabilidade operacional, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6. A Tabela 4.12 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4.12. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA empregada na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 4h.

Atividade inicial (U/g)*	Atividade Residual (U/g)*	K _d (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)
3038,35	2379,39	0,0175	39

*base seca

Os dados da Tabela 4.12 revelam que após a reação, o biocatalisador manteve 78% de sua atividade hidrolítica inicial, o que resultou em um tempo de meia vida de 39 dias. Estes resultados são bastante satisfatórios e mostram a boa estabilidade operacional do derivado imobilizado empregado na catálise da reação. Além disso, são comparáveis aos obtidos em trabalho anterior (PAULA et al., 2011), no qual avaliou-se o potencial da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA na catálise da mesma reação estudada neste trabalho, porém empregando-se proporção mássica (80:20 gordura de leite:óleo de soja) e fonte de gordura diferentes. A reação foi mantida por 35 dias e o tempo de meia vida do biocatalisador foi de 34 dias (PAULA et al., 2011), resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. A boa estabilidade operacional do derivado imobilizado pode ser atribuída ao procedimento de imobilização e ao suporte empregado (SiO₂-PVA), um material híbrido que combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, capacidade tamponante, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral. Este procedimento simples, mas eficaz, originou uma preparação de lipase imobilizada com maiores valores de atividade e estabilidade, como já demonstrado em trabalhos publicados (PAULA et al., 2008; FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010). Osório et al. (2005), por exemplo, avaliaram o emprego da Novozym® 435, uma preparação comercial de lipase na forma imobilizada, na reação de interesterificação da

estearina de palma com óleo de soja, em reator de leito fluidizado e obtiveram um tempo de meia vida de 17 dias.

4.10.3. Interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca Mimosa e mistura inicial composta por 65% de gordura de leite

Conforme previamente descrito, as reações 3 e 4 (Tabela 3.3) foram realizadas nos laboratórios do Centro de Engenharia de Biossistemas-CEER, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade Técnica de Lisboa (Lisboa, Portugal) e empregaram manteiga comercial da marca Mimosa, adquirida em um mercado local em Lisboa, como fonte de gordura. Portanto, nesta seção serão discutidos os resultados obtidos na reação 3, que foi acompanhada pela quantificação dos triglicerídeos por cromatografia gasosa, determinação do índice de acidez (%), produtos de oxidação, consistência dos produtos interesterificados e conteúdo de gordura sólida por RMN.

De acordo com as condições ótimas estabelecidas no laboratório de Biocatálise da EEL/USP, o teor de umidade ideal no derivado imobilizado é de 10% (m/m). No entanto, nos laboratórios do Centro Engenharia de Biossistemas-CEER, não foi possível realizar a medição direta do teor de umidade, tornando-se necessário verificar a relação entre a umidade absoluta e a atividade de água (a_w). Para isso, construiu-se uma isotérmica a 30 °C para a lipase L036P imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, pré-equilibrando-se o biocatalisador com fase vapor de soluções sobressaturadas de sais com diferentes valores de a_w (Tabela 3.6). Quando cada preparação atingiu o valor de a_w pretendido, determinou-se o seu teor de umidade residual por secagem em estufa, a 101°C, até massa constante.

Com os valores obtidos, construiu-se a isotérmica (base seca) para o biocatalisador, representada na Figura 4.37. A partir da equação apresentada no gráfico, verificou-se que a a_w ideal, que corresponde aos 10% de umidade no derivado imobilizado, é de 0,40.

Figura 4.37. Curva de a_w versus teor de umidade (% base seca) obtida para a lipase L036P imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física.

As condições reacionais desta primeira reação empregando-se a manteiga comercial da marca Mimosa como fonte de gordura de leite, foram determinadas com base em trabalho previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Universidade Técnica de Lisboa (OSÓRIO et al., 2005), relacionado à interesterificação da estearina de palma com óleo de soja em reator de leito fluidizado, catalisada por lipase de *Candida antarctica* (Novozym® 435). Neste trabalho, os autores utilizaram um tempo de residência de 19 min e 7,6g de lipase.

Portanto, a reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por lipase L036P imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física, foi efetuada empregando-se uma vazão de 0,76 mL/min, 7,6 g de derivado imobilizado, correspondendo a um tempo espacial de 12 minutos. A reação foi mantida por 21 dias, na temperatura de 45 °C, sendo a mistura reacional composta por 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja.

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), os resultados são apresentados na Figura 4.38. Os resultados mostram que inicialmente o teor de ácidos livres atingiu valores em torno de 3% nas primeiras horas de reação, diminuindo após este período, mantendo-se praticamente constante até o final da reação ($0,88 \pm 0,24$ %; valor médio $\pm$ desvio padrão, após 16h).

Figura 4.38. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

Durante a operação do reator, a presença dos produtos de oxidação foi também avaliada, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.10. Os produtos primários são os hidroperóxidos e dienos conjugados, enquanto os produtos secundários são formados por aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta. Os produtos primários e secundários foram quantificados, respectivamente, nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. Os resultados são apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

Produtos de oxidação	Coefficiente de absorção* (E) no estado estacionário
Primários (Abs _{232 nm})	0,1117 ± 0,0468
Secundários (Abs _{270 nm})	0,0235 ± 0,0073

*Valor médio ± desvio padrão

De acordo com a literatura, as principais alterações químicas que ocorrem nos óleos vegetais são por processos químicos como a oxidação, que pode ser acelerada pelo calor, luz (foto-oxidação), ou traços de metais (MALLÉGOL; LEMAIRE; GARDETTE, 2000; FONSECA; YOSHIDA, 2009). A reação de oxidação inicia-se com a formação de radicais livres, seguida da formação de hidroperóxidos. Estes compostos são instáveis e são também os principais intermediários no mecanismo de oxidação do óleo. Sua decomposição se dá por diferentes mecanismos produzindo compostos carbonílicos como cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, além de alcoóis, éter e outros compostos orgânicos (FONSECA; YOSHIDA, 2009).

Os resultados da Tabela 4.13 revelam que a formação de produtos de oxidação primários e secundários pode ser desprezada, uma vez que os valores médios de absorvância obtidos no estado estacionário são muito baixos. Estes resultados são bastante satisfatórios e estão de acordo com a literatura. Osório et al. (2005), por exemplo, também avaliaram a formação de produtos de oxidação na interesterificação da estearina de palma com óleo de soja e obtiveram valores considerados desprezíveis ($Ab_{S_{232\text{ nm}}} = 0,151 \pm 0,031$; $Ab_{S_{270\text{ nm}}} = 0,624 \pm 0,024$).

Após o início da reação, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise da composição em triacilgliceróis. Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, plotou-se um gráfico com os valores de concentração dos triacilgliceróis na mistura reacional inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) e nos produtos interesterificados obtidos em diferentes tempos reacionais. Estes resultados são apresentados na Figura 4.39.

De maneira geral, no tempo de 3h, observa-se a diminuição da concentração dos TAGs C_{52} - C_{54} e o aumento dos demais, em relação à mistura reacional. A partir de 24h, observa-se que a concentração dos TAGs C_{46} - C_{54} aumenta, enquanto a dos TAGs C_{28} - C_{42} diminui, em relação à mistura, mantendo-se praticamente constante ou sofrendo pequenas variações até o final da reação.

Figura 4.39. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

A partir da concentração em TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação, de acordo com a metodologia do item 3.4.8. Os resultados estão apresentados na Figura 4.40 e para facilitar a compreensão dos resultados, plotou-se no mesmo gráfico, os valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio $\pm$ desvio padrão) obtidos na reação. A análise da Figura 4.40 revela que, em 3h de reação obteve-se um GI de 7,75%. Calculando-se um GI médio, obtêm-se o valor de $7,12 \pm 2,21$ % (valor médio $\pm$ desvio padrão, no estado estacionário), ao longo da reação. Com relação à consistência dos produtos interesterificados, todos os valores atingiram a faixa ideal ($200\text{-}800 \text{ gf/cm}^2$) em apenas 3h de reação, mantendo-se praticamente constante até o final da reação, sendo este (3h) o tempo no qual o estado estacionário foi atingido.

Figura 4.40. Consistência (gf/cm², ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

Os valores de redução percentual das consistências dos produtos interesterificados, em relação à consistência da mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) são apresentados na Tabela 4.14. Calculando-se a média dos valores da Tabela 4.14, obtém-se uma consistência de $712,08 \pm 50,31$ gf/cm², o que representa uma porcentagem de redução média de 29 ± 5 %, em relação à consistência da mistura inicial. Este resultado é inferior ao obtido nas reações em leito fixo quando a manteiga da marca comercial Aviação foi utilizada como fonte de gordura de leite (item 4.10.2). No entanto, é importante ressaltar que as consistências das misturas iniciais diferem entre si, o que justifica a diferença de valores observada. A mistura reacional oriunda da marca comercial Aviação forneceu consistência de $1431,15 \pm 41,9$ (Tabela 4.11), enquanto a originada da manteiga comercial da marca Mimosa forneceu consistência de $1002,43 \pm 44,65$ (Tabela 4.14), uma diferença de aproximadamente 30%. Além disso, embora o emprego da manteiga da marca Mimosa como fonte de gordura de leite tenha levado à menor redução percentual (29 ± 5 %), o produto interesterificado resultante apresentou consistência ($712,08 \pm 50,31$ gf/cm²) dentro da faixa de 200-800 gf/cm², considerada por Haighton (1959) como ideal para um produto com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade. Este resultado é bastante

satisfatório considerando-se o pequeno tempo espacial empregado (Tabela 3.3). Desta forma, observa-se que o tempo espacial a ser utilizado depende fortemente das características das matérias-primas empregadas. Gordura de leite com maior valor de consistência poderá exigir tempos espaciais substancialmente mais elevados.

Tabela 4.14. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

Tempo (h)	Consistência ** (gf/cm²)	% Redução
Mistura 65:35*	1002,43 ± 44,65	----
3	738,00 ± 17,00	26,36
40	819,50 ± 59,38	18,25
64	731,73 ± 8,64	27,00
72	689,71 ± 43,22	31,20
96	656,94 ± 70,77	34,47
160	677,82 ± 14,86	32,38
280	730,58 ± 97,26	27,12
304	689,71 ± 43,22	31,20
352	673,86 ± 49,31	32,78
400	747,50 ± 27,98	25,43
424	750,13 ± 58,59	25,17
472	638,49 ± 23,19	36,31

*65:35 gordura de leite:óleo de soja

** Valor médio ± desvio padrão

Além da consistência, efetuou-se a determinação do conteúdo de gordura sólida por RMN, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.13. As análises foram realizadas em três diferentes temperaturas: 10, 20 e 35°C (CGS_{10°C}, CGS_{20°C} e CGS_{35°C}). Estas temperaturas foram selecionadas porque, conforme previamente discutido, estão relacionadas respectivamente à espalhabilidade do produto na temperatura de refrigeração, estabilidade e resistência à exsudação do óleo e as impressões e sensações de arenosidade do alimento na boca. Os resultados são apresentados na Figura 4.41.

Figura 4.41. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

De acordo com os resultados da Figura 4.41, os produtos interesterificados apresentaram os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS: $CGS_{10^{\circ}C} = 26,24 \pm 1,41$; $CGS_{20^{\circ}C} = 10,92 \pm 0,60$ e $CGS_{35^{\circ}C} = 0,18 \pm 0,11$. Os valores de CGS apresentam-se dentro das respectivas faixas ideais, em todas as temperaturas avaliadas, conforme os critérios de O' Brien (2004), ou seja, abaixo de 32% entre 4 e 10°C, acima de 10% entre 20 e 22°C e baixo CGS entre 33 e 38°C.

