UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GISELE FÁTIMA MORAIS NUNES

Avaliação da interesterificação enzimática de misturas binárias e ternárias de
gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará nas propriedades do
produto obtido

Lorena
2011

GISELE FÁTIMA MORAIS NUNES

Avaliação da interesterificação enzimática de misturas binárias e ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará nas propriedades do produto obtido

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

Lorena
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, 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

Nunes, Gisele Fátima Morais

Avaliação da interesterificação enzimática de misturas binárias e ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará nas propriedades do produto obtido. / Gisele Fátima Morais Nunes. – 2011.

200p: 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: Julio César dos Santos.

1. Lipase de *Rhizopus oryzae* 2. Imobilização (Enzimas) 3. Óleos e gorduras. I. Título.

577.15 CDU

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e me iluminado permitindo superar todos os desafios deste trabalho.

Ao Dr. Júlio César dos Santos e à Prof^a. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro pela orientação, amizade, paciência, disponibilidade, incentivo, confiança e apoio.

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

Ao Rafael meu companheiro em todos os momentos, pelo amor incondicional.

À minha família que amo tanto, meus pais, Amaro e Edna, minha tia Celina e minha vó Maria, meu irmão Rodrigo, sua esposa Raphaela, minha irmã Ana, seu marido Marcus e meus sobrinhos Pedro e Helena, meu irmão André, sua esposa Margarida e meu sobrinho Francisco, por sempre estarem ao meu lado, pelo apoio, carinho, incentivo e amizade.

Aos meus sogros, Graça e Odilon pelo incentivo.

À minha amiga Ariela, por toda força, incentivo, amizade e carinho.

Aos colegas do nosso grupo de trabalho (Larissa, Patrícia, Grazielle, Weriton, Matheus, Ana Karine, Karen, Márcio, Natália e todos os demais que não estão mais no grupo, mas que fizeram também parte deste trabalho) pela ajuda e convivência diária.

Aos meus amigos Tina e Anderson, Gabriela e Pedro, Patrícia e Sérgio, e às amigas Poliana, Josiane, Isabela e Livia, por todo incentivo e carinho.

À Bruna Novaes e à Cristina Chacon pelo carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Shigue e sua aluna Mariane pelas análises de DSC.

Ao Breno e a Cirlene do laboratório de análises térmicas da FEG pelas análises de DSC.

Ao Prof. Marco Antônio pelos aprendizados durante o estágio em docência.

Aos funcionários e professores da Escola de Engenharia de Lorena pela colaboração e ensinamentos.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

RESUMO

NUNES, G. F. M. **Avaliação da interesterificação enzimática de misturas binárias e ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará nas propriedades do produto obtido.** 2011. 200p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2011.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará nas propriedades do produto alimentício obtido, empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em sílica-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) como catalisador. Considerou-se desejável a obtenção de um produto que, ao incorporar parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes nos óleos, apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração. Na primeira etapa as propriedades das matérias-primas foram determinadas aplicando técnicas oficiais de análise e verificou-se que todas apresentaram características de acordo com a legislação brasileira para uso em produtos alimentícios. Em seguida, foram testados dois métodos (adsorção física e ligação covalente) para efetuar a imobilização da lipase selecionada em SiO₂-PVA e os resultados obtidos indicaram a adequação do procedimento de adsorção física. As condições otimizadas para conduzir as reações de interesterificação enzimática de blendas binárias de gordura de leite e óleo de canola, e de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, foram determinadas por planejamento composto central (CCD) constituído de 11 experimentos. A influência das variáveis temperatura (45–65°C) e teor de gordura no meio reacional (50–80%) foi avaliada simultaneamente, considerando como variáveis-resposta o grau de interesterificação (GI) e a consistência dos produtos. Modelos empíricos que possibilitaram a seleção de condições para obtenção de produtos interesterificados com satisfatória espalhabilidade (consistência entre 200 e 800 gf/cm²) foram compostos e confirmados para cada caso. Para a blenda gordura de leite e óleo de canola, as condições selecionadas corresponderam a um meio contendo 65% de gordura e 35% de óleo e incubado a 45°C por 12 h. Nessas condições foram obtidos produtos com consistência de 700 gf/cm². No caso da blenda gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, produtos interesterificados que atendem o parâmetro desejado (200-800 gf/cm²) foram obtidos empregando-se um meio contendo 50% de gordura e 50% do óleo, incubados a 45°C por 24 h. Reações de interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará foram também efetuadas de acordo com um planejamento de misturas, constituído de 17 experimentos visando avaliar a influência da proporção de cada componente da blenda na consistência do produto interesterificado. Na faixa de variação investigada, o uso de blendas contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará incubadas por 3 h a 45°C resultou em produtos interesterificados com satisfatória consistência e plasticidade (634 gf/cm²). O desempenho das reações enzimáticas conduzidas sob aquecimento convencional e não convencional (irradiação de micro-ondas) foi ainda avaliado para as blendas binárias nas condições previstas pelo planejamento composto central, não sendo observada interferência das micro-ondas na atuação da enzima, obtendo-se produtos interesterificados com valores similares de consistência. Os dados obtidos sugerem que o processo de interesterificação enzimática catalisado pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA foi eficaz para a modulação das características de plasticidade dos produtos obtidos empregando tanto misturas binárias como ternárias.

Palavras-chave: Lipase de *Rhizopus oryzae*. Imobilização (Enzimas). Óleos e gorduras.

ABSTRACT

NUNES, G. F. M. **Assessment of the enzymatic interesterification of the binary and ternary blends of milkfat with canola oil and Brazil nut oil on the properties of the products obtained.** 2011. 200p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2011.

The objective of this work was to assess the effect of the enzymatic interesterification of milkfat with canola oil and Brazil nut oil on the properties of the resulting food product, using *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on silica-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) as catalyst. The work was carried out considering as desirable to obtain a more spreadable product under domestic refrigerated conditions as well as enriched with unsaturated and essential fatty acids. Firstly, the properties of the raw materials were determined by applying official analysis techniques and results indicated that all raw materials were in agreement with the Brazilian legislation to food products. Then, two methodologies (physical adsorption and covalent binding) were tested for immobilizing the selected lipase on SiO₂-PVA and physical adsorption was found to be the most suitable procedure. The optimized conditions to perform the enzymatic interesterification reactions of binary blends (milkfat and canola oil and milkfat and Brazil nut oil) were determined by central composite design (CCD), leading to a set of 11 runs. The influence of the variables, temperature (45–65°C) and the content of milk fat in the reaction medium (50–80%), was assessed simultaneously, taking the interesterification degree (ID) and consistency (10°C) as response variables. Empiric models were composed and confirmed for each case to establish conditions at which products with satisfactory spreadability (consistency in the range from 200 and 800 gf/cm²) can be obtained. For the milkfat and canola oil blend, the established conditions corresponded to a medium containing 65% of milk fat and 35% of oil, and lipase incubated at 45°C for 12 h. In these conditions, products with consistency of 700 gf/cm² were obtained. In the case of milkfat and Brazil nut oil blend, interesterified products with desirable parameter (200 and 800 gf/cm²) were obtained from reactions carried out with medium containing 50% of milk fat and 50% of oil, and lipase incubated at 45°C for 24 h. Interesterification reactions of ternary blends of milkfat, canola oil and Brazil nut oil were also carried out according to a mixture design with 17 runs to assess the influence of the mass proportion of each compound in the blend on the consistency of the interesterified products. In the range studied, the use of blends with 56% of milkfat, 22% of canola oil and 22% of Brazil nut oil and incubation at 45°C for 3 h resulted in products with satisfactory consistency and plasticity (634 gf/cm²). The performance of enzymatic reactions carried out under conventional and non-conventional (microwave irradiation) heating was also assessed for binary blends under the conditions predicted by the central composite design, and no interference of the microwave in the enzyme action was observed, resulting in interesterified products with similar values of consistency. The results obtained suggested that the process of enzymatic interesterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* immobilized on SiO₂-PVA was effective in modulating the plasticity properties of the products obtained using both binary and ternary blends.

Keywords: *Rhizopus oryzae* lipase. Immobilization (Enzymes). Oils and fats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fluxograma representativo dos principais métodos utilizados para modificação da gordura de leite.....	31
Figura 2.2 – Principais parâmetros que interferem na interesterificação da gordura de leite pela rota enzimática.	37
Figura 2.3 – Número de publicações envolvendo o tema interesterificação enzimática da gordura de leite entre os anos de 1986 e 2011.	42
Figura 2.4 – Quantidade de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados presentes nas matérias-primas gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará (FIRESTONE, 2006).	46
Figura 2.5 – Comparação entre o aquecimento convencional (a) e o aquecimento por irradiação de micro-ondas (b).	53
Figura 2.6 – Distribuição da irradiação das micro-ondas em reatores dos tipos (a) multimodo e (b) monomodo	55
Figura 2.7 – Curva de força em função do tempo obtida em testes de consistência de gorduras utilizando uma sonda acrílica correspondente a um cone com ponta não truncada e ângulo de 45°.....	57
Figura 3.1 – Foto do sistema de alto vácuo utilizado para redução da umidade dos derivados imobilizados.....	61
Figura 3.2 – Foto do reator empregado nas reações de interesterificação.	62
Figura 3.3 – Reator de micro-ondas Discover (modelo CEM-SP1245, CEM Corporation, USA) de configuração monomodo utilizado nas reações de interesterificação.....	65
Figura 3.4 – Sonda TA15, correspondente a um cone acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45° utilizado para a análise de consistência das amostras.....	69
Figura 4.1 – Consistência da gordura de leite e da manteiga utilizadas no presente trabalho, comparativamente aos valores obtidos para quatro margarinas comerciais.	84
Figura 4.2 – Teor de ácidos graxos livres das amostras das reações de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física (—■—) e por ligação covalente (—●—).....	87
Figura 4.3 – Composição em TAGs, quanto ao número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula, dos produtos da interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física e por ligação covalente	88
Figura 4.4 – Consistência a 10°C dos produtos da interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada por lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física e por ligação covalente.....	90

Figura 4.5 – Teor de ácidos graxos livres das amostras das reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de canola realizadas nas seguintes condições: (—■—) 45°C/ blenda 80:20; (—■—) 65°C/blenda 80:20; (—■—) 45°C/blenda 50:50; (—■—) 65°C/blenda 50:50; (—■—, —■—, —■—) 55°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 50:50; (—■—) 45°C/blenda 65:35..... 92

Figura 4.6 – Perfil de TAGs quanto ao número de carbonos para os produtos (48h) das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite: óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada. Na Figura Col: Colesterol e NIE: não interesterificada..... 96

Figura 4.7 – Superfície de resposta para grau de interesterificação (a) e consistência (b) dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA. 102

Figura 4.8 – Gráficos de contorno sobrepostos de consistência e grau de interesterificação dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA. 104

Figura 4.9 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C..... 105

Figura 4.10 – Índice de peróxido em função do tempo das amostras retiradas durante a reação de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida a 45°C.107

Figura 4.11 – Concentração de TAGs em função do tempo para os produtos da reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob temperatura de 45°C. Na figura Col: Colesterol..... 108

Figura 4.12 – Grau de interesterificação em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C..... 109

Figura 4.13 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 110

Figura 4.14 – Relação linear entre os valores de grau de interesterificação e consistência dos produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola, nos diferentes tempos reacionais. 111

Figura 4.15 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de canola e blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*. 113

Figura 4.16 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite. 115

Figura 4.17 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 50% de óleo de canola, nos diferentes tempos reacionais. 118

Figura 4.18 – Teor de ácidos graxos livres para as amostras retiradas do meio reacional nas reações de interesterificação de gordura de leite e óleo de canola realizadas nas seguintes condições: (—■—) 45°C/ blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 80:20; (—■—) 45°C/blenda 50:50; (—■—) 65°C/blenda 50:50; (—■—, —■—, —■—) 55°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 50:50; (—■—) 45°C/blenda 65:35. 119

Figura 4.19 – Perfil de TAGs quanto ao número de carbonos para os produtos (48h) das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite:óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central. Na Figura Col: Colesterol e NIE: não interesterificada. 122

Figura 4.20 – Superfície de resposta para consistência dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA. 127

Figura 4.21 – Gráfico de contorno para consistência dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA. 128

Figura 4.22 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 130

Figura 4.23 – Índice de peróxido em função do tempo dos produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 130

Figura 4.24 – Concentração de TAGs em função do tempo para os produtos da reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA conduzida sob temperatura de 45°C. Na figura Col: Colesterol. 132

Figura 4.25 – Grau de interesterificação em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 133

Figura 4.26 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 133

Figura 4.27 – Relação linear entre os valores de grau de interesterificação e consistência dos produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais..... 134

Figura 4.28 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de castanha-do-pará e blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*..... 137

Figura 4.29 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite. 138

Figura 4.30 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais. 140

Figura 4.31 – Teor de ácidos graxos livres para as amostras retiradas do meio reacional nas reações de interesterificação de blends ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará nas seguintes proporções: 100:0:0 (—■—) (—■—); 83:0:17 (—■—); 83:8:8 (—■—); 83:17:0 (—■—); 67:0:33 (—■—) (—■—); 67:17:17 (—■—); 67:33:0 (—■—); 58:8:33 (—■—); 58:33:8 (—■—); 50:0:50 (—■—) (—■—); 50:17:33 (—■—); 50:33:17 (—■—); 50:50:0 (—■—) (—■—)..... 142

Figura 4.32 – Diagrama triangular em curvas de nível correspondentes às consistências das blends NIE (a) e dos produtos EIE (b) das reações de interesterificação enzimática de blends ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, realizadas segundo um planejamento de misturas. 151

Figura 4.33 – Diagrama triangulares correspondentes aos gráficos de contorno das consistências blends NIE (a) e dos produtos EIE (b) das reações de interesterificação enzimática de blends ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, realizadas segundo um planejamento de misturas..... 152

Figura 4.34 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C..... 154

Figura 4.35 – Índice de peróxido em função do tempo dos produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C..... 155

Figura 4.36 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C. 158

Figura 4.37 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de canola, óleo de castanha-do-pará e blenda contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*. 159

Figura 4.38 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação desta blenda mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite. 161

Figura 4.39 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais. 162

Figura 4.40 – Teor de ácidos graxos livres dos produtos das reações de interesterificação das blendas binárias contendo (a) 65% de gordura de leite e 35% óleo de canola e (b) 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola, realizadas sob aquecimento convencional (—■—) e por irradiação de micro-ondas (—■—). 164

Figura 4.41 – Concentração de TAGs, quanto ao número de carbonos, dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% óleo de canola, realizadas sob (a) aquecimento convencional e (b) irradiação de micro-ondas. Na Figura Col: Colesterol..... 165

Figura 4.42 – Concentração de TAGs, quanto ao número de carbonos, dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% óleo de castanha-do-pará, realizadas sob (a) aquecimento convencional e (b) irradiação de micro-ondas. Na Figura Col: Colesterol. 166

Figura 4.43 – Grau de interesterificação para os produtos obtidos nas reações de interesterificação da blenda binária contendo (a) 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola e (b) 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob temperatura de 45°C, por aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas..... 168

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição estereoespecífica em ácidos graxos da gordura de leite.....	28
Tabela 2.2 – Trabalhos publicados em periódicos no período de 1986 a 2011 sobre o tema interesterificação enzimática da gordura de leite.....	38
Tabela 2.3 – Alguns trabalhos publicados envolvendo reações enzimáticas catalisadas por lipases assistidas por irradiação de micro-ondas.	54
Tabela 3.1 – Níveis reais e codificados das variáveis temperatura e teor de gordura de leite nos meios reacionais empregados nos experimentos conduzidos segundo planejamento composto central com face centrada.	63
Tabela 3.2 – Planejamento estatístico de misturas com três componentes.....	64
Tabela 4.1 – Índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das matérias-primas comparadas aos valores estabelecidos pela legislação brasileira.....	73
Tabela 4.2 – Composição em ácidos graxos da gordura de leite, óleo de canola e castanha-do-pará.	78
Tabela 4.3 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) individuais e quanto ao número de carbono dos óleos de canola e castanha-do-pará, obtida teoricamente através do computacional 1,2,3 óleos.	80
Tabela 4.4 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as matérias-primas gordura de leite, óleos de canola e castanha-do-pará, com base nos resultados obtidos teoricamente através do programa computacional 1,2,3 óleos.	81
Tabela 4.5 – Composição em triacilgliceróis (%) da gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, quanto ao número de carbonos presentes nos grupos acil dos triacilgliceróis, obtida por análise cromatográfica.....	82
Tabela 4.6 – Avaliação de margarinas e “shortenings” por meio de sua consistência.....	85
Tabela 4.7 – Umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização obtidos para a lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA por adsorção física e por ligação covalente.....	86
Tabela 4.8 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de canola não interesterificadas.	93
Tabela 4.9 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas de gordura de leite e óleo de canola antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase <i>sn</i> -1,3 específica.	94
Tabela 4.10 – Matriz experimental e resultados do grau de interesterificação e consistência para os produtos obtidos em experimentos de interesterificação enzimática de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola, conduzidos de acordo com planejamento composto central com face centrada.	97

Tabela 4.11 – Consistência das blendas reacionais de gordura de leite/óleo de canola não interesterificadas empregadas nas reações de interesterificação enzimática.	98
Tabela 4.12 – Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste “t” de Student e valores de p para grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada.	99
Tabela 4.13 – Critérios para a validação de diferentes modelos.	100
Tabela 4.14 – Análise de Variância (ANOVA) para os modelos ajustados representando o grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/ óleo de canola, catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, realizadas de acordo com planejamento composto central com face centrada.	101
Tabela 4.15 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas.	120
Tabela 4.16 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase <i>sn</i> -1,3 específica.	121
Tabela 4.17 – Matriz experimental com resultados de grau de interesterificação e consistência para os produtos obtidos em experimentos de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará, conduzidos de acordo com planejamento composto central com face centrada para análise da influência dos parâmetros teor de gordura de leite e temperatura de reação.	124
Tabela 4.18 – Consistência das blendas reacionais de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará não interesterificadas empregadas nas reações de interesterificação catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA.	124
Tabela 4.19 – Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste “t” de Student e valores de <i>p</i> para grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada.	125
Tabela 4.20 – Análise de Variância (ANOVA) para o modelo ajustado representando a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/ óleo de castanha-do-pará, catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA, realizadas de acordo com planejamento composto central com face centrada.	127
Tabela 4.21 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas.	144

Tabela 4.22 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica. 145

Tabela 4.23 – Consistência (10°C) para as blendas ternárias de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas (NIE) e para seus respectivos produtos interesterificados (EIE) obtidos nos experimentos conduzidos segundo planejamento estatístico de misturas..... 146

Tabela 4.24 – Análise de Variância (ANOVA) para os modelos ajustados representando a consistência das blendas ternárias e produtos das reações de interesterificação catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas de acordo com planejamento de misturas..... 148

Tabela 4.25 – Composição em ácidos graxos (% molar) da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificadas. 156

Tabela 4.26 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para a blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% óleo de castanha-do-pará antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica. 157

LISTA DE SIGLAS

A	Ácido araquídico
ANOVA	Análise de variância
AOCS	American Oil Chemists' Society
Be	Ácido Behênico
CCD	<i>"Central Composite Design"</i> (Planejamento composto central)
CGS	Conteúdo de gordura sólida
CLA	Conjugated Linoleic Acid (Ácidos linolêicos conjugados)
CN	Número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes nos triglicerídeos
Col.	Colesterol
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria de varredura diferencial)
EIE	Enzimaticamente Interesterificado
Er	Ácido erúcico
FT-NIR	<i>Fourier transform near-infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
GI	Grau de Interesterificação
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
III	Tri-insaturados
IIS	Monossaturados-di-insaturados
L	Ácido linolêico
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
Ln	Ácido linolênico
NIE	Não interesterificado
O	Ácido olêico
P	Ácido palmítico

PEG	Polietilenoglicol
Po	Ácido palmitoléico
PVA	Álcool polivinílico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SC-CO₂	Dióxido de carbono supercrítico
SiO₂-PVA	Sílica-álcool polivinílico
SSI	Dissaturados-monoinsaturados
SSS	Trissaturados
St	Ácido esteárico
TAGs	Triacilgliceróis
TEOS	Tetraetilortossilicato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1. Gordura de leite.....	27
2.2. Métodos de modificação da gordura de leite	30
2.2.1. <i>Modificação Física</i>	30
2.2.2. <i>Modificação Química</i>	32
2.2.3. <i>Métodos Enzimáticos.....</i>	35
2.3. Interesterificação enzimática da gordura de leite	36
2.3.1. <i>Biocatalisador.....</i>	42
2.3.2. <i>Matérias-primas: óleos vegetais</i>	45
2.3.3. <i>Condições reacionais.....</i>	50
2.3.4. <i>Configurações de reator</i>	52
2.4. Reações enzimáticas assistidas por irradiação de micro-ondas.....	52
2.5. Caracterização de lipídeos obtidos a partir da interesterificação enzimática da gordura de leite	55
2.5.1. <i>Textura</i>	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1. Materiais	59
3.1.1. <i>Matérias-primas.....</i>	59
3.1.2. <i>Enzima</i>	59
3.1.3. <i>Substrato para atividade hidrolítica.....</i>	59
3.2. Procedimento Experimental	59
3.2.1. <i>Separação da gordura de leite.....</i>	59
3.2.2. <i>Obtenção da matriz de imobilização</i>	60
3.2.3. <i>Ativação do suporte com metaperiodato de sódio.....</i>	60
3.2.4. <i>Neutralização do suporte com hidróxido de potássio</i>	60
3.2.5. <i>Imobilização da lipase</i>	60
3.2.6. <i>Interesterificação da gordura de leite com óleo de canola empregando lipase de Rhizopus oryzae imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente:</i>	61
3.2.7. <i>Planejamento estatístico: avaliação do efeito da temperatura e composição da mistura nas reações de interesterificação das blendas binárias de gordura de leite com óleo de canola e gordura de leite com óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase....</i>	62
3.2.8. <i>Planejamento estatístico: avaliação do efeito da composição da mistura nas reações de interesterificação das blendas ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará catalisada por lipase</i>	63

3.2.9. Reações de interesterificação das misturas binárias de gordura de leite com óleo de canola e gordura de leite com óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase assistidas por irradiação de micro-ondas.....	65
3.3. Métodos de Análise	65
3.3.1. Teor de umidade e compostos voláteis presentes nas matérias-primas	65
3.3.2. Índice de acidez	66
3.3.3. Índice de saponificação	66
3.3.4. Índice de iodo.....	66
3.3.5. Índice de peróxido	66
3.3.6. Composição em ácidos graxos	66
3.3.7. Composição em triacilgliceróis (TAGs)	67
3.3.8. Grau de Interesterificação.....	68
3.3.9. Consistência.....	68
3.3.10. Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	69
3.3.11. Conteúdo de gordura sólida	70
3.3.12. Teor de umidade do derivado imobilizado	70
3.3.13. Atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada.....	70
3.3.14. Rendimento de imobilização.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1. Caracterização das matérias-primas	73
4.1.1. Índice de acidez	73
4.1.2. Índice de saponificação	74
4.1.3. Índice de iodo.....	75
4.1.4. Índice de peróxido	76
4.1.5. Composição em ácidos graxos	77
4.1.6. Composição em triacilgliceróis	79
4.1.7. Consistência.....	83
4.2. Seleção do método de imobilização da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em SiO₂-PVA..	85
4.3. Interesterificação de blendas binárias gordura de leite e óleo de canola	90
4.3.1. Influência da temperatura e do teor de gordura de leite em reações de interesterificação de blendas binárias gordura de leite e óleo de canola.....	91
4.3.2. Modelos empíricos para as respostas grau de interesterificação e consistência...	100
4.3.3. Confirmação dos modelos obtidos e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de canola ao longo do tempo	104

4.4. Interesterificação de blendas binárias de gordura de leite com óleo de castanha-do-pará.....	118
4.4.1. <i>Influência da temperatura e do teor de gordura de leite em reações de interesterificação enzimática de blendas binárias de gordura de leite com óleo de castanha-do-pará.....</i>	<i>119</i>
4.4.2. <i>Modelo empírico para consistência.....</i>	<i>126</i>
4.4.3. <i>Confirmação do modelo obtido e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de castanha-do-pará ao longo do tempo.....</i>	<i>129</i>
4.5. Interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará	141
4.5.1. <i>Influência do teor de gordura de leite e óleos de canola e castanha-do-pará em reações de interesterificação enzimática de blendas ternárias.....</i>	<i>142</i>
4.5.2. <i>Confirmação dos modelos obtidos e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da blenda ternária gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará ao longo do tempo.</i>	<i>153</i>
4.6. Interesterificação das blendas binárias contendo 65% gordura de leite e 35% de óleo de canola e 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará assistida por irradiação de micro-ondas	163
5. CONCLUSÕES.....	171
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	175
REFERÊNCIAS.....	177
APÊNDICES	194

1. INTRODUÇÃO

Entre as gorduras, uma muito apreciada pelo consumidor é a gordura de leite, a qual se atribui sabor e aroma agradáveis. A redução do consumo desta gordura na dieta humana foi recomendada nas últimas décadas em função da quantidade de ácidos graxos saturados presentes em sua composição. Estes ácidos graxos têm sido relacionados à elevação dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL – “*Low Density Lipoprotein*”, o denominado “colesterol ruim”) no organismo e consequentemente ao aumento do risco das doenças cardiovasculares. Desta forma, a manteiga foi gradativamente substituída por margarinas obtidas a partir de óleos vegetais, por um processo atrativo do ponto de vista econômico: a hidrogenação parcial.

Entretanto, estudos mostraram que a gordura obtida por hidrogenação parcial de óleos possui considerável quantidade de ácidos graxos insaturados na configuração *trans*, que têm sido apontados como mais prejudiciais à saúde que os ácidos graxos saturados. Isso porque a gordura *trans* conduz não apenas ao aumento no teor de LDL, mas também à redução da lipoproteína de alta densidade (HDL – “*High Density Lipoprotein*”, o denominado “colesterol bom”), resultando em maior elevação da relação LDL/HDL em comparação à ingestão de ácidos graxos saturados, e, consequentemente, em efeito adverso à saúde mais acentuado. Em função disso, tem-se buscado a substituição da hidrogenação parcial por vias de produção que não resultem em formação de isômeros “*trans*”. Além disso, a presença na gordura de leite de componentes como os ácidos linolêicos conjugados, que têm sido associados a efeito anticarcinogênico, tem despertado novamente o interesse nesta matéria-prima.

Os aspectos nutricionais, entretanto, não são suficientes para a aceitabilidade de um produto. Muitas vezes, alimentos capazes de resultar em benefícios à saúde não são consumidos em função de propriedades físicas inadequadas. Para manteigas e margarinas uma análise importante é a de textura, a qual inclui a avaliação de características como espalhabilidade, aparência e as diversas impressões sensoriais do alimento na boca. A obtenção de um produto que alie o sabor da gordura de leite com as características físicas desejáveis pode ser alcançada pela interesterificação de blendas desta gordura com óleos vegetais, possibilitando a aquisição de lipídeos com melhores propriedades nutricionais pelo aumento da quantidade de gordura insaturada.

A reação de interesterificação pode ser catalisada por via química ou enzimática; entretanto, deve-se destacar que a via enzimática, além de representar uma rota ambientalmente amigável, possui vantagens se comparada à química, tais como a reogioespecificidade, que permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final e o emprego de condições reacionais mais brandas (temperaturas reduzidas), que podem ser menos prejudiciais às qualidades sensoriais da manteiga. A obtenção de produto interesterificado por via enzimática pode ser alcançada empregando-se lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3), um grupo de enzimas versáteis, capazes de atuar sob diferentes meios e condições reacionais.