Com relação às misturas iniciais, foram obtidos os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS: $CGS_{10^{\circ}C} = 28,83 \pm 1,46$; $CGS_{20^{\circ}C} = 11,21 \pm 0,62$ e $CGS_{35^{\circ}C} = 0,20 \pm 0,11$. Portanto, os resultados mostraram um ligeiro decréscimo nos valores de CGS dos produtos em relação às misturas iniciais, nas temperaturas de 10 e 20°C (8,9 e 2,54%, respectivamente). Nenhuma variação no $CGS_{35^{\circ}C}$ foi observada, provavelmente porque nessa temperatura, a estrutura cristalina da mistura e dos produtos já tenha sido desfeita, ou seja, nesta temperatura o CGS aproxima-se de zero.

A reação foi mantida por 21 dias e após o término, efetuou-se a dosagem da atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada, para se calcular o tempo de meia vida e avaliar sua estabilidade operacional, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.15 e revelam que após a reação, o biocatalisador manteve 44% de sua atividade hidrolítica inicial, o que resultou em um tempo de meia vida de 18 dias. Este valor é inferior ao obtido no item 4.10.2 (Tabela 4.12), isso porque, provavelmente o emprego de uma vazão cerca de 10 vezes superior à anteriormente utilizada pode ter favorecido a dessorção da enzima.

Tabela 4.15. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35), em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 12 min.

Atividade inicial (U/g)*	Atividade Residual (U/g)*	K _d (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)
5139,9	2250,1	0,039	18

*base seca

4.10.4. Propriedades das diferentes fontes comerciais de gordura de leite utilizadas no presente trabalho: manteigas das marcas Aviação e Mimosa

Considerando-se os resultados obtidos na seção anterior, relacionados à diferença nos valores de consistência das misturas reacionais, foram comparadas as principais propriedades das duas fontes de gordura empregadas neste trabalho (manteigas das marcas comerciais Aviação e Mimosa). A Tabela 4.16 apresenta os valores de consistência das gorduras de leite e das misturas reacionais de acordo com as diferentes marcas de manteiga empregadas.

Tabela 4.16. Consistência das gorduras de leite e das misturas reacionais de acordo com as diferentes marcas de manteiga empregadas.

Amostra	Consistência** (gf/cm ²)
Gordura de leite (Marca Aviação)	6074,00 ± 406,80
Gordura de leite (Marca Mimosa)	3724,94 ± 249,91
Mistura 65:35* (Marca Aviação)	1431,15 ± 41,94
Mistura 65:35* (Marca Mimosa)	1002,43 ± 44,65

*65:35 (gordura de leite:óleo de soja)

** valor médio ± desvio padrão

Os resultados da Tabela 4.16 revelam que a consistência da gordura de leite oriunda da manteiga comercial da marca Mimosa, é aproximadamente 38% inferior ao respectivo

valor da manteiga comercial da marca Aviação, o que resultou em diferentes consistências das misturas reacionais.

A fim de se avaliar a razão desta diferença, foram feitas análises da composição em ácidos graxos das diferentes gorduras e os resultados são apresentados na Tabela 4.17. De maneira geral, a composição de ambas as gorduras foi semelhante. Os ácidos graxos presentes em quantidades mais expressivas foram o palmítico, oléico, esteárico, e mirístico. Além disso, foi também observada a presença do ácido butírico, ácido graxo característico da gordura de leite (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007; PARODI, 2006; RODRIGUES; GIOIELLI, 2003), apresentando-se em maior porcentagem na gordura original da manteiga da marca Mimosa.

No entanto, os resultados da Tabela 4.17 revelam que a gordura de leite da marca comercial Mimosa apresentou menor quantidade de ácidos graxos insaturados (30,44%) e maior de saturados (69,56%) em comparação à gordura da marca comercial Aviação. À primeira vista, portanto, a gordura da marca comercial “Mimosa” deveria ter fornecido valores de consistência mais elevados em comparação à gordura da marca “Aviação”, o que, de acordo com os resultados da Tabela 4.16, não ocorreu. Isso pode ser explicado em função da maior massa molar média dos TAGs da gordura de leite oriunda da manteiga da marca Aviação, cujo valor, calculado com base nos dados apresentados na Tabela 4.17, foi 812,78 g/mol. A massa molar média dos TAGs da gordura de leite oriunda da manteiga da marca Mimosa foi, por sua vez, foi 785,14 g/mol.

Além disso, de acordo com as informações dos rótulos, a manteiga da marca Mimosa apresenta em sua composição fermentos lácteos, enquanto a da marca comercial Aviação é composta apenas por creme de leite. De fato, de acordo com a literatura, a fermentação láctica constitui uma das formas mais antigas de conservação de alimentos de produtos oriundos da agricultura ou da indústria agro-alimentar (DIAS, 2008). Consiste na oxidação anaeróbica parcial de carboidratos com a produção final de ácido láctico, além de outras substâncias orgânicas. Trata-se de um processo microbiano de grande importância utilizado pelo homem na produção de derivados do leite (queijos, manteiga, leite fermentado), na fermentação de vegetais (picles, azeitonas e chucrutes), entre outros (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Os microrganismos presentes alteram a composição do produto, podendo inclusive promover sua hidrólise parcial e, portanto, a presença de fermentos lácteos na manteiga da marca Mimosa é responsável pela diferença de consistência das gorduras, observada na Tabela 4.16, devido ao ácido láctico. De fato, a

mistura 65:35, original da gordura de leite da manteiga de marca Mimosa apresentou maior teor de ácidos graxos livres (0,46%) em comparação à original da gordura de leite da manteiga de marca Aviação (0,11%).

Tabela 4.17. Composição em ácidos graxos (% m/m) das gorduras de leite originadas de diferentes manteigas comerciais.

Ácidos Graxos		gordura de leite "Marca Aviação"		gordura de leite "Marca Mimosa"	
		obtida	normalizada	obtida	normalizada
		%m/m	%m/m	%m/m	%m/m
butírico	C 4:0	1,18	1,23	2,79	2,92
capróico	C 6:0	1,36	1,42	2,07	2,16
caprílico	C 8:0	0,97	1,01	1,26	1,32
cáprico	C 10:0	2,21	2,31	2,92	3,06
láurico	C 12:0	2,71	2,83	3,32	3,47
mirístico	C 14:0	9,99	10,42	10,79	11,30
pentadecanóico	C 15:0	1,11	1,16	0,98	1,02
pentadecenóico	C 15:1	-----	-----	0,26	0,27
palmitico	C 16:0	29,45	30,73	31,51	33,00
palmitoléico	C 16:1	1,91	1,99	1,96	2,05
margárico	C 17:0	0,48	0,5	0,55	0,58
cis-10-heptadecenóico	C 17:1	0,75	0,78	0,27	0,28
estearico	C 18:0	12,09	12,62	10,14	10,62
trans elaidico	C 18:1	3,05	3,18	2,17	2,27
oléico	C 18:1	24,38	25,44	21,82	22,85
trans t-linoléico	C 18:2	0,17	0,18	0,21	0,22
linoléico	C 18:2	2,03	2,12	1,89	1,98
trans t-linolênico	C 18:3	0,16	0,17	0,17	0,18
linolênico	C 18:3	0,3	0,31	0,22	0,23
octadecatetraenóico	C 18:4	0,9	0,94	-----	-----
araquídico	C 20:0	0,19	0,2	0,11	0,11
eicosenóico	C 20:1	0,16	0,17	0,10	0,11
behênico	C 22:0	0,12	0,13	-----	-----
lignocérico	C 24:0	0,08	0,08	-----	-----
nervônico	C 24:1	0,08	1,23	-----	-----
não identificados	-----	4,17	-----	4,52	-----
Total identificado		95,83	100	95,48	100
Saturados		66,03	64,55	66,42	69,56
Insaturados		33,81	35,28	29,06	30,44

Além da composição em ácidos graxos, foram comparados os perfis de concentração em TAGs das diferentes misturas reacionais (65:35 gordura de leite: óleo de soja) de acordo com a fonte de manteiga. De acordo com a Figura 4.42, observa-se que a mistura reacional originada da gordura de leite da marca Mimosa apresenta maior quantidade dos TAGs C₂₄-C₃₀, C₃₈ e C₅₄ e menor quantidade dos TAGs C₃₆ e C₄₀-C₅₀. Quanto aos demais TAGs pouca ou nenhuma variação pode ser observada.

Figura 4.42. Comparação do perfil de concentração de triacilgliceróis das misturas reacionais de gordura de leite e óleo de soja (65:35) empregando-se diferentes marcas de manteiga como fonte de gordura de leite. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

Com base nestes resultados, e visando-se obter uma mistura inicial com consistência semelhante ao valor empregando-se a manteiga da marca comercial Aviação ($1431,15 \pm 41,94$ gf/cm²), a próxima reação em leito fixo foi efetuada com uma mistura reacional contendo maior teor de gordura (reação 4, tabela 3.3). Os resultados são apresentados na próxima seção.

4.10.5. Interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leito fixo empregando-se manteiga da marca mimosa e mistura inicial composta por 80% de gordura de leite

A reação 4 (Tabela 3.3), também foi acompanhada pela determinação do teor de ácidos graxos livres (%), produtos de oxidação, quantificação dos triacilgliceróis por cromatografia gasosa, consistência dos produtos interesterificados e conteúdo de gordura sólida por RMN. Manteve-se a mesma vazão de alimentação empregada na reação anterior (0,76 mL/min). No entanto, considerando-se o aumento do teor de gordura de leite na mistura inicial, empregou-se maior tempo espacial, buscando-se que reação ocorresse em extensão satisfatória, aumentando o tempo de contato do substrato com o biocatalisador. Portanto, foram utilizadas 25g de lipase L036P imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção, correspondendo a um tempo espacial de 37 minutos. A reação foi mantida por 15 dias, na temperatura de 45 °C, sendo a mistura reacional composta por 80% de gordura de leite e 20% de óleo de soja.

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), os resultados apresentados na Figura 4.43 mostram que inicialmente foram atingidos valores em torno de 9,5% nas primeiras horas de reação. Após este período, a concentração dos ácidos graxos livres diminuiu, mantendo-se praticamente constante até o final da reação ($1,29 \pm 0,17$ %, valor médio $\pm$ desvio padrão, após 24h).

Durante a operação do reator, a presença dos produtos de oxidação foi também avaliada, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.10. Os produtos primários e secundários foram quantificados nos comprimentos de onda de 232 e 268 nm, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.18. Os valores obtidos são semelhantes aos da reação anterior (item 4.10.3) e os resultados revelam que a formação dos produtos de oxidação primários e secundários pode ser desprezada, sendo este um resultado bastante satisfatório, uma vez que indica a não ocorrência de oxidação na reação.

Figura 4.43. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Tabela 4.18. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Produtos de oxidação	Coefficiente de absorção* (E) no estado estacionário
Primários (Abs _{232 nm})	0,2931 ± 0,0525
Secundários (Abs _{268 nm})	0,0330 ± 0,0000

*Valor médio ± desvio padrão

Após o início da reação, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise da composição em triacilgliceróis. Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, plotou-se um gráfico com os valores de concentração dos triacilgliceróis na mistura reacional inicial (80:20 gordura de leite:óleo de soja) e nos produtos interesterificados obtidos em diferentes tempos reacionais. Estes resultados são apresentados na Figura 4.44.

Figura 4.44. Perfil de concentração de triacilgliceróis obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO_2 -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

De maneira geral, as maiores modificações ocorreram até 6h de reação. A análise da Figura 4.44 revela que a concentração dos TAGs C_{24} - C_{30} e C_{46} - C_{52} aumentou, enquanto a dos TAGs C_{34} - C_{44} diminuiu em relação à mistura reacional, nas primeiras 6h, mesmo tempo no qual se obteve o máximo teor de ácidos graxos (Figura 4.43). A partir de 24h, a concentração dos TAGs C_{34} - C_{44} e C_{54} aumentou, enquanto a dos TAGs C_{24} - C_{30} e C_{48} - C_{52} diminuiu, em relação à concentração obtida em 6h, mantendo-se praticamente constante ou sofrendo pequenas variações até o final da reação.

A partir da concentração em TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação, de acordo com a metodologia do item 3.4.8. Os resultados estão apresentados na Figura 4.45 e para facilitar a compreensão dos resultados, plotou-se no mesmo gráfico, os valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio $\pm$

desvio padrão) obtidos na reação. Observa-se que em 6h de reação obteve-se um GI de aproximadamente 11%. De maneira geral, após este período, o GI variou entre 7 e 11%, sendo o valor de GI médio de $9,32 \pm 2,14 \%$.

Com relação à consistência, a mistura reacional 80:20 (gordura de leite:óleo de soja) forneceu um valor de $1849,67 \pm 239,56 \text{ gf/cm}^2$. Conforme o esperado, o aumento do teor de gordura de leite possibilitou a obtenção de uma mistura com consistência mais elevada. No entanto, os resultados da Figura 4.45 revelam que apenas a consistência do produto interesterificado em 6h de reação atingiu um valor dentro da faixa ideal ($200\text{-}800 \text{ gf/cm}^2$). Isso porque, neste mesmo tempo reacional, o teor de ácidos graxos livres foi o máximo obtido, indicando a presença de produtos de hidrólise parcial, que influenciam na consistência do produto. Após este período, o estado estacionário foi atingido e os produtos apresentaram consistências semelhantes e acima do limite superior. Portanto, embora os resultados mostrem uma diminuição da consistência dos produtos interesterificados em relação ao respectivo valor da mistura reacional inicial, essa diminuição não foi suficiente para a obtenção de um produto com satisfatória plasticidade e espalhabilidade.

Figura 4.45. Consistência (gf/cm^2 , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO_2 -PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Os valores de redução percentual das consistências dos produtos interesterificados, em relação à consistência da mistura inicial (80:20 gordura de leite:óleo de soja) são apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Tempo (h)	Consistência**(gf/cm ²)	% Redução
Mistura 80:20*	1849,67 ± 239,56	----
6	727,68 ± 96,13	60,66
24	1015,19 ± 43,56	45,12
32	1189,37 ± 30,14	35,70
48	1192,70 ± 57,29	35,52
56	1264,89 ± 19,24	31,62
72	1365,47 ± 20,50	26,18
80	1298,64 ± 113,27	29,79
96	1319,80 ± 57,39	28,65
120	1383,85 ± 60,00	25,18
144	1407,43 ± 165,00	23,91
152	1395,52 ± 78,47	24,55
168	1331,50 ± 103,05	28,01
192	1410,37 ± 13,53	23,75
264	1426,52 ± 48,56	22,88
288	1542,88 ± 33,35	16,59
312	1481,57 ± 42,07	19,90
336	1430,03 ± 167,88	22,69
360	1361,48 ± 24,09	26,39

*80:20 gordura de leite:óleo de soja

** Valor médio ± desvio padrão

Calculando-se a média dos valores da Tabela 4.19 no estado estacionário (a partir de 24h), obteve-se consistência de 1342,20 ± 125,01 gf/cm², o que representa porcentagem de redução média de 27,44 ± 6,76 %, em relação à consistência da mistura inicial.

Além da consistência, efetuou-se a determinação do conteúdo de gordura sólida por RMN, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.13. As análises foram realizadas em três diferentes temperaturas: 10, 20 e 35°C (CGS_{10°C}, CGS_{20°C} e CGS_{35°C}) e os resultados são apresentados na Figura 4.46.

Figura 4.46. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20) catalisada por L036P imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

De acordo com os resultados, os produtos interesterificados apresentaram os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS, no estado estacionário: CGS_{10°C} = $32,13 \pm 1,23$; CGS_{20°C} = $14,05 \pm 0,38$ e CGS_{35°C} = $0,19 \pm 0,11$. Com relação às misturas iniciais, foram obtidos os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS: CGS_{10°C} = $33,74 \pm 0,39$; CGS_{20°C} = $14,24 \pm 0,17$ e CGS_{35°C} = $0,19 \pm 0,08$. Os valores de CGS apresentam-se dentro das respectivas nas faixas ideais, apenas nas temperaturas de 20 e 35°C. À 10°C, o CGS foi superior a 32% não garantindo boa espalhabilidade nesta temperatura. Portanto, embora observe-se um ligeiro decréscimo nos valores de CGS dos produtos em relação à mistura inicial, na temperatura de 10°C (4,78%), essa diminuição não foi suficiente para promover a desejada redução da consistência, propriedade também avaliada na temperatura de 10°C, que conforme previamente discutido, não atingiu valores dentro da faixa ideal (200-800 gf/cm²). Além disso, analisando-se a Figura 4.48, verifica-se que os valores de CGS apresentaram-se baixos até as primeiras 6h, mesmo tempo em que o teor de ácidos graxos livres foi máximo (Figura 4.43) e a consistência mínima (Figura 4.45). Após este período, tanto os valores de CGS_{10°C} e CGS_{20°C} (Figura

4.46), quanto o teor de ácidos graxos livres e a consistência permaneceram praticamente constantes.

A reação foi mantida por 15 dias e após o término, efetuou-se a dosagem da atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada, para se calcular o tempo de meia vida e avaliar sua estabilidade operacional, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.20 e revelam que após a reação, o biocatalisador manteve 48% de sua atividade hidrolítica inicial, o que resultou em um tempo de meia vida de 14 dias. Este valor semelhante ao relatado no item 4.10.3 (Tabela 4.15), uma vez que a vazão empregada em ambas as reações foi a mesma. Este resultado é satisfatório e mostra a boa estabilidade operacional do derivado imobilizado empregado na catálise da reação.

Tabela 4.20. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (80:20), em reator de leito fixo, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Atividade inicial (U/g)*	Atividade Residual (U/g)*	K _d (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)
4515,19	2183,47	0,048	14

*base seca

4.11. Reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reatores operando em modo contínuo: reações em leito fluidizado

Após a realização das reações em leito fixo operando em modo contínuo, foram feitas reações em leito fluidizado. Deve-se observar que, na literatura, não são encontrados trabalhos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja empregando-se este tipo de reator. Conforme previamente apresentado, as vantagens do leito fluidizado incluem a eliminação da formação de caminhos preferenciais, menor alteração da pressão quando altas vazões de alimentação são empregadas, e não formação de gradientes de concentração (WILLIS; MARANGONI, 2008). Além disso, a diferença de densidade entre as fases sólida e fluida deve ser a maior possível de forma a permitir velocidades elevadas de circulação de fluido que, por sua vez, vão melhorar as condições de mistura, transferência de calor e massa no interior do reator (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007).

Foram realizadas duas reações de interesterificação em leite fluidizado, de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.10.2, sendo a mistura inicial composta por 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja. As reações foram acompanhadas pela determinação do teor de ácidos graxos livres (%), dos produtos de oxidação, pela quantificação dos triglicerídeos por cromatografia gasosa, consistência dos produtos interesterificados, e conteúdo de gordura sólida por RMN.

Antes de se iniciar as reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em reator de leite fluidizado, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, foram efetuados testes para determinar a velocidade mínima de fluidização e a Distribuição do Tempo Residência (DTR), a fim de caracterizar o reator de maneira mais completa, sendo os resultados apresentados a seguir.

4.11.1. Testes para avaliação da velocidade mínima de fluidização a ser empregada na reação de interesterificação

Foram realizados testes experimentais para a determinação da velocidade mínima de fluidização, empregando-se 6,28 g (seca) de lipase L036 imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física. O meio reacional utilizado foi constituído por 65% de gordura de leite e 35% de óleo de soja. Variou-se a posição da bomba, medindo-se a respectiva altura do leite (cm) e vazão (mL/min). A velocidade mínima de fluidização foi calculada a partir de dados experimentais de porosidade do leite em função da velocidade superficial do líquido, ajustada à Equação 3.1, enquanto a porosidade do leite foi calculada através da Equação 3.2. Considerou-se como velocidade mínima de fluidização a velocidade superficial do fluido na equação de Richardson e Zaki (1954) para a qual a porosidade do leite corresponde à altura do leite com velocidade superficial de fluidização nula. Os resultados da altura do leite em função da vazão empregada, bem como os respectivos valores de velocidade superficial (cm/min) e porosidade, são apresentados na Tabela 4.21.

Fazendo-se a linearização da equação 3.1, obtém-se a seguinte equação logarítmica: **Log (U) = Log (U_{tc}) + n * Log (ε)**. Aplicando-se esta equação aos dados experimentais da Tabela 4.21, foi possível calcular os parâmetros U_{tc} e n, através da linearização dos dados experimentais, com R² = 0,9673. Estes resultados são apresentados na Figura 4.47.

Tabela 4.21. Altura do leito de biocatalisador (cm) em função da vazão (mL/min) empregada: velocidade superficial (cm/min) e porosidade.

Posição Bomba	altura do leito (cm)	vazão (mL/min)	U (cm/min)	ε
0	2,50	--	--	0,6822
60	11,8	14,40	4,5860	0,9327
80	15,0	18,00	5,7325	0,9470
85	15,0	20,00	6,3694	0,9470
75	11,0	17,40	5,5414	0,9278
65	8,5	16,80	5,3503	0,9065
55	7,0	13,20	4,2038	0,8865
50	6,4	12,60	4,0127	0,8759
45	5,6	11,40	3,6306	0,8581
40	5,2	9,60	3,0573	0,8472
35	4,6	9,00	2,8662	0,8273
30	4,1	7,60	2,4204	0,8062

Figura 4.47. Linearização dos dados experimentais de velocidade superficial (cm/min) em função da porosidade, para o cálculo dos parâmetros U_{tc} e n .

A partir dos valores de U_{tc} e n , através da equação 3.1, obteve-se a velocidade mínima de fluidização. Os resultados são apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Valores de U_{tc} e n obtidos a partir dos dados experimentais: cálculo da velocidade mínima de fluidização.

Linearização dos dados experimentais	Parâmetros da equação 3.1	Cálculos a partir da equação 3.1		
$\text{Log}(U_{tc})$	n	U_{tc} (cm/min)	U_{min} (cm/min)	V_{min} (mL/min)
0,9056	5,46	8,05	1,00	3,13

De acordo com os resultados da Tabela 4.22 obteve-se o seguinte modelo:

$$\left(\frac{U}{U_{tc}}\right) = \varepsilon^n \quad \longrightarrow \quad \left(\frac{U}{8,05}\right) = \varepsilon^{5,46}$$

Portanto, nesta etapa do trabalho calculou-se o valor da velocidade mínima de fluidização, que correspondeu à vazão mínima de 3,13 mL/min. Para garantir a fluidização optou-se por trabalhar com o dobro da vazão mínima, ou seja, 6,26 mL/min.