Entre os óleos com potencial para emprego em reações de interesterificação com a gordura de leite estão os de canola e de castanha-do-pará. Estes óleos possuem quantidade expressiva de ácidos graxos monoinsaturados (oléico) e poli-insaturados, incluindo os essenciais linoléico (ômega 6) e, especialmente no caso do óleo de canola, linolênico (ômega 3). Estes ácidos graxos têm sido relacionados a diferentes benefícios à saúde humana, incluindo a prevenção de várias doenças como: coronarianas artrite reumatóide e câncer. O óleo de canola é oriundo da planta *Brassica* spp., sendo a terceira oleaginosa mais produzida mundialmente, e que apresenta perspectivas de aumento no cultivo no Brasil, especialmente na região sul. O óleo de castanha-do-pará é oriundo da planta *Bertholletia excelsa*, uma espécie nativa da Amazônia, conhecida por sua amêndoa e madeira de lei, representando importante base de subsistência para os habitantes da região norte do Brasil.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar as características dos produtos obtidos por interesterificação de blendas binárias e ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em sílica-álcool polivinílico (SiO₂-PVA). Considerou-se desejável a obtenção de um produto que ao incorporar parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes nos óleos, apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração. Trabalhos de interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de canola já foram desenvolvidos, entretanto o emprego desta particular lipase imobilizada nesta reação constitui nova alternativa de estudo. Com relação ao óleo de castanha-do-pará, destaque pode ser dado à sua utilização para a interesterificação enzimática com gordura de leite, sendo este um trabalho pioneiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gordura de leite

O leite tem sido descrito como um dos produtos naturais mais próximos da perfeição, devido ao seu elevado teor de nutrientes, incluindo proteínas, gorduras, açúcares, minerais e vitaminas (BALCÃO; MALCATA, 1998; NUNES et al., 2010). Muitos desses nutrientes são prontamente biodisponíveis, o que faz com que o leite seja importante base para alimentação de recém nascidos e crianças durante os estágios de crescimento e desenvolvimento, e se mantenha como um elemento nutritivo da dieta de adolescentes e adultos (PARODI, 2009).

A gordura é a maior fonte de energia do leite e responsável por muitas de suas propriedades físicas, características de manufatura e qualidades sensoriais, além de ser um componente de representativo valor econômico (BAUMAN; GRINERI, 2001).

Triacilgliceróis (TAGs), que são triésteres de ácidos graxos e glicerol, compõem 98% da gordura de leite, sendo formados por mais de 400 diferentes ácidos graxos, o que torna esta gordura uma das gorduras mais complexas encontradas na natureza (LOPEZ et al., 2006; KONTKANEN et al., 2011). Suas propriedades são diretamente influenciadas por sua composição em ácidos graxos e pela distribuição desses ácidos nas moléculas dos TAGs (AUGUSTIN; VERSTEEG, 2006). Sua composição química varia com raça, estágio de lactação e o tipo de alimentação do animal do qual esta deriva (AUGUSTIN; VERSTEEG, 2006; LOPEZ et al., 2006).

A gordura de leite bovina é caracterizada por conter ácidos graxos de cadeia curta (C 4 – C 8: 8,3%), cadeia média (C 10 – C 12: 6,6%) e cadeia longa (C 14 – C 18: 81,9%). Além disso, esta gordura possui uma quantidade relativamente alta de ácidos graxos saturados, aproximadamente 65% (principalmente C 14:0, C 16:0 e C 18:0) e os 35% restantes de ácidos graxos insaturados (principalmente C 18:1) (LOPEZ et al., 2006).

A distribuição dos ácidos graxos nos TAGs da gordura de leite não é aleatória, pois, como mostrado na Tabela 2.1, a maior parte dos ácidos graxos de cadeia curta são esterificados nas posições primárias dos TAGs (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007; LUBARY et al., 2009). Nesta tabela também pode ser observado que grande parte dos ácidos graxos saturados desta gordura se localizam na posição *sn*-2 dos TAGs.

Tabela 2.1 – Composição estereoespecífica em ácidos graxos da gordura de leite (% mol).

Ácido graxo		Distribuição posicional		
		<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	<i>sn-3</i>
butírico	C 4:0	0	0	35,4
capróico	C 6:0	0	0,9	12,9
caprílico	C 8:0	1,4	0,7	3,6
cáprico	C 10:0	1,9	3,0	6,2
láurico	C 12:0	4,9	6,2	0,6
mirístico	C 14:0	9,7	17,5	0,4
pentadecanóico	C 15:0	2,0	2,9	1,4
palmitico	C 16:0	34,0	32,3	5,4
hexadecenóico	C 16:1	2,8	3,6	1,4
margárico	C 17:0	1,3	1,0	0,1
esteárico	C 18:0	10,3	9,5	1,2
oleico	C 18:1	30,0	18,9	23,1
linolênico	C 18:2	1,7	3,5	2,3

Fonte: (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007).

Os principais produtos da gordura de leite são a manteiga, que é obtida pela batedura do creme de leite, e a gordura de leite anidra, preparada pela separação a partir da manteiga após fusão ou do creme de leite concentrado (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

A complexa composição da gordura de leite faz com que a manteiga possua sabor e aroma muito agradáveis (LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011) e uma imagem natural que têm sido apresentados como características importantes que conduzem a preferência de seu consumo em lugar da margarina (BOURLIEU; BOUHALLAB; LOPEZ, 2009). Isso pode ser confirmado pelo grande número de produtos com aroma de manteiga presentes no mercado (RACT; GIOIELLI, 2008).

A gordura de leite possui também importância nutricional, sendo fonte de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis (RØNNE et al., 2005). Possivelmente o mais importante componente bioativo presente nesta gordura é o ácido linoléico conjugado (“*Conjugated Linoleic Acid*”- CLA) que corresponde a todos os isômeros posionais e geométricos do ácido octadecadienóico com ligações duplas conjugadas. A gordura de leite é a fonte natural mais abundante de CLA (COLLOMB et al., 2006; PARODI, 2009), com *cis*, *trans*-11-18:2 ácido rumênico representando mais de 90% dos isômeros presentes (PARODI, 2009).

Estudos têm demonstrado que os CLA tem ação anti-aterogênica, auxiliam na modulação do sistema imunológico e do crescimento ósseo, e atuam no combate a diabetes e à obesidade, e ao câncer, principalmente tumores de pele, estômago, cólon e glândulas

mamárias (COLLOMB et al., 2006; LOCK; BAUMAN, 2004; PARODI, 2006; PARODI, 2009; LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011).

Além disso, a gordura de leite proveniente de animais ruminantes contém o ácido butírico, um ácido graxo de cadeia curta, que tem demonstrado ser também um inibidor de uma ampla gama de células humanas cancerígenas (PARODI, 2006; LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011). O consumo de produtos que contém gordura de leite também foi associado à redução do risco da ocorrência de asma em testes em crianças da pré-escola (WIJGA et al., 2003).

Apesar de sua notoriedade, a gordura de leite possui algumas desvantagens devido a sua baixa espalhabilidade quando refrigerada (RØNNE; JACOBSEN; XU, 2006; LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011), principalmente comparada às margarinas (COUVREUR et al., 2006), e ao seu alto conteúdo de ácidos graxos saturados (láurico, mirístico e palmítico), que são apontados como hipercolesterolêmicos (RØNNE et al., 2005).

Desde o início da comercialização de margarinas e “*spreads*” (produtos espalháveis), estes têm sido importantes competidores com a manteiga. Uma das razões para isso foram as propagandas nutricionais em torno destes produtos (LITZ; OBERT; SZILY, 2006); entretanto, diante de todos os malefícios ocasionados pela ingestão das chamadas “gorduras *trans*”, presentes em margarinas e demais cremes vegetais resultantes do processo de hidrogenação parcial, a manteiga tem recebido novamente atenção em estudos científicos (NUNES et al., 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de “redesenhar” a gordura de leite para melhorar suas propriedades nutricionais e funcionais. Por exemplo, isto pode envolver a redução do conteúdo de ácidos graxos saturados e o aumento dos ácidos graxos insaturados (especialmente o CLA) e do ácido butírico (BAUMAN; GRINERI, 2001; LOCK; BAUMAN, 2004). Estudos têm mostrado que a espalhabilidade também pode ser positivamente correlacionada à porcentagem de ácidos graxos insaturados presentes na manteiga (COUVREUR et al., 2006; HILLBRICK; AUGUSTIN, 2003).

2.2. Métodos de modificação da gordura de leite

Para aumentar a aplicabilidade da gordura de leite, diferentes processos de modificação têm sido utilizados e um fluxograma representativo dos principais métodos é mostrado na Figura 2.1.

2.2.1. Modificação Física

A modificação física da gordura de leite ocorre principalmente por fracionamento ou pela blenda com outros componentes, resultando em produtos com diferente composição em TAGs, porém os ácidos graxos presentes na gordura de leite mantêm sua posição original nas moléculas dos TAGs (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

O método de fracionamento refere-se ao processo em que a matéria-prima é aquecida acima de seu ponto de fusão, e em seguida submetida ao resfriamento, sob condições que estimulam a cristalização dos TAGs com mais altos pontos de fusão. A fase líquida oleína é então separada da fase sólida, estearina (HAYLOCK; DODDS, 2009).

Blendas consistem na simples mistura física de gordura de leite com óleos vegetais e/ou outras gorduras comestíveis, ou mesmo com lipídeos secundários (monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres) para obtenção de produtos com propriedades funcionais desejáveis, que aumentam sua aplicabilidade e em geral diminuem seu custo (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

Outros métodos de modificação física podem envolver mudanças na textura da gordura de leite somente pela aplicação de tratamentos físicos na gordura sem modificação na composição em TAGs. Isto envolve o “temperamento” ou reprocessamento do creme ou manteiga para incorporação de ar. Embora este tipo de técnica resulte em modificações úteis, os efeitos são moderados e os benefícios podem ser perdidos com o tempo de armazenamento (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

Figura 2.1 – Fluxograma representativo dos principais métodos utilizados para modificação da gordura de leite.

2.2.2. Modificação Química

Os processos de transformação química compreendem a hidrogenação e a interesterificação (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

A hidrogenação consiste na introdução de átomos de hidrogênio às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, em presença de um catalisador, sob altas temperaturas, obtendo-se produtos com maior número de ácidos graxos saturados e que possuem mais estabilidade em relação à oxidação e prolongada “vida de prateleira” (AUSTIN; VERSTEEG, 2006; DE GREYT; HUYGHEBAERT; KELLENS, 1998; GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002).

Embora a gordura de leite tenha uma quantidade relativamente elevada de ácidos graxos saturados, a avaliação do seu potencial como gordura hidrogenada foi considerado no passado, quando demonstrou-se que a estabilidade à estocagem desta gordura pode ser melhorada por este processo (DE GREYT; KELLENS, 2001).

O processo de hidrogenação foi também muito utilizado no passado na produção de margarinas e “*spreads*” à base de óleos vegetais insaturados, objetivando-se substituir a manteiga que era um produto de alto valor agregado, por ser um processo atrativo do ponto de vista econômico (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002; NUNES et al., 2010). Porém, este método leva a isomerização de algumas duplas ligações e migração de outras resultando em aumento do conteúdo de ácidos graxos “*trans*”, os quais têm sido apontados como mais nocivos à saúde que os ácidos graxos saturados, principalmente com respeito à elevação dos níveis de colesterol no sangue. Isso se deve ao fato de que a ingestão de gordura “*trans*” conduz não apenas ao aumento no teor de lipoproteína de baixa densidade (LDL – “*Low Density Lipoprotein*”, o denominado “colesterol ruim”), mas também à redução de lipoproteína de alta densidade (HDL – “*High Density Lipoprotein*”, o denominado “colesterol bom”), resultando em maior elevação da relação LDL/HDL em comparação à ingestão de ácidos graxos saturados, e, conseqüentemente, em efeito adverso à saúde mais acentuado (AUED-PIMENTEL et al., 2003). Em função dessas restrições, muitas pesquisas têm sido direcionadas à busca da substituição do processo de hidrogenação por vias de produção que não resultem na formação de isômeros “*trans*” e, neste caso, a interesterificação tem sido apresentada como uma boa alternativa (NUNES et al., 2010; RIBEIRO et al., 2007).

Aplicada a óleos e gorduras, a interesterificação refere-se à reação na qual há um rearranjo dos ácidos graxos dentro de um mesmo TAG e/ou entre diferentes TAGs. Ao contrário da hidrogenação, a interesterificação não modifica a composição em ácidos graxos dos materiais de partida (DE GREYT; HUYGHEBAERT; KELLENS, 1998; NUNES et al., 2010; RIBEIRO et al., 2007). A interesterificação pode, então, claramente ser distinguida da hidrogenação, em que o nível de insaturação dos ácidos graxos é reduzido, e do fracionamento, no qual os TAGs não modificados ou previamente modificados são separados em duas ou mais frações através da cristalização (RAMAMURTHI; MCCURDY, 1995).

A interesterificação tem sido utilizada como um eficiente método para melhorar as propriedades de textura de gorduras e de suas blendas com óleos vegetais não interesterificadas, pois a reestruturação dos ácidos graxos na cadeia do triacilglicerol conduz à formação de uma nova rede cristalina (GAMBOA; GIOIELLI, 2006).

Outro benefício do processo de interesterificação é a melhora do potencial nutricional das gorduras, que tem sido avaliado por alguns autores através de estudos da biodisponibilidade desses produtos em animais. Pferuffer et al. (1995) mostraram que, apesar dos produtos da interesterificação química e enzimática da gordura de leite pura terem sido menos hipercolesterolêmicos que a gordura de leite não interesterificada, a gordura modificada não apresentou efeitos distintos favoráveis nos níveis de lipídeos no plasma de “*mini pigs*” (suínos miniatura).

Em trabalho mais recente, Porsgaard et al. (2007) mostraram que a ingestão do produto da interesterificação da blenda de gordura de leite com óleo de colza enriquecida com pequena porção de óleo de peixe resultou em nível mais elevado de ômega-3 no plasma, no eritrócito (glóbulo vermelho do sangue), e no fígado de “*hamster*”, sugerindo que este processo é uma alternativa para melhorar os níveis destes ácidos graxos nos tecidos biológicos. Comparando estes dois trabalhos, é possível concluir que produtos de blendas de gordura de leite com óleos vegetais são mais importantes nutricionalmente que os produtos da interesterificação desta gordura pura.

A interesterificação pode ser conduzida a elevadas temperaturas (>300°C) sem nenhum catalisador, entretanto, desta forma a reação requer um tempo muito longo e o produto final não apresenta qualidade desejável devido à polimerização e à decomposição dos produtos (ROUSSEAU; MARANGONI, 2008).

Dois tipos de interesterificação são usuais: química e enzimática (RIBEIRO et al., 2007; RODRIGUES; GIOIELLI, 2003). Pela via química numerosos catalisadores têm sido empregados para aumentar a velocidade da reação e desempenhá-la a temperaturas mais reduzidas (80 – 100°C) que na ausência do catalisador. Os catalisadores mais utilizados são o alquilatos de sódio e hidróxido de sódio ou potássio (ROUSSEAU; MARANGONI, 2008). Em geral, esta via requer uma melhor preparação inicial das matérias-primas, pois gorduras ou óleos contendo água e ácidos graxos livres devem ser secos e neutralizados antes da reação para evitar a inativação do catalisador (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

A reação de interesterificação química ocorre em três etapas: ativação do catalisador, quebra das ligações ésteres e troca de ácidos graxos. As diferenças de energia entre as várias combinações de TAGs são pequenas, não conduzindo, portanto, à seletividade de ácidos graxos. Desta forma, a reação ocorre de forma aleatória e é entropicamente dirigida até que o equilíbrio termodinâmico seja alcançado (ROUSSEAU; MARANGONI, 2008).

Atualmente, sob a perspectiva de custo e aplicação em larga escala, a interesterificação química parece ser o método mais atrativo. Por outro lado, a reação não tem especificidade e oferece pouco ou nenhum controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final. Além disso, ao produzir a randomização dos TAGs, diversos produtos indesejáveis, como sabões, ésteres metílicos, monoacilgliceróis e diacilgliceróis são formados durante a reação, exigindo refinação posterior (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Embora os processos de hidrogenação e interesterificação química sejam comumente utilizados na indústria para transformação de diversos óleos e gorduras, e possam ser também aplicados à gordura de leite, existem inúmeros fatores que impedem estes de serem processos atrativos na modificação desta gordura (AUSTIN; VERSTEEG, 2006). As exigências dos consumidores e dos órgãos governamentais dos países desenvolvidos, por menor quantidade de aditivos alimentares e pela redução de tratamentos químicos dados aos produtos alimentícios, têm aumentado o potencial de aplicação de enzimas na indústria de alimentos (PORTE, 1999).

Alguns autores estudaram comparativamente o emprego da interesterificação química e enzimática da gordura de leite.

Kalo et al. (1986), por exemplo, investigaram o uso de catalisador químico em relação à atuação da lipase de *Candida cylindracea* imobilizada por adsorção em Celite na interesterificação da gordura de leite pura, em reações efetuadas em frascos agitados, com solvente (hexano) a 40°C. Os resultados mostraram que os produtos obtidos por catálise química e enzimática foram similares em composição, visto que a lipase empregada não apresentou especificidade sob as condições estudadas. Entretanto, a gordura interesterificada com biocatalisador apresentou-se mais macia devido à presença de mono e diacilgliceróis formados.

Pfeuffer et al. (1995) estudaram a aplicação da lipase de *Chromobacterium viscosum* em comparação ao uso de metóxido de sódio na interesterificação da gordura de leite. Esses autores observaram que o grau de randomização obtido para a catálise química, foi semelhante ao obtido na catálise enzimática, porém produtos indesejáveis foram formados durante a interesterificação química. Na via enzimática, a necessidade de refino foi reduzida o que resultou em pouca influência no aroma da gordura de leite.

Em outro trabalho, Brys et al. (2004) examinaram o emprego do catalisador metóxido de sódio, comparativamente ao uso da lipase de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym® 435), na interesterificação da gordura de leite com óleo de colza, sendo ambas as reações realizadas a 60°C. Foi verificado que as duas vias conduziram ao aumento do conteúdo de ácidos graxos livres e de frações polares (mono e diacilgliceróis), sendo que por via química foram obtidos teores mais elevados destes compostos.

2.2.3. Métodos Enzimáticos

O potencial de um processo catalisado por enzimas inclui condições reacionais mais brandas, menor número de reações paralelas, redução da perda de produto, e mínimo impacto sobre componentes do aroma da gordura de leite (DE GREYT; KELLENS, 2001; RØNNE et al., 2005). Além disso, sob a perspectiva de produzir lipídios com composições específicas para aplicações funcionais e medicinais, os métodos enzimáticos são mais interessantes. Neste caso, o uso de lipases como biocatalisadores para a modificação da estrutura dos TAGs vem aumentando (NUNES et al. 2011; PAULA et al., 2010a; PAULA et al., 2010b; SILVA; GIOIELLI, 2009).

Entre os processos de modificação enzimática da gordura de leite, pode-se citar a hidrólise e a interesterificação (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

A hidrólise consiste em uma reação na qual há quebra das ligações ésteres dos TAGs, em presença de água, resultando na formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácidos graxos livres (DE CASTRO et al., 2004). Alguns estudos têm investigado o uso de lipases de uma variedade de fontes para a hidrólise da gordura de leite, em geral com o objetivo de aumentar o conteúdo de ácidos graxos livres responsáveis pelo aroma característico de produtos derivados do leite (AUSTIN; VERSTEEG, 2006). Hidrolisados deste tipo de gordura têm sido extensivamente utilizados em cereais, molhos, aperitivos e assados em geral (um exemplo clássico é o uso em pipocas), resultando em produtos com melhor aroma e maior aceitabilidade pelos consumidores. A adição desses hidrolisados aos alimentos confere uma variedade de efeitos sensoriais e é dependente da quantidade empregada (DE CASTRO et al., 2004).

Com relação ao processo de interesterificação enzimática, este pode ser realizado com a gordura de leite pura ou com blendas de gordura de leite com óleos vegetais e/ou outras gorduras, ou mesmo com blendas de gordura de leite e ácidos graxos livres devido ao seu potencial para incorporação de ácidos graxos nutricionalmente desejáveis nos TAGs (AUSTIN; VERSTEEG, 2006).

2.3. Interesterificação enzimática da gordura de leite

A realização de reações de interesterificação enzimática da gordura de leite depende de alguns fatores (Figura 2.2), os quais interferem na velocidade de reação, no rendimento do processo e na obtenção dos produtos desejados. A preparação de lipase e a matéria-prima devem ser escolhidas adequadamente. O biocatalisador deve ser imobilizado para melhorar sua estabilidade e eficiência catalítica. As condições reacionais devem ser estabelecidas, incluindo a necessidade de adição de solvente orgânico ou não, a otimização da proporção mássica das matérias-primas, da temperatura, da quantidade de biocatalisador no meio reacional e a configuração do reator, entre outros fatores (NUNES et al., 2010).

Figura 2.2 – Principais parâmetros que interferem na interesterificação da gordura de leite pela rota enzimática (NUNES et al., 2010).

Visando identificar a influência desses parâmetros na eficiência da interesterificação enzimática da gordura de leite foi realizada uma pesquisa bibliográfica em diferentes bases de dados científicas (*ISI Web of Knowledge*, *Scopus*, *Scifinder Scholar*) utilizando como, palavras-chave: “*enzymatic interesterification*”, “*milkfat*”, “*butterfat*”, “*butteroil*” e lipase. Foram encontrados 41 trabalhos publicados no período entre 1986 a 2011, e estes são apresentados na Tabela 2.2, dispostos em ordem cronológica.

Continua Tabela 2.2 – Trabalhos publicados em periódicos no período de 1986 a 2011 sobre o tema interesterificação enzimática da gordura de leite.

Fonte de lipase	Suporte para imobilização	Matérias-primas	Solvente	Temperatura (°C)	Proporção mássica matérias-primas	Configuração do reator	Referência
<i>C. cylindraceae</i>	Celite	gordura de leite	hexano	60	-----	batelada	KALO et al., 1986
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme TM)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite	isooctano	60	-----	batelada	KALO et al., 1988
<i>Aspergillus niger</i>	Celite			35			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Celite	gordura de leite	isento isooctano isento	não informada 40, 50 e 60.	-----	batelada	KALO; HUOTARI; ANTILA, 1989a e b; 1990.
<i>C. cylindraceae</i>	Celite	gordura de leite e óleo de canola	SC- CO ₂	40	1:1	batelada	YU; RIZVI; ZOLLWEGF, 1992
<i>P. fluorescens</i>	Celite	gordura de leite	isento	50 e 60	-----	batelada	KALO; KEMPPINEN, 1993
<i>M. miehei</i> (Lipozyme)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite e óleo de girassol	isento	60	1:1	batelada	FOGLIA; PETRUSO; FEAIRHELLER, 1993
<i>M. miehei</i> (Lipozyme 10000L)	*	gordura de leite	hexano, clorofórmio, acetato etila	37	-----	batelada	SAFARI; KERMASHA; PABAI, 1993
<i>Rhizopus niveus</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Mucor javanicus</i> <i>M. miehei</i> (Lipozyme 10000L)	*	gordura de leite	hexano	37	-----	batelada	SAFARI; KERMASHA, 1994.
<i>Pseudomonas putida</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>R. oryzae</i>	*	gordura de leite	isento	não informada	-----	batelada	PABAI; KERMASHA; MORIN, 1995
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Celite	gordura de leite	isento	40	-----	batelada	PFEUFFER et al., 1995
<i>P. fluorescens</i>	vidro poroso	gordura de leite	hexano	42	-----	batelada	LEE; SWAISGOOD, 1997
<i>M. javanicus</i>	polipropileno	gordura de leite	isento	40	-----	fibra oca	BALCÃO et al., 1998

*biocatalisador não imobilizado

Continuação Tabela 2.2 – Trabalhos publicados em periódicos no período de 1986 a 2011 sobre o tema interesterificação enzimática da gordura de leite.

Fonte de lipase	Suporte para imobilização	Matérias-primas	Solvente	Temperatura (°C)	Proporção mássica matérias-primas	Configuração do reator	Referência
<i>Rhizopus arrhizus</i>	polipropileno	gordura de leite e óleo de canola	isento	40 – 60	100:0, 90:10, 80:20, 70:30 e 60:40	batelada	ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a e b, MARANGONI; ROUSSEAU, 1998
				50	80:20		ROUSSEAU; MARANGONI, 1999
<i>Pseudomonas</i> sp.	Celite	gordura de leite e estearina de palma	isento	60	80:20, 70:30 60:40, 50:50, 40:60	batelada	LAI et al., 2000a
<i>R. miehei</i> (Lipozyme IM60)	resina aniônica macroporosa						
<i>A. niger</i> , <i>R. miehei</i> , <i>R. javanicus</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Candida rugosa</i>	Celite	gordura de leite e estearina de palma	isento	60	60:40	batelada	LAI et al., 2000b
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite, estearina de palma “mole” e “dura”	isento	60 – 70	1:0:0, 3:1:0, 1:1:0, 1:3:0, 0:1:0, 0:3:1, 0:1:1, 0:1:3, 0:0:1, 1:0:3, 1:0:1, 3:0:1, 4:1:1, 1:4:1, 1:1:4 e 1:1:1	batelada	NOR HAYATI; AMINAH; MAMOT, 2000
<i>R. miehei</i> (células integras) <i>R. miehei</i> (Lipozyme IM60)	* resina aniônica macroporosa	gordura de leite e oleína de palma	isento	60	100:0, 70:30, 60:40 50:50 e 0:100	batelada	LIEW et al., 2001a

*biocatalisador não imobilizado

Continuação Tabela 2.2 – Trabalhos publicados em periódicos no período de 1986 a 2011 sobre o tema interesterificação enzimática da gordura de leite.

Fonte de lipase	Suporte para imobilização	Matérias-primas	Solvente	Temperatura (°C)	Proporção mássica matérias-primas	Configuração do reator	Referência
<i>R. miehei</i> (células íntegras)	*	gordura de leite e óleo de palma	isento	60	100:0 e 70:30	batelada	LIEW et al., 2001b
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	polímero macroporoso	gordura de leite e óleo de colza	isento	60	25 – 75%	batelada	BRYS et al., 2004
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sílica granulada	gordura de leite e óleo de colza	isento	60	70:30	batelada e contínuo de leito empacotado	RØNNE et al., 2005
<i>R. miehei</i> (Lipozyme RM- IM)	resina aniônica macroporosa						
<i>T. lanuginosus</i>	Accurel EP100						
<i>C.antarctica</i> (Novozym 435)	polímero macroporoso			batelada			
<i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS-C-I)	partículas de cerâmica						
<i>B. cepacia</i> (Lipase PS-D-I)	terra diatomácea						
<i>R. miehei</i> (Lipozyme RM- IM)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite e óleo de colza	isento	50 – 80	não informada	batelada	BRYS et al., 2005a e b
<i>C.antarctica</i> (Novozym 435)	polímero macroporoso	gordura de leite			-----		
<i>R. miehei</i> (Lipozyme RM- IM)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite e óleo de girassol	isento	70	1:1	batelada	WIRKOWSKA; BRYS; KOWALSKI, 2005a e b
<i>C. antarctica</i> (Novozym 435)	polímero macroporoso	gordura de leite e óleo de colza					
<i>C. antarctica</i> (Novozym 435)	polímero macroporoso	gordura de leite e óleo de girassol	isento	70 e 80	1:1, 1:3 e 3:1	batelada	BRYS et al., 2006 BRYS; WIRKOWSKA; KOWALSKI, 2006
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sílica granulada	gordura de leite e óleo de colza	isento	70	100:0 e 70:30	leito empacotado	ZHANG; MU; XU, 2006

*biocatalisador não imobilizado

Conclusão Tabela 2.2 – Trabalhos publicados em periódicos no período de 1986 a 2011 sobre o tema interesterificação enzimática da gordura de leite.

Fonte de lipase	Suporte para imobilização	Matérias-primas	Solvente	Temperatura (°C)	Proporção mássica matérias-primas	Configuração do reator	Referência
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de colza	Isento	60	7:3	leito empacotado	RØNNE; JACOBSEN; XU, 2006
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de colza	Isento	60	100:0 e 70:30	leito empacotado	PORSGAARD et al., 2007
	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de colza e de peixe	Isento		75 : 25,5 : 4,5		
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de colza	Isento	60	1:1	batelada	SVENSSON; ADLERCREUTZ, 2008
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de linhaça	Isento	70	100:0, 90:10, 80:20, 70:30 e 60:40	batelada	AGUEDO et al., 2008
		gordura de leite e óleo de linhaça e de colza			70:20:10		
<i>T. lanuginosa</i> (Lipozyme TL IM)	silica granulada	gordura de leite e óleo de colza	Isento	70	70: 30	batelada	AGUEDO et al., 2009
<i>T. lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	sfílica granulada	gordura de leite e óleo de linhaça	Isento	70	70: 30	batelada	GIET et al., 2009
		gordura de leite e óleo de linhaça e de colza			70:20:10		
<i>R. miehei</i> (Lipozyme RM- IM)	resina aniônica macroporosa	gordura de leite e estearina de palma e óleo de linhaça	Isento	60	8:6:6, 6:6:8, 6:6:9 e 4:6:10	leito empacotado	SHIN et al., 2009
<i>R. oryzae</i>	SiO ₂ -PVA	gordura de leite e óleo de soja	Isento	45	100:0, 80:20, 65:35 e 50:50	batelada	PAULA et al., 2010b
<i>A. niger</i>	SiO ₂ -PVA	gordura de leite e óleo de soja	Isento	45	100:0, 75:25, 67:33, 50:50; 33:67; 25:75 e 0:100	batelada	NUNES et al., 2011

Observou-se aumento no número de publicações nos últimos 25 anos (Figura 2.3), sendo que 56% do total de artigos encontrados foram publicados entre os anos de 2000 e 2011, o que demonstra a importância do estudo deste tema e como ele está inserido no contexto atual.