4.11.2. Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

A determinação da DTR foi efetuada de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.11. O cálculo da função de distribuição de tempo de residência $E(t)$, foi realizado de acordo com as equações apresentadas na seção 4.10.1, quando este mesmo ensaio foi realizado para reatores em leito fixo. Empregou-se a mesma curva de concentração do traçador (Figura 4.26), sendo a injeção do traçador do tipo pulso.

O sistema foi montado de acordo com o esquema reacional da Figura 3.7. Neste caso, devido à densidade cristalina do derivado imobilizado ser muito superior à densidade da mistura reacional 65:35 gordura de leite: óleo de soja, tornou-se necessário um sistema com recirculação do meio, uma vez que a passada única não foi suficiente para promover a fluidização do biocatalisador. Após o carregamento do reator com 14,6g do derivado imobilizado (Tabela 3.5), o mesmo foi preenchido com meio reacional e mantido sob vácuo até que todo o ar fosse retirado dos poros das partículas. Com o valor da densidade cristalina da lipase L036P imobilizada em suporte SiO_2 -PVA por adsorção física (item 3.3.12), determinou-se o volume ocupado pelo derivado imobilizado (5,80 mL). Vale salientar que neste caso, o volume útil do reator, foi obtido através da diferença entre o volume total (75,95 mL) e o ocupado pelo derivado imobilizado (5,80 mL) no

empacotamento, sendo o volume total a soma dos volumes do reator de coluna, mangueiras e tanque de recirculação. A vazão de recirculação empregada foi de 0,8108 mL/min, obtendo-se tempo espacial de 87 minutos. Na Figura 4.48 é mostrada a curva de DTR obtida para o reator em estudo.

De acordo com a literatura, quando a curva de concentração-tempo tem uma cauda muito longa, a análise pode estar sujeita a grandes imprecisões. Neste caso, o ideal é que a cauda seja extrapolada e o cálculo seja feito analiticamente, podendo ser aproximada como um decaimento exponencial. As imprecisões introduzidas por esta suposição são bem menores do que aquelas resultantes do truncamento ou imprecisão numérica nessa região (FOGLER, 2009). Assim, a partir de 160 min, os dados de concentração do traçador que originaram a curva $E(t)$ da Figura 4.48 foram obtidos por um ajuste exponencial dos dados experimentais de concentração coletados durante a realização do ensaio, até este tempo ($C = 0,7546 * e^{-0,01 * t}$; $R^2 = 0,9787$).

Figura 4.48. Distribuição de Tempo de Residência para o reator de coluna empregado nas reações de interesterificação enzimática da gordura de leite e óleo de soja em leito fluidizado.

O tempo médio de residência calculado foi de 101,12 minutos, indicando que a maior parcela de moléculas de traçador injetado permaneceu por 101,12 minutos dentro do reator. Comparando-se o tempo espacial calculado (87 minutos) com o tempo de residência médio, tem-se uma diferença de aproximadamente 15 minutos (erro de 16,89 %),

considerada aceitável neste tipo de ensaio em função dos erros experimentais envolvidos. A relativa coincidência entre o tempo espacial e o tempo médio de residência foi um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou retromistura no leito, demonstrando boas condições de mistura.

A Figura 4.48 apresenta além da curva com dados experimentais, uma curva com dados teóricos (em vermelho), calculados de acordo com a equação 4.5 (FOGLER, 2009), que fornece a função $E(t)$ para um reator do tipo CSTR ideal:

$$E(t) = \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \quad (4.5)$$

em que: t = tempo (min); τ = tempo espacial calculado (min).

Portanto, substituindo-se o tempo espacial calculado (87 minutos) na equação 4.5, obteve-se a curva teórica da Figura 4.48. Nota-se que os dados experimentais foram bem ajustados à função $E(t)$ de um reator do tipo CSTR ideal. Logo, o reator de leito fluidizado comportou-se como CSTR ideal, no qual a concentração de qualquer substância na corrente efluente é idêntica à concentração em todo o reator (FOGLER, 2009).

4.11.3. Reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado operando em modo contínuo.

Considerando-se o fato de que na literatura, não são encontrados trabalhos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja em leito fluidizado, antes de se efetuar a reação catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, fez-se uma reação catalisada por Novozym® 435. Isso porque esta é uma enzima comercial amplamente utilizada na literatura, especialmente nos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa da professora Suzana Ferreira-Dias, e os resultados obtidos servirão de base para comparação com os obtidos na reação catalisada pela lipase L036P.

Portanto, as condições reacionais desta primeira reação em leito fluidizado também foram determinadas com base no trabalho previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Universidade Técnica de Lisboa (OSÓRIO et al., 2005), relacionado à

interesterificação da estearina de palma com óleo de soja em reator de leito fluidizado, catalisada por lipase de *Candida antarctica* (Novozym® 435).

A reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por Novozym® 435 (densidade cristalina = $0,833 \pm 0,067$; valor médio $\pm$ desvio padrão), foi efetuada empregando-se uma vazão de 0,76 mL/min, 7,6 g de derivado imobilizado, sendo mantida por 7 dias. Após a fluidização, a altura do leito passou a ser 12 cm, correspondendo a um volume útil de 28,55 mL, e tempo espacial de 37 minutos, calculado de acordo com a equação 3.5. O sistema foi montado de acordo com a Figura 3.6, ou seja, sem recirculação, com passada única.

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), os resultados apresentados na Figura 4.49, mostram que inicialmente foram atingidos valores em torno de 3,5% nas primeiras horas de reação. Após este período, a acidez diminuiu, mantendo-se praticamente constante até o final da reação ($1,68 \pm 0,15$ %; valor médio $\pm$ desvio padrão, após 2h).

Figura 4.49. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Durante a operação do reator, a presença dos produtos de oxidação foi também avaliada, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.10. Os produtos primários e secundários foram quantificados nos comprimentos de onda de 232 e 268 nm, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.23 e os valores obtidos

revelam que, como nas demais reações efetuadas, a formação dos produtos de oxidação pode ser desprezada.

Tabela 4.23. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Produtos de oxidação	Coefficiente de absorção* (E) no estado estacionário
Primários (Abs _{232 nm})	0,2390 ± 0,0202
Secundários (Abs _{268 nm})	0,0460 ± 0,0348

*Valor médio ± desvio padrão

Como nas reações em leito fixo, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise da composição em triglicerídeos. Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, plotou-se um gráfico com os valores de concentração dos triglicerídeos na mistura reacional inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) e dos produtos interesterificados obtidos em diferentes tempos reacionais. Estes resultados são apresentados na Figura 4.50. A análise da figura revela que a concentração dos TAGs C₂₄-C₂₈ e C₄₆-C₅₂ aumentou, enquanto a dos TAGs C₃₂-C₄₀ diminuiu em relação à mistura reacional. Com relação ao C₅₄, este TAG sofreu uma diminuição da concentração em relação à mistura inicial, até o tempo de 75h de reação, aumentando depois disso.

A partir da concentração em TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação, de acordo com a metodologia do item 3.4.8. Os resultados estão apresentados na Figura 4.51 e para facilitar a compreensão, plotou-se no mesmo gráfico, os valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio ± desvio padrão) obtidos na reação. Observa-se que em 6h de reação obteve-se um GI de 8,31%. De maneira geral, após este período, o GI variou até 12%, sendo o valor de GI médio de 10,50 ± 1,64 % (valor médio ± desvio padrão).

Figura 4.50. Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

Figura 4.51. Consistência (gf/cm², ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Com relação à consistência, os resultados da Figura 4.51 revelam que todos os produtos interesterificados, a partir de 75h de reação, atingiram valores de consistência dentro da faixa ideal (200-800 gf/cm²), mantendo-se praticamente constante até o final da reação, resultado bastante coerente por se tratar de um processo contínuo. Os valores de redução percentual das consistências dos produtos interesterificados, em relação à consistência (1002,43 + 44,65 gf/cm²) da mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) são apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Tempo (h)	Consistência ** (gf/cm ²)	% Redução
Mistura 65:35*	1002,43 + 44,65	----
51	808,57 + 12,27	19,34
75	737,6 + 17,66	26,42
115	725,37 + 56,92	27,64
147	612,04 + 3,10	38,94
163	572,56 + 68,98	42,88

*65:35 gordura de leite:óleo de soja

** Valor médio $\pm$ desvio padrão

Calculando-se a média dos valores da Tabela 4.24 no estado estacionário (a partir de 75h), obtem-se consistência de $661,89 \pm 82,11$ gf/cm², o que representa porcentagem de redução média de $33,97 \pm 8,19\%$, em relação à consistência da mistura inicial, sendo este um resultado bastante satisfatório.

Além da consistência, efetuou-se a determinação do conteúdo de gordura sólida por RMN, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.13. As análises foram realizadas em três diferentes temperaturas: 10, 20 e 35°C (CGS_{10°C}, CGS_{20°C} e CGS_{35°C}) e os resultados são apresentados na Figura 4.52.

Os produtos interesterificados apresentaram os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS, no estado estacionário: CGS_{10°C} = $28,18 \pm 0,70$; CGS_{20°C} = $12,57 \pm 0,37$ e CGS_{35°C} = $0,29 \pm 0,17$. Com relação às misturas iniciais, foram obtidos os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS: CGS_{10°C} = $26,70 \pm 0,67$; CGS_{20°C} = $11,00 \pm 0,08$ e CGS_{35°C} = $0,23 \pm 0,09$. Os valores de CGS apresentam-se dentro das respectivas nas faixas ideais, em todas as temperaturas estudadas. Além disso, os

resultados da Figura 4.52 mostram que uma pequena elevação no CGS ocorreu nas primeiras horas de reação. Após este período, os valores de $\text{CGS}_{10^\circ\text{C}}$ e $\text{CGS}_{20^\circ\text{C}}$ mantiveram-se praticamente constantes.

Figura 4.52. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por Novozym® 435, em reator de leito fluidizado, empregando-se tempo espacial de 37 min.

Os resultados mostram que os valores de CGS médio em comparação ao CGS das misturas iniciais, nas respectivas temperaturas foram próximos, variando muito pouco. Na temperatura de 10°C observa-se um leve aumento no CGS nesta temperatura em relação à mistura inicial. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang et al. (2006), que estudaram a interesterificação da gordura de leite com óleo de colza, catalisada por Lipozyme TL IM, a 70°C , objetivando demonstrar a aplicação da espectroscopia FTNIR para monitoramento da reação, em comparação ao método do CGS. Os autores concluíram que a quantificação do CGS para monitorar a interesterificação não é método adequado, uma vez que as variações observadas no CGS, por RMN, nas temperaturas entre 15 e 40°C são muito pequenas. Maiores variações puderam ser observadas na temperatura de 5°C . No entanto, nesta temperatura, não havia como efetuar a quantificação do CGS, uma vez que esta análise foi realizada nos laboratórios de uma usina produtora de margarinas Fima

VG Distribuidora de Produtos Alimentares Ltda. (Lisboa, Portugal), e a empresa emprega apenas as temperaturas pré-determinadas (10, 20 e 35°C).

4.11.4. Reação de Interesterificação da gordura de leite e óleo de soja, catalisada por lipase de Rhizopus oryzae imobilizada em SiO₂-PVA, em reator de leito fluidizado operando em modo contínuo.