Figura 2.3 – Número de publicações envolvendo o tema interesterificação enzimática da gordura de leite entre os anos de 1986 e 2011.

A influência dos parâmetros mostrados na Figura 2.2 na reação de interesterificação enzimática da gordura de leite é discutida a seguir inserida no contexto dos principais trabalhos apresentados na Tabela 2.2.

2.3.1. Biocatalisador

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) e atuam na hidrólise de triacilgliceróis formando monoacilgliceróis, diacilglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol em meio aquoso ou na reação inversa em meio orgânico (AUGUSTIN; VERSTEEG, 2006). Estes biocatalisadores são comumente encontrados na natureza, podendo ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas (WEETE, 2008). As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente porque demandam pouco tempo para serem produzidas, apresentam altos rendimentos na conversão de substratos em produtos, têm grande versatilidade com relação às condições do meio reacional e são mais simples com relação à

manipulação genética e às condições de cultivo (RIBEIRO et al., 2011). Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em larga faixa de pH (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004) e apresentam a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (WEETE, 2008).

Com relação à especificidade, a literatura relata que esta propriedade é controlada pelas características estruturais do substrato (comprimento da cadeia dos ácidos graxos, insaturação e estereoquímica), fatores físico-químicos da interface, e/ou diferenças nos sítios de ligação da enzima (WEETE, 2008). As lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (não específicas ou 1,3-específicas) ou quanto à especificidade por ácidos graxos (RIBEIRO et al., 2011; REIS et al., 2009). Além disso, lipases podem apresentar especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um isômero óptico (QUEIROZ, 2002; WEETE, 2008).

A versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam selecionadas para aplicações potenciais em diversos setores, como: alimentício, de detergentes, farmacêutico, têxtil, cosmético, combustível e indústrias de papel entre outros (HASAN; SHAH; HAMEED; 2006).

Lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, tais como hidrólise, esterificação e transesterificação (alcoólise, acidólise e interesterificação) (PAQUES; MACEDO, 2006; REIS et al., 2009). A interesterificação em especial tem sido o método mais usado para obtenção de óleos e gorduras com funções desejáveis para a manufatura de produtos específicos (DE CASTRO et al., 2004).

As enzimas mais empregadas para catálise da interesterificação da gordura de leite foram as lipases de *Mucor miehei* (anteriormente *Rhizomucor miehei*), *R. oryzae* (anteriormente *R. javanicus*, *R. arrhizus*) e *T. lanuginosus* (Tabela 2.2).

Alguns autores avaliaram o uso de diferentes fontes de lipase comparativamente. Kalo et al. (1988) utilizaram as lipases de *M. miehei* e *A. niger*, obtendo resultados em composição de TAGs semelhantes para ambas as fontes de enzima, mesmo com temperaturas de trabalho diferentes e com distintas técnicas de imobilização, o que demonstrou que estas enzimas não apresentaram especificidade sob as condições reacionais estudadas.

Safari e Kermasha (1994) estudaram comparativamente o uso das lipases de *R. niveus*, *R. delemar*, *M. javanicus* e *M. miehei* (Lipozyme 10000L) na interesterificação da gordura de leite em sistema de microemulsão e os resultados obtidos mostraram que as lipases possuíam afinidade hidrolítica por ácidos graxos de baixa massa molecular C_{4:0}–C_{14:0}. A análise de estereoespecificidade dos produtos da interesterificação catalisadas pela lipase de *R. niveus* revelou aumento de 46% na porção de C_{18:1 cis},9, na posição *sn*-2, enquanto que para as reações catalisadas pelas demais lipases em estudo, houve elevação dos ácidos graxos C_{16:0} nesta mesma posição.

No trabalho desenvolvido por Lai et al. (2000b) sete diferentes fontes de lipases (*A. niger*, *R. miehei*, *R. javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Alcaligenes* sp. *Pseudomonas* sp. e *Candida rugosa*) foram empregadas na interesterificação de blendas de gordura de leite e estearina de palma, e apresentaram comportamentos distintos, sendo que o melhor desempenho foi observado para a lipase de *Pseudomonas* sp., que atingiu o mais elevado grau de interesterificação. Em outro trabalho estes mesmos autores (LAI et al., 2000a) avaliaram as propriedades físicas dos produtos obtidos na reação de interesterificação de blendas de gordura de leite e estearina de palma mediada pelas lipases de *Pseudomonas* sp. e *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM60), sendo observado que a lipase de *Pseudomonas* sp. também atuou de forma mais expressiva na modificação das propriedades físicas dos lipídeos interesterificados.

Rønne et al. (2005) estudaram o uso de seis lipases disponíveis comercialmente na interesterificação da blenda contendo 70% de gordura de leite e 30% de óleo de colza em reações conduzidas em batelada, e nestes experimentos selecionaram as lipases de *T. lanuginosus* (Lipozyme TL IM) e *R. miehei* (Lipozyme RM- IM) para desenvolvimento de estudos adicionais empregando reator contínuo de leite empacotado, nos quais a Lipozyme TL IM mostrou o melhor desempenho.

Lipases estão disponíveis comercialmente nas formas livre e imobilizada (AUSTIN; VERSTEEG, 2006), sendo que para aplicações industriais é recomendado seu uso na forma imobilizada, por apresentar vantagens tais como: maior estabilidade e redução do custo do produto final, devido à facilidade de recuperação do sistema imobilizado e posterior reutilização (NUNES; MARTY, 2006). Para o desenvolvimento de um sistema imobilizado com bom desempenho dois fatores devem ser considerados: o método e o suporte para imobilização (ZANIN; MORAES, 2004).

Os métodos de imobilização (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003; DE CASTRO et al., 2008; FABER, 1997; ZANIN; MORAES, 2004), tipos de suporte (ATIA et al., 2003; DE CASTRO et al., 2008) e aplicações desses sistemas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; DE CASTRO et al., 2008; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006) são amplamente descritos na literatura.

Com relação especificamente a interesterificação da gordura de leite, até o final da década de 90, a maior parte dos pesquisadores utilizava a técnica de adsorção para a imobilização das enzimas adquiridas sob a forma livre, e como suportes empregavam Celite e polipropileno. Nos trabalhos desenvolvidos a partir do ano 2000, observa-se o uso predominante de enzimas adquiridas comercialmente na forma imobilizada (Tabela 2.2).

Pode-se destacar o uso do SiO₂-PVA (sílica-álcool polivinílico) como matriz para imobilização da enzima por ser diferente dos suportes já empregados nas pesquisas desenvolvidas até o ano de 2010 envolvendo a interesterificação enzimática da gordura de leite. O SiO₂-PVA é um composto híbrido, não comercial, obtido pela técnica sol-gel, que combina atributos físico-químicos de materiais orgânicos e inorgânicos (SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2008b). Este suporte apresentou resultados promissores ao ser utilizado na imobilização de diferentes fontes de lipase e aplicados para uma gama de reações, tais como produção de monoacilgliceróis, biodiesel e lipídeos estruturados (FREITAS et al., 2009; PAULA et al., 2007; PAULA et al., 2010a).

2.3.2. *Matérias-primas: óleos vegetais*

As matérias-primas utilizadas para promover a interesterificação com a gordura de leite devem ser selecionadas considerando-se aspectos como disponibilidade, custo, composição, valor nutricional, qualidades físico-químicas e microbiológicas.

Nos trabalhos pioneiros desenvolvidos na década de 80 a interesterificação enzimática da gordura de leite era conduzida com esta gordura pura, sendo que apenas a partir dos anos 90 a interesterificação de sua blenda com óleos vegetais passou a ser realizada (Tabela 2.2). Os óleos mais utilizados foram os de colza/canola (16 trabalhos) e girassol (4 trabalhos).

Destaque pode ser dado aos trabalhos recentes, desenvolvidos por Aguedo et al. (2008), Giet et al. (2009) e Shin et al. (2009), empregando óleo de linhaça, um óleo importante com relação a aspectos nutricionais por apresentar alto conteúdo de ácidos graxos insaturados C 18 (ácidos linolênico – C 18:3, linoléico – C 18:2, e oléico – C 18:1).

Entretanto, o uso deste óleo em alimentos é limitado em alguns países devido à sua instabilidade. Como forma de minimizar este problema, Aguedo et al. (2008) utilizaram misturas ternárias de gordura de leite com óleos de linhaça e colza.

Das matérias-primas para compor blenda com a gordura de leite pode se destacar os óleos de canola e castanha-do-pará, ambos justificados principalmente pelo valor nutricional devido a expressiva quantidade de gorduras mono e poli-insaturadas (Figura 2.4). Evidência pode ser dada ao óleo de castanha-do-pará, que ainda não foi explorado em reações de interesterificação com a gordura de leite. A seguir estas matérias-primas são apresentadas relacionando-se as vantagens do seu uso e disponibilidade.

Figura 2.4 – Quantidade de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados presentes nas matérias-primas gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará (FIRESTONE, 2006).

2.3.2.1 . Óleo de Canola

A canola (*Brassica napus* e *Brassica rapa campestris*) foi obtida por pesquisadores do Canadá a partir do melhoramento genético de sementes de colza, que apresentava alta quantidade de ácido erúico no óleo e altos níveis de glucosinolatos no farelo que são compostos que inviabilizavam seu uso para fins alimentícios (PRZYBYSKI; MAG, 2002; GUPTA; PRATAP, 2007).

A ingestão de óleos contendo elevadas quantidades de ácido erúico tem mostrado causar lesões no músculo do coração seguido por outros problemas cardíacos, e a presença de glucosinolatos no farelo da canola reduz o seu valor nutritivo para ser utilizado como ração animal (O' BRIEN, 2004), tendo em vista que os produtos de sua hidrólise, tais como isocianatos e outros componentes que contém enxofre, interferem na absorção de iodo pela glândula tireóide, o que contribui para o desenvolvimento de doenças no fígado e reduz o crescimento e o ganho de massa em animais (PRZYBYSKI; MAG, 2002; GUPTA; PRATAP, 2007).

O nome CANOLA vem do inglês "*Canadian Oil Low Acid*" e corresponde ao óleo que contem menos de 2% de ácido erúico e no máximo 30 μ mol de glucosinolatos a cada grama de componente sólido da semente seca ao ar (BLACK; BEWLEY; HALMER, 2006; GUSNTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007). Variedades destas espécies passaram a ser denominadas também de canola "duplo zero" (GALDIOLI, 2002) ou em inglês "*double low*" ou "*double zero*", por conter quantidade reduzidas dos dois componentes (ácido erúico e glucosinolatos) (SHAHIDI, 1990; GUPTA; PRATAP, 2007).

A canola pode ser cultivada em climas de baixas temperaturas e razoável umidade, podendo, portanto, ser produzida em zonas de temperaturas onde a soja e o girassol não podem ser cultivados (SHAHIDI, 1990). É uma planta de ciclo anual, típica do inverno, com grande potencial para ser utilizada na alimentação humana e animal (MURAKAMI et al., 1995; GALDIOLI, 2002).

Dos grãos de canola, além de óleo (em torno de 38%) usado para consumo humano, se extrai o farelo, que possui de 34 a 38% de proteínas, sendo excelente suplemento protéico na formulação de rações para bovinos, suínos, ovinos e aves (TOMM, 2005; MOURAD, 2006).

A canola é a terceira oleaginosa em importância econômica no mundo (ANTUNES; BROCHADO, 2011) e seus principais produtores são China, Canadá, Índia, Alemanha e França (GALLO NETTO, 2007).

A cultura de canola representa uma opção atraente para os sistemas de cultivo que predominam no sul do Brasil, sendo mais uma alternativa de inverno. Além disso, é indicada para entrar em esquema de rotação de culturas, bem como para diversificação agrícola e cobertura vegetal do solo (MARCHIORI JR et al., 2002), constituindo lucrativa e vantajosa alternativa de cultivo de inverno no norte do Rio Grande do Sul (MOURAD, 2006).

No Brasil, as pesquisas e cultivo de colza/canola iniciaram em 1974 no Rio Grande do Sul (RS), nos anos 80 no Paraná (PR) e em Goiás (GO) no ano de 2003 (TOMM, 2005). O primeiro ano de cultivo comercial de canola em Goiás organizado e fomentado pela Caramuru Alimentos Ltda., sugeriu que essa cultura apresenta potencial também como nova alternativa de cultivo em determinadas áreas do cerrado do Brasil central (TOMM et al., 2004). Em 2006 iniciaram esforços buscando o aumento da área de cultivo de canola no estado do Mato Grosso do Sul nas safras seguintes (TOMM et al., 2007). Em 2010, no Brasil, a área cultivada cresceu 49,4%, sendo o Rio Grande do Sul seu o maior produtor, com 64,99% do total produzido (ANTUNES; BROCHADO, 2011).

A introdução de cultivos de canola no Brasil ocorreu visando-se à produção de óleo, que tem como principal característica apresentar teor mais baixo de ácidos graxos saturados que o óleo de soja (GALDIOLI et al., 2002).

Atualmente o Óleo de Canola é muito consumido no Canadá, onde ocupa 80% do mercado de óleos para salada, apresentando-se como um óleo de cor amarelada, com odor e sabor suaves característicos. Pode ser utilizado para várias finalidades: alimentícia, cosmética, farmacêutica, ração animal, veterinário, industrial, entre outras (CAMPESTRE, 2011a).

Para consumo humano é um dos óleos mais saudáveis, pois possui o menor teor de gordura saturada de todos os óleos vegetais, contendo vitamina E (antioxidante que reduz radicais livres) e gorduras monoinsaturadas (MOURAD, 2006). Estas, segundo Fagundes (2002), são as mais recomendadas por serem um importante componente das membranas celulares. Além disso, o óleo de canola possui a proporção de ômega-6:ômega-3 (2:1) indicada para uma Ingestão Adequada (IA) (FAGUNDES, 2002; GUSNTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007).

Para que se aumente a participação do óleo de Canola no mercado, é necessário incentivar a plantação e diminuir os custos de produção através de novas pesquisas que envolvam a sua utilização. Trabalhos envolvendo a interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de canola já foram desenvolvidos por pesquisadores do Canadá (ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a; 1998b; 1999; MARANGONI; ROUSSEAU, 1998); entretanto o uso da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA como biocatalisador, constitui nova alternativa de estudo.

2.3.2.2. Óleo de castanha-do-pará

A castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), também conhecida como castanha-do-Brasil (FERREIRA et al., 2006), castanha-da-amazônia (LOCATELLI et al., 2005; SOUZA, 2006) e internacionalmente conhecida como *Brazil Nut* (RYAN et al., 2006; STRUNZ et al., 2008) pertence à família das Lecitidáceas e foi descrita em 1808 por Humbolt e Bonpland. A castanheira-do-brasil é uma espécie arbórea de grande porte, podendo medir de 50 a 60 m de altura e é considerada uma espécie nativa da Amazônia (FERREIRA et al., 2006). Sua área de distribuição geográfica estende-se pelos estados brasileiros do Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso (ARAÚJO et al., 2008) e em países vizinhos como Venezuela, Bolívia, Peru, Colômbia e Guianas (FERREIRA et al., 2006).

A castanha-do-pará constitui o principal produto extrativo para exportação da Região Norte do Brasil, na categoria de produtos básicos (LOCATELLI et al., 2005) e é um dos produtos com grande potencial de exploração socioeconômica com mínimo impacto ambiental (SOUZA, 2006).

A população nacional desconhece o potencial nutricional e industrial da castanha-do-pará. Isto, somado ao seu elevado valor comercial, faz com que grande parte da produção seja destinada ao mercado internacional, que reconhece seu valor (SILVA; MARSAIOLI JUNIOR, 2004; TRUCON, 2010). Seus principais consumidores são Estados Unidos, Reino Unido, Alemanha e Itália (BENTES-GAMA et al., 2007; TRUCON, 2010).

A castanha-do-pará é um alimento muito apreciado pelo seu sabor e por apresentar qualidades nutricionais importantes. É constituída de 60 a 70% de lipídios e de 15 a 20% de proteína de boa qualidade biológica, além de fonte reconhecida de selênio, cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas do complexo B (FERREIRA et al., 2006), pró-vitamina A e vitamina E (BENTES-GAMA et al., 2007), o que confere a castanha a posição de alimento benéfico à saúde humana (SOUZA, 2006). Dentre os minerais, o elemento de maior destaque é o selênio (SILVA; MARSAIOLI JUNIOR, 2004; SOUZA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2009), pois a ingestão diária de doses adequadas pode evitar a propagação do câncer ou diminuir sua incidência, prevenindo cardiomiopatias e melhorando o sistema imunológico. Atua também no equilíbrio do hormônio ativo da tireóide, reduz a toxicidade de metais pesados e age como antioxidante, protegendo o organismo contra os problemas provocados pelos radicais livres (COUTINHO, 2003; SOUZA, 2006).

A maior parte da castanha-do-pará destina-se ao consumo *in natura*. Entretanto, a castanha-do-pará possui uma ampla cadeia de produtos e subprodutos (FREITAS et al.; 2007). É fonte de matéria-prima na produção de artesanatos (luminárias, cinzeiros, chocalhos), cosméticos (sabonetes, xampus, cremes hidratantes, baton) e fármacos (repelente, cicatrizantes) (SOUZA, 2006). É considerada também uma boa fonte nutricional no enriquecimento e produção de alimentos como forma alternativa para alimentação da população local, em função da disponibilidade regional (FERREIRA et al., 2006). Tem sido ainda recomendada como matéria-prima para extração de óleo, devido ao elevado conteúdo de lipídios (FREITAS et al., 2007).

O óleo da castanha-do-pará tem alto valor alimentício, apresentando em sua composição principalmente os ácidos graxos oléico (C 18:1) (monoinsaturado) e linoléico (C 18:2) (essencial) (BENTES-GAMA et al., 2007). É obtido por processo de prensagem a frio o qual resulta um óleo fino, de altíssima qualidade e elevado valor comercial. Apresenta-se como um óleo de cor amarelo claro, odor e sabor característicos (CAMPESTRE, 2011b). Tem sido utilizado como óleo fino de mesa e na formulação de cosméticos (FREITAS et al., 2007). Este óleo apresenta ainda propriedades emolientes, hidratantes e lubrificantes (CAMPESTRE, 2011b).

Devido ao agradável sabor e elevado valor nutritivo, a castanha pode ser incorporada à dieta da população brasileira. Para tanto, é necessário ampliar o seu aproveitamento industrial e promover maior divulgação de seu valor nutricional, bastante elevado quando comparado ao de frutas e outras nozes (FERBERG et al., 2002). Trabalhos de pesquisas envolvendo óleo da castanha-do-pará têm sido desenvolvidos. Solis, Gioielli e Polakiewicz (2001), por exemplo, estudaram a interesterificação química do óleo puro e misturado a outras gorduras hidrogenadas.

2.3.3. Condições reacionais

Reações catalisadas por lipase podem ser desempenhadas em meios na presença ou ausência de solventes (AUSTIN; VERSTEEG, 2006; LUBARY et al., 2009). No caso da interesterificação enzimática da gordura de leite, a maior parte dos estudos foi desenvolvida em meios isentos de solvente (Tabela 2.2). Embora estes sistemas sejam mais viscosos, eliminam a necessidade de etapas de separação na fase final do processo (LUBARY et al., 2009).

Quando presente, os solventes mais comumente utilizados são hexano e isooctano. O hexano também pode ser empregado em combinação com outros solventes, tais como clorofórmio e acetato de etila, como no trabalho desenvolvido por Safari, Kermasha e Pabai (1993), no qual esta mistura promoveu aumento do rendimento de interesterificação.

Em outro estudo realizado por Yu, Rizvi e Zollwegf (1992) foi utilizado o dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), solvente geralmente recomendado nos setores de alimentos e farmacêutico. Comparado aos solventes líquidos, SC-CO₂ não é tóxico, possui baixa viscosidade, altas taxas de difusão e transferência de massa, propriedades que são adequadas para reações enzimáticas (YU; RIZVI; ZOLLWEGF, 1992). É um solvente de baixo custo, não é inflamável e é lipofílico (HABULIN; PRIMOŽIČ; KNEZ, 2007). Apresenta temperatura crítica relativamente baixa (31,2°C), que permite que não haja degradação térmica de produtos termossensíveis (SALDAÑA; MAZZAFERA; MOHAMED, 1997). Além disso, devido à facilidade de separá-lo dos produtos reacionais (por despressurização), em comparação aos demais solventes (LUBARY et al., 2009), é considerado extremamente atrativo para o uso em processos ecologicamente mais aceitáveis. Entretanto, apresenta limitações podendo ocasionar redução da atividade catalítica da enzima, fato geralmente creditado à formação de ácido carbônico (HABULIN; PRIMOŽIČ; KNEZ, 2007).

Os estudos citados na Tabela 2.2 mostram também que a reação de interesterificação enzimática da gordura de leite pode ser conduzida em temperaturas que oscilam desde 35 até 80°C. Em geral, observa-se o uso de temperaturas mais baixas para reações em meios à solvente e de temperaturas mais elevadas para reações catalisadas por enzimas obtidas comercialmente na forma imobilizada.

Com relação à proporção das matérias-primas, verifica-se que grande parte dos trabalhos (Tabela 2.2) empregando blendas binárias de gordura de leite com óleos vegetais para a interesterificação é conduzida com maiores proporções de gordura de leite (de 50 a 100%), provavelmente para evitar a formação de produto com textura inadequada para “*spread*”. Blendas contendo proporções superiores a 50% de óleo, fornecem produtos fluidos à temperatura de refrigeração (cerca de 10°C) (NUNES et al., 2011).

As demais variáveis que interferem no processo de interesterificação enzimática da gordura de leite incluem quantidade de biocatalisador (PAULA et al., 2010c) e teor de água presente no meio reacional.

2.3.4. Configurações de reator

Os estudos realizados envolvendo as reações de interesterificação enzimática da gordura de leite foram conduzidos em sua maioria em reatores de tanque agitado operando em regime descontínuo (batelada). O tanque agitado é o tipo de reator mais utilizado em processos industriais (TEIXEIRA; FONSECA; VICENTE, 2007). Pode-se destacar o trabalho realizado por Balcão et al. (1998) no qual a reação foi conduzida em reator do tipo fibra oca. Observa-se nos trabalhos de pesquisa recentes o uso frequente de reatores de leite empacotado operando de forma contínua (RØNNE et al., 2005; RØNNE; JACOBSEN; XU, 2006; ZHANG; MU; XU, 2006; PORSGAARD et al., 2007; SHIN et al., 2009; PAULA et al., 2011).

Uma alternativa interessante ainda não explorada na interesterificação enzimática de gordura de leite envolve o uso de reações assistidas por irradiação de micro-ondas. Neste caso, podem ser empregados reatores adaptados especificamente para este fim, conforme discutido a seguir.

2.4. Reações enzimáticas assistidas por irradiação de micro-ondas

As micro-ondas são formadas por ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, correspondendo a comprimentos de onda da ordem de 1 cm a 1 m e encontram-se na região do espectro eletromagnético entre o infravermelho e as radiofrequências (DE SOUZA; MIRANDA, 2011).

O aquecimento por micro-ondas é também denominado de aquecimento dielétrico, sendo que existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor: rotação de dipolo e condução iônica (TEIXEIRA et al., 2010). Um importante atributo desse aquecimento é a absorção direta da energia pelo material a ser aquecido, ao contrário do que ocorre quando o aquecimento é realizado por convecção, no qual a energia é transferida lentamente do recipiente de reação para a solução (Figura 2.5). O aquecimento por micro-ondas é seletivo e dependerá, principalmente, da constante dielétrica e da frequência de relaxação do material (NEAS; COLLINS, 1998; SANVERINO, 2002; TEIXEIRA et al., 2010).

Figura 2.5 – Comparação entre o aquecimento convencional (a) e o aquecimento por irradiação de micro-ondas (b) (NEAS; COLLINS, 1998).

Reações enzimáticas assistidas por irradiação de micro-ondas constituem tema de relevante importância principalmente para aplicação em sistemas não aquosos, nos quais as enzimas apresentam elevada estabilidade térmica quando comparada à observada em sistemas aquosos. Trabalhos publicados sugerem a possibilidade dos campos magnéticos de alta frequência influenciarem não apenas a velocidade inicial das reações, mas também a enantiosseletividade das enzimas quando comparado com sistemas submetidos ao aquecimento convencional (ROY; GUPTA, 2003; YADAV; LATHI, 2006).

A Tabela 2.3 apresenta exemplos de estudos envolvendo reações enzimáticas com lipases assistidas por irradiação de micro-ondas.

Braddo et al. (2002) observaram que a velocidade da reação de hidrólise da trioleína com diferentes lipases em aquecimento dielétrico pode ser elevada de 7 a 11 vezes se comparado ao aquecimento por convecção. Esses mesmos autores estudaram também a atividade hidrolítica das lipases de *Bacillus stearothermophilus* e *Burkholderia cepacia* em diversos óleos vegetais e obtiveram aumento de 7 a 11 vezes e de 8 a 12 vezes, respectivamente, na atividade dessas enzimas quando o aquecimento foi realizado sob irradiação de micro-ondas.

O mecanismo pelo qual as micro-ondas interagem com sistemas enzimáticos ainda não está claramente definido, mas alguns autores acreditam que o efeito das micro-ondas

na velocidade da reação deve-se não apenas ao efeito térmico (FANG; HUANG; XIA, 2008; FANG; SUN; XIA, 2008).

Tabela 2.3 – Alguns trabalhos publicados envolvendo reações enzimáticas catalisadas por lipases assistidas por irradiação de micro-ondas.

Fonte de lipase	Substrato	Tipo de Reação	Referência
Pancreática <i>Mucor miehei</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Trioleína		
<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Óleos de Nim, Oliva, Milho, Girassol, Mostarda, Soja, Mamona, Amendoim, Shikakai, Linhaça, Amêndoa, Rosa, Amla, Babaçu, Jasmin	Hidrólise	BRADDO et al., 2002
<i>Aspergillus carneus</i>	Óleo vegetal	Transesterificação	SAXENA et al., 2005
	Trioleína	Hidrólise	
<i>C. antarctica</i>	Álcoois secundários	Transesterificação	BACHU et al., 2007
<i>C. antarctica</i>	(R,S)-2-octanol	Transesterificação	YU et al., 2007
<i>B. cepacia</i>	Etanol anidro e óleo de babaçu	Etanólise	DA RÓS; CASTRO; DE CASTRO, 2009a
<i>P. fluorescens</i>	Etanol anidro e óleo de palma	Etanólise	DA RÓS; CASTRO; DE CASTRO, 2009b
<i>P. fluorescens</i> <i>B. cepacia</i> <i>Penicillium camembertii</i> Pancreática	Xilitol protegido ácido oléico	Esterificação	RUFINO et al., 2010

As reações com aquecimento por micro-ondas podem ser conduzidas em fornos de micro-ondas modificados, em digestores de micro-ondas (tradicionalmente usados em Química Analítica) ou em reatores de micro-ondas. A maioria dos estudos tem sido realizada usando fornos de micro-ondas domésticos adaptados, por este possuir um baixo custo. Entretanto aparelhos mais seguros e com controles de pressão e temperatura mais precisos têm sido utilizados em sínteses em laboratórios. Outro fator importante, é que esses reatores operam de forma diferente do forno doméstico, no qual a distribuição de micro-ondas no interior do forno não é homogênea (multimodo). Nestes reatores, a distribuição é homogênea (monomodo) (SANVERINO, 2002) como ilustrado na Figura 2.6.

Figura 2.6 – Distribuição da irradiação das micro-ondas em reatores dos tipos (a) multimodo e (b) monomodo (HAYES, 2002).

2.5. Caracterização de lipídeos obtidos a partir da interesterificação enzimática da gordura de leite

Os métodos de análise mais utilizados para avaliação dos produtos resultantes da interesterificação enzimática da gordura de leite são cromatografia em fase líquida ou gasosa para quantificação dos monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, titulação para a determinação do conteúdo de ácidos graxos livres e peróxidos, ressonância magnética nuclear (RMN) para a quantificação do conteúdo de gordura sólida, e calorimetria exploratória diferencial (“*Differential Scanning Calorimetry*”, DSC) para análise do comportamento térmico, polimorfismo e também quantificação do conteúdo de gordura sólida dos produtos interesterificados.

Destaque pode ser dado ao estudo desenvolvido por Zhang, Mu e Xu (2006) no qual nova abordagem é dada ao monitoramento da reação aplicando-se a Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (“*Fourier transform near-infrared spectroscopy*”, FT-NIR). Os autores utilizaram a lipase de *Thermomyces lanuginosa* para catalisar a interesterificação da gordura de leite com óleo de colza em reator de leito empacotado. A reação foi monitorada por FT-NIR para obtenção do grau de conversão e do conteúdo de gordura sólida das blendas reacionais e produtos interesterificados. Foi observada boa correlação tanto entre os resultados obtidos por FT-NIR e o perfil de triacilgliceróis, quanto entre os resultados obtidos por FT-NIR e o conteúdo de gordura sólida a 5°C obtido por RMN.

Entre as características que devem ser consideradas na condução da interesterificação enzimática da gordura de leite estão as propriedades físicas, as quais são muito importantes na determinação da adequação desta gordura aos seus vários usos. Alguns autores têm avaliado a relação entre a percepção sensorial de textura (dureza e espalhabilidade) e com medidas instrumentais incluindo sensores de penetração, compressão uniaxial e tensão produzida (KRAUSE et al., 2008). Krause, Lopetchara, e Drake (2007) fizeram um mapeamento das características da manteiga para indicar quais são as preferidas do consumidor. Neste estudo os pesquisadores concluíram que a manteiga é a fonte de gordura mais desejável em termos de aroma e textura (KRAUSE et al., 2008).

A textura e o aroma de produtos como a manteiga são comumente avaliados por técnicas de análise sensorial. A avaliação sensorial é uma medida qualitativa baseada em informações recebidas pelos sentidos humanos (BOURNE, 2002). Esta medida é muitas vezes realizada em painéis de análise sensorial, nos quais pessoas são empregadas para fazer a avaliação das características do produto (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006). Métodos sensoriais, no entanto, apesar de serem muito importantes e largamente empregados, parecem perder a precisão desejável em pesquisa científica em função da variabilidade inerente à avaliação individual de cada pessoa envolvida. Assim, o emprego de equipamentos capazes de realizar medidas mais objetivas e que possam pelo menos complementar a análise tradicional na avaliação da qualidade de produtos alimentícios é desejável. Sendo assim, a seguir é apresentado um breve resumo sobre o método utilizado para avaliação da textura (seção 2.5.1) dos produtos resultantes da interesterificação da gordura de leite.

2.5.1. Textura

A textura da manteiga é um aspecto essencial para sua qualidade, sendo um dos quatro fatores que determinam sua aceitabilidade pelo consumidor. Esta propriedade influencia sua espalhabilidade, aparência, sabor, impressões sensoriais na boca e adequação aos vários usos (WRIGHT et al., 2001). Manteigas não devem ser viscosas, escamosas, ou quebradiças (SHERMAN, 1976).

Dentre as propriedades de textura para avaliar os produtos interesterificados encontra-se a consistência, cujo valor apresenta relação inversa com a espalhabilidade. A consistência é um aspecto funcional importante das gorduras plásticas, que são misturas de cristais de gordura sólida e óleo líquido. A relação entre as duas fases e o caráter cristalino

da fase sólida determina a consistência e a firmeza das amostras (SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998). Em termos de impressões sensoriais, consistência pode ser definida como o conjunto de todas as sensações resultantes da estimulação dos receptores mecânicos e táteis, especialmente na região da boca (BOURNER, 2002).

Muitos instrumentos são utilizados para medida da consistência de gorduras plásticas, destacando-se entre eles o penetrômetro (DEMAN, 1976). Este aparelho originalmente foi desenvolvido para medir a firmeza ou ponto de escoamento de materiais como petróleo gelatinoso e betume, mas por muitos anos vem sendo largamente utilizado para efetuar medidas destas mesmas propriedades em margarinas, manteigas e outras gorduras plásticas. Ele consiste de uma haste vertical unida a um cone que é submerso dentro de uma gordura sólida, sob a força da gravidade, por um tempo padrão, sendo medida a profundidade de penetração (BOURNER, 2002). Esta resposta depende das propriedades geométricas envolvidas na medida, bem como da massa e ângulo do cone, da altura inicial do sensor e da combinação das propriedades do material testado (VLIET, 1999).

Este é também uma espécie de teste de compressão (VLIET, 1999) e pode ser usado para medir a máxima força quando o sensor é submerso em uma amostra a velocidade constante e com profundidade de penetração especificada. Neste caso a máxima força pode ser obtida em curvas de força em função do tempo, como ilustrado na Figura 2.7.

Figura 2.7 – Curva de força em função do tempo obtida em testes de consistência de gorduras utilizando uma sonda acrílica correspondente a um cone com ponta não truncada e ângulo de 45°.

Rousseau e Marangoni (1998b) estudaram a interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de canola para avaliar o potencial da lipase de *R. arrhizus* como agente modificador da textura da manteiga. Os estudos concluíram que este processo é uma ferramenta viável para modificar a textura deste produto, resultando na redução da dureza e do caráter sólido da gordura de leite pela queda na quantidade de sólidos presentes e pequena mudança na estrutura da rede cristalina.

Em outro trabalho, estes mesmos pesquisadores (MARANGONI; ROUSSEAU, 1998) investigaram o efeito da interesterificação química e enzimática sobre as propriedades físicas da gordura de leite pura e de sua blenda com óleo de canola. Na rota enzimática foi utilizada a lipase de *R. arrhizus* imobilizada por adsorção em polipropileno. Estes autores verificaram que produtos da reação catalisada por lipase apresentaram redução nos pontos de amolecimento (“*softening points*”) em relação às amostras não interesterificadas, enquanto que produtos obtidos por via química apresentaram aumento desta propriedade. A análise de textura por cone de penetração revelou que produtos de ambas as vias apresentaram aumento na profundidade de penetração do cone em relação às amostras antes da reação, demonstrando, portanto o potencial do uso desta reação na melhora da espalhabilidade da gordura de leite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias-primas

A gordura de leite anidra foi obtida a partir de fusão completa de manteiga comercial (Aviação sem sal, adquirida no mercado local) a temperatura de 50-60°C em forno de micro-ondas para desfazer a emulsão, seguida de centrifugação e separação da fase aquosa. O óleo de canola comercial (Liza, adquirido no mercado local) e o óleo de castanha-do-pará adquirido da Inovam Brasil (Ji-Paraná/RO) foram utilizados sem nenhum tratamento adicional.

3.1.2. Enzima

Todos os experimentos foram efetuados com a lipase de grau alimentício de *Rhizopus oryzae* (L036P, Biocatalysts, Cardiff, England), adquirida em sua forma livre e posteriormente imobilizada em suporte não comercial sílica-PVA. Esta fonte de lipase foi previamente selecionada em trabalho anteriormente desenvolvido para catalisar reações de interesterificação (PAULA et al., 2010a).

3.1.3. Substrato para atividade hidrolítica

Azeite de oliva comercial (Carbonell, baixa acidez) foi utilizado para determinação da atividade hidrolítica.

3.2. Procedimento Experimental

3.2.1. 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.

3.2.2. *Obtenção da matriz de imobilização*

O suporte (polissiloxano-álcool polivinílico- SiO_2 -PVA) foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2007), pela mistura de 5 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60°C, sob agitação, com adição de 0,1 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 SiO_2 -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.

3.2.3. *Ativação do suporte com metaperiodato de sódio*

Foi adotada a metodologia descrita por Paula et al. (2010a), conforme segue: o suporte foi suspenso numa solução aquosa 0,5 M de metaperiodato de sódio, na proporção de 1 g de suporte: 10 mL NaIO_4 . 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.

3.2.4. *Neutralização do suporte com hidróxido de potássio*

Para imobilização da lipase por adsorção física, o suporte (polissiloxano-álcool polivinílico) foi previamente neutralizado, conforme segue: o suporte 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 sólido foi levado à estufa (60°C) por 24 h, para então ser utilizado no procedimento de imobilização.

3.2.5. *Imobilização da lipase*

O suporte, previamente ativado ou neutralizado, foi embebido em hexano (1 g:10 mL), sendo mantido sob agitação em temperatura ambiente durante 2h. Após este período, o sólido foi decantado e o excesso de hexano descartado. Ao suporte, misturou-se uma solução aquosa de PEG 1500 (5mg/ mL) e lipase na proporção de 250 mg de enzima: 1g suporte: 150 μL de solução de PEG. O sistema foi mantido em geladeira a 4°C, por 24h.

A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a 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 (Figura 3.1), com o objetivo de reduzir a umidade para valores próximos a 10%. A atividade hidrolítica e umidade de todos os derivados imobilizados foram determinadas utilizando as técnicas descritas nos itens 3.4.12 e 3.4.13.

Figura 3.1 – Foto do sistema de alto vácuo utilizado para redução da umidade dos derivados imobilizados.

*3.2.6. Interesterificação da gordura de leite com óleo de canola empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO_2 -PVA por adsorção física e ligação covalente: Seleção do método de imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em SiO_2 -PVA.*

As reações de interesterificação foram realizadas em regime de batelada, em reatores cilíndricos encamisados (Figura 3.2), carregados com 40 g de meio contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola. Os meios reacionais foram incubados com os derivados imobilizados na proporção fixa de 500 unidades de atividade por grama de meio (500 U/g de meio) (PAULA et al., 2010c). As reações foram conduzidas por 48 h, com agitação magnética (150 rpm), em atmosfera inerte (N_2), ao abrigo da luz, a 55°C. O progresso das reações foi acompanhado pela mudança do perfil em triacilgliceróis por cromatografia gasosa e da consistência dos produtos interesterificados, sendo retiradas amostras em 0h, 24h e 48h.

Figura 3.2 – Foto do reator empregado nas reações de interesterificação.

3.2.7. Planejamento estatístico: avaliação do efeito da temperatura e composição da mistura nas reações de interesterificação das blendas binárias de gordura de leite com óleo de canola e gordura de leite com óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase

Com objetivo de selecionar a melhor composição e temperatura do meio reacional para conduzir as reações de interesterificação de blendas binárias (gordura de leite e óleo de canola e gordura de leite e óleo de castanha-do-pará) foram realizados experimentos segundo planejamento composto central com face centrada (CCD), cujas variáveis codificadas e reais empregadas são apresentadas na Tabela 3.1. Estas reações foram conduzidas em regime de batelada, em reatores cilíndricos encamisados, carregados com 40 g de meio e lipase imobilizada na proporção de 500 U/g de meio, com agitação magnética (150 rpm), em atmosfera inerte (N_2), ao abrigo da luz, por 48 h.

As temperaturas de reação variaram de 45°C (temperatura mínima necessária para manter o substrato fluido) a 65°C. As proporções de gordura de leite nas blendas binárias (50, 65 e 80%) utilizadas têm por base trabalhos anteriores desenvolvidos (NUNES et al., 2011; PAULA et al., 2010b; PAULA et al., 2009).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas STATISTICA (versão 5.0) e Design – Expert (versão 6.0.6 – Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA), considerando como variáveis resposta o grau de interesterificação (GI) e a consistência dos produtos.

Tabela 3.1 – Níveis reais e codificados das variáveis temperatura e teor de gordura de leite nos meios reacionais empregados nos experimentos conduzidos segundo planejamento composto central com face centrada.

Variáveis independentes	Níveis codificados		
	-1	0	+1
X ₁ : Teor de gordura de leite (%)	50	65	80
X ₂ : Temperatura, °C	45	55	65

Para a confirmação dos modelos obtidos foram realizadas reações de interesterificação da mistura binária nas condições reacionais dentro da faixa indicada pelos modelos para obtenção de um produto com adequada consistência. Estas reações foram conduzidas em regime de batelada, em reatores cilíndricos encamisados, carregados com 40 g de meio e derivado imobilizado na proporção de 500 U/g de meio, com agitação magnética (150 rpm), em atmosfera inerte (N₂), ao abrigo da luz, por 48 h. Neste caso, foi avaliada a cinética do processo em termos de acidez, índice de peróxido, composição em TAGs, grau de interesterificação, consistência (10°C), perfil térmico e conteúdo de gordura sólida dos produtos obtidos a cada 6 h de reação.

3.2.8. Planejamento estatístico: avaliação do efeito da composição da mistura nas reações de interesterificação das blendas ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará catalisada por lipase

Com objetivo de selecionar a melhor composição do meio reacional que fornecesse as características positivas de cada componente foram realizadas reações de interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará segundo planejamento de misturas Simplex Lattice. Foram efetuados 17 experimentos e a fração mássica dos componentes utilizada na preparação de cada mistura pode ser observada na Tabela 3.2, na qual a gordura de leite é representada por X₁, o óleo de canola é representado por X₂ e o óleo de castanha-do-pará é representado por X₃, sendo que $X_1 + X_2 + X_3 = 100$. Estas reações foram conduzidas em regime de batelada, em reatores cilíndricos encamisados, carregados com 40 g de meio e o derivado imobilizado na proporção de 500 U/g de meio, com agitação magnética (150 rpm), em atmosfera inerte (N₂), ao abrigo da luz, à temperatura de 45°C, por 24 h.

Tabela 3.2 – Planejamento estatístico de misturas com três componentes.

Misturas	Teor dos componentes (%)		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	50	50	0
2	67	0	33
3	100	0	0
4	58	8	33
5	83	8	8
6	100	0	0
7	83	0	17
8	58	33	8
9	50	33	17
10	67	17	17
11	50	0	50
12	50	17	33
13	67	0	33
14	50	50	0
15	67	33	0
16	50	0	50
17	83	17	0

X₁ = gordura de leite; X₂ = óleo de canola; X₃ = óleo de castanha-do-pará.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Design – Expert (versão 6.0.6 – Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA), considerando como variáveis resposta o grau de interesterificação e a consistência dos produtos obtidos em 24h de processo. Os resultados obtidos foram aplicados a modelos de regressão múltipla e os coeficientes destes modelos gerados pelo programa estatístico, que apresentou também seus níveis de significância e análise de variância.

Para a confirmação dos modelos obtidos foram efetuadas reações de interesterificação da mistura ternária gordura de leite - óleo de canola - óleo de castanha-do-pará dentro da faixa de condições indicada pelo modelo para obtenção de um produto com adequada consistência. Estas reações foram conduzidas em regime de batelada, em reatores cilíndricos encamisados, carregados com 40 g de meio e o derivado imobilizado na proporção de 500 U/g de meio, com agitação magnética (150 rpm), em atmosfera inerte (N₂), ao abrigo da luz, por 24 h. O progresso das reações foi acompanhado pela acidez, índice de peróxido, composição em TAGs, grau de interesterificação, consistência (10°C), perfil térmico e conteúdo de gordura sólida dos produtos obtidos a cada 3 h de reação.

3.2.9. Reações de interesterificação das misturas binárias de gordura de leite com óleo de canola e gordura de leite com óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase assistidas por irradiação de micro-ondas

As reações foram realizadas no reator de micro-ondas Discover (modelo CEM-SP1245, CEM Corporation, USA) de configuração monomodo (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Reator de micro-ondas Discover (modelo CEM-SP1245, CEM Corporation, USA) de configuração monomodo utilizado nas reações de interesterificação.

Um balão de fundo chato de vidro (100 mL), contendo 40 g da blenda gordura de leite-óleo de canola ou gordura de leite-óleo de castanha-do-pará foi inserido na câmara de micro-ondas do reator (Figura 3.3), sendo irradiada uma potência máxima suficiente para manter a temperatura adequada do meio reacional constante durante todo o experimento. Ao balão foi acoplada uma longa conectada a um cilindro de nitrogênio para manter o meio reacional sob atmosfera inerte. As misturas foram incubadas com lipase imobilizada na proporção de 500 U/g de meio. As condições de temperatura e composição do meio reacional foram as mesmas utilizadas para a confirmação dos modelos obtidos nos planejamentos de experimentos. A reação foi conduzida por um período máximo de 12 h, com agitação magnética no nível baixo. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h.

3.3. Métodos de Análise

3.3.1. Teor de umidade e compostos voláteis presentes nas matérias-primas

A determinação do teor de umidade da gordura de leite e dos óleos vegetais foi efetuada por Karl Fisher segundo método oficial Ca 2e-84 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.3.2. Índice de acidez

O índice de acidez e o teor de ácidos graxos livres foram determinados de acordo com método Ca 5a-40 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.3.3. Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado de acordo com método Cd 3-25 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.3.4. Índice de iodo

O índice de iodo foi determinado de acordo com método Cd 1b-85 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.3.5. Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o método Cd 8b-90 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

3.3.6. 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 µm 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.

3.3.7. Composição em triacilgliceróis (TAGs)

3.3.7.1. Composição em triacilgliceróis quanto ao grau de saturação

A composição em triacilgliceróis quanto ao seu grau de saturação para a gordura de leite foi calculada com base na composição em ácidos graxos experimentais e na distribuição estereoespecífica dos ácidos graxos nos triacilgliceróis obtida na literatura, Tabela 2.1 da revisão bibliográfica (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007). Para os óleos de canola e castanha-do-pará, a composição em triacilgliceróis quanto ao seu grau de saturação foi calculada a partir da composição em triacilgliceróis individuais fornecida pelo programa computacional 1,2,3 óleos (APÊNDICE A) e fazendo-se as considerações de que a hidroxila C-2 do glicerol é preferencialmente acilada por ácidos graxos insaturados e que as hidroxilas C-1 e C-3 das extremidades do glicerol são subsequentemente aciladas pelos ácidos graxos remanescentes e por ácidos graxos insaturados não requeridos na posição C-2 do glicerol (ANTONIOSI FILHO, 1995). A partir destes dados, fez-se a média ponderada para se obter a composição das blendas não interesterificadas. Para os produtos da interesterificação esta composição foi calculada mantendo-se a composição em ácidos graxos da posição *sn*-2 dos TAGs, considerando-se o uso da lipase *sn*-1,3 específica, e redistribuindo-se os ácidos restantes nas posições *sn*-1,3 dos TAGs. A partir dos resultados obtidos, em todos os casos foram calculadas as porcentagens de triacilgliceróis trissaturados (SSS), dissaturados-monoinsaturados (S₂I), monossaturados-di-insaturados (I₂S) e tri-insaturados (III).

3.3.7.2. Composição em triacilgliceróis 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; MOLKENTIN, 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.

3.3.8. Grau de Interesterificação

O grau de interesterificação (GI) foi calculado de acordo com a Equação 3.1 (NUNES et al., 2011).

$$GI(\%) = \frac{\sum (TAG_{A_t} - TAG_{A_0})}{\sum TAG_{D_0}} \quad (3.1)$$

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

3.3.9. Consistência

A consistência das amostras foi determinada utilizando-se texturômetro QTS-25 (Brookfield), controlado pelo programa Texture Pro. As amostras foram aquecidas em forno micro-ondas (50 – 60°C) para fusão completa dos cristais, e condicionadas em formas cúbicas de silicone com aresta de 25 mm. O condicionamento foi efetuado por 48 h em estufa com temperatura controlada, a 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 3.4).

Os testes foram conduzidos nas seguintes condições: retorno ao início, distância: 10 mm, velocidade: 120 mm/min, tempo: 5s, determinação da força em compressão (gf), duplicata.

Figura 3.4 – Sonda TA15, correspondente a um cone acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45° utilizado para a análise de consistência das amostras.

As amostras foram analisadas quanto ao “*yield value*” que foi calculado através da Equação 3.3, proposta por Haighton (1959):

$$C = K \cdot \frac{W}{p^{1.6}} \quad (3.2)$$

Em que: C = “*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 (0,1 mm).

3.3.10. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As análises térmicas das amostras foram realizadas em calorímetro exploratório diferencial (TA Instruments, Modelo Q10/ SII Nanotechnology - Seiko, Modelo 6220) 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, 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. O sistema de manuseio de dados utilizado foi o Software Universal Analysis

2000 (Versão 4.5A) para os dados obtidos no calorímetro da *TA Instruments* e Excel e Origin para os dados obtidos no calorímetro *SII Nanotechnology – Seiko*.

3.3.11. Conteúdo de gordura sólida

O conteúdo de gordura sólida foi calculado para cada temperatura, de acordo com a Equação 3.4, 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).

$$CGS(T) = \frac{\int_{T_0}^{T_f} Cp(T)dT - \int_{T_0}^T Cp(T)dT}{\int_{T_0}^{T_f} Cp(T)dT} \quad (3.3)$$

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; Cp é o calor específico.

3.3.12. Teor de umidade do derivado imobilizado

O teor de água presente nos derivados imobilizados foi medido diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (MARTE ID 50).

3.3.13. Atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite : água) e 4 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, a 37°C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática (0,5 mg/mL, preparada em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) ou 0,1 g do derivado imobilizado, mantendo-se o sistema reacional sob agitação, a 37°C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) e 10 mL de uma solução de hidróxido de potássio, KOH, (0,05 M). O excesso de KOH foi titulado com HCl 0,05 M utilizando-se um titulador automático, até pH 10. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 3.4:

$$A(U/g) = \frac{(V_b - V_a) \times C_{HCl} \times 10^6}{t \times m} \quad (3.4)$$

Em que: V_b = volume de HCl utilizado para titular o branco (L); V_a = volume de HCl utilizado para titular a amostra (L); C_{HCl} = concentração da solução de HCl (M); t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

3.3.14. *Rendimento de imobilização*

O rendimento de imobilização da lipase no suporte foi calculado usando a Equação 3.5:

$$\eta(\%) = \frac{U \times 100}{U_0} \quad (3.5)$$

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas utilizadas no processo de interesterificação foram inicialmente caracterizadas com relação as suas propriedades físico-químicas, de composição em ácidos graxos e de textura. Os resultados obtidos quanto aos índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido são apresentados na Tabela 4.1 e discutidos na sequência.

Tabela 4.1 – Índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das matérias-primas comparadas aos valores estabelecidos pela legislação brasileira.

Índices	gordura de leite		óleo de canola		óleo de castanha-do-pará	
	Observado	Legislação (BRASIL, 1996)	Observado	Legislação (BRASIL, 2006)	Observado	Legislação (BRASIL, 2005)
Acidez	2,41*	máx. 3*	0,13**	≤ 0,20**	4,0**	4,0**
Saponificação (mg KOH/g)	223	218 – 325	185	182 – 193	187	-----
Iodo (g I₂/ 100g)	31	28 – 38	111	105 – 126	105	-----
Peróxido (meq/ 1000g)	0,48	máx. 1	0,56	≤ 2,5	4,57	15

* mmol/100g; **mg KOH/g.

4.1.1. Índice de acidez

A acidez livre de uma gordura é proveniente da hidrólise parcial dos glicerídeos, sendo sua medida muito importante, pois revela o estado de conservação de um óleo ou gordura, estando relacionado com a qualidade da matéria-prima, o processamento e, principalmente, com as condições de conservação do produto (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). A formação dos ácidos graxos livres pode ser acelerada por luz e calor, sendo estes ácidos responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis, especialmente em gorduras como a manteiga, que possui grande quantidade de ácidos graxos de baixa massa molecular (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2006).

O índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de óleo ou gordura. Pode ser expresso também em porcentagem (em massa) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, geralmente o ácido oléico ou outro

ácido graxo predominante na amostra (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2006), ou ainda em milimol de ácidos graxos livres por 100g de matéria graxa (BRASIL, 1996).

Para gordura de leite analisada o valor de acidez apresentado na Tabela 4.1 (2,41 mmol/100g) está dentro do previsto pela legislação, que estabelece um valor máximo de 3 mmol/100g (BRASIL, 1996).

Os óleos de canola e castanha-do-pará apresentaram índices de acidez de 0,13 e 4 mgKOH/g, respectivamente, sendo estes resultados correspondentes a valores dentro dos estipulados pelas legislações brasileiras (BRASIL, 2006; BRASIL, 2005).

4.1.2. Índice de saponificação

A saponificação consiste de uma reação entre uma solução alcalina e um óleo ou gordura, da qual resultam sabões (sais alcalinos de ácidos graxos) e glicerol (REGITANO-D'ARCE, 2006) de acordo com a reação representada pela Equação 4.1.

O índice de saponificação é definido como a quantidade de álcali necessária para saponificar uma quantidade definida de amostra, sendo expressa como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar 1 grama de amostra (AOCS, 2004). De acordo com Cecchi (2003) este índice é uma indicação da quantidade relativa de ácidos graxos de alta e baixa massa molecular. Os ácidos graxos de baixa massa molecular requerem mais álcalis para a saponificação, portanto, o índice de saponificação é inversamente proporcional a massa molecular dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis. Essa determinação é útil para verificação da massa molecular média de uma gordura e da adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes.

A gordura de leite apresentou índice de saponificação de 223 mg KOH/g, resultado este compreendido na faixa de valores estabelecida pela legislação brasileira

(218 – 325 mg KOH/g) (BRASIL, 1996) e nas faixas indicadas por Firestone (2006) (210 – 232 mg KOH/g) e por Cecchi (2003) (225mg KOH/g).

O índice de saponificação do óleo de canola foi 185 mg KOH/g, sendo que este valor está compreendido na faixa indicada para óleos vegetais 182 – 193 mg KOH/g pela legislação brasileira (BRASIL, 2006).

Para o óleo de castanha-do-pará o índice de saponificação foi 187 mg KOH/g estando este resultado próximo ao valor mínimo descrito por Firestone (2006) e por Campestre (2011b) (192 – 202 mg KOH/g), e se aproximando também do resultado obtido por Araujo et al. (2008) (185 mg KOH/g).

Os óleos apresentaram, conforme esperado, menores índices de saponificação que a gordura de leite, visto que esta apresenta em sua composição maior quantidade de ácidos graxos de baixa massa molecular que os óleos em estudo.

4.1.3. Índice de iodo

A medida da insaturação é uma determinação importante para a classificação dos óleos e gorduras e controle do processo, sendo normalmente quantificada pelo índice de iodo (CECCHI, 2003). Este índice é definido como a quantidade em gramas de iodo que reage com 100g de gordura ou óleo (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008) e tem como base o fato de que o iodo ou outros halogênios podem ser quantitativamente introduzidos nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados dos triacilgliceróis (conforme reação representada pela Equação 4.2) (TURATTI; GOMES; ATHIÉ, 2002). Quanto mais insaturado for um ácido graxo, maior será a sua capacidade de reagir com iodo e, conseqüentemente, maior também será o índice de iodo (CECCHI, 2003).

Para a gordura de leite analisada, o índice de iodo determinado foi 32g I₂/ 100g, estando de acordo com a faixa estabelecida pela legislação brasileira que varia entre 28 e 38g I₂/ 100g (BRASIL, 1996), com Firestone (2006) que apresenta valores entre 26 e 40g I₂/ 100g (para a gordura de leite) e com Cecchi (2003) que apresenta uma faixa de 25 – 42 gI₂/ 100g (para manteiga).

Os óleos de canola e castanha-do-pará apresentaram índices de iodo de 111 e 105 I₂/ 100g, respectivamente, sendo estes valores satisfatórios, pois correspondem à valores abaixo do máximo estipulado pela legislação brasileira para o óleo de canola (BRASIL, 2006) e dentro da faixa apresentada por Firestone (2006) e por Campestre (2011b) (97 e 106 g I₂/ 100g) no caso do óleo de castanha-do-pará.

Os índices de iodo dos óleos foram mais elevados que o valor encontrado para a gordura de leite, visto que esta apresenta em sua composição uma quantidade menor de ácidos graxos insaturados.

4.1.4. Índice de peróxido

Uma importante consideração a ser feita em relação a óleos e gorduras é a estabilidade oxidativa, sendo que seu grau de importância está diretamente relacionado à temperatura de uso e ao tempo de estocagem do produto final (MOUSTAFA; STAUFEEER, 1997). Um dos métodos mais utilizados para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras é o índice de peróxido, pois os peróxidos são os primeiro compostos formados quando uma gordura se deteriora e, sendo assim, toda gordura oxidada dá resultados positivo neste teste (CECCHI, 2003). O método para avaliação do índice de peróxido determina todas as substâncias em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio (KI) sob as condições de teste (conforme reação representada pela Equação 4.3). Estas substâncias são geralmente assumidas como peróxidos ou outros produtos similares provenientes da oxidação de óleos e gorduras (AOCS, 2004).