Nesta etapa do trabalho, a reação de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja em leito fluidizado, foi catalizada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física. A reação foi mantida por 7 dias, sendo acompanhada pela determinação do teor de ácidos graxos livres (%), produtos de oxidação, quantificação dos triacilgliceróis por cromatografia gasosa, consistência dos produtos interesterificados e conteúdo de gordura sólida por RMN.

O sistema reacional foi montado de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.7, com recirculação. De acordo com os resultados apresentados no item 4.11.1, a velocidade mínima de fluidização calculada foi de 3,13 mL/min (Tabela 4.22), optando-se por trabalhar com o dobro desta vazão para garantir a fluidização. Assim, empregou-se vazão de fluidização de 6,8 mL/min e de alimentação de 1,6 mL/min, praticamente o dobro da vazão empregada no item 4.11.3, quando a reação foi catalisada por Novozym® 435. A massa de biocatalisador foi 24,56 g (Tabela 3.4), que ocupou toda a altura do reator (20 cm). De acordo com o valor da densidade cristalina da lipase L036P, esta massa correspondeu a 9,76 mL. Portanto, o volume útil do reator foi 81 mL, fornecendo tempo espacial de 50 minutos, calculado de acordo com a equação 3.5. Na Figura 4.53 é apresentada uma foto ilustrativa do sistema reacional, a fim de facilitar a compreensão da montagem da reação.

Figura 4.53. Foto do sistema reacional empregado na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Com relação ao teor de ácidos graxos livres (%), os resultados apresentados na Figura 4.54, mostram que inicialmente foram atingidos valores em torno de 9% nas primeiras horas de reação. Após este período, a acidez diminuiu, mantendo-se praticamente constante até o final da reação ($1,65 \pm 0,22$ %; valor médio $\pm$ desvio padrão, após 24h).

Durante a operação do reator, a presença dos produtos de oxidação foi também avaliada, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.10. Os produtos primários e secundários foram quantificados nos comprimentos de onda de 232 e 268 nm, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.25. Os valores obtidos são semelhantes aos da reação anterior (item 4.10.3), revelando que a formação dos produtos de oxidação primários e secundários pode ser desprezada.

Figura 4.54. Teor de ácidos graxos livres (%) obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Tabela 4.25. Produtos de oxidação primários e secundários obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Produtos de oxidação	Coefficiente de absorção* (E) no estado estacionário
Primários (Abs _{232 nm})	0,0511 ± 0,0000
Secundários (Abs _{268 nm})	0,0175 ± 0,0044

*Valor médio ± desvio padrão

Como nas reações em leito fixo, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise da composição em triglicerídeos. Para facilitar a comparação das modificações observadas durante as reações, plotou-se um gráfico com os valores de concentração dos triglicerídeos na mistura reacional inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) e dos produtos interesterificados obtidos em diferentes tempos reacionais. Estes resultados são apresentados na Figura 4.55.

Figura 4.55 Perfil de concentração de triglicerídeos obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min: comparação da composição da mistura reacional inicial e diferentes produtos interesterificados. Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes (Col = colesterol).

A análise da Figura 4.55 revela que a concentração dos TAGs C₂₄-C₃₀ e C₄₆-C₅₂ aumentou, nas primeiras 6h de reação, diminuindo e mantendo-se praticamente constante após este período. A concentração dos TAGs C₃₂-C₄₄ apresentou comportamento inverso: diminuiu em relação à mistura reacional, nas primeiras 6h, aumentando e mantendo-se praticamente constante até o final da reação. Com relação ao TAG C₅₄, este sofreu uma diminuição da concentração em relação à mistura inicial, até o tempo de 48h de reação, aumentando e mantendo-se constante até 168h.

A partir da concentração em TAGs, foram calculados os valores de grau de interesterificação, de acordo com a metodologia do item 3.4.8. Os resultados estão apresentados na Figura 4.56 e para facilitar a compreensão, plotou-se no mesmo gráfico, os valores de consistência dos produtos interesterificados (valor médio $\pm$ desvio padrão) obtidos na reação. Observa-se que em 6h de reação obteve-se um GI de 8,17%. De maneira

geral, após este período, o GI diminuiu, variando de 4,5 a 6%, sendo o valor médio de $5,10 \pm 0,57\%$ (valor médio $\pm$ desvio padrão).

Figura 4.56. Consistência (gf/cm^2 , ●) dos produtos interesterificados e grau de interesterificação (GI, %, ■) obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Com relação à consistência, os resultados da Figura 4.56 revelam que todos os produtos interesterificados, a partir de 6h de reação, atingiram valores de consistência dentro da faixa ideal ($200\text{-}800 \text{ gf/cm}^2$). Os valores de redução percentual das consistências dos produtos interesterificados, em relação à consistência ($1002,43 + 44,65 \text{ gf/cm}^2$) da mistura inicial (65:35 gordura de leite:óleo de soja) são apresentados na Tabela 4.26.

Calculando-se a média dos valores da Tabela 4.26, obtém-se consistência de $478,02 \pm 71,78 \text{ gf/cm}^2$, o que representa porcentagem de redução média de $52,31 \pm 7,16\%$, em relação à consistência da mistura inicial, sendo este um resultado bastante satisfatório.

Tabela 4.26. Redução percentual da consistência dos produtos interesterificados em relação à mistura reacional inicial, obtido na reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Tempo (h)	Consistência ** (gf/cm ²)	% Redução
Mistura 65:35*	1002,43 + 44,65	----
6	403,11 + 29,75	59,79
24	409,21 + 8,17	59,18
48	442,97 + 61,15	55,81
54	485,66 + 63,74	51,55
96	464,50 + 2,86	53,66
120	538,32 + 4,92	46,30
168	602,38 + 7,35	39,91

*65:35 gordura de leite:óleo de soja

** Valor médio $\pm$ desvio padrão

Destaca-se que, quando a reação foi catalisada por Novozym® 435, a consistência média dos produtos interesterificados no estado estacionário, foi maior ($661,89 \pm 82,11$ gf/cm²) e, conseqüentemente, a redução percentual ($33,97 \pm 8,19\%$), em relação à consistência da mistura inicial foi menor. Portanto, a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA apresentou melhores resultados em comparação com a Novozym® 435, uma enzima comercial amplamente explorada na literatura. Provavelmente, essa diferença de valores na redução da consistência, esteja relacionada à especificidade dessas enzimas. A Novozym® 435 é uma enzima inespecífica (IRIMESCU; IWASAKI; HOU, 2002), enquanto a lipase de *R. oryzae* é 1,3 específica (PAULA, 2011). Portanto as alterações promovidas em termos de composição final em TAGs dos produtos interesterificados é diferente, o que pode explicar as diferenças nos valores de consistência.

Além da consistência, efetuou-se a determinação do conteúdo de gordura sólida por RMN, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.13. As análises foram realizadas em três diferentes temperaturas: 10, 20 e 35°C (CGS_{10°C}, CGS_{20°C} e CGS_{35°C}) e os resultados são apresentados na Figura 4.57.

Os produtos interesterificados apresentaram os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS, no estado estacionário: CGS_{10°C} = $21,78 \pm 0,74$; CGS_{20°C} = $9,27 \pm 1,26$ e CGS_{35°C} = $0,04 \pm 0,06$. Com relação às misturas iniciais, foram obtidos os seguintes valores (valor médio $\pm$ desvio padrão) de CGS: CGS_{10°C} = $24,45 \pm 0,93$; CGS_{20°C} = $10,26 \pm 0,19$ e CGS_{35°C} = $0,08 \pm 0,09$. Os valores de CGS apresentam-se dentro das respectivas

faixas ideais, em todas as temperaturas avaliadas (abaixo de 32% entre 4 e 10°C, acima de 10% entre 20 e 22°C e baixo CGS entre 33 e 38°C). Na temperatura de 10 °C, obteve-se redução de 11% no CGS em relação à mistura inicial. É interessante notar que esse comportamento foi diferente do observado empregando-se como biocatalisador a Novozym® 435 (item 4.11.3), onde os resultados de CGS mostraram uma pequena elevação no CGS ocorreu nas primeiras horas de reação (Figura 4.52). Isso pode explicar a diferença nos valores observados em termos de consistência do produto final, uma vez que esta propriedade esta relacionada ao CGS da amostra.

Figura 4.57. Conteúdo de Gordura Sólida (CGS), em diferentes temperaturas, quantificados ao longo da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

A reação foi mantida por 7 dias e após o término, efetuou-se a dosagem da atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada, para se calcular o tempo de meia vida e avaliar sua estabilidade operacional, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.27 e revelam que após a reação, o biocatalisador manteve 73% de sua atividade hidrolítica inicial, o que resultou em um tempo de meia vida de 16 dias, sendo este um resultado satisfatório.

Tabela 4.27. Atividade hidrolítica inicial e residual da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA empregada da reação de interesterificação da gordura de leite e óleo de soja (65:35) , em reator de leito fluidizado, com recirculação, empregando-se tempo espacial de 50 min.

Atividade inicial (U/g)*	Atividade Residual (U/g)*	K _a (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)
3351,20	2460,90	0,044	16

*base seca

4.12. Comparação do desempenho dos sistemas estudados: leito fixo e fluidizado

Visando-se à análise comparativa do desempenho dos sistemas estudados na reação de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja, em reatores operando em modo contínuo, construiu-se a Tabela 4.28, que apresenta um resumo dos resultados obtidos no presente trabalho. Nesta tabela, são apresentados os resultados de tempo de meia vida (dias), consistência (gf/cm²), redução percentual da consistência (%) e grau de interesterificação (GI, %), uma vez que estas são propriedades importantes para avaliação das reações de interesterificação da gordura de leite.

A análise da tabela 4.28 revela que, de maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho foram bastante satisfatórios. Com relação ao tempo de meia vida, foram obtidos valores semelhantes quando foram empregados tempos espaciais inferiores a 1h. A diminuição da vazão, e conseqüentemente o emprego de maior tempo espacial, permitiu a obtenção de maior tempo de meia vida (39 dias), isso porque, conforme previamente discutido, altas vazões podem favorecer a dessorção da enzima.

Com relação à consistência dos produtos interesterificados, os resultados revelaram que, com excessão da reação empregando meio reacional composto por 80% de gordura de leite e 20% de óleo de soja, todos os produtos interesterificados apresentaram valores de consistência dentro da faixa ideal (200-800 gf/cm²) para um produto com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade, segundo critérios de Haighton (1959).

Tabela 4.28. Comparação dos principais resultados obtidos com os sistemas estudados para a reação de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja, em reatores operando em modo contínuo.