Para a gordura de leite analisada o índice de peróxido foi 0,48 meq/ 1000g, sendo este valor inferior ao mínimo estabelecido para a legislação brasileira (1 meq/ 1000g).

O óleo de canola apresentou índice de peróxido de 0,56 meq/1000g, sendo este valor aproximadamente cinco vezes menor que o valor máximo (2,5 meq/1000g) estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2006).

Para o óleo de castanha-do-pará este índice (4,57 meq/1000g) apresentou-se abaixo do máximo estabelecido pela legislação brasileira (15 meq/1000g).

Estudos têm sugerido que uma boa qualidade da matéria-prima, em termos de baixos valores de índice de peróxido e outros componentes prejudiciais, é necessária para que a lipase se mantenha mais estável. Por esta razão recomenda-se que os óleos a serem empregados no processo de interesterificação enzimática sejam refinados e desodorizados (IBRAHIM et al., 2008). Os resultados mostrados na Tabela 4.1 revelaram que as matérias-primas em estudo apresentaram valores de índices de acidez e peróxido dentro do estabelecido pelas legislações brasileiras, o que indicou que possuíam qualidade para serem empregadas na reação proposta.

4.1.5. Composição em ácidos graxos

Na Tabela 4.2 é apresentada a composição em ácidos graxos da gordura de leite e dos óleos de canola e castanha-do-pará.

Para a gordura de leite, foram identificados 24 diferentes ácidos graxos com concentrações superiores a 0,15%, sendo que aproximadamente 4% dos ácidos graxos não foram identificados. Esta gordura apresentou uma grande variedade de ácidos graxos, sendo estes de curta, média e longa cadeia, e a maior parte saturados (66,03%). Os ácidos graxos presentes em quantidades mais expressivas foram o palmítico (30,73%), oléico (25,44%), esteárico (12,62%) e mirístico (10,42%). Esta composição está de acordo com resultados apresentados por Gunstone, Harwood e Dijkstr (2007) e Rodrigues e Gioielli (2003), para os quais as porcentagens desses ácidos graxos estavam na faixa de 28,2–29,3%, 21,3–21,4%, 11,8–12,6% e 10,6%, respectivamente. Na gordura de leite foi também observada a presença do ácido butírico, ácido graxo característico desta gordura (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007; PARODI, 2006; RODRIGUES; GIOIELLI, 2003).

Tabela 4.2 – Composição em ácidos graxos da gordura de leite, óleo de canola e castanha-do-pará.

Ácidos Graxos		gordura de leite			óleo de canola		óleo de castanha-do-pará	
		obtida	normalizada					
		%m/m	%m/m	%molar	%m/m	%molar	%m/m	%molar
butírico	C 4:0	1,18	1,23	3,45	-----	-----	-----	-----
capróico	C 6:0	1,36	1,42	3,02	-----	-----	-----	-----
caprílico	C 8:0	0,97	1,01	1,73	-----	-----	-----	-----
cáprico	C 10:0	2,21	2,31	3,31	-----	-----	-----	-----
láurico	C 12:0	2,71	2,83	3,49	0,03	0,04	0,07	0,10
mirístico	C 14:0	9,99	10,42	11,28	0,08	0,10	0,07	0,09
pentadecanóico	C 15:0	1,11	1,16	1,20	0,03	0,04	-----	-----
palmitico	C 16:0	29,45	30,73	29,61	4,77	5,23	13,75	14,90
palmitoléico	C 16:1	1,91	1,99	1,94	0,25	0,28	0,32	0,35
margárico	C 17:0	0,48	0,50	0,46	0,06	0,06	0,08	0,08
cis-10-heptadecenóico	C 17:1	0,75	0,78	0,73	0,06	0,06	0,04	0,04
esteárico	C 18:0	12,09	12,62	10,96	2,64	2,61	10,21	9,97
trans eláidico	C 18:1	3,05	3,18	2,78	-----	-----	-----	-----
oléico	C 18:1	24,38	25,44	22,25	59,96	59,67	29,38	28,89
trans t-linoléico	C 18:2	0,17	0,18	0,16	-----	-----	-----	-----
linoléico	C 18:2	2,03	2,12	1,87	21,37	21,42	45,54	45,10
trans t-linolênico	C 18:3	0,16	0,17	0,15	0,40	0,40	-----	-----
linolênico	C 18:3	0,30	0,31	0,28	7,76	7,83	0,09	0,09
octadecatetraenóico	C 18:4	0,90	0,94	0,84	-----	-----	-----	-----
araquídico	C 20:0	0,19	0,20	0,16	0,70	0,63	0,28	0,25
eicosenóico	C 20:1	0,16	0,17	0,13	1,02	0,92	0,07	0,06
behênico	C 22:0	0,12	0,13	0,09	0,41	0,34	0,07	0,06
erúcico	C 22:1	-----	-----	-----	0,10	0,08	-----	-----
lignocérico	C 24:0	0,08	0,08	0,06	0,21	0,16	0,03	0,02
nervônico	C 24:1	0,08	1,23	0,06	0,15	0,12	-----	-----
não identificados	-----	4,17	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Total identificado		95,83	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Saturados		66,03	64,55	68,82	8,93	9,21	24,56	25,46
Insaturados		33,81	35,28	31,18	91,07	90,79	75,44	74,54

No óleo de canola foram identificados 18 ácidos graxos com composições superiores a 0,05%. Observa-se predominantemente a presença de ácidos graxos insaturados (91%) sendo os mais abundantes os ácidos oléico (59,96%), linoléico (21,37%) e linolênico (7,76%), e baixo conteúdo de ácidos graxos saturados (8,93%), sendo os mais elevados o palmítico (4,77%) e o esteárico (2,64%). Esta composição se assemelha à apresentada por Gunstone, Harwood e Dijkstr, (2007) e à obtida por Ribeiro et. al. (2009a) para este óleo, nos quais as quantidades dos ácidos oléico, linoléico e linolênico estão na faixa de 61,60–61,97%, 20,72–21,40% e 6,54–9,60%, respectivamente. Do ponto de vista nutricional, a baixa quantidade de ácidos graxos saturados (<9%) e a expressiva quantidade de ácidos graxos monoinsaturados (>60%) presentes no óleo de canola, o tornam apropriado para diferentes aplicações industriais, incluindo processos de interesterificação (RIBEIRO et. al., 2009a; O'BRIEN, 2004).

Para o óleo de castanha-do-pará foram identificados 14 ácidos graxos com composições maiores que 0,03%. Apesar de conter em maior quantidade ácidos graxos insaturados (75,44%), diferentemente do óleo de canola, o óleo de castanha-do-pará contém quantidade expressiva de ácidos graxos saturados (24,56%). Os ácidos graxos mais abundantes são o linoléico (45,54%), oléico (29,38%), palmítico (13,75%) e esteárico (10,21%). A composição experimental determinada para este óleo foi semelhante à obtida por Solis, Gioielli e Polakiewicz (2001) para o qual as concentrações dos ácidos graxos linoléico, oléico, palmítico e esteárico foram 37,8%, 34,5%, 15,20 e 11,6%, respectivamente.

4.1.6. Composição em triacilgliceróis

A Tabela 4.3 mostra a composição em triacilgliceróis (TAGs) individuais e quanto ao número de carbono dos óleos de canola e castanha-do-pará, obtida utilizando o programa computacional 1,2,3 óleos e as considerações feitas por Antoniosi Filho (1995).

Foram encontradas 20 diferentes espécies de TAGs para o óleo de canola, sendo os mais abundantes o OLO (Oleico-Linoleico-Oleico, 24,95%), OOO (Oleico-Oleico-Oleico 24,42%), OLnO (Oleico-Linolênico-Oleico, 17,82%), somando 67,19% de sua composição total em TAGs. Este resultado é próximo ao reportado por Gunstone, Harwood e Dijkstr (2007) e ao obtido por Antoniosi Filho (1995) e Ribeiro et al. (2009a), para os quais os TAGs OLO, OOO e OLnO estão presentes nas faixas de concentrações de 22–24,4%, 22–35,6%, e 10–16,55%, respectivamente. No óleo de castanha-do-pará, 18 diferentes espécies

de TAGs foram determinados, predominando OLL (Oleico-Linoleico-Linoleico), OLO (Oleico-Linoleico-Oleico) e PLO (Palmítico-Linoleico-Oleico) e StLO (Esteárico-Linoleico-Oleico), correspondendo a 59,43% de sua composição total em TAGs. Esta composição é semelhante à obtida por Antoniosi Filho (1995) para este óleo, no qual estes TAGs foram os mais abundantes, somando 59,9%.

Tabela 4.3 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) individuais e quanto ao número de carbono dos óleos de canola e castanha-do-pará, obtida teoricamente através do programa computacional 1,2,3 óleos.

Número de carbonos	tipo de TAG	óleo de canola (% molar)	óleo de castanha-do-pará (% molar)
C ₄₈	PPP	----	0,27
	PPS	----	0,59
C ₅₀	POP	0,43	1,74
	PLP	----	2,74
C ₅₂	PStSt	----	0,45
	POSt	0,48	2,53
	POO	5,50	----
	PLSt	----	7,58
	PLO	4,13	11,40
	PLnO	2,32	----
	PLL	----	8,98
	PLnL	0,63	----
	PoLL	----	0,24
	StOSt	----	1,01
C ₅₄	SOO	3,21	4,26
	OOO	24,42	----
	StLO	----	10,94
	OLO	24,95	18,46
	OLnO	17,82	----
	OLL	----	18,63
	OLnL	7,52	----
	LLL	----	9,67
	OLnLn	2,39	----
	LLnLn	0,44	----
C ₅₆	AOO	0,95	----
	OOEr	1,75	----
	ALO	----	0,27
	OLEr	1,14	----
	ALL	----	0,23
	OLnEr	0,53	----
C ₅₈	BeOO	0,55	----
	BeOL	0,49	----
C ₆₀	OON	0,35	----

P= ácido palmítico; Po= ácido palmitoléico; St= ácido esteárico; O= ácido oléico;
L= ácido linoléico; Ln= ácido linolênico; A= ácido araquídico; Be= ácido behênico;
Er= ácido erúico.

De acordo com Ribeiro et al. (2009b), na formulação de produtos destinados ao setor de alimentos, as propriedades físicas são mais facilmente interpretadas quando os TAGs são denominados por seu grau de saturação: tri-saturados (SSS), dissaturados-monoin saturados (SSI), di-insaturados-monossaturado (SII) e tri-insaturados (III), ao invés de serem designados com relação às espécies individuais de TAGs.

A Tabela 4.4 apresenta a composição das matérias-primas segundo teores de triacilgliceróis quanto a seu grau de saturação. Os resultados obtidos têm por base a composição em ácidos graxos obtida experimentalmente (Tabela 4.2), bem como a distribuição estereoespecífica destes ácidos graxos nas moléculas de TAGs obtida na literatura (Tabela 2.1) (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTR, 2007) no caso da gordura de leite, e calculada através do programa computacional 1,2,3 óleos, de acordo com o proposto por Antoniosi Filho (1995), no caso dos óleos de canola e castanha-do-pará.

Tabela 4.4 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as matérias-primas, óleos de canola e castanha-do-pará, com base nos resultados obtidos teoricamente através do programa computacional 1,2,3 óleos.

tipo de TAG	gordura de leite	óleo de canola	óleo de castanha-do-pará
SSS	34,65	0,00	1,32
SSI	44,24	0,91	15,60
IIS	18,55	17,78	36,09
III	2,56	81,31	47,00
Total	100,00	100,00	100,00

S = Saturado; I= Insaturado

Na Tabela 4.4 é possível notar que a gordura de leite contém predominantemente triacilgliceróis dissaturados (44,24%), seguido pelos tri-saturados (34,65%) e di-insaturados (18,55%), sendo a quantidade de tri-insaturados nesta gordura muito pequena (2,56%). Estes resultados são muito próximos aos obtidos por Rodrigues e Gioielli (2003) para esta gordura.

Para o óleo de canola, observa-se que a maior parte das espécies de triacilgliceróis é tri-insaturada (81,31%) e di-insaturada (17,78%), o que torna este óleo líquido a temperatura ambiente, já que estas espécies possuem pontos de fusão entre 1 a 23°C e -14 e 1°C (RODRIGUES; GIOELLI, 2003).

No óleo de castanha-do-pará os TAGs mais abundantes são os tri-insaturados (47%), seguidos dos TAGs di-insaturados (36,09%). Diferentemente do óleo de canola, neste óleo pode-se notar a presença de quantidade expressiva de TAGs dissaturados (15,60%), e muito pequena quantidade de trissaturados (1,32%). Estes resultados são similares aos reportados por Solis, Gioielli e Polakiewicz (2001).

Na Tabela 4.5 é apresentado o perfil de triacilgliceróis, com base no número de carbonos (CN) dos resíduos de ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis da gordura de leite e dos óleos de canola e castanha-do-pará obtida por cromatografia gasosa, com números de carbonos variando de 24 a 54.

Tabela 4.5 – Composição em triacilgliceróis (%) da gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, quanto ao número de carbonos presentes nos grupos acil dos triacilgliceróis, obtida por análise cromatográfica.

TAG	gordura de leite	óleo de canola	óleo de castanha-do-pará
Colesterol + C₂₄	0,35	----	----
C₂₆	0,21	----	----
C₂₈	0,50	----	----
C₃₀	1,00	----	----
C₃₂	2,20	----	----
C₃₄	5,37	----	----
C₃₆	10,29	----	----
C₃₈	12,35	----	----
C₄₀	9,72	----	----
C₄₂	6,43	----	----
C₄₄	6,01	----	----
C₄₆	6,98	----	----
C₄₈	9,12	----	----
C₅₀	12,04	----	7,53
C₅₂	11,45	19,20	34,74
C₅₄	5,96	80,80	57,73

Observa-se que na gordura de leite analisada, assim como apresentado por Marangoni e Rousseau (1998) e por Aguedo et al. (2008), está presente predominantemente triacilgliceróis resultantes de dois grandes grupos C₃₄-C₄₂ (44,16%) e C₄₆-C₅₄ (45,55%), enquanto que nos óleos de canola e castanha-do-pará os triacilgliceróis mais abundantes são C₅₂ (19,20% e 34,74%, respectivamente) e C₅₄ (80,80 e 57,73%, respectivamente).

Os resultados obtidos são similares aos apresentados por Wright e Marangoni (2002) e por De Man e De Man (2002) para a gordura de leite e óleo de canola, e com os

reportados por Rousseau e Marangoni (1999) para os quais os TAGs com 38 e 50 carbonos estão presentes em maiores concentrações na gordura de leite antes da interesterificação, contribuindo com cerca de 12 e 11% em sua composição, respectivamente. Para o óleo de castanha-do-pará, os resultados se assemelham aos obtidos por Antoniosi Filho (1995) pela técnica de cromatografia gasosa.

De acordo com Ribeiro et al. (2009a), a predominância significativa de TAGs com 54 carbonos no óleo de canola é diretamente relacionada a sua composição em ácidos graxos, em que, neste caso, os ácidos oléico, linoléico e linolênico somam 88,93% do total de ácidos graxos como mostrado na Tabela 4.2. Com relação aos TAGs com 52 átomos de carbono, estes são relativas às porcentagens das espécies POO (Palmítico-Oleico-Oleico) e PLO (Palmítico-Linoleico-Oleico) (Tabela 4.3).

Os resultados mostrados na Tabela 4.5, obtidos por cromatografia gasosa, para os óleos vegetais, são próximos aos apresentados na Tabela 4.3 obtidos usando o computacional 1,2,3 óleos e as considerações feitas por Antoniosi Filho (1995), sendo os resultados para o óleo de canola os que mais se aproximam, principalmente com relação a concentração das espécies de TAGs C₅₄.

4.1.7. Consistência

Dentre as propriedades de textura para avaliar as matérias-primas e, posteriormente, os produtos interesterificados, foi selecionada a consistência, cujos valores apresentam relação inversa com a espalhabilidade.

Na Figura 4.1 podem ser observados os valores de consistência à temperatura de 10°C, para a gordura de leite e a manteiga, utilizadas no presente trabalho, comparativamente aos valores obtidos para quatro marcas diferentes de margarinas comerciais adquiridas em mercado local.

É possível notar que a gordura de leite apresentou valor de consistência mais elevado em comparação à manteiga, o que pode ser atribuído à presença de água nesta última. Sabe-se da literatura que, em geral, a manteiga apresenta cerca de 15% de umidade (CECCHI, 2003), estando a manteiga analisada no presente trabalho próxima deste valor, com 15,57% de umidade. A gordura de leite, para ser considerada anidra, deve ser obtida a partir de creme ou manteiga pela eliminação quase total de água, restando no máximo 0,2% de umidade e sólidos não gordurosos, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1996).

Figura 4.1 – Consistência da gordura de leite e da manteiga utilizadas no presente trabalho, comparativamente aos valores obtidos para quatro margarinas comerciais.

Verifica-se ainda que as margarinas comerciais apresentaram valores de consistência inferiores ao da gordura de leite e da manteiga, o que era esperado considerando-se sua melhor espalhabilidade sob temperatura de refrigeração. Segundo Rodrigues e Gioielli (2003), a gordura de leite contém aproximadamente 10% mais gordura sólida, a 10°C, que as margarinas comerciais, e por isso é menos espalhável nesta temperatura.

Para estabelecer um critério de escolha em relação à melhor consistência a ser alcançada nos produtos obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho foram usados critérios estabelecidos por Haighton (1959) (Tabela 4.6), através dos quais é possível comparar as amostras analisadas em função da propriedade subjetiva de espalhabilidade. Estes critérios têm sido utilizados como base em outros estudos realizados na última década (RODRIGUES, 2002; RACT, 2006) para avaliar a textura de “*spreads*” a base de gordura de leite, como é o caso do presente trabalho.

Tabela 4.6 – Avaliação de margarinas e “shortenings” por meio de sua consistência.

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

Fonte: (HAIGHTON, 1959)

Comparando os dados da Figura 4.1 com a Tabela 4.6, nota-se que a gordura de leite pura e a manteiga podem ser classificadas segundo Haighton (1959) como “*muito duras*”, pois apresentaram, em média, consistência de 6479 e 1526 gf/cm², respectivamente, enquanto que as margarinas apresentaram valores de consistência entre 200–800 gf/cm² mostrando, portanto comportamento de um material segundo Haighton (1959) com “*satisfatória plasticidade e espalhabilidade*”. Esta elevada consistência da gordura de leite pode ser creditada a porcentagem de triacilgliceróis SSS e S₂I presente nesta gordura (Tabela 4.4), os quais possuem pontos de fusão entre 54 a 65°C, 27 a 42°C, respectivamente.

Diante dos resultados referentes às matérias-primas, observa-se a necessidade de realização de processos que possam melhorar a espalhabilidade da gordura de leite sob temperatura de refrigeração (10°C), o que demonstra a importância do desenvolvimento do presente trabalho. A inserção dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos de canola e castanha-do-pará à gordura de leite, por interesterificação enzimática, conforme proposto neste trabalho, é um processo adequado que pode promover a modificação desejada.

4.2. Seleção do método de imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em SiO₂-PVA

Métodos químicos e físicos têm sido desenvolvidos para a imobilização de enzimas, visando aumentar a estabilidade dos biocatalisadores, entre os quais destacam-se a ligação covalente e adsorção física. O primeiro método oferece a vantagem de permitir uma forte ligação entre enzima-suporte reduzindo os efeitos de dessorção da enzima do suporte (ZANIN; MORAES, 2004), porém neste método são utilizados agentes químicos para ligar a enzima ao suporte, os quais devem ser escolhidos cuidadosamente, principalmente ao serem utilizados em estudos como o do presente trabalho, no qual o produto obtido é

destinado à indústria de alimentos. O segundo método, adsorção física, é um procedimento simples e de baixo custo e consiste na adsorção da enzima no suporte sólido, sem qualquer modificação prévia da matriz ou do biocatalisador. A retenção da enzima na matriz deve-se ao estabelecimento de interações fracas, do tipo de forças de van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de hidrogênio (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003).

Sendo assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi selecionar o procedimento mais adequado para imobilizar a lipase de *Rhizopus oryzae* em SiO₂-PVA que resultasse na obtenção de um sistema imobilizado efetivo para mediar a reação de interesterificação da gordura de leite com os óleos propostos. Para tanto, o potencial catalítico da lipase imobilizada obtida por adsorção física no suporte não ativado e ligação covalente no suporte ativado com metaperiodato de sódio foi avaliado e comparado. Entre os diversos agentes de ativação do suporte recomendados na literatura (DE CASTRO et al., 2008), o metaperiodato de sódio foi selecionado em função do desempenho já comprovado na imobilização de diferentes fontes de lipase na matriz SiO₂-PVA (SANTOS et al., 2008a; PAULA et al., 2010a; PAULA et al., 2010b; NUNES et al., 2011). Outro fator importante que também foi considerado nesta escolha é que o metaperiodato de sódio apenas oxida a superfície do suporte, resultando em grupo aldeído capaz de ligar-se covalentemente à enzima, ou seja, ele não permanece quimicamente ligado ao sistema.

Adotando a metodologia descrita em 3.3.5, a lipase de *R. oryzae* foi imobilizada na matriz SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente e os resultados obtidos com relação a atividade hidrolítica e rendimento de imobilização (Tabela 4.7) revelaram similaridade da eficiência dos métodos em relação a atividade hidrolítica recuperada no suporte.

Tabela 4.7 – Umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização obtidos para a lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente

Derivado Imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
Adsorção física	9,65	5386	27,41
Ligação covalente	7,69	5881	28,95

Para comparar o desempenho dos derivados imobilizados na reação de interesse, ensaios envolvendo a interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola foram realizados por um período máximo de 48h, quantificando a formação de ácidos graxos livres (Figura 4.2), composição em TAGs (Figura 4.3) e textura dos produtos resultantes (Figura 4.4).

A observação da Figura 4.2 indica um perfil semelhante na formação de ácidos graxos livres para ambas as reações. Nas primeiras 24 h, verifica-se um aumento da ordem de 7 a 9 vezes do teor de ácidos graxos livres em relação a acidez inicial da blenda (0,47%) seguido da estabilização desses valores. Esse comportamento pode ser relacionado com ativação inicial da reação por meio da liberação dos ácidos graxos (hidrólise). Rousseau e Marangoni (1998a) também observaram maior formação de ácidos graxos nas primeiras horas de reação ao interesterificar uma blenda contendo 80% de gordura de leite e 20% de óleo de canola, utilizando lipase dessa mesma fonte de micro-organismo (*Rhizopus arrhizus*, atualmente denominado *Rhizopus oryzae*) imobilizada em polipropileno por adsorção física.

Figura 4.2 – Teor de ácidos graxos livres das amostras das reações de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física (—■—) e ligação covalente (—●—).

Maiores teores de ácidos graxos livres foram verificados para amostras da reação catalisada pelo derivado imobilizado obtido por adsorção física, o que pode ser uma consequência deste derivado ter apresentado teor de água ligeiramente superior (9,65%, Tabela 4.7) em comparação ao sistema imobilizado obtido por ligação covalente (7,69%).

A Figura 4.3 mostra a composição em TAGs quanto ao número de carbonos dos grupos acil, dos produtos obtidos nas reações em comparação à composição da gordura de leite pura e da blenda não interesterificada.

Figura 4.3 – Composição em TAGs, quanto ao número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos da molécula, dos produtos da interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente.

Comparando-se a composição em TAGs da gordura de leite pura à da blenda (65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola) verifica-se que, após a mistura, houve redução na concentração dos TAGs C₂₆-C₅₀ e aumento na concentração dos TAGs C₅₂-C₅₄, característicos do óleo.

Com relação ao efeito da interesterificação, é possível verificar que para ambas as reações houve redução no teor dos TAGs C₃₄-C₃₈ e C₅₄ e aumento nos TAGs C₂₄-C₃₀ e C₄₆-C₅₂. Nota-se também que, para ambos os sistemas reacionais, o conteúdo dos TAGs C₄₀-C₄₄ praticamente não se alterou durante o processo.

As variações de concentração em TAGs obtidas foram similares as reportadas por Rousseau e Marangoni (1998a) ao investigar o progresso da interesterificação da blenda binária contendo 80% de gordura de leite e 20% de óleo de canola, utilizando a lipase da mesma fonte imobilizada em propileno por adsorção física. Os resultados descritos indicaram que quantidade de TAGs C₃₄-C₃₈ e C₅₄ decresceu, enquanto a quantidade dos TAGs C₄₆-C₅₂ aumentou em relação a blenda inicial e o conteúdo dos C₄₀-C₄₄ não apresentou notáveis modificações.

No presente trabalho, de forma geral, a modificação do perfil de triacilgliceróis da mistura reacional após a reação de interesterificação (Figura 4.3) mostrou pequenas diferenças em função do tipo de derivado imobilizado empregado. Como forma de melhor quantificar estas diferenças foi calculado, com base na Equação 3.1, o grau de interesterificação, que representa o rendimento da reação, e observou-se que o valor obtido para a reação catalisada pela lipase imobilizada obtida pela técnica de adsorção física (21,73%) foi ligeiramente superior ao obtido para a reação catalisada pela lipase imobilizada preparada pelo procedimento de ligação covalente (16,90%).

Os resultados mostrados na Figura 4.4. referem-se a consistência dos produtos da interesterificação da gordura de leite com óleo de canola catalisada pelos derivados imobilizados obtidos por adsorção física e ligação covalente, comparativamente a gordura de leite pura e a blenda reacional.

Observa-se que a adição de 35% de óleo de canola à gordura de leite reduziu 5 vezes a consistência da gordura. Ract (2006) também notou redução de consistência de 60% (a temperatura de 5°C) ao estudar uma mistura contendo 80% de gordura de leite e 20% de óleo de girassol, enquanto Paula et al. (2010b) obtiveram reduções de consistência de 47 a 98% ao analisarem blendas contendo proporções mássicas de 80:20 a 50:50 de gordura de leite: óleo de soja, respectivamente. Os autores destes dois trabalhos atribuíram esta diminuição à formação de uma rede cristalina estruturalmente mais frágil ocasionada pela adição do óleo à gordura.

Figura 4.4 – Consistência a 10°C dos produtos da interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada por lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física e ligação covalente.

Com relação aos efeitos da reação sobre a espalhabilidade do produto final interesterificado, pode-se notar que na reação catalisada pelo derivado imobilizado obtido por adsorção física a redução da consistência foi ligeiramente superior, alcançando valores da ordem de 84%, enquanto na reação catalisada pelo derivado imobilizado preparado por ligação covalente foi constatado redução de 76%.

Considerando que o desempenho de ambos os derivados imobilizados não apresentaram influência na qualidade dos produtos resultantes da reação de interesterificação, optou-se pela seleção do procedimento de imobilização da lipase *R. oryzae* em SiO₂-PVA por adsorção física, pois além de ser uma técnica de fácil execução, não envolve o uso de substâncias tóxicas, condição requerida para obtenção de produtos alimentícios, como no caso do presente trabalho.

4.3. Interesterificação de blendas binárias gordura de leite e óleo de canola

Nesta etapa do trabalho, reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite e óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física, foram realizadas segundo planejamento composto central com face centrada, visando-se avaliar o efeito da temperatura e do teor de gordura de leite do meio reacional no desempenho do processo. Para tanto, foram quantificados as seguintes

variáveis: composição em ácidos graxos das blendas reacionais, o teor de ácidos graxos livres, a composição em triacilgliceróis (TAGs) e a consistência (a 10°C) dos produtos, sendo os resultados obtidos apresentados e discutidos na seção 4.3.1. A caracterização dos derivados imobilizados utilizados nestas reações com relação à umidade, atividade hidrolítica (em azeite de oliva) e rendimento de imobilização encontram-se no APÊNDICE C (Tabela 1). É importante destacar que o método selecionado para imobilização da lipase apresentou boa reprodutibilidade, fornecendo derivados de lipase com atividade hidrolítica média de 4889 ± 322 U/g e teor de água na faixa requerida ($8,57 \pm 1,42$ %).

4.3.1. Influência da temperatura e do teor de gordura de leite em reações de interesterificação de blendas binárias gordura de leite e óleo de canola

Um fator muito importante para a realização de reações de interesterificação enzimática é a quantidade de água presente no meio reacional. Segundo Rousseau (1997), durante a interesterificação a presença de água é fundamental para a formação dos intermediários, monoacilgliceróis e diacilgliceróis via hidrólise, que em sequência reagirão com os ácidos graxos livres formando novos triacilgliceróis, porém é a abundância de água no meio reacional que determinará a quantidade de subprodutos (mono- diglicerídeos e ácidos graxos livres) formados ao final da reação. O controle adequado da umidade é considerado um fator crítico nas reações catalisadas por lipases, tendo em vista que o teor de água interfere na velocidade da reação, no rendimento e na seletividade do produto, e na estabilidade operacional do biocatalisador. Em meios reacionais contendo baixos teores de água, o rendimento do produto pode ser alto, mas a reação é mais lenta, enquanto que em meios com altos conteúdos de água a velocidade da reação pode ser mais alta, porém com baixos rendimentos.