Meio Reacional*	Fonte da Gordura	Reator	Lipase	Tempo espacial	Tempo de meia vida (dias)	Consistência (gf/cm ²) **	Redução Percentual da consistência** (%)	Grau de Interesterificação** (GI, %)
65:35	Manteiga comercial da marca Aviação	Leito Fixo	L036P imobilizada por ADS	4h	n.a.***	412,3 ± 134,2	71,19	n.a.***
				2h		1086,6 ± 152,9	24,08	
				1h		1198,0 ± 272,8	16,29	
				½ h		1182,4 ± 115,3	17,38	
65:35	Manteiga comercial da marca Aviação	Leito Fixo	L036P imobilizada por ADS	4h	39	799,80 ± 62,60	39,00 ± 4,78	n.a.***
65:35	Manteiga comercial da marca Mimosa	Leito Fixo	L036P imobilizada por ADS	12 min	18	712,08 ± 50,31	29,00 ± 5,00	7,12 ± 2,21
80:20	Manteiga comercial da marca Mimosa	Leito Fixo	L036P imobilizada por ADS	37 min	14	1342,20 ± 125,01	27,44 ± 6,76	9,32 ± 2,14
65:35	Manteiga comercial da marca Mimosa	Leito Fluidizado	Novozym® 435	37 min	n.a.***	661,89 ± 82,11	33,97 ± 8,19	10,50 ± 1,64
65:35	Manteiga comercial da marca Mimosa	Leito Fluidizado	L036P imobilizada por ADS	50 min	16	478,02 ± 71,78	52,31 ± 7,16	5,10 ± 0,57

*Gordura de leite: óleo de soja (% m/m); **valor médio ± desvio padrão, no estado estacionário; ***não avaliado.

É importante ressaltar que, as reações em leito fixo empregando tempos espaciais de 4h e 12 min, forneceram produtos interesterificados com consistência próxima ao limite superior (800 gf/cm^2). No entanto, este resultado também pode ser considerado adequado, uma vez que de acordo com os critérios de Haigthon (1959) (Tabela 3.7), produtos com consistência entre 800 e 1000 gf/cm^2 , também apresentam satisfatória espalhabilidade. Além disso, comparando-se estas duas reações, observa-se que a consistência do produto interesterificado empregando-se o mínimo tempo espacial foi menor, embora esta reação tenha apresentado a mais baixa redução percentual da consistência ($29,00 \pm 5,00 \%$). Isso porque, a fonte de gordura de leite empregada em cada reação foi diferente.

Avaliando-se os resultados das reações em leito fluidizado, observa-se que a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA representa um biocatalisador com elevado potencial para modificação da gordura de leite. Os resultados da Tabela 4.28 mostram que a Novozym® 435, uma enzima comercial amplamente descrita na literatura, promoveu menor redução percentual na consistência dos produtos interesterificados, em comparação à lipase de *R. oryzae*, embora esta lipase tenha fornecido menor valor de GI em comparação àquela. Conforme previamente discutido, a diferença de valores na redução percentual da consistência, bem como no grau de interesterificação, relacionam-se à especificidade dessas enzimas. Portanto, as alterações promovidas em termos de composição final em TAGs dos produtos interesterificados é diferente, o que pode explicar as diferenças observadas. É importante ressaltar que, embora apenas testes iniciais tenham sido realizados, os resultados obtidos empregando-se reator de leito fluidizado foram melhores do que os obtidos empregando-se reatores de leito fixo. De fato, o leito fluidizado consiste em uma tentativa de se atenuar os problemas apresentados pelo leito fixo, relacionados à dificuldade de se obter uma boa mistura. Assim, o desempenho destes biorreatores é melhor do que os do tipo PBR. Isso porque, provavelmente, parte da atividade enzimática disponível no leito fixo não está em contato com o substrato devido à formação dos caminhos preferenciais e à oclusão da superfície do leito pelo contato partícula-partícula ou partícula-parede do reator (OSÓRIO et al., 2009).

5. CONCLUSÕES

Com base nos dados relatados neste trabalho, pôde-se concluir que:

- As melhores condições reacionais que favoreceram a maximização do grau de interesterificação, minimização do teor de ácidos graxos livres e obtenção de produto interesterificado com consistência na faixa estabelecida por Haighton (200 a 800 gf/cm²), em reatores batelada com agitação, foram: 65% de gordura de leite na mistura reacional, 500 unidades de atividade por grama de meio, 10% de umidade no derivado imobilizado e temperatura de reação de 45 °C. Nessas condições, foi obtido um produto interesterificado com consistência de 385 gf/cm², com satisfatórias plasticidade e propriedades de espalhabilidade;

- Os testes de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja em reator de tanque agitado, operando em regime de batelada com a adaptação de uma cesta (central ou lateral) para o isolamento do sistema imobilizado de possíveis efeitos danosos devidos ao do contato com as partes mecânicas do agitador, permitiram selecionar a cesta central, uma vez que em 4h de reação, obteve-se um produto IE com adequado valor de consistência ($387 \pm 105,83$ gf/cm²), o mais elevado grau de interesterificação (8,01%) e o mais baixo teor de ácidos graxos livres (4,61 %), além da maior facilidade no manuseio, se comparado à cesta lateral. A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada empregando-se reator batelada adaptado com a cesta central, e os resultados obtidos revelaram que o biocatalisador se manteve estável por 60 h de reação, sendo este tempo bastante satisfatório;

- Na etapa de caracterização hidrodinâmica do reator de leito fixo, a relativa coincidência entre o tempo espacial (124,2 min) e o tempo médio de residência (135 min) indicou a inexistência de caminhos preferenciais ou retromistura no leito, demonstrando boa qualidade do empacotamento;

- Os testes em reator de leito fixo mostraram que a fonte de gordura de leite empregada em cada reação é muito importante, influenciando nos resultados obtidos. A mistura reacional composta por gordura de leite da marca Aviação apresentou maior consistência em relação à composta por gordura de leite da marca Mimosa. Além disso, empregando-se a manteiga comercial da marca Aviação, o tempo reacional que permitiu a obtenção de um produto com consistência satisfatória ($799,80 \pm 62,60 \text{ gf/cm}^2$) foi 4h, enquanto que em apenas 12 minutos, obteve-se um produto IE com consistência adequada ($712,08 \pm 50,31 \text{ gf/cm}^2$), a partir da interesterificação da gordura de leite oriunda da manteiga comercial Mimosa.

- Com relação ao estudo do processo em leito fluidizado, os resultados mostraram que a velocidade mínima de fluidização correspondeu à vazão mínima de 3,13 mL/min. Na etapa de caracterização hidrodinâmica do reator de leito fluidizado, o tempo médio de residência calculado foi de 101,12 minutos, indicando que a maior parcela de moléculas de traçador injetado permaneceu por 101,12 minutos dentro do reator. Comparando-se o tempo espacial calculado (87 minutos) com o tempo de residência médio, obteve-se uma diferença de aproximadamente 15 minutos (erro de 16,89 %). A relativa coincidência entre o tempo espacial e o tempo médio de residência foi um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou retromistura no leito, demonstrando boas condições de mistura. Além disso, o reator de leito fluidizado comportou-se como CSTR ideal, no qual a concentração de qualquer substância na corrente efluente é idêntica à concentração em todo o reator.

- Os resultados das reações em leito fluidizado, revelaram que a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA representa um biocatalisador com potencial para modificação da gordura de leite, uma vez que apresentou maior redução percentual da consistência ($52,31 \pm 7,16 \%$) dos produtos IE, em comparação aos resultados obtidos empregando-se Novozym® 435 ($33,97 \pm 8,19 \%$) como biocatalisador.

- Os resultados obtidos empregando-se reator de leito fluidizado foram melhores do que os obtidos empregando-se reatores de leito fixo. Isso porque, provavelmente, parte da atividade enzimática disponível no leito fixo não está em contato com o substrato devido à formação dos caminhos preferenciais e à oclusão da superfície do leito pelo contato partícula-partícula ou partícula-parede do reator.

De maneira geral, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios e contribuíram para o estabelecimento de condições reacionais e operacionais para reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em matriz híbrida orgânico-inorgânica e diferentes tipos de biorreator.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Uso de ferramentas de análise sensorial para avaliação das propriedades sensoriais e da aceitabilidade de produto alimentício que pode ser obtido usando-se como base a gordura oriunda da interesterificação enzimática de gordura de leite com óleo de soja;
- Estudo de processos de desodorização do produto alimentício obtido por interesterificação enzimática de gordura de leite;
- Otimização das condições reacionais e operacionais usando reator de leito fluidizado para condução do processo de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja;
- Avaliar o emprego de outros óleos vegetais na interesterificação da gordura de leite, em reator de leito fluidizado.

REFERÊNCIAS

- ABELYAN, V.A.; ABELYAN, L.A. Production of lactic acid by immobilized cells in stirred reactors. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 32, p. 495–499, 1996.
- ADAMCZAK, M., BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, n 6, p. 491-504, 2008.
- AGUEDO, M.; GIET, J.; HANON, E.; LOGNAY, G.; WATHELET, B.; DESTAIN, J.; BRASSEUR, R.; VANDENBOL, M.; DANTHINE, S.; BLECKER, C.; WATHELET, J. Calorimetric study of milk fat/rapeseed oil blends and their interesterification products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, p. 376–385, 2009.
- AGUEDO, M.; HANON, E.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; LOGNAY, G.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J. P.; BLECKER, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 5, p. 1757-1765, 2008.
- AIRES-BARROS, M. R.; FERNANDES, P. Imobilização dos biocatalisadores. In: J. CABRAL, M.S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. *Engenharia enzimática*. Lisboa: Lidel, 2003. cap. 5, p. 121 – 140.
- AKOH, C. C. Structured and Specialty Lipids. In: AKOH, C. C; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOSC PRESS, 2005. 762 p. ISBN: 1-893997-51-0.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Characterization of the equilibrium behavior of lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100 L (from *Humicola*) onto Accurel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.3, p. 177-188, 1997.
- ALIM, M. A., LEE, J. H., SHIN, J. A., LEE, Y. J., CHOI, M. S., AKOH, C. C.; LEE, K. T. Lipase-catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 106, p. 712-719, 2008.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 06/01/2010.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 20045th ed. AOCS Press.
- BADOLATO, E. S. G. *Aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos trans em margarinas e gorduras vegetais hidrogenadas*. 2000. 92f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, X. Enzyme-Mediated Modification of Milkfat. In: KUO, T. M.; GARDNER, H. W. *Lipid Biotechnology*. United States of America: Marcel Dekker, 2002. 716 p. ISBN: 0-8247-0619-6.

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. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 75, p. 1347-1358, 1998.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 392 – 416, 1996.

BARRERA-ARELLANO, D. **Ácidos Graxos Trans.** Disponível em: <http://www.simabesp.org.br/arquivos/Apresenta_UNICAMP.pdf> Acesso em: 09/12/2006.

BASRI, M.; YUNUS, W. M. Z. W.; YOONG, W. S.; AMPON, K., RAZAK, C. N. A.; SALLEH, A. B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 169-173, 1996.

BELITZ, H. D., GROSCH, W. and SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. Heidelberg, Berlin: Springer, 2009. 1070 p. ISBN: 978-3-540-69934-7.

BODALO, A.; BASTIDA, J.; MAXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C.; MURCIA, M. D.; ORTEGA, S. Influence of the operating conditions on lipase - catalysed synthesis of ricinoleic acid estolides in solvent - free systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 2-3, p. 214-219, 2009.

BOLETIM anual do mercado de grãos: *Soja Safrá 2008/09 e expectativas para 2009/10*. Diretoria de Desenvolvimento de Negócios, Gerência de Estudos e Assessoria, Unidade de Estudos Econômicos e Pesquisas, abril 2009.

BOURLIEU, C.; BOUHALLAB, S.; LOPEZ, C. Biocatalyzed modifications of milk lipids : applications and potentialities. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 10, p. 458-469, 2005.

BRAGA, L. P. *Estabilização da lipase de Candida rugosa em suportes híbridos de polissiloxano e álcool polivinílico obtidos pela técnica sol-gel.* Lorena: Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005. 64 p. Projeto FAPESP 04/06087-1. Relatório de Atividades de Iniciação Científica.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#> Acesso em: 15/03/2007.