Em ambientes cujo teor de água é elevado há o predomínio de reações de hidrólise, enquanto que em ambientes com baixo conteúdo de água é predominante a formação de ésteres. A interesterificação requer um equilíbrio dessas duas reações para ser efetiva (ROSSEAU; MARANGONI, 1998a). Uma boa forma de avaliar o favorecimento da formação de produtos de hidrólise em paralelo a interesterificação é através da verificação do teor de ácidos graxos livres das amostras retiradas do meio reacional (Figura 4.5).

Observa-se em todas as reações (ensaios 1 a 11) tendência de aumento do teor de ácidos graxos livres até 24 h de reação, sendo que após este tempo pode-se notar pouca

variação nos valores de acidez, com exceção dos ensaios efetuados com blendas contendo 80 e 65% de gordura de leite, respectivamente (ensaios 8 e 11). Os menores valores de ácidos graxos livres foram obtidos para os produtos das reações de blendas que continham frações de gordura de 50 e 80%, nesta ordem. As demais reações apresentaram conteúdos de ácidos graxos livres intermediários aos valores obtidos para os experimentos citados. Os produtos apresentaram de 2,35 até 10,24%, para as amostras retiradas em 48h de reação.

Figura 4.5 – Teor de ácidos graxos livres das amostras das reações de interesterificação da gordura de leite e óleo de canola realizadas nas seguintes condições: (—■—) 45°C/ blenda 80:20; (—■—) 65°C/blenda 80:20; (—■—) 45°C/blenda 50:50; (—■—) 65°C/blenda 50:50; (—■—, —■—, —■—) 55°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 50:50; (—■—) 45°C/blenda 65:35.

Os conteúdos de ácidos graxos livres obtidos foram comparáveis aos reportados por Rousseau e Marangoni (1998a) que observaram valores entre 7 a 10%, na interesterificação de blenda binárias de gordura de leite com óleo de canola, em meios contendo reduzido conteúdo de água (0,35 e 0,55% m/m). No caso do presente trabalho, para assegurar que a quantidade de água no meio reacional fosse reduzida, e que, portanto as reações de hidrólise fossem minimizadas, a umidade do sistema imobilizado foi mantida em torno de 10% (APÊNDICE C – Tabela 1).

A Tabela 4.8 apresenta a composição em ácidos graxos das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de canola empregadas nas reações de interesterificação. Esta composição foi obtida por média ponderada com bases nos dados da Tabela 4.2.

Verifica-se que a adição do óleo de canola à gordura de leite provocou aumento no teor de ácidos graxos insaturados oléico, linoléico e linolênico. A mistura que contém 20% de óleo de canola (blenda 80:20) apresenta 29,74, 5,78 e 1,79% destes ácidos graxos respectivamente, e a que contém 50% (blenda 50:50) apresenta 40,96, 11,64 e 4,06%, respectivamente, em contraste com apenas 22,5, 1,87 e 0,28% da gordura de leite pura (Tabela 4.2). De acordo com Rodrigues (2002) o grau de saturação da gordura de leite em um produto espalhável pode ser reduzido pela adição de óleo vegetal, o que contribuiria não só para melhora nas características físicas do produto, como também nas propriedades nutricionais e para menores custos de produção.

Tabela 4.8 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blends binárias contendo gordura de leite e óleo de canola não interesterificadas.

Ácidos Graxos		blenda 50:50*	blenda 65:35*	blenda 80:20*
butírico	C 4:0	1,73	2,24	2,76
capróico	C 6:0	1,51	1,96	2,41
caprílico	C 8:0	0,87	1,13	1,39
cáprico	C 10:0	1,65	2,15	2,65
láurico	C 12:0	1,77	2,28	2,80
mirístico	C 14:0	5,69	7,37	9,04
pentadecanóico	C 15:0	0,62	0,79	0,97
palmítico	C 16:0	17,42	21,08	24,74
palmitoléico	C 16:1	1,11	1,35	1,60
margárico	C 17:0	0,26	0,32	0,38
cis-10-heptadecenóico	C 17:1	0,40	0,50	0,60
esteárico	C 18:0	6,78	8,04	9,29
trans elaidico	C 18:1	1,39	1,81	2,23
oléico	C 18:1	40,96	35,35	29,74
trans t-linoléico	C 18:2	0,08	0,10	0,13
linoléico	C 18:2	11,64	8,71	5,78
trans t-linolênico	C 18:3	0,28	0,24	0,20
linolênico	C18: 3	4,06	2,92	1,79
octadecatetreenóico	C 18:4	0,42	0,55	0,67
araquídico	C 20:0	0,39	0,32	0,25
eicosenóico	C 20:1	0,53	0,41	0,29
behênico	C 22:0	0,21	0,18	0,14
erúcico	C 22:1	0,04	0,03	0,02
lignocérico	C 24:0	0,11	0,09	0,08
nervônico	C 24:1	0,09	0,08	0,07
Total		100,00	100,00	100,00
Saturados		39,01	47,95	56,90
Insaturados		60,99	52,05	43,10

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de canola

A Tabela 4.9 apresenta a composição das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de canola e dos respectivos produtos interesterificados, segundo teores de triacilgliceróis dos tipos tri-saturados (SSS), dissaturado-monoinsaturados (SSI), di-insaturados-monossaturado (IIS) e tri-insaturados (III). Observa-se que, quanto maior a quantidade de gordura de leite presente na blenda maior a quantidade de TAGs tri-saturados (SSS). Da mesma forma, quanto maior a quantidade de óleo de canola na blenda, maior a quantidade de TAGs tri-insaturados (III).

Tabela 4.9 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas de gordura de leite e óleo de canola antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica.

tipo de TAG	blenda 50:50*		blenda 65:35*		blenda 80:20*	
	NIE	EIE	NIE	EIE	NIE	EIE
SSS	17,33	5,93	22,52	11,03	27,72	18,39
SSI	24,77	34,09	26,59	36,85	28,42	37,35
SII	15,98	37,31	20,76	38,02	25,55	36,27
III	41,93	22,67	30,12	14,10	18,31	7,99
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*Proporção mássica: óleo de canola; S = Saturado; I = Insaturado.

NIE = não interesterificado; EIE = enzimaticamente interesterificado.

Para as blendas contendo 50:50, 65:35 e 80:20 em porcentagem mássica de gordura de leite e óleo de canola a interesterificação resultou em decréscimo de 66, 51 e 34%, respectivamente, da concentração dos TAGs SSS e redução de 46, 53 e 56%, respectivamente, da concentração dos TAGs III, com simultâneo aumento de 75, 58 e 36%, respectivamente, das espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS.

De acordo com Rodrigues e Gioielli (2003), as propriedades funcionais de manteigas e margarinas podem estar relacionadas a composição em TAGs de sua fase gordurosa. Os TAGs SSS com ponto de fusão de 54 a 65°C e alguns TAGs SSI, com ponto de fusão de 27 a 42°C, são responsáveis pela estrutura sólida desses produtos, além de serem importantes para impressão sensorial deixada pelo alimento na boca (“*morthfeel*”) à temperatura corporal. Os TAGs IIS, com pontos de fusão de 1 a 23°C, são também importantes para a impressão sensorial deixada pelo alimento na boca e estão relacionados à funcionalidade do produto à temperatura ambiente. Os III, com pontos de fusão de -14 a 1°C são responsáveis pela maciez do produto e oferecem os benefícios nutricionais dos ácidos graxos poli-insaturados (SILVA; GIOIELLI, 2006).

Portanto, diminuição dos TAGs SSS e III e a elevação da quantidade de espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS, obtida através da interesterificação enzimática para as blendas de gordura de leite com óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* (*sn*-1,3 específica), possibilitou o aumento da funcionalidade tecnológica e melhora das propriedades sensoriais dos produtos, fazendo com que tenham maior potencial para serem aplicados como base em alimentos.

Observou-se que dentre os produtos estudados, o que apresentou maior concentração dessas espécies intermediárias (~75%), foi o proveniente da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola.

A Figura 4.6 mostra o perfil em TAGs, segundo número de carbonos, obtido por cromatografia gasosa, para os produtos obtidos nas interesterificações de blendas binárias contendo 80:20, 65:35 e 50:50 em massa de gordura de leite: óleo de canola, respectivamente, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada, comparativamente à composição da gordura de leite e às composições de suas respectivas blendas reacionais não interesterificadas.

Verifica-se que apenas a adição de óleo de canola à gordura de leite conduz à redução da concentração dos TAGs C_{30} – C_{50} característicos da gordura de leite (Tabela 4.5) e ao aumento da concentração dos TAGs C_{52} e C_{54} , característicos do óleo de canola (Tabela 4.5). Este efeito aumenta com o aumento da porção de óleo na blenda.

O processo de interesterificação resultou em mudança no perfil de TAGs da gordura de leite, sendo esta modificação composicional diferente da obtida com a simples blenda. De forma geral, comparando-se a composição dos produtos interesterificados à das blendas iniciais das matérias-primas, pode-se notar que os lipídeos estruturados apresentaram diminuição dos TAGs C_{34} – C_{40} e C_{54} , com simultâneo aumento no teor dos TAGs C_{24} – C_{30} e C_{46} – C_{50} . Resultados semelhantes foram obtidos por Rousseau e Marangoni (1998a) ao estudar também a interesterificação enzimática da blenda binária 80:20 de gordura de leite: óleo de canola. Para estes autores após a reação houve redução na concentração dos TAGs C_{34} – C_{42} e C_{54} e aumento dos TAGs C_{46} – C_{52} .

Para avaliar quantitativamente as mudanças ocorridas nas concentrações dos TAGs dos produtos obtidos, foi calculado o grau de interesterificação das amostras após 48 h de reação segundo Equação 3.1 (NUNES et al., 2011) e os resultados são apresentados na matriz experimental proposta (Tabela 4.10), juntamente com os resultados de consistência.

a

b

c

Figura 4.6 – Perfil de TAGs quanto ao número de carbonos para os produtos (48h) das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite: óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada. Na Figura Col: Colesterol e NIE: não interesterificada.

Tabela 4.10 – Matriz experimental e resultados do grau de interesterificação e consistência para os produtos obtidos em experimentos de interesterificação enzimática de blends binárias de gordura de leite/óleo de canola, conduzidos de acordo com planejamento composto central com face centrada.

Ensaio	Valores codificados		Valores não codificados		Variáveis-resposta	
	X ₁	X ₂	T (°C)	Teor de gordura de leite (% m/m)	Grau de Interesterificação (GI) (%)*	Consistência (gf/cm ²)*
1	-	+	45	80	16,78	1775
2	+	+	65	80	20,39	1477
3	-	-	45	50	19,49	0
4	+	-	65	50	24,77	0
5	0	0	55	65	21,73	233
6	0	0	55	65	18,00	753
7	0	0	55	65	19,19	244
8	0	+	55	80	17,24	1918
9	+	0	65	65	23,62	435
10	0	-	55	50	22,38	30
11	-	0	45	65	21,01	845

*Valores obtidos em 48h de reação

Na Tabela 4.10 verifica-se que os valores de grau de interesterificação encontram-se na faixa de 16,78 a 24,77%, sendo o maior valor obtido no ensaio 4, realizado a 65°C, com blenda contendo quantidades iguais de gordura de leite e óleo de canola (50:50).

Com relação à consistência, que é a medida de textura cujo valor está relacionado a espalhabilidade (maior consistência, menor espalhabilidade e vice-versa), esta apresentou resultados que oscilaram entre 0 e 1918 gf/cm², sendo o maior e menor valor observado para meios contendo 80% e 50% de gordura de leite, respectivamente. Nos ensaios 3 e 4, provenientes da blenda contendo 50% de cada componente, para os quais atribuiu-se valor zero à consistência, não foi possível determinar esta propriedade, tendo em vista que as amostras apresentam-se fluidas na temperatura analisada (10°C) devido à alta quantidade de óleo presente na blenda, e consequentemente a elevada quantidade de TAGs III, o que impossibilitou a detecção pelos sensores.

Comparando-se os valores de consistência dos produtos (Tabela 4.10) com os resultados obtidos para suas respectivas blends reacionais (Tabela 4.11), é possível observar que os produtos provenientes da blenda contendo 50% de gordura de leite foram os que mais sofreram redução de consistência, de 88% (Ensaio 10) a 100% (Ensaio 3 e 4),

enquanto que os produtos resultantes da blenda contendo 80% de gordura foram os que apresentaram as menores reduções em relação a blenda reacional não interesterificada, de 26% (Ensaio 8) a 43% (Ensaio 2), respectivamente. Para os ensaios contendo 65% de gordura de leite a redução variou desde 32%, para o ensaio realizado a 45°C (Ensaio 11), até cerca de 80% para os ensaios realizados nos pontos centrais (Ensaio 5 e 7).

Tabela 4.11 – Consistência das blends reacionais de gordura de leite/óleo de canola não interesterificadas empregadas nas reações de interesterificação enzimática.

blenda reacional	Consistência (gf/cm²)
80:20*	2599
65:35*	1240
50:50*	244

* Proporção mássica gordura: óleo.

Comparando os dados de consistência dos produtos (Tabela 4.10) aos critérios estabelecidos por Haigthon (1959) (Tabela 4.6), observa-se que os produtos dos ensaios 1, 2 e 8, cujas blends reacionais iniciais continham 80% de gordura de leite foram classificados como “*muito duros*”, pois apresentaram consistência de 1477 a 1918 gf/cm². Esta consistência elevada pode ser explicada pelo fato de que mais da metade das espécies de TAGs presentes nestes produtos são SSS e SSI (60%) (Tabela 4.9), os quais possuem pontos de fusão entre 54 a 65°C e 27 a 42°C, respectivamente, e por isso, são responsáveis por uma estrutura mais firme.

Para os produtos da blenda contendo 50% de gordura de leite (ensaios 3, 4 e 10) para os quais a consistência praticamente não foi detectada, constatou-se que mais da metade das espécies de TAGs (66%) consistia de III e IIS (Tabela 4.9), com baixos pontos de fusão, -14 a 1°C e 1 a 23°C, respectivamente, o que explica, portanto sua fluidez na temperatura de análise (10°C). Com relação aos produtos, provenientes da blenda 65:35, estes foram os únicos que forneceram, em média, valores de consistência próximos à faixa estabelecida por Haigthon (1959), de 187 a 845 gf/cm², o que pode ser justificado por esses produtos serem os únicos que após a completa interesterificação apresentaram quantidades praticamente equilibradas das espécies de TAGs responsáveis pela estrutura (SSS+SSI = 47%) e responsáveis pela maciez (III+IIS = 53%) do produto (Tabela 4.9).

Com auxílio do programa STATISTICA 5.0, os efeitos individuais e de interação dos fatores temperatura e teor de gordura foram analisados estatisticamente, considerando como variáveis resposta o grau de interesterificação e a consistência apresentados na Tabela 4.10. Os valores dos efeitos são dispostos na Tabela 4.12 juntamente com as respectivas estimativas de erro padrão, teste t de Student e valores de p.

Tabela 4.12 – Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste “t” de Student e valores de p para grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blends binárias de gordura de leite/óleo de canola catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada.

Variável	Fatores	Efeitos	Erro-padrão	Valores de t	p
GI	Média	20,09	0,80	25,18	0,0000*
	X ₁	3,83	1,27	3,02	0,0294*
	X ₁ ²	3,11	1,95	1,59	0,1723
	X ₂	-4,08	1,27	-3,21	0,0237*
	X ₂ ²	-1,90	1,95	-0,97	0,3756
	X ₁ .X ₂	-0,83	1,55	-0,54	0,6143
Consistência	Média	492,32	129,51	3,80	0,0126*
	X ₁	-236,00	206,13	-1,14	0,3041
	X ₁ ²	48,42	317,23	0,15	0,8847
	X ₂	1713,33	206,13	8,31	0,0004*
	X ₂ ²	716,42	317,23	2,26	0,0735**
	X ₁ .X ₂	-149,00	252,46	-0,59	0,5807

* p<0,05: significativo ao nível de confiança de 95%;

** p < 0,10: significativo ao nível de confiança de 90%;

X₁: Temperatura; X₂: Teor de gordura de leite (%); GI : Grau de interesterificação.

Na Tabela 4.12 verifica-se que os efeitos principais de ambos os fatores (temperatura e teor de gordura) influenciaram significativamente o grau de interesterificação ao nível de confiança de 95%. O teor de gordura (X₂) apresentou efeito negativo (-4,08), o que significa que quanto maior o teor de gordura mais baixo será o grau de interesterificação. A temperatura (X₁) apresentou efeito positivo (3,83), ou seja, ao ser elevada o valor da variável-resposta também aumentará.

Para a consistência, tanto o efeito principal quanto o quadrático do fator teor de gordura de leite foram significativos aos nível de confiança de 95% e 90%, respectivamente, com efeitos positivos (1713,33 e 716,42, respectivamente). Por outro lado, a temperatura (X₁) e a interação entre temperatura e teor de gordura (X₁.X₂) não apresentaram influência significativa na consistência.

4.3.2. Modelos empíricos para as respostas grau de interesterificação e consistência

Com o objetivo de otimizar as reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola, os valores de grau de interesterificação e consistência (Tabela 4.10) foram ajustados por regressão múltipla a modelos empíricos representados pelas Equações 4.4 e 4.5, respectivamente. Para a consistência o modelo foi composto considerando-se apenas o teor de gordura, tendo em vista que apenas este fator foi significativo para esta variável-resposta.

$$Y_1 = 20,42 + 1,92 \cdot X_1 - 2,04 \cdot X_2 \quad (4.4)$$

$$Y_2 = 502,00 + 856,67 \cdot X_2 + 364,67 \cdot X_2^2 \quad (4.5)$$

Em que: Y_1 é a variável-resposta grau de interesterificação; Y_2 é a variável-resposta consistência; X_1 representa o valor codificado para temperatura e X_2 representa o valor codificado para o teor de gordura de leite.

Segundo Moldaviski e Cohen (1996) equações podem ser estatisticamente validadas através dos seguintes testes:

- 1) Análise de variância (ANOVA) que determina a significância de cada termo e fornece estimativa da qualidade do ajuste;
- 2) Coeficiente de correlação (R^2);
- 3) Falta de ajuste, que indica se a diferença entre os valores experimentais e os valores calculados pelo modelo podem ser explicadas pelo erro experimental.

Esses testes podem ser realizados com base nos critérios de aceitabilidade expostos na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Critérios para a validação de diferentes modelos.

ANOVA	R^2	Falta de ajuste	Modelo Validado
$p < 0,10$	$R^2 > 0,9$	-----	Sim
	$0,7 < R^2 < 0,9$	$p > 0,01$	Sim
		$p < 0,01$	Não
$p > 0,10$	$R^2 < 0,7$	-----	Não
	-----	-----	Não

Fonte: (MOLDAVISKI; COHEN, 1996).

A validade dos modelos propostos foi verificada pela Análise de Variância com auxílio do programa Design – Expert (versão 6.0.6), e os dados gerados são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Análise de Variância (ANOVA) para os modelos ajustados representando o grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blends binárias de gordura de leite/ óleo de canola, catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas de acordo com planejamento composto central com face centrada.

	Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
GI	Modelo	46,97	2	23,49	9,54	0,0076*
	X ₁	22,04	1	22,04	8,95	0,0193*
	X ₂	24,93	1	24,93	10,13	0,0130*
	Erro residual	19,69	8	2,46		
	Falta de ajuste	12,43	6	2,07	0,57	0,7483
	Erro puro	7,26	2	3,63		
	R²	0,7046				
Consistência	Modelo	4,766x10 ⁶	2	2,383x10 ⁶	44,76	< 0,0001*
	X ₂	4,403x10 ⁶	1	4,403x10 ⁶	82,71	< 0,0001*
	X ₂ ²	3,627 x10 ⁵	1	3,627x10 ⁵	6,81	0,0311*
	Erro residual	4,259 x10 ⁵	8	53238,58		
	Falta de ajuste	2,494 x10 ⁵	6	41562,44	0,47	0,7993
	Erro puro	1,765 x10 ⁵	2	88267,00		
	R²	0,9180				

* p < 0,05: significativo ao nível de confiança de 95%; GI = Grau de interesterificação; X₁: temperatura codificada; X₂: teor de gordura de leite codificado.

A observação da Tabela 4.14 indica que ambos os modelos gerados foram validados de acordo com os critérios de Moldaviski e Cohen (1996).

O modelo proposto para o grau de interesterificação foi estatisticamente significativo, sem falta de ajuste ao nível de confiança de 95%, e mais de 70% da variabilidade experimental pode ser explicada por este modelo ($R^2 = 0,7046$).

O modelo ajustado para a consistência foi também estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%, sem falta de ajuste, explicando mais de 91% da variabilidade experimental ($R^2 = 0,9180$).

Os resultados preditos pelos modelos podem ser representados pelas superfícies de resposta mostradas nas Figuras 4.7 (a) e (b) para grau de interesterificação e consistência, respectivamente.

Figura 4.7 – Superfície de resposta para grau de interesterificação (a) e consistência (b) dos produtos da interesterificação de blends binários de gordura de leite/óleo de canola catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

No gráfico representado pela Figura 4.7 (a) verifica-se que os valores mais elevados de grau de interesterificação, em torno de (25%) – região destacada em vermelho escuro, foram obtidos para a temperatura no nível alto (65°C) e teor de gordura de leite no nível baixo (50%). Uma hipótese para este comportamento seria de que os meios com maiores quantidades de óleo e maiores temperaturas a viscosidade é menor, o que facilitaria a agitação e consequentemente aumentaria a velocidade da reação, justificando maiores rendimentos (grau de interesterificação). Com relação a influência da composição do meio no grau de interesterificação, cabe ainda comentar que, nos meios em que há maior

quantidade de óleo, a enzima atuou mais intensamente provavelmente por sua especificidade pelos ácidos graxos presentes no óleo, tendo em vista que a lipase de *Rhizopus oryzae* tem preferência por ácidos graxos C18 (PAULA et al., 2010b; RØNNE; JACOBSEN; XU, 2006). Song et al. (2008) estudaram a especificidade de nove lipases de diferentes fontes, por 15 substratos com distintos comprimentos de cadeias, graus de saturação e posição. Estes autores mostraram que, além da lipase de *R. oryzae* não hidrolisar ácidos graxos na posição 2 do triacilgliceróis, significando que ela atua apenas quebrando ácidos graxos nas posições 1 e 3, possui alta atividade hidrolítica em ésteres contendo ácidos graxos insaturados de cadeia longa.

Com relação à consistência, na Figura 4.7 (b) verifica-se um decaimento quadrático em seus valores à medida que se reduz a quantidade de gordura de leite na blenda reacional. Observa-se também que na região marcada com cor verde de diferentes tonalidades estão incluídos valores de consistência que oscilam de 207 a 833 gf/cm² os quais pertencem à faixa estabelecida por Haighton (1959) para “*spreads*” com espalhabilidade satisfatória. Para melhor visualização destas condições foi construído o gráfico de contorno (Figura 4.8), no qual se observa que produtos com satisfatória espalhabilidade podem ser obtidos para todas as condições delimitadas pela faixa marcada em amarelo, correspondendo a produtos provenientes de blendas com teores de gordura de leite variando entre 60 e 70%, independente da temperatura de reação (45 a 65°C).

Para a confirmação dos modelos obtidos de consistência e grau de interesterificação, dentro da faixa indicada pelo gráfico de contorno como adequada, foi selecionada a blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola (situada mais ou menos no centro da faixa) e a temperatura de 45°C (mais baixa dentre as estudadas), já que o uso de temperaturas mais elevadas demandaria maiores custos com energia e que em uso prolongado poderia afetar negativamente o aroma e sabor da manteiga e a atividade catalítica da lipase. Além disso, verificou-se que a variação de temperatura dentro da faixa estudada implicou numa variação do grau de interesterificação (de 16 a 25%) que não foi considerada suficiente para justificar o uso de temperaturas mais elevadas. Verifica-se também que, sob as condições selecionadas é possível obter produtos interesterificados com valores correspondentes a 75% do máximo obtido nas reações conduzidas segundo o planejamento de experimentos (24,77%).

Figura 4.8 – Gráficos de contorno sobrepostos de consistência e grau de interesterificação dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de canola catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

4.3.3. Confirmação dos modelos obtidos e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de canola ao longo do tempo

Embora existam muitos estudos sobre a interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais e seus produtos interesterificados (ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a e b, RØNNE et al, 2005; AGUEDO et al. 2008, AGUEDO et al, 2009), a cinética da reação ainda é pouco explorada na literatura.

Reações de interesterificação enzimática de gordura de leite em geral são realizadas por extensos períodos (ROUSSEAU; MARANGONI 1998a e b; AGUEDO et al., 2008; AGUEDO et al., 2009; PAULA et al., 2010b; NUNES et al., 2011) com o objetivo de garantir completa redistribuição dos ácidos graxos nas cadeias dos TAGs. Entretanto, se esse tempo de reação fosse menor, poderia haver diminuição de custo do processo e a capacidade dos reatores poderia ser mais bem aproveitada. Segundo Ribeiro et al. (2009c) é importante fazer um estudo minucioso do tempo de reação, pois a intensidade de formação de novas espécies triacilglicerólicas pode afetar consideravelmente as propriedades físicas das bases oleosas. Gorduras parcialmente interesterificadas apresentam teor de sólidos, composição triacilglicerólica e comportamento de cristalização

que diferem muito da mistura inicial e do produto completamente redistribuído. Estes produtos consistem em frações oleosas com propriedades únicas, que podem ser aplicados diretamente como ingredientes plásticos.

Além disso, na literatura poucos trabalhos envolvem o estudo das características de textura ao longo do tempo dos produtos provenientes da interesterificação enzimática de gordura de leite. Sendo assim, na condição selecionada no planejamento de experimentos para a confirmação dos modelos (blenda 65:35, temperatura de 45°C), foram também retiradas amostras ao longo do tempo reacional a cada 6h, para que fossem verificadas características como acidez, peróxido, composição em TAGs, grau de interesterificação, consistência e conteúdo de gordura sólida dos produtos (Figuras 4.9 a 4.17).

Na Figura 4.9, verifica-se que o teor de ácidos graxos livres para as amostras da reação de interesterificação da blenda binária (65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola) ao longo do tempo variou de 3,50 a 7,11%. Houve tendência de aumento neste teor até 36 h de reação, sendo que a partir deste tempo não foi constatada nenhuma variação notável.

Figura 4.9 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

O resultado obtido difere-se do reportado por Aguedo et al. (2008), ao estudar a interesterificação de blendas de gordura de leite com óleo de linhaça mediada pela lipase de *T. lanuginosa*. Estes autores observaram valor máximo de ácidos graxos entre 4 a 6 h de reação, sendo que para algumas das blendas este valor diminuiu suavemente até 24h de reação, o que foi explicado como sendo resultado da alta volatilidade dos ácidos graxos de cadeia curta, o ácido butírico, por exemplo, o qual está localizado principalmente na posição 3 dos TAGs presentes na gordura de leite e, portanto é primariamente liberado pela enzima.

Os resultados são também distintos dos obtidos por Rousseau e Marangoni (1998a) ao estudarem a interesterificação catalisada por lipase de *R. arrhizus*, que observaram valor máximo de ácidos graxos (4,5%) em 6 h de reação para meio contendo somente gordura de leite, enquanto que para meios contendo blendas com 90, 80, 70 e 60% de gordura de leite e 10, 20, 30 e 40% de óleo de canola, respectivamente, o teor de ácidos graxos atingiu máximo valor em 12 h de reação (4,5%) permanecendo constante após este tempo.

É provável que essas diferenças sejam devidas aos distintos teores de água presentes nos meios reacionais, tendo em vista que, como já relatado anteriormente, a extensão das reações de hidrólise depende da quantidade de água disponível no meio reacional (AGUEDO et al., 2008), o que no caso do presente trabalho dependeu essencialmente da umidade proveniente do derivado imobilizado da ordem de 7,97% (APÊNDICE C – Tabela 2).

Embora a reação de interesterificação entre a gordura de leite com óleos vegetais resulte em alimentos com melhores características nutricionais e de espalhabilidade, deve-se considerar que os produtos obtidos são mais suscetíveis à oxidação devido à presença dos ácidos graxos insaturados (GIET et al., 2009). Assim, avaliou-se o índice de peróxidos nas amostras da reação de interesterificação da blenda binária ao longo do tempo, e os resultados estão dispostos graficamente na Figura 4.10.

Os resultados obtidos variaram de 0,69 a 0,95 meq/kg. Embora não existam valores padrões de índice de peróxidos para produtos interesterificados, os resultados obtidos podem ser considerados adequados, tendo em vista que estão de acordo com a legislação brasileira estabelecida para a manteiga (BRASIL, 1996), a qual admite até 1 meq/kg. Estes valores comprovam a eficiência da manutenção de atmosfera reacional inerte, livre de oxigênio, através da introdução de nitrogênio gasoso no meio reacional.

Figura 4.10 – Índice de peróxido em função do tempo das amostras retiradas durante a reação de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida a 45°C.

O perfil em TAGs quanto ao número de carbonos quantificado por cromatografia gasosa, ao longo do tempo para as amostras obtidas na reação de interesterificação, mostrado na Figura 4.11, indica que os lipídeos estruturados obtidos ao longo do tempo de reação apresentaram redução na concentração dos TAGs C₃₄-C₃₈ e C₅₄ e aumento no teor dos TAGs C₄₆-C₅₂.

Para melhor quantificar estas modificações foi calculado o grau de interesterificação e os resultados ao longo do tempo são mostrados na Figura 4.12. Verifica-se elevação mais acentuada do grau de interesterificação até 12 h de reação (em torno de 15%), sendo que após este período pequenas variações foram constatadas atingindo um máximo (em torno de 19%) em 36h. Nota-se ainda que o valor obtido em 48h de reação, 19,77% é próximo ao previsto pelo modelo, 18,50% (Equação 4.4), e está dentro da faixa predita para intervalo de confiança de 95% (16,67 – 20,34%).

Figura 4.11 – Concentração de TAGs em função do tempo para os produtos da reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob temperatura de 45°C. Na figura Col: Colesterol.

Figura 4.12 – Grau de interesterificação em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

A Figura 4.13 apresenta a variação da consistência dos produtos da interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola em função do tempo.

Os valores de consistência variaram de 1315 até cerca de 600 gf/cm². Observa-se que a consistência diminuiu com o tempo de processo e que houve tendência de redução até as primeiras 12 horas de reação, sendo que após este tempo apenas suaves mudanças foram notadas. Estes resultados condizem com os alcançados por Rousseau e Marangoni (1998b) ao estudarem também a interesterificação enzimática com lipase *sn*-1,3 específica, de blendas de gordura de leite com óleo de canola, que reportaram que muitas das mudanças na dureza para todas as amostras ocorreram no período de 12 h de reação. Estes autores explicaram ainda que a rápida variação na dureza sugere que somente pequenos rearranjos estruturais foram necessários para induzir grandes modificações nas propriedades reológicas dos produtos e baseados nesses resultados demonstraram que existe uma correlação entre a consistência com o conteúdo de gordura sólida e composição em TAGs dos produtos.

Figura 4.13 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

No presente trabalho foram também constatadas maiores alterações composicionais (Figuras 4.11 e 4.12) nas primeiras 12 h de reação. Além disso, apenas os produtos obtidos após 12h de reação apresentaram valores de consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) (200 a 800gf/cm²) para uma gordura com satisfatória espalhabilidade. Verifica-se ainda que o resultado de consistência obtido em 48 h de reação, 574 gf/cm², se aproxima do valor predito pelo modelo, 502gf/cm² (Equação 4.5), e está dentro da faixa prevista (264,05 – 739,95 gf/cm²) para intervalo de confiança de 95%.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer uma correlação entre os dados de grau de interesterificação e consistência (Figura 4.14) dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária (65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola) em função do tempo.

A análise da Figura 4.14 mostra uma correlação linear entre a consistência e o grau de interesterificação. A partir da linearização dos dados experimentais foi possível obter a Equação 4.6, com R^2 0,9296, em que GI = grau de interesterificação (%). De acordo com o comportamento descrito por esta equação, produtos que apresentem valores de grau de interesterificação superior a 13% terão consistência dentro da faixa de 200–800gf/cm², considerada por Haighton (1959) como ideal para um produto com satisfatórias propriedades de plasticidade e espalhabilidade. Por esta relação, é possível notar também, que a redução da consistência é diretamente proporcional ao aumento do grau de interesterificação.

Figura 4.14 – Relação linear entre os valores de grau de interesterificação e consistência dos produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola, nos diferentes tempos reacionais.

$$\text{Consistência (gf/cm}^2\text{)} = 1360,59 - 43,69 \cdot \text{GI} \quad (4.6)$$

Outro parâmetro importante na caracterização de óleos e gorduras é o perfil térmico e alguns estudos têm sido conduzidos neste sentido (AGUEDO et al. 2009; RIBEIRO et al. 2009d; RIBEIRO et al. 2009e). Dentre as metodologias empregadas para esta investigação, destaca-se a análise por calorimetria de varredura diferencial (DSC–“*Diferencial Scanning Calorimetry*”), que é a técnica termo analítica mais amplamente utilizada para avaliar óleos e gorduras (RIBEIRO et al., 2009e) e é uma importante ferramenta na investigação da transição das formas cristalinas durante a fusão das gorduras (GRIMALDI et al., 2001). Ela oferece vantagens perante outras técnicas calorimétricas por promover uma medida direta das variações de energia permitindo o acompanhamento das alterações físico-químicas das amostras (TAN; CHE MAN, 2000).

A Figura 4.15a mostra o termograma de fusão em função da temperatura, obtido por DSC, para as matérias-primas gordura de leite e óleo de canola, comparativamente ao termograma obtido para a blenda reacional (65% de gordura de leite e 35% de óleo de

canola) antes da interesterificação. A Figura 4.15b, por sua vez, mostra o efeito da reação enzimática sobre o perfil térmico dos produtos ao longo do tempo de reação. 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., 2009e).

Verifica-se para a gordura de leite (Figura 4.15a) a presença de 3 regiões endotérmicas, a primeira de -17 a 7°C, a segunda de 7 ao 20°C, na qual está presente o pico “B” 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), o que pode estar associado à presença dos TAGs I₂S, S₂I e SSS (Tabela 4.4), respectivamente, devido a suas temperaturas de fusão (RODRIGUES; GIOIELLI, 2003).

Para o óleo de canola é possível notar a presença de um evento endotérmico principal o pico “A” a -17°C, que corresponde às espécies de TAGs III e I₂S (Tabela 4.4) presentes neste óleo. Este resultado é semelhante ao observado por Fasina et al. (2008) para qual a temperatura do pico “A” foi de -14°C. A gordura de leite apresentou ampla faixa de fusão de -35°C a 36°C, enquanto que o óleo de canola possui faixa de fusão mais restrita de -33°C a -7°C, o que pode ser diretamente relacionada a mais complexa composição em TAGs da gordura comparativamente ao óleo de canola.

Para blenda não interesterificada é possível observar um evento endotérmico mais intenso, em comparação ao observado no termograma da gordura de leite, na região do pico “A”, característico do óleo, estando presente também o pico “B”, característico da gordura. Notou-se, portanto, que apenas a adição de óleo à gordura conduziu ao deslocamento do pico “B” (característico da gordura) para temperaturas mais baixas, e a substancial diminuição da amplitude do pico “A” (característico do óleo).

a **b**

Figura 4.15 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de canola e blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*.

A análise dos termogramas presentes na Figura 4.15b revela que, após a reação, houve deslocamento do pico endotérmico “B” (característico da gordura de leite) para temperaturas mais baixas e aumento de sua amplitude, promovendo a formação de um pico mais estreito e agudo. Resultados semelhantes foram observados por Aguedo et al. (2009) ao estudar a interesterificação de blendas de gordura de leite e óleo de colza. Segundo estes autores estas mudanças refletem a reestruturação dos TAGs ocasionadas pela interesterificação. Segundo Nassu (1994) o predomínio de apenas alguns tipos de TAGs específicos, ou a interação entre os TAGs que compõe a amostra, pode ser responsável pela presença de picos mais agudos e estreitos. Foi observado que o deslocamento mais acentuado do pico “B” ocorreu nas primeiras 6 h de reação, mantendo-se praticamente constante até 24 h, quando sofre novo deslocamento mais suave até 48 h de reação. É possível notar também a formação de novos picos “C” e “D” em temperaturas em torno de -14°C e 24°C , respectivamente. Os produtos interesterificados apresentaram, em geral, faixas de fusão semelhantes a da blenda não interesterificada.

O DSC é também um método utilizado para determinação do teor de sólidos de uma gordura. O conteúdo de gordura sólida 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 conteúdo de sólidos de gorduras vegetais e animais obtidos por DSC tem sido uma promissora técnica em pesquisa, por ser um procedimento que oferece vantagens tais como a obtenção de um perfil térmico que pode fornecer vestígios de como a amostra foi condicionada e armazenada, permite distinguir entre duas gorduras que tenha o mesmo conteúdo de gordura sólida, possibilita obter os sólidos em gorduras em ampla faixa de temperatura e não requer um limite de dureza, como no caso do índice de gordura sólida obtido por dilatometria. Além disso, os resultados podem ser obtidos em aproximadamente 1 hora de análise e a correlação com o índice de gordura sólida obtido por dilatometria é boa (O'BRIEN, 2004).

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 esse valor é em geral maior do que aquele determinado pela técnica de RMN (CHIU, 2006; ALI, DIMICK 1994). 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).

Através dos termogramas de fusão de DSC (Figura 4.15) foi obtido o conteúdo de gordura sólida para os produtos interesterificados e os resultados são apresentados graficamente na Figura 4.16, em função da temperatura, comparativamente aos valores obtidos para a blenda não interesterificada (0h) e para gordura de leite.

Figura 4.16 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite.

Os resultados encontrados para conteúdo de gordura sólida indicam que tanto a gordura de leite, quanto a blenda não interesterificada e os produtos de reação apresentaram menores valores em função do aumento da temperatura de análise.

Características especiais das gorduras são obtidas em diferentes faixas de temperaturas (GRIMALDI; GONÇALVES; ESTEVES, 2000). Segundo alguns autores a espalhabilidade desejável ocorre dentro de uma faixa de sólidos de 15 a 30%, a chamada faixa de gorduras plásticas (O'BRIEN 2004; OTERO et al., 2006).

O conteúdo de gordura sólida entre 4 e 10°C determina a espalhabilidade do produto na temperatura de refrigeração. Um teor de sólidos não superior a 32% à temperatura de 10°C, é indicado para garantir boa espalhabilidade nesta temperatura. O teor de sólidos 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., 2009b). O conteúdo de gordura sólida 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 sólidos para propiciar estrutura cristalina adequada à temperatura ambiente, e baixo teor de sólidos em altas temperaturas, de modo que ocorra fusão fácil na boca (GRIMALDI et al., 2001; WOERFEL, 1995).

Para a gordura de leite foi observado alto teor de sólidos a 10°C (57%), resultado plenamente justificável em função do valor de consistência anteriormente quantificado da ordem de 6479 gf/cm² (Figura 4.1), sendo por isso, classificada segundo os critérios de Haighon (1959), como “muito dura” (Tabela 4.6). Esses elevados valores de sólidos e alta consistência podem ser creditados a alta quantidade de TAGs SSS+SSI presentes nesta gordura (79%, Tabela 4.4), que é responsável pela sua estrutura sólida devido aos seus pontos de fusão (RODRIGUES; GIOIELLI, 2003). A 20°C, a gordura de leite apresentou teor de sólido de 29%, tendo, portanto boa resistência a migração de óleo a temperatura ambiente. A 30°C, esta gordura apresentou 10% de sólidos, mostrando certa areosidade em temperaturas próximas à corporal (~35°C). Comparando-se o conteúdo de gordura sólida da gordura de leite ao da blenda não interesterificada, pode-se observar que apenas a adição de óleo de canola à gordura de leite, conduziu a diminuição deste parâmetro para todas as temperaturas de análise. Ainda assim, a blenda não interesterificada apresentou elevado teor de sólidos a 10°C (40%), o que justifica também sua elevada consistência (1315 gf/cm², Figura 4.1) a esta temperatura, e que pode ser correlacionada a presença de grande quantidade de TAGs SSS+SSI (53%, Tabela 4.9).

Após a reação observou-se que em temperaturas de análise abaixo de 15°C, os produtos apresentaram menor conteúdo de gordura sólida em comparação a blenda não interesterificada, enquanto que para temperaturas acima deste valor, o teor de sólidos foi maior para os produtos interesterificados. Isso ocorreu devido ao surgimento de novas espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS (Tabela 4.9) formados pelo rearranjo ocasionado pela interesterificação.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Rodrigues (2002) ao interesterificar quimicamente blendas de gordura de leite com óleo de milho, para o qual o rearranjo provocou diminuição no conteúdo de sólidos da gordura de leite abaixo de 15°C, mas provocou aumento de 15 a 20°C até fusão total. Estão também de acordo com os resultados relatados por Rousseau et al. (1996), que estudaram interesterificação química de blendas de gordura de leite e óleo de canola. Segundo Rodrigues (2002), a explicação pode residir no fato de que na gordura de leite natural há grande quantidade de triacilgliceróis que se fundem nesta faixa de temperatura (15 a 20°C), refletindo-se em uma linha mais inclinada no gráfico, enquanto que a interesterificação provoca efeito de diluição na gordura, fazendo com que a fusão ocorra mais lentamente neste intervalo refletindo, neste caso, em uma linha no gráfico menos inclinada.

De uma forma geral, verifica-se que de acordo com os critérios estabelecidos por O'Brien (2004), os produtos que apresentaram melhor plasticidade foram os obtidos em 6 e 12 h de reação, em função dos teores de sólido considerados ideais para um “*spread*” a 10°C (próximos de 30%), apresentarem boa resistência à migração do óleo a 20°C (sólidos > 10%) e teor de sólidos próximos a zero a 30°C (sólidos < 3%), mostrando serem, portanto adequados para aplicações nesta temperatura, já que neste caso não apresentam arenosidade na boca.

Como a consistência de gorduras é influenciada por seu conteúdo de gordura sólida (SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998), foi feita uma correlação entre estas duas propriedades, ambas determinadas a 10°C, para os produtos das reações de interesterificação da blenda binária (65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola) em função do tempo, e o resultados são mostrados na Figura 4.17, na qual verifica-se que há uma relação linear entre os dados de consistência e conteúdo de gordura sólida. Chiu (2006) observou em diferentes trabalhos que a relação entre consistência e conteúdo de gordura sólida é sempre direta, mas nem sempre linear.

Figura 4.17 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 50% de óleo de canola, nos diferentes tempos reacionais.

A partir da linearização dos dados experimentais foi possível obter a Equação 4.7, com R^2 0,8969, em que CGS = conteúdo de gordura sólida (%). De acordo com esta equação, produtos que apresentem valores de conteúdo de gordura sólida abaixo de 24 % proporcionarão consistência dentro da faixa de 200–800gf/cm², estabelecida por Haighton (1959) com espalhabilidade satisfatória para “*spreads*”.

$$\text{Consistência (gf/cm}^2\text{)} = -30,43 + 34,62 \cdot \text{CGS} \quad (4.7)$$

4.4. Interesterificação de blends binárias de gordura de leite com óleo de castanha-do-pará

Nesta etapa do trabalho, reações de interesterificação de blends binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física em SiO₂-PVA, foram realizadas segundo planejamento composto central com face centrada, visando-se avaliar o efeito da temperatura e do teor de gordura de leite do meio reacional no desempenho do processo. Nos ensaios efetuados foram quantificados a composição em ácidos graxos das blends reacionais, o teor de

ácidos graxos livres, a composição em triacilgliceróis (TAGs) e a consistência (10°C) dos produtos em função do tempo de reação, sendo os resultados obtidos apresentados e discutidos a seguir (seção 4.4.1). Para realização desta série de experimentos foram preparadas 11 bateladas de lipase imobilizada que apresentaram atividade hidrolítica média de 4144 ± 434 U/g e umidade de $9,03 \pm 1,20\%$, tomando por base os dados apresentados no APÊNDICE C (Tabela 3).

4.4.1. Influência da temperatura e do teor de gordura de leite em reações de interesterificação enzimática de blendas binárias de gordura de leite com óleo de castanha-do-pará

O perfil de formação de ácidos graxos livres das amostras retiradas do meio reacional das reações de interesterificação da gordura de leite com óleo de castanha-do-pará, mostrado na Figura 4.18, indica tendência de aumento do teor de ácido graxo até 24 h de reação, para todos os experimentos efetuados. Após este período, verifica-se pouca variação atingindo em 48 h, valores de ácidos graxos livres variando entre 3,77 a 10,76%. Os valores mais elevados foram obtidos para as reações conduzidas com blendas reacionais contendo 50 e 65% de gordura de leite, respectivamente. O menor valor foi obtido para o produto de reação da blenda que continha 80% de gordura (ensaio 1).

Figura 4.18 – Teor de ácidos graxos livres para as amostras retiradas do meio reacional nas reações de interesterificação de gordura de leite e óleo de canola realizadas nas seguintes condições: (—■—) 45°C/ blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 80:20; (—■—) 45°C/blenda 50:50; (—■—) 65°C/blenda 50:50; (—■—, —■—, —■—) 55°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 80:20; (—■—) 65°C/ blenda 65:35; (—■—) 55°C/blenda 50:50; (—■—) 45°C/blenda 65:35.

Estes resultados são comparáveis aos obtidos para os produtos resultantes da interesterificação das blendas de gordura de leite com óleo de canola, como anteriormente discutido na seção 4.3.1 (Figura 4.5).

A Tabela 4.15 apresenta a composição em ácidos graxos das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de castanha-do-pará empregadas nas reações de interesterificação. A adição do óleo de castanha-do-pará à gordura de leite promoveu aumento na quantidade de ácido graxo insaturado linoléico. As blendas contendo de 20% a 50% de óleo de castanha-do-pará apresentaram, 10,51% a 23,49% deste ácido graxo, respectivamente, em contraste a apenas 1,87 % da gordura de leite pura (Tabela 4.2).

Tabela 4.15 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas.

Ácidos Graxos		blenda 50:50*	blenda 65:35*	blenda 80:20*
butírico	C 4:0	1,73	2,24	2,76
capróico	C 6:0	1,51	1,96	2,41
caprílico	C 8:0	0,87	1,13	1,39
cáprico	C 10:0	1,65	2,15	2,65
láurico	C 12:0	1,79	2,30	2,81
mirístico	C 14:0	5,68	7,36	9,04
pentadecanóico	C 15:0	0,60	0,78	0,96
palmitico	C 16:0	22,25	24,46	26,67
palmitoléico	C 16:1	1,14	1,38	1,62
margárico	C 17:0	0,27	0,33	0,39
cis-10-heptadecenóico	C 17:1	0,39	0,49	0,59
esteárico	C 18:0	10,46	10,61	10,76
trans elaídico	C 18:1	1,39	1,81	2,23
oléico	C 18:1	25,57	24,58	23,58
trans t-linoléico	C 18:2	0,08	0,10	0,13
linoléico	C 18:2	23,49	17,00	10,51
trans t-linolênico	C 18:3	0,07	0,10	0,12
linolênico	C 18:3	0,18	0,21	0,24
octadecatetreenóico	C 18:4	0,42	0,55	0,67
araquídico	C 20:0	0,20	0,19	0,18
eicosenóico	C 20:1	0,10	0,11	0,12
behênico	C 22:0	0,07	0,08	0,08
erúcico	C 22:1	0,00	0,00	0,00
lignocérico	C 24:0	0,04	0,04	0,05
nervônico	C 24:1	0,03	0,04	0,05
Total		100,00	100,00	100,00
Saturados		47,14	53,64	60,15
Insaturados		52,86	46,36	39,85

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará.

A Tabela 4.16 apresenta a composição das blendas binárias contendo gordura de leite e óleo de castanha-do-pará e dos respectivos produtos interesterificados, segundo teores de triacilgliceróis dos tipos trissaturados (SSS), dissaturado-monoin saturados (SSI), di-insaturados-monossaturado (IIS) e tri-insaturados (III). Observa-se que quanto maior a quantidade de gordura de leite presente na blenda maior a quantidade de TAGs trissaturados (SSS). Da mesma forma, quanto maior a quantidade de óleo de castanha-do-pará na blenda, maior a quantidade de TAGs tri-insaturados (III).

Tabela 4.16 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica.

tipo de TAG	blenda 50:50*		blenda 65:35*		blenda 80:20*	
	NIE	EIE	NIE	EIE	NIE	EIE
SSS	17,98	10,46	22,98	15,43	27,98	21,73
SSI	41,27	37,52	38,14	38,02	35,01	37,2
IIS	15,98	37,26	20,76	36,58	25,55	34,77
III	24,78	14,76	18,11	9,96	11,45	6,31
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará; S = Saturado; I = Insaturado.
NIE = não interesterificado; EIE = enzimaticamente interesterificado.

Após a reação verifica-se que, para as blendas contendo 50:50, 65:35 e 80:20 em porcentagem mássica de gordura de leite: óleo de castanha-do-pará, respectivamente, houve redução de 42, 33 e 22%, respectivamente, da concentração dos TAGs SSS e redução de 40, 45 e 45%, respectivamente, da concentração dos TAGs III, com simultâneo aumento de 18, 16 e 11%, respectivamente, das espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS. Como já discutido anteriormente, a diminuição dos TAGs SSS e III, e a elevação da quantidade de espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS, obtida através da interesterificação enzimática, possibilita o aumento da funcionalidade tecnológica e melhora das propriedades sensoriais dos produtos, fazendo com que tenham maior potencial para serem aplicados como base em alimentos (RODRIGUES; GIOIELLI, 2003).

As Figuras 4.19 (a,b, c) mostram o perfil em TAGs, segundo número de carbonos, quantificado por cromatografia gasosa, para os produtos obtidos nas interesterificações de blendas binárias contendo 80:20, 65:35 e 50:50 em massa de gordura de leite: óleo de castanha-do-pará, respectivamente, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada, comparativamente à composição da gordura de leite e às composições de suas respectivas blendas reacionais não intereterificadas.

Figura 4.19 – Perfil de TAGs quanto ao número de carbonos para os produtos (48h) das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite:óleo de canola, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central. Na Figura Col: Colesterol e NIE: não interesterificada.

Observa-se que a adição do óleo de castanha-do-pará à gordura de leite, resultou na redução da concentração dos TAGs C_{30} – C_{50} , característicos da gordura de leite (Tabela 4.5), e no aumento da concentração dos TAGs C_{52} e C_{54} , característicos do óleo de castanha-do-pará (Tabela 4.5). Este efeito foi mais intenso com o aumento da proporção de óleo na blenda.

A interesterificação conduziu a mudança no perfil de TAGs da gordura de leite, sendo esta modificação diferente da obtida com a simples blenda. De forma geral, comparando-se a composição dos produtos interesterificados à composição das blendas não interesterificadas, pode-se notar que os produtos apresentaram diminuição no teor dos TAGs C_{34} – C_{38} e C_{54} , com simultâneo aumento no teor dos TAGs C_{24} – C_{32} e C_{44} – C_{50} . Estes resultados foram similares aos obtidos nos experimentos efetuados com a blenda binária de gordura de leite e óleo de canola, porém em diferentes proporções.

Para os produtos das blendas com óleo de canola não foram observadas diferenças acentuadas na composição em TAGs para reações realizadas sob diferentes temperaturas, enquanto que para os produtos provenientes das blendas com óleo de castanha-do-pará, esse comportamento só foi constatado para os produtos obtidos em reações conduzidas com blendas contendo 50:50. Os produtos das demais blendas (65:35 e 80:20) sofreram interferência mais acentuada com a variação da temperatura de incubação.

Para avaliar quantitativamente as mudanças ocorridas nas concentrações dos TAGs dos produtos obtidos, foi calculado o grau de interesterificação das amostras em 48 h de reação segundo Equação 3.1 e os resultados são apresentados na matriz experimental proposta (Tabela 4.17) juntamente com os valores de consistência.

Na Tabela 4.17 verifica-se que os valores de grau de interesterificação encontram-se na faixa de 12,27 a 19,67%, sendo o valor mais elevado constatado para o ensaio 11, realizado a 45°C, com uma blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% óleo de castanha-do-pará.

Com relação à consistência, os resultados variaram entre 353 e 4099 gf/cm², sendo o menor e maior resultado constatado para meios contendo 50% e 80% de gordura de leite, respectivamente. Comparando-se os valores de consistência dos produtos (Tabela 4.17) com os resultados obtidos para suas respectivas blendas reacionais (Tabela 4.18), é possível observar que houve aumento da consistência para os produtos provenientes das três blendas empregadas nas reações efetuadas a 45°C, sendo este crescente quanto maior a proporção de óleo na blenda. Isso pode ser devido a maior variação em TAGs também

verificada para os produtos obtidos a 45°C, conforme mencionado anteriormente (Figura 4.18). Os produtos obtidos a 55°C apresentaram variações pequenas de consistência (<10%) e os produtos obtidos a 65°C, em geral, mostraram redução da consistência, apenas para a blenda contendo maior proporção de óleo 50:50 a consistência do produto foi maior que para a blenda não interesterificada.

Tabela 4.17 – Matriz experimental com resultados de grau de interesterificação e consistência para os produtos obtidos em experimentos de interesterificação de blends binárias de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará, conduzidos de acordo com planejamento composto central com face centrada para análise da influência dos parâmetros teor de gordura de leite e temperatura de reação.

Ensaio	Valores codificados		Valores não codificados		Variáveis-resposta	
	X ₁	X ₂	T (°C)	Teor de gordura de leite (% m/m)	Grau de Interesterificação (GI) (%)*	Consistência (gf/cm ²)*
1	-	+	45	80	14,52	4099
2	+	+	65	80	16,04	2774
3	-	-	45	50	17,30	689
4	+	-	65	50	15,39	449
5	0	0	55	65	18,37	1727
6	0	0	55	65	15,49	1861
7	0	0	55	65	19,06	1478
8	0	+	55	80	12,27	3139
9	+	0	65	65	13,02	1103
10	0	-	55	50	17,94	353
11	-	0	45	65	19,67	2225

*Valores obtidos em 48h de reação.

Tabela 4.18 – Consistência das blends reacionais de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará não interesterificadas empregadas nas reações de interesterificação catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

blenda reacional	Consistência (gf/cm ²)
80:20*	3532
65:35*	1593
50:50*	385

* Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará.

Comparando os dados de consistência dos produtos (Tabela 4.17) aos critérios estabelecidos por Haighon (1959) (Tabela 4.6), observa-se que os produtos dos ensaios 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 11, cujas blends reacionais iniciais continham 80% e 65% de gordura de

leite foram classificados como “*muito duros*”, pois apresentaram consistência de 1103 a 4099 gf/cm². Esta elevada consistência pode ser explicada pelo fato de que mais da metade das espécies de TAGs presentes nestes produtos são SSS e SSI (56 % para os produtos da blenda 65:35, e 65% para os produtos da blenda 80:20) (Tabela 4.16), os quais possuem pontos de fusão entre 54 a 65°C e 27 a 42°C, respectivamente, e por isso, são responsáveis por uma estrutura mais firme a temperatura de refrigeração.

Com relação aos produtos provenientes da blenda 50:50, estes apresentaram valores de consistência de 352 a 689 gf/cm², dentro da faixa estabelecida por Haighon (1959) para produtos com satisfatória plasticidade, o que pode ser justificado por apresentaram quantidades quase equilibradas das espécies de TAGs responsáveis pela estrutura (SSS+SSI=46%) e responsáveis pela maciez (III+IIS=54%) do produto (Tabela 4.16).

Com auxílio do programa STATISTICA 5.0, os efeitos individuais e de interação dos fatores temperatura (X_1) e teor de gordura (X_2) foram analisados estatisticamente, considerando como variáveis resposta o grau de interesterificação e a consistência (Tabela 4.17). Os valores dos efeitos são dispostos na Tabela 4.19 juntamente com as respectivas estimativas de erro padrão, teste t de Student' e valores de p.

Tabela 4.19 – Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste “t” de Student e valores de *p* para grau de interesterificação e a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blends binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas segundo planejamento composto central com face centrada.