BREGUET, V.; VOJINOVIC, V.; MARISON, I. W. Encapsulates for food Bioconversions and Metabolite Production. In: ZUIDAM, N. J. and NEDOVIC, V. A. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York: Springer, 2009. p. 367. ISBN 978-1-4419-1007-3.

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

BRYN, J.; WIRKOWSKA, M.; KOWALSKI, B. Interesterification of milkfat and sunflower oil mixtures in the presence of Novozym 435. *Zywnosc*, v. 13, n. 2, p. 28-35, 2006.

BRYN, J.; WIRKOWSKA, M.; RATUSZ, K.; KOWALSKI, B. Use of a nonspecific enzyme for modification of properties of mixtures of milk fat with sunflower oil. *Tłuszcze Jadalne*, v. 41, n. 1-2, p. 123-130, 2006.

CAO, L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2005. Cap. 3: Covalent Enzyme Immobilization. ISBN: 3-527-31232-3.

CAPRILES, V. D.; ARÊAS, J. A. G. Desenvolvimento de salgadinhos com teores reduzidos de gordura saturada e de ácidos graxos trans. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 25, n. 2, p. 363-369, 2005.

CARVALHO, P. D. ; CAMPOS, P. R. B. ; NOFFS, M. D. ; OLIVEIRA, J. G. ; SHIMIZU, M. T. ; SILVA, D. M. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids, *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

COELHO, R. A. L.; YAMASAKI, H.; PEREZ, E.; CARVALHO Jr, L. B. The use of polysiloxane / polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 391-393, 2003.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G.V.; DONATE, P. M. *Fundamentos de química experimental*. São Paulo: Ed. da USP, 2004. v. 53.

COULTATE, T. *Foods: The Chemistry of its components*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2009. 501p. ISBN 978-0-85404-111-4.

COUPLAND, J. Determination of Solid Fat Content by Nuclear Magnetic Resonance. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001.

DA RÓS, P. C. M. *Etanolise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas*. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

DA ROS, P. C. M. ; SILVA, G. A. M. ; MENDES, A. A. ; SANTOS, J. C. ; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 101, p.5508–5516, 2010.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of lipases immobilized on polymers. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. Cap. 6. p. 123. ISBN 978-85-7193-189-3.

DIAS, M. C. *Utilização de diferentes substratos e culturas lácteas comerciais empregadas na produção de bebidas lácteas*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

EM DEZ anos o Brasil consolidará liderança. Disponível em: <<http://www.icnews.com.br/2011.06.17/negocios/agronegocio/em-dez-anos-o-brasil-consolidara-lideranca>> Acesso em: 17/10/2011.

ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FAGUNDES, L. A. *Ômega-3 & Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças*. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, 2002. 111 p. ISBN: 8574971162.

FERNANDES, P; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. Reactores enzimáticos Multifásicos; Em: J. CABRAL, M.S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. *Engenharia enzimática*. Lisboa: Lidel, 2003. cap. 8, p. 189-208.

FIRESTONE, D. *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes*. 2nd ed. Washington: AOCS PRESS, 2006. 237 p. ISBN: 978-1-893997-99-8.

FOGLER, H. S. *Elementos de engenharia das reações químicas*. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 853 p.

FOGLIA, T.A.; PETRUSO, K.; FEAIRHELLER, S. H. Enzyme interesterification of tallow sunflower oil mixtures. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 70, n. 3, p.281– 285, 1993.

FONSECA, M. M. e YOSHIDA, M. I. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. *Vértices*, v. 11, n. 1/3, p. 61-75, 2009.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em Biocatálise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. Cap. 16. p. 369. ISBN 978-85-7193-189-3.

FREITAS, L. *Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel*. 2006. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena; Universidade de São Paulo, Lorena.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 2: Importantes aspectos da alternativa biotecnológica. *Ciência e Cultura*, v. 1, n. 1, p. 50- 60, 2006^a.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 1: Aspectos nutracêuticos e características da tecnologia atual de hidrólise. *Ciência e Cultura*, v. 1, n. 1, p. 43- 49, 2006b.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, V. R. B.; DE FARIA, A. C. E. A. Substituição da Proteína do Farelo de Soja pela Proteína do Farelo de Canola em Rações para Alevinos de Curimatá (*Prochilodus lineatus* V.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.2, p.552–559, 2002.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. Nobel: São Paulo. 2009. 511 p.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Fractionated milk fat: Composition, structure, and functional properties. *Food Technology*, v. 52, n. 2, p. 33-38, 1998.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE-MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, p. 633-639, 1995.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Lipid shortenings: a review. *Food Research International*, v. 35, p. 1015–1048, 2002.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. A bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): Sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 442-442, 2000.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. *Journal of the American Chemical's Society*, v. 120, n. 34, p. 8587-8598, 1998.

GIOIELLI, L. A. Interesterificação de óleos e gorduras. *Revista Engenharia de Alimentos*, v. 4, p. 22-24, 1998.

GREEN, S. *Brochura Corporativa 2007/2008 Reforçando as Colheitas – Contribuindo com a produtividade*. Disponível em: <http://www.bayercropscience.com.br/imprensa/publicacoes/pdf/corportate_brochure.pdf> Acesso em: 18/01/2010.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; ESTEVES, W. Características de Gorduras Comerciais Brasileiras. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 3, p.159-164, 2000.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; GIOIELLI, L. A.; SIMÕES, I. S. Interactions in interesterified palm and palm kernel oils mixtures. I-Solid fat content and consistency. *Grasas y Aceites*, v.52, p. 349-354, 2001.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. *The Lipid Handbook*. 3rd.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 791p.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, n. 6, p. 635-644, 2003.

HAIGHTON, A. J. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 36, n. 8, p. 345–348, 1959.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases : A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235–251, 2006.

HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: a systematic study. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 181-190, 1999.

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*. 5th ed. New York: Wiley, 1996. v. 2: p. 125-158; v. 3: p. 1-63.

HUNT, N.; BUCKIN, V. Temperature dependence and the effects of heat treatment on rheological properties of various butters. *Progress in Colloid & Polymer Science*, v. 115, p. 320 – 324, 2000.

HUNTER, J. E. Dietary *trans* fatty acids: Review of recent human studies and food industry responses. *Lipids*, v. 41, p. 976-992, 2006.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Milk Lipids: composition, origin and properties. In: TAMINE, A. Y. *Dairy Fats and Related Products*. United Kingdom: John Wiley and Sons, 2009, 344 p. ISBN 978-1-4051-5090-3.

JIMÉNEZ-FLORES, R. Trends in research for alternate uses of milk fat. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 2644 – 2650, 1997.

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

JOSÉ, M. N.; RADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos: preparação e algumas aplicações. *Química Nova*, v. 28, p. 281-288, 2005.

KAETHONG, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1525–1530, 2005.

KARABULUT, I.; TURAN, S.; ERGIN, G. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology*, v. 218, n. 3, p.224–229, 2004.

KATAN, M. B. Trans fatty acids and plasma lipoproteins. *Nutrition reviews*, v. 58, n. 6, p. 188-191, 2000.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. *Solid Phase Biochemistry – Analytical and Synthetic Aspects*. New York: John Wiley & Sons, 1983.

KENNEDY, J. F.; ROIG, M. G. Principles of Immobilization of Enzymes. In: WISEMAN A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Great Britain: T.J. Press, 1995. p. 235, 246, 249.

KIM, B. H.; AKOH, C. C. Chemical and physical properties of butterfat-vegetable oil blend spread prepared with enzymatically transesterified canola oil and caprylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 12, p. 4954-4961, 2005.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S.K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *Journal of the American College of Nutrition*, v.19, p. 472S–477S, 2000.

LAI, O. M.; GHAZALI, H. M.; CHO, F.; CHONG, C. L. Physical properties of lipase-catalyzed transesterified blends of palm stearin and anhydrous milk fat. *Food Chemistry*, v. 70, n. 2, p. 215-219, 2000.

LAMBOURSAIN, L.; MARTY, A.; KERMASHA, S.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. Enzymatic transesterification of a triacylglycerol mixture: Application to butterfat modification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, p. 678-682, 1996.

LEDOUX, M.; CHARDIGN, J-M.; DARBOIS, M.; SOUSTRE, Y.; SÉBÉDIO, J-L.; LALOUX, L. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, p. 409–425, 2005.

LEE, P.; SWAISGOOD, H. E. Modification of milkfat physical properties by immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 3343-3349, 1997.

LIDA, A. M. D. N.; ALI, A. R. Physico-chemical characteristics of palm-based oil blends for the production of reduced fat spreads. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, p. 1625-163, 1998.

LIEW, M. Y. B.; GHAZALI, H. M.; LONG, K.; LAI, O. M.; YAZID, A. M. Physical properties of palm kernel olein-anhydrous milk fat mixtures transesterified using mycelium-bound lipase from *Rhizomucor miehei*. *Food Chemistry*, v. 72, p. 447-454, 2001a.

LIEW, M. Y. B.; GHAZALI, H. M.; YAZID, A. M.; LAI, O. M. Rheological properties of ice cream emulsion palm kernel olein: anhydrous milk fat mixture prepared from lipase-catalyzed transesterified. *Journal of Food Lipids*, v. 8, p. 131-146, 2001b.

LIMA-BARROS, A.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO Jr., L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 459-463, 2002.

LOPEZ-HERNANDEZ, A.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G. Lipase - catalyzed transesterification of medium - chain triacylglycerols and a fully hydrogenated soybean oil. *Journal of Food Science*, v. 70, n. 6, p. 365-372, 2005.

LUCCAS, V. *Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate*. 2001. 195p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química; Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MALCATA, F. X.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: part I. Lipase adsorption studies. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, n. 6, p. 647-57, 1992.

MALLÉGOL, J.; LEMAIRE, J.; GARDETTE, J. L. Drier Influence in the curing of linseed oil. *Progress in Organic Coatings*, London, v. 39, n. 2, p. 107 - 113, 2000.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Research International*, v. 31, n. 8, p. 595-599, 1999.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 1. Melting and crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, p. 1265-1271, 1998.

MARANGONI, A. J. Lipases: Structure, Function, and Properties. In: KUO, T. M.; GARDNER, H. W. *Lipid Biotechnology*. United States of America: Marcel Dekker, 2002. 716 p. ISBN: 0-8247-0619-6.

McGRADY, J. More-healthy fats and oils. *Food Technology*, p. 148, 1994.

MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J. A.; WILLET, W. C. *Trans fatty acids and cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine*, v. 354, p. 1601-1613, 2006.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L.A.G. Solid fat content determination: Comparison between pNMR and DSC techniques. *Grasas y Aceites*, v. 46, n.6, p.337–343, 1995.

NEIVA, P. Está no rótulo: a tabela nutricional deve informar a quantidade de gordura trans nos alimentos. *Revista Veja*, p. 86, 9 agosto 2006.

NOR HAYATI, I.; AMINAH, A.; MAMOT, S. Melting Characteristic and solid fat content of milk fat and palm stearin blends before and after enzymatic interesterification. *Journal of Food Lipids*, v. 7, p.175-193, 2000.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Compositional and texture properties of milkfat-soybean oil blends following enzymatic interesterification. *Food Chemistry*, v.125, p.133–138, 2011.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterificação da gordura de leite com óleo de canola empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente In: *Simpósio de Hidrólise enzimática de Biomassas - IX SHEB*, 2009, Maringá.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Modificação bioquímica da gordura do leite. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 431- 437, 2010.

O'BRIEN, R. D. *Fats and oils: Formulating and processing for applications*. 3rd ed. Florida: CRC Press, 2009. ISBN 978-1-4200-6166-6.

O' BRIEN, R. D. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. 2nd ed. New York: CRC Press LLC, 2004.

ODA Y.; YAJIMA, Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiology*, v. 20, p. 371-375, 2003.

ORCHEL, A.; DZIERZEWICZ, Z.; PARFINIEWICZ, B.; WEGLARZ, L.; WILCZOK, T. Butyrate induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 50, n. 3, p.490–498, 2005.

OSÓRIO, N. M.; DUBREUCQ, E.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Operational stability of immobilised lipase/ acyltransferase during interesterification of fat blends. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, n. 4, p. 358-367, 2009.

OSÓRIO, N. M.; FONNSECA, M. M.; FERREIRA-DIAS, S. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 108, p. 545-553, 2006.

OSÓRIO, N. M.; GUSMÃO, J. H.; FONSECA, M. M.; FERREIRA-DIAS, S. Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 107, p. 455-463, 2005.

OTERO, C.; LÓPEZ-HERNANDEZ, A.; GARCÍA, H. S.; HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; HILL JR., C. G. Continuous enzymatic transesterification of sesame oil and a fully hydrogenated fat: effects of reaction conditions on product characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 5, 2006.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARODI, P. W. Nutritional significance of milk lipids. In: FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. *Advanced Dairy Chemistry*. New York: Springer Science, 2006. cap. 17

PAULA, A. V. *Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite com óleo de soja*. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; DE CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova*, v. 31, p. 35 – 40, 2008.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Interesterification of milkfat with soybean oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilised on SiO₂-PVA on packed bed reactor. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, p. 2124–2130, 2011.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F.; SILVA, J. L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 1146–1156, 2010.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007.

PAVAN, R. *Avaliação dos teores de ácidos graxos trans em margarinas e cremes vegetais após a resolução RDC 360 (ANVISA)*. 2008. 95. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo.

PISKA, I.; ZARUBOVA, M.; LOUZECKY, T.; KARAMI, H.; FILIP, V. Properties and crystallization of fat blends. *Journal of Food Engineering*, v. 77, 3, p. 433-438, 2006.

PRECHT, D.; MOLKENTIN, J. *The certification of the triglyceride contents of an anhydrous butter fat reference material with additional value for free cholesterol CRM 519*. Brussels, Luxembourg: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, ECSC-EC-EAEC, 1997.

QUAST, L. B. *Estudo do efeito da adição de gorduras alternativas na cristalização da manteiga de cacau*. 2008. 117p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química; Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

QUEIROZ, N. *Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases*. 2002. 152 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas; Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.147–148, p. 237–250, 2009.

RIBEIRO, A.P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Instrumental methods for the evaluation of interesterified fats. *Food Analytical Methods*, v. 2, p. 282–302, 2009a.

RIBEIRO, A. P. B.; DE MOURA, J. M. L. N.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G. Interesterificação Química: Alternativa para obtenção de gorduras Zero Trans. *Química Nova*, 2007, v. 30, n. 5, p.1295-1300.

RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; SANTOS, A. O.; CARDOSO, L. P.; GONÇALVES, L. A. G. Thermal behavior, microstructure, polymorphism, and crystallization properties of zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil. *Food Biophysics*, v. 4, p. 106–118, 2009b.

RIBEIRO, A. P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; SANTOS, A. O.; CARDOSO, L. P.; GONÇALVES, L. A. G. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International*, v.42, p. 1153–1162, 2009c.

RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. The sedimentation of a suspension of uniform spheres under conditions of viscous flow. *Chemical Engineering Science*, v. 8, p. 66 -78, 1954.

ROCHE. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga em la nutrición y prevención de enfermedades. *PUFA INFOCUS*, 2000, n. 4, p. 1-8, 2000.

RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Research International*, v. 36, p. 149–159, 2003.

RODRIGUES, J. N. *Reestruturação por Mistura e Interesterificação da Gordura do Leite com Óleo de Milho*. 2002. 119f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo.

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*, v. 23, p. 226-233, 2003.

RONNE, T. H.; YANG, T.; MU, H.; JACOBSEN, C.; XU, X. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5617-5624, 2005.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 1. Compositional modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 6, p. 2368-2374, 1998a.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. Tailoring the Textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 2. Modifications of physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 6, p. 2275-2381, 1998b.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil. *Food Research International*, v. 31, n. 5, p. 381-388, 1999.

ROUSSEAU, D.; FORESTIERE, K.; HILL, A. R.; MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, p. 963-972, 1996.

ROZENAAAL, A. Interesterification of oils and fats. *INFORM*, v. 3, p. 1232-1237, 1992.

SAMBANTHAMURTI, R.; SHAHRUL, S.; PARVEEZ, G. K. A. Safety, Regulatory Aspects, and Public Acceptance of Genetically Modified Lipids. In: AKOH, C. C.; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOSC PRESS, 2005. 762 p. ISBN: 1-893997-51-0.

SANT'ANA, L. S. Biochemical mechanisms involved in the Omega fatty acids digestion, absorption and metabolism. *Brazilian Journal in Health Promotion*, v. 17, n. 4, p. 211-216, 2004.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 354, p. 4823 – 4826, 2008a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 52/53, p. 49 – 57, 2008b.

SANTOS, J. C. *Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: Avaliação das condições operacionais*. 2005. 199 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena.

SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A. Bioenergetics of xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in fluidized bed reactor. Effect of the aeration rate. *Biotechnology Progress*, v. 19, n. 4, p. 1210-1215, 2003.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, v. 52, p. 1 – 18, 2003.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C. Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by Lipozyme IM60. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p.2071-2076, 2001.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHEN, Z.; BIRKETT, A.; AUGUSTIN, M.A.; DUNGEY, S.; VERSTEEG, C. Melting behavior of blends of milk fat with hydrogenated coconut and cottonseed oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 78, n. 4, p. 387 – 394, 2001.

SHIN, J. A.; AKOH, C. C.; LEE, K. T. Production and physicochemical properties of functional - butterfat through enzymatic interesterification in a continuous reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 3, p. 888-900, 2009.

SILVA, R. C.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; BALCAO, V. M.; DE ALMEIDA, D. B.; GONCALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. The effects of enzymatic interesterification on the physical - chemical properties of blends of lard and soybean oil. *LWT--Food Science and Technology*, v. 42, n. 7, p. 1275-1282, 2009.

SILVA, V. C.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 7, p. 949-954, 2009.

SÍNTESE das projeções do agronegócio 2011-2021 do Mapa. Disponível em: <<http://www.auroraserios.com.br/imprensa-aurora/noticias-agricolas/155-sintese-das-projecoes-do-agronegocio-2011-2021-do-mapa.html>> Acesso em: 17/10/2011.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.77-9, p. 745-757, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. *Química Orgânica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v. 1: p. 766. ISBN: 85-2161449-7.

STUART, B.; GEORGE, W. O.; McINTYRE, P. S. In: ANDO, D. J. *Modern Infrared Spectroscopy: Analytical Chemistry by Open Learning*. John Wiley & Sons, 1996. 180 p.

TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 2, 2000.

TEIXEIRA, J. A.; FONSECA, M. M.; VICENTE, A. Geometria e modos de operação. Em: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel, 2007.

TIRAPEGUI, J. *Nutrição fundamentos e aspectos atuais*. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 49-62.

TORRES, E. A. F. S. *Alimentos do milênio: a importância dos transgênicos, funcionais e fitoterápicos para a saúde*. São Paulo: Signus, 2002. p. 94.

TRIVEDI, R.; SINGH, R. P. Modification of Oil and Fats to Produce Structured Lipids. *Journal of Oleo Science*, v. 54, n. 8, p. 423-430, 2005.

UHLIG, H. *Industrial Enzymes and Their Applications*. Traduzido por E. M. Linsmaier-Bednar. United States of America: John Wiley & Sons, 1998. 454 p. ISBN: 0-471-19660-6.

UYTTENBROECK, W.; HENDRIKS, D.; VRIEND, G.; DE BAERE, I.; MOENS, L.; SCHARPE, S. Molecular characterization of an extracellular acid - resistant lipase produced by *Rhizopus javanicus*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 374, n. 4, p. 245-54, 1993.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WATANABE, T.; SUGIURA, M.; SATO, M.; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 637-643, 2004.

WILLIAMS, E. A.; COXHEAD, J. M.; MATHERS, J. C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 62, p. 107-115, 2003.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Enzymatic Interesterification. In: AKOH, C. C. and MIN, D. B. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Florida: CRC Press, 2008. Cap. 30. p. 807. ISBN 978-1-4200-4663-2.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 102, n. 4, p. 287-303, 2000.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (ed.) *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p.35-85.

ZANIN, G. M. *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada*. 1989. 454f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de alimentos; Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZHANG, H., MU, H.; XU, X. Monitoring lipase-catalyzed butterfat interesterification with rapeseed oil by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 386, n. 6, p. 1889–1897, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Atividade hidrolítica (em azeite de oliva) da lipase de *R. oryzae* livre e imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente ou adsorção física.

Tabela 1 – Atividade hidrolítica (em azeite de oliva) da lipase de *R. oryzae* na forma livre.

Lipase L036P livre	Atividade Hidrolítica (U/g seco)	Umidade (%)
Média ± Desvio padrão	83286,1 ± 4754,9	4,5 ± 1,49

Tabela 2 – Atividade hidrolítica (em azeite de oliva) da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por ligação covalente: derivados imobilizados empregados em reações em batelada.

Derivado imobilizado (ligação covalente)	Atividade Hidrolítica (U/g seco)	Umidade (%)	Rendimento de imobilização (%)
Média ± Desvio padrão	4586,68 ± 468,16	8,23 ± 1,44	25,17 ± 2,61

Tabela 3 – Atividade hidrolítica (em azeite de oliva) da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física: derivados imobilizados empregados em reações de leitos fixo e fluidizado.

Derivado imobilizado (Adsorção física)	Atividade Hidrolítica (U/g seco)	Umidade (%)	Rendimento de imobilização (%)
Média ± Desvio padrão	3849,62 ± 926,25	8,85 ± 2,05	25,29 ± 6,75

APÊNDICE B – Exemplo de cromatograma obtido na análise da composição em triacilgliceróis (TAGs) quanto ao número de carbonos por cromatografia gasosa.

manteiga padrão CRM-519

APÊNDICE C – Dados experimentais empregados no estabelecimento da curva de calibração da concentração de traçador para determinação da distribuição de tempo de residência (DTR).

Concentração de traçador (mg/mL)	Experimento 1	Experimento 2	Média dos experimentos	Desvio Padrão
0,9612	1,0044	0,9968	1,0006	0,0054
0,8582	0,8484	0,8825	0,8655	0,0241
0,7689	0,7576	0,8028	0,7802	0,0320
0,6454	0,6296	0,6562	0,6429	0,0188
0,5492	0,5333	0,5577	0,5455	0,0173
0,4325	0,4090	0,4529	0,4310	0,0310
0,3227	0,2702	0,3173	0,2938	0,0333
0,2128	0,1636	0,2126	0,1881	0,0346
0,1098	0,0948	0,1033	0,0991	0,0060