Variável	Fatores	Efeitos	Erro-padrão	Valores de t	P
GI	Média	17,22	1,27	13,55	0,0000*
	X_1	-2,35	2,02	-1,16	0,2982
	X_1^2	-0,48	3,11	-0,15	0,8829
	X_2	-2,60	2,02	-1,29	0,2548
	X_2^2	-2,96	3,11	-0,95	0,3849
	$X_1 \cdot X_2$	1,71	2,48	0,69	0,5194
Consistência	Média	1629,42	93,53	17,42	0,0000*
	X_1	-895,67	148,86	-6,02	0,0018*
	X_1^2	246,90	229,09	1,08	0,3304
	X_2	2840,33	148,86	19,08	0,0000*
	X_2^2	410,89	229,09	1,79	0,1329
	$X_1 \cdot X_2$	-542,50	182,32	-2,98	0,0310*

* $p < 0,05$: significativo ao nível de confiança de 95%;

X_1 : Temperatura; X_2 : Teor de gordura de leite (%); GI : Grau de interesterificação.

Conforme mostrado na Tabela 4.19 para o grau de interesterificação, não foi observada influência significativa para nenhum dos fatores avaliados.

Verifica-se ainda que tanto o efeito principal referente a temperatura, quanto o efeito principal referente ao teor de gordura, e o efeito de interação entre estes dois fatores, influenciaram significativamente a consistência dos produtos interesterificados a um nível de confiança de 95%. A temperatura apresentou efeito negativo (-895,67) o que significa que quanto maior, mais baixa será a consistência. O teor de gordura, apresentou efeito positivo (2840,33), ou seja, ao ser elevado o valor da variável-resposta também aumentará. Como o efeito quadrático do teor de gordura foi significativo a um nível de confiança de 85% (Tabela 4.18), este também foi considerado no modelo proposto, bem como na análise de variância deste modelo. A interação apresentou efeito negativo (-542,50) na consistência dos produtos.

4.4.2. Modelo empírico para consistência

Com o objetivo de otimizar as reações de interesterificação da blenda binária de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, os valores de consistência (Tabela 4.17) foram ajustados por regressão múltipla a um modelo empírico representado pela Equação 4.8. O modelo foi composto considerando-se a influência do efeito principal da temperatura, a influência tanto do efeito principal quanto quadrático no caso do teor de gordura de leite, e a influência da interação entre estes dois fatores (temperatura e teor de gordura), tendo em vista que apresentaram efeitos significativos sobre a variável-resposta (Tabela 4.19). Como o efeito quadrático da temperatura não foi estatisticamente significativo sobre a consistência, este termo foi desconsiderado na composição do modelo (Tabela 4.19).

$$Y = 1678,80 - 447,83 \cdot X_1 + 1420,17 \cdot X_2 + 238,37 \cdot X_2^2 - 271,27 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.8)$$

Em que: Y é a variável-resposta consistência; X_1 representa o valor codificado para temperatura; X_2 representa o valor codificado para o teor de gordura de leite.

Para testar a validade do modelo proposto foi realizada a análise de variância com auxílio do programa Design – Expert (versão 6.0.6), a qual é apresentada na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Análise de Variância (ANOVA) para o modelo ajustado representando a consistência dos produtos das reações de interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/ óleo de castanha-do-pará, catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas de acordo com planejamento composto central com face centrada.

	Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Consistência	Modelo	$1,38 \times 10^7$	4	$3,44 \times 10^6$	100,73	< 0,0001*
	X ₁	$1,20 \times 10^6$	1	$1,20 \times 10^6$	35,25	0,0010*
	X ₂	$1,21 \times 10^7$	1	$1,21 \times 10^7$	354,52	< 0,0001*
	X ₂ ²	$1,55 \times 10^5$	1	$1,55 \times 10^5$	4,54	0,0771**
	X ₁ ·X ₂	$2,94 \times 10^5$	1	$2,94 \times 10^5$	8,62	0,0261*
	Erro residual	$2,05 \times 10^5$	6	$3,41 \times 10^4$		
	Falta de ajuste	$1,29 \times 10^5$	4	$3,23 \times 10^4$	0,85	0,6017
	Erro puro	$7,55 \times 10^4$	2	$3,78 \times 10^4$	100,73	< 0,0001*
	R²	0,9853				

*p<0,05: significativo ao nível de confiança de 95%;

**p<0,10: significativo ao nível de confiança de 90%;

X₁: temperatura codificada; X₂: teor de gordura de leite codificado.

É possível observar que o modelo proposto para consistência foi estatisticamente significativo, sem falta de ajuste, ao nível de confiança de 95%, e que mais de 98% da variabilidade experimental pode ser explicada por este modelo ($R^2 = 0,9853$), sendo portanto validado de acordo com os critérios de Moldaviski e Cohen (1996) (Tabela 4.13). Os resultados preditos por este modelo podem ser representados pela superfície de resposta mostrada na Figura 4.20.

Figura 4.20 – Superfície de resposta para consistência dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite/óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

Verifica-se que produtos com valores mais elevados de consistência (região demarcada em vermelho escuro) podem ser obtidos em reações provenientes de meios com maior proporção de gordura de leite e menor temperatura, enquanto que os valores mais baixos de consistência podem ser obtidos para reações conduzidas com blendas contendo baixos teores de gordura de leite e incubadas em temperaturas mais elevadas.

Para melhor visualização das condições reacionais que podem resultar na obtenção de produtos com consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) para “spreads” com espalhabilidade satisfatória (200 a 8000 gf/cm²) foi construído o gráfico de contorno como mostrado na Figura 4.21.

Figura 4.21 – Gráfico de contorno para consistência dos produtos da interesterificação de blendas binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA.

Observa-se que produtos com consistência nesta faixa (200 a 8000 gf/cm²) podem ser obtidos para todas as condições delimitadas pela região marcada em amarelo, ou seja, produtos com consistência satisfatória podem ser obtidos sob qualquer uma das temperaturas reacionais estudadas, numa proporção máxima de gordura de leite na blenda de 59%.

Para confirmar o modelo obtido, dentro da faixa indicada pelo gráfico de contorno, foram selecionadas as seguintes condições: blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola e temperatura de 45°C (mais baixa dentre as estudadas). Deve ser destacado que o uso de temperaturas mais elevadas demanda custos energéticos mais elevados e pode afetar negativamente o aroma e sabor da manteiga, bem como a atividade catalítica da enzima em usos prolongados.

Nas condições selecionadas para a confirmação do modelo (blenda 50:50, temperatura de 45°C), foram também monitoradas as variáveis: teor de ácidos graxos, índice de peróxido, composição em TAGs, grau de interesterificação, consistência e conteúdo de gordura sólida dos produtos a cada 6h e os resultados são apresentados na seção 4.4.3. A caracterização do derivado imobilizado utilizado nesta reação com relação à umidade, atividade hidrolítica (em azeite de oliva) e rendimento de imobilização encontram-se no APÊNDICE C (Tabela 4).

4.4.3. Confirmação do modelo obtido e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de castanha-do-pará ao longo do tempo

A Figura 4.22 mostra o teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará. Verifica-se que houve aumento no teor de ácidos graxos livres nas primeiras 6h de reação, alcançando valores da ordem de 7,19 % seguido de uma estabilização com oscilação na faixa de 5,20 a 8,39%. Estes resultados são similares aos obtidos para produtos da interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola.

A Figura 4.23 dispõe graficamente os resultados dos índices de peróxidos nas amostras da reação de interesterificação da blenda (50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará) ao longo do tempo. Os resultados obtidos variaram de 1,86 a 4,80 meq/kg e foram mais elevados que os obtidos para os produtos da interesterificação da blenda binária (65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola). Esse comportamento pode ser creditado ao índice de peróxido da amostra de óleo de castanha-do-pará que foi mais elevado que o índice determinado para o óleo de canola. Estes resultados também se apresentam acima do valor estabelecido para a manteiga de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1996), a qual admite valor máximo de 1 meq/kg.

Figura 4.22 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

Figura 4.23 – Índice de peróxido em função do tempo dos produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

Observa-se, no entanto, redução dos valores de peróxidos ao longo do tempo. Giet et al. (2009) mostraram que os produtos da interesterificação enzimática de gordura de leite com óleo vegetal podem conter menor quantidade de peróxidos que as blends reacionais não interesterificadas. Estes autores explicam que isso ocorre devido a uma possível acilação dos hidroperóxidos por ácidos graxos livres, catalisada pela lipase quando submetidas a determinadas temperaturas por longos períodos.

A Figura 4.24 apresenta o perfil em TAGs quanto ao número de carbonos obtido por cromatografia gasosa, ao longo tempo para os produtos interesterificados enzimaticamente. É possível observar que os lipídeos estruturados obtidos ao longo do tempo de reação apresentaram redução na concentração dos TAGs C_{34} - C_{38} e C_{54} e aumento no teor dos TAGs C_{46} - C_{50} .

Para melhor quantificar estas modificações foi calculado o grau de interesterificação (Equação 3.1) e os resultados ao longo do tempo são mostrados na Figura 4.25.

Verifica-se elevação mais acentuada do grau de interesterificação até 6 h de reação (em torno de 11%), sendo que após este tempo este sofre pequenas variações atingindo um máximo (em torno de 15%) em 48 h. Este resultado reflete as maiores variações ocorridas na composição em TAGs, pois observa-se na Figura 4.24 queda mais acentuada dos TAGs C_{54} , com simultâneo aumento da concentração dos TAGs C_{48} e C_{50} , nas primeiras 6h de reação.

A variação da consistência dos produtos da interesterificação da blenda binária (50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará) em função do tempo, mostrada na Figura 4.26, indica uma variação acentuada dos valores de consistência dos produtos (84 até cerca de 631 gf/cm²). Verifica-se ainda uma tendência inicial de redução da consistência nas primeiras 12 h de reação, seguida de um comportamento inverso alcançando valor adequado ao final da reação. Este comportamento difere daquele obtido para os produtos provenientes da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola (Figura 4.13), para os quais a consistência diminuiu com o tempo de processo até 12 h, quando a reação parece atingir um equilíbrio, não havendo praticamente mais alterações na consistência dos produtos após este tempo.

Figura 4.24 – Concentração de TAGs em função do tempo para os produtos da reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA conduzida sob temperatura de 45°C. Na figura Col: Colesterol.

Figura 4.25 – Grau de interesterificação em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

Figura 4.26 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

Apenas os produtos obtidos a partir de 18h de reação apresentaram valores de consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) (200 a 800gf/cm²) para uma gordura com satisfatória espalhabilidade (Tabela 4.6). Verifica-se ainda que o resultado de

consistência obtido em 48 h de reação, 631gf/cm², se aproxima do valor predito pelo modelo, 585gf/cm² (Equação 4.8), e está dentro da faixa prevista (286,27 – 884,31gf/cm²) para um intervalo de confiança de 95%.

Os resultados permitiram a obtenção de uma correlação entre os dados de grau de interesterificação e consistência, como mostrada na Figura 4.27.

Figura 4.27 – Relação linear entre os valores de grau de interesterificação e consistência dos produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais.

A análise da Figura 4.27 mostra uma correlação linear entre a consistência e o grau de interesterificação. A partir da linearização dos dados experimentais foi possível obter a Equação 4.9, com $R^2 = 0,9652$, em que GI = grau de interesterificação (%). De acordo com o comportamento descrito por esta equação, produtos que apresentem valores de grau de interesterificação acima de 10% terão consistência dentro da faixa de 200–800 gf/cm².

$$\text{Consistência (gf/cm}^2\text{)} = -572,41 + 78,19 \cdot \text{GI} \quad (4.9)$$

Além disso, a equação mostra que a consistência dos produtos é diretamente proporcional ao grau de interesterificação. Este comportamento foi diferente do obtido para os produtos provenientes da blenda contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola, no qual a consistência foi inversamente proporcional ao grau de interesterificação ao longo do processo.

Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que, apesar dos produtos obtidos em ambos os processos apresentarem ao final da completa interesterificação praticamente as mesmas quantidades de TAGs quanto ao grau de saturação (SSS=11%; SSI=37%; IIS=37,5%; III=15%) (Tabelas 4.9 e 4.16), o processo de modificação foi diferente, tendo em vista que se partiu de blends contendo diferentes tipos de TAGs. Na blenda com óleo de castanha-do-pará o ácido linoléico é o ácido graxo insaturado presente em maior quantidade, enquanto que para blenda com óleo de canola entre os ácidos graxos insaturados prevalece o oléico. Em relação aos saturados, na blenda que contém óleo de canola, há maior quantidade de gordura de leite, e por isso, mais ácidos graxos saturados de cadeia curta e média, enquanto que para a blenda contendo óleo de castanha-do-pará existem também os ácidos graxos saturados de cadeia longa provenientes deste óleo.

Uma possível explicação associada a essas diferenças é que os processos podem ter apresentado diferentes velocidades de reação, ocasionadas pela especificidade da lipase por determinados tipos de ácidos graxos, tendo em vista que sua especificidade por ácidos graxos insaturados aumenta com o aumento do número de insaturações presentes nas matérias-primas (PINSIRODOM; PARKIN, 2003). Sendo assim, a lipase pode ter atuado de diferentes formas na quebra e reesterificação destes ácidos graxos nas moléculas dos TAGs. Isto pode explicar também porque, para as blends binárias com o óleo de castanha-do-pará, a consistência diminuiu no início do processo em relação à blenda inicial. Neste caso, além da presença de subprodutos do processo, como monoacilgliceróis e diacilgliceróis, a menor consistência estaria associada a dificuldades de empacotamento das moléculas de TAGs contendo maior quantidade de resíduos de ácido linoléico oriundos do óleo de castanha-do-pará. Ao longo do processo, no entanto, o aumento na consistência pode ser devido à formação dos novos TAGs, os quais incorporaram os ácidos graxos do óleo de castanha-do-pará, mais saturados que os do óleo de canola e de maior massa molar média em comparação aos ácidos graxos saturados presentes na gordura de leite. Desta forma, os TAGs formados ao longo do processo, provavelmente seriam mais homogêneos

e compatíveis, e por isso se intersolubilizam, podendo interagir melhor entre si e constituir uma estrutura cada vez mais firme. Nos TAGS presentes na blenda contendo óleo de canola a maior parte dos ácidos graxos saturados presentes são de cadeia curta provenientes da gordura de leite, havendo maior dificuldade de empacotamento das moléculas e consequentemente o produto se torna menos consistente.

A Figura 4.28a apresenta o termograma de fusão, em função da temperatura, obtido por DSC, para a gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, utilizados como matérias-primas, comparativamente ao termograma obtido para a blenda reacional contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará antes da interesterificação. A Figura 4.28b mostra o efeito da reação enzimática sobre o perfil térmico dos produtos ao longo do tempo de reação.

Verifica-se que o óleo de castanha-do-pará possui 4 eventos endotérmicos. O primeiro a $-35,7^{\circ}\text{C}$, o segundo a -30°C e o terceiro correspondendo ao pico principal, o Pico “A”, a -19°C , sendo provavelmente estes três eventos correspondendo às espécies de TAGs III e IIS (Tabela 4.4) presentes em maior quantidade neste óleo. O quarto evento endotérmico ocorreu por volta de 6°C , correspondendo provavelmente às espécies de TAGs S_2I e SSS . A gordura de leite apresentou maior faixa de fusão (de -35°C a 36°C), que o óleo de castanha-do-pará (-42°C a 10°C), o que pode ser diretamente relacionada a mais complexa composição em TAGs da gordura comparativamente a este óleo.

Para blenda não interesterificada observa-se a presença de um evento endotérmico em comparação ao termograma da gordura de leite, na região do pico “A”, característico do óleo de castanha-do-pará, estando presentes também os picos “B” e “C”, característicos da gordura. É possível verificar ainda que apenas a adição de óleo à gordura conduziu à diminuição da amplitude dos picos “A”, “B” e “C”.

A análise dos termogramas presentes na Figura 4.28b revela que, após a reação, houve deslocamento dos picos endotérmicos “B” e “C” (característico da gordura de leite) para temperaturas mais baixas e aumento da amplitude do pico “C” até 18 h de reação. Após 24 h de reação, observa-se um deslocamento do pico “C” para temperaturas mais elevadas e sua divisão em dois novos picos, além do aumento da amplitude do pico “A”, indicando que os produtos obtidos a partir deste tempo apresentaram mudanças notáveis em seu perfil de fusão, em comparação a simples misturas das matérias-primas, refletindo as alterações de composição ocorridas após a reação.

a

b

Figura 4.28 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de castanha-do-pará e blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*.

A análise dos termogramas possibilita ainda observar que, apesar dos produtos obtidos em 24, 36 e 48 h de reação terem apresentado consistências semelhantes à consistência da blenda não interesterificada, e de não ter havido diferenças perceptíveis a olho nu entre o estado físico destas amostras, as amostras interesterificadas apresentaram uma faixa de fusão maior do que a da simples mistura (0h), o que pode resultar em maior funcionalidade, e, portanto, maior potencialidade de aplicação destes produtos, mostrando a vantagem de se obter um produto interesterificado em comparação à simples mistura das matérias-primas.

Através dos termogramas de fusão de DSC (Figura 4.28), foi obtido o conteúdo de gordura sólida para os produtos interesterificados e os resultados são apresentados graficamente na Figura 4.29, em função da temperatura, comparativamente aos valores obtidos para a blenda não interesterificada (0h) e para gordura de leite.

Os resultados encontrados para conteúdo de gordura sólida indicam que tanto a gordura de leite, quanto a blenda não interesterificada e os produtos de reação, mostraram menores conteúdos em função do aumento da temperatura de análise.

Figura 4.29 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite.

Comparando-se os conteúdos de gordura sólida da gordura de leite aos da blenda não interesterificada, pode-se observar que o acréscimo do óleo de castanha-do-pará à gordura de leite resultou na redução deste parâmetro para todas as temperaturas de análise. Ainda assim, a blenda não interesterificada apresentou elevado teor de sólidos a temperatura de 10°C (54%), o que pode ser correlacionada a presença de grande quantidade de TAGs SSS+SSI (59%, Tabela 4.16).

Após a reação, observou-se que, a 10°C, dentre os produtos obtidos, o de 48 h apresentou conteúdo de gordura sólida acima do valor de sólidos da blenda não interesterificada (NIE) (0 h). Estes resultados estão em acordo com os resultados de consistência, já que dentre os produtos obtidos ao longo tempo, apenas o produto de 48 h de processo apresentou consistência superior a blenda NIE (Figura 4.26). Em 15°C somente os produtos de 12 e 18 h apresentaram conteúdo de gordura sólida inferior da blenda NIE. A partir de 20°C até a completa fusão, todos os produtos apresentaram valores superiores ao da blenda NIE.

Pelos valores de conteúdo de gordura sólida, apresentados na Figura 4.29, observa-se que, dentre os produtos obtidos ao longo do tempo, segundo os critérios apresentados por O'Brien (2004), os que apresentaram melhor plasticidade foram os obtidos com 12 e 18 h de reação, em função dos teores de sólido ideais para um “*spread*” a 10°C (próximos de 30%), boa resistência a migração do óleo a 20°C (sólidos > 10%) e teor de sólidos próximos a zero a 30°C (sólidos < 3%), mostrando serem, portanto adequados para aplicações nesta temperatura, já que neste caso não devem apresentar arenosidade na boca. Porém, o produto obtido em 12 h reação apresentou consistência muito baixa a 10°C (<200gf/cm²). Para o produto obtido em 18h, quando mantido em temperatura ambiente (~25°C) foi visualmente perceptível a migração do óleo, além de ter apresentado consistência a 10°C muito próxima do limite inferior da faixa determinada para um “*spread*” com boa espalhabilidade (~200 gf/cm²).

Neste sentido, o produto que apresentou consistência dentro da faixa indicada com boa espalhabilidade (entre 200 a 800gf/cm²), a 10°C, e que não apresentou visualmente migração de óleo quando mantido em temperatura ambiente (~25°C), foi o obtido em 24 h de reação (Figura 4.26), apesar de ter apresentado conteúdo de gordura sólida, segundo os critérios de O'Brien (2004) elevado a 10°C (44%). Isso pode ser explicado pelo fato de que o conteúdo de gordura sólida não é a única variável que influencia a consistência de uma gordura, pois, além da relação entre a quantidade de sólido e líquido presentes na gordura,

o caráter cristalino da fase sólida presente também é uma variável de fundamental importância na determinação da consistência do produto (SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998; RIBEIRO et al. 2009f).

Verifica-se que a curva de conteúdo de gordura sólida para os produtos obtidos a partir de 24 h, não apresenta uma inclinação tão acentuada quanto a curva da mistura (0 h), e esse comportamento pode ampliar a faixa de fusão do produto, possibilitando o aumento do conteúdo de gordura sólida em temperaturas mais elevadas, como a 20°C, favorecendo outras propriedades além da consistência, como a menor exsudação do óleo, por exemplo. Cabe ainda observar que, embora a consistência do produto obtido em 24 h seja semelhante à da mistura, o valor de sólidos (a 10°C) deste produto (44%) apesar de considerado elevado segundo os critérios de O'Brien (2004), é 10% mais baixo que valor de sólidos da mistura (0 h) (54%), o que sugere que a reação também resultou em redução desta propriedade.

A Figura 4.30 mostra a correlação entre os dados de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará em função do tempo.

Figura 4.30 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais.

A partir da linearização dos dados experimentais dispostos na Figura 4.30, foi possível obter a Equação 4.10, com $R^2=0,9511$, em que CGS = conteúdo de gordura sólida (%). De acordo com esta equação, produtos que apresentem valores de conteúdo de gordura sólida acima de 30% proporcionarão consistência dentro da faixa de 200–800 gf/cm². Este resultado é superior ao obtido para os produtos provenientes da blenda de contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola, o que pode estar relacionado à formação de diferentes tipos de cristais em cada caso.

$$\text{Consistência (gf/cm}^2\text{)} = -208,52 + 13,48 \cdot \text{CGS} \quad (4.10)$$

4.5. Interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará

Nesta etapa do trabalho, reações de interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite e óleos de canola e castanha-do-pará, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada por adsorção física em SiO₂-PVA, foram realizadas segundo planejamento estatístico de misturas, visando-se avaliar o efeito do teor de gordura de leite e dos óleos no meio reacional no desempenho do processo e objetivando-se equilibrar as características positivas de cada componente. Para tanto, foram acompanhados a composição em ácidos graxos das blendas reacionais, o teor de ácidos graxos livres, a composição em triacilgliceróis (TAGs) quanto ao grau de saturação e a consistência (10°C) dos produtos, sendo os resultados obtidos apresentados e discutidos a seguir (seção 4.5.1). A caracterização dos derivados imobilizados utilizados nestas reações com relação à umidade e atividade hidrolítica (em azeite de oliva) encontra-se no APÊNDICE C (Tabela 5). O método selecionado para imobilização da lipase apresentou boa reprodutibilidade, fornecendo derivados de lipase com atividade hidrolítica média de 4534 ± 288 U/g e teor de água na faixa requerida ($8,13 \pm 1,88$ %).

4.5.1. Influência do teor de gordura de leite e óleos de canola e castanha-do-pará em reações de interesterificação enzimática de blendas ternárias

A Figura 4.31 mostra o teor de ácidos graxos livres das amostras retiradas do meio reacional das reações de interesterificação de blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará.

Observa-se tendência de aumento deste teor até 8 h de reação em todos os ensaios, sendo que após este tempo pode-se notar pouca variação nos valores obtidos para todas as reações estudadas. Os maiores teores de ácidos graxos livres foram obtidos para as reações cujas blendas reacionais continham 83:0:17 e 58:33:8 de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, respectivamente. O menor valor foi obtido para o produto de reação da blenda que continha 67:33:0 de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, respectivamente. As demais reações apresentaram teores de ácidos graxos livres intermediários aos valores obtidos para os experimentos citados. Os produtos apresentaram de 5,18 até 16,42%, para as amostras retiradas em 24 h de reação.

Figura 4.31 – Teor de ácidos graxos livres para as amostras retiradas do meio reacional nas reações de interesterificação de blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará nas seguintes proporções: 100:0:0 (—■—); 83:0:17 (—■—); 83:8:8 (—■—); 83:17:0 (—■—); 67:0:33 (—■—); 67:17:17 (—■—); 67:33:0 (—■—); 58:8:33 (—■—); 58:33:8 (—■—); 50:0:50 (—■—); 50:17:33 (—■—); 50:33:17 (—■—); 50:50:0 (—■—) (—■—).

A Tabela 4.21 apresenta a composição em ácidos graxos das blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará empregadas nas reações de interesterificação. Essa composição foi obtida por média ponderada com base nos dados da Tabela 4.2. Observa-se que as quantidades dos três maiores ácidos graxos saturados, ou seja, mirístico, palmítico e esteárico, são diretamente proporcionais à quantidade de gordura de leite (11,28, 29,61 e 10,96%, respectivamente, para a blenda contendo 100% de gordura) e inversamente proporcionais à quantidade de óleo de canola presentes na blenda (5,69, 17,42 e 6,78%, respectivamente, para a blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola). Para as blendas contendo óleo de canola observa-se que a adição deste óleo à gordura de leite promoveu aumento diretamente proporcional nas quantidades de ácidos graxos oléico e linolênico (40,96 e 4,06%, respectivamente, para blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola), enquanto que para as blendas contendo óleo de castanha-do-pará, foi possível notar que o acréscimo deste óleo à gordura de leite promoveu aumento, também diretamente proporcional, na quantidade de ácido graxo linoléico (23,49% para blenda contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará).

A Tabela 4.22 apresenta a composição das blendas ternárias, contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, empregadas nas reações de interesterificação e dos respectivos produtos interesterificados, segundo teores de triacilgliceróis dos tipos tri-saturados (SSS), dissaturado-monoin saturados (SSI), di-insaturados-monossaturado (IIS) e tri-insaturados (III). Observa-se que quanto maior a quantidade de gordura de leite presente na blenda maior a quantidade de TAGs tri-saturados (SSS). Da mesma forma, quanto maior a quantidade de óleo de canola na blenda, maior a quantidade de TAGs tri-insaturados (III).

Na Tabela 4.22 é possível notar que, após a reação, para a blenda contendo 100% de gordura de leite as variações nas concentrações dos TAGs quanto ao grau de saturação foram mínimas (<20%).

Depois da interesterificação, as maiores reduções nas concentrações de TAGs SSS, 66%, 59%, 58% e 54%, ocorreram nas blendas contendo 50:50:0, 67:33:0, 50:33:17 e 58:33:8 em porcentagem mássica de (gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará) respectivamente, ou seja, nas blendas que continha maiores quantidades de óleo de canola e menores quantidades de óleo de castanha-do-pará.

Tabela 4.21 – Composição em ácidos graxos (% molar) das blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas.

Ácidos Graxos		blendas*												
		100:0:0	83:0:17	83:8:8	83:17:0	67:0:33	67:17:17	67:33:0	58:08:33	58:33:08	50:0:50	50:17:33	50:33:17	50:50:0
butírico	C 4:0	3,45	2,86	2,86	2,86	2,31	2,31	2,31	2,00	2,00	1,73	1,73	1,73	1,73
capróico	C 6:0	3,02	2,50	2,50	2,50	2,02	2,02	2,02	1,75	1,75	1,51	1,51	1,51	1,51
caprílico	C 8:0	1,73	1,44	1,44	1,44	1,16	1,16	1,16	1,01	1,01	0,87	0,87	0,87	0,87
cáprico	C 10:0	3,31	2,75	2,75	2,75	2,22	2,22	2,22	1,92	1,92	1,65	1,65	1,65	1,65
láurico	C 12:0	3,49	2,91	2,91	2,90	2,37	2,36	2,37	2,06	2,04	1,79	1,78	1,77	1,77
mirístico	C 14:0	11,28	9,38	9,38	9,38	7,58	7,59	7,60	6,58	6,58	5,68	5,68	5,69	5,69
pentadecanóico	C 15:0	1,20	1,00	1,00	1,00	0,80	0,81	0,82	0,70	0,71	0,60	0,61	0,61	0,62
palmitico	C 16:0	29,61	27,11	26,19	25,47	24,76	23,26	24,10	22,51	20,09	22,25	20,61	19,06	17,42
palmitoléico	C 16:1	1,94	1,67	1,66	1,65	1,41	1,40	1,45	1,26	1,24	1,14	1,13	1,12	1,11
margárico	C 17:0	0,46	0,40	0,40	0,40	0,34	0,34	0,35	0,30	0,30	0,27	0,27	0,27	0,26
<i>cis</i> -10-heptadecenoico	C 17:1	0,73	0,61	0,62	0,62	0,50	0,51	0,52	0,44	0,45	0,39	0,39	0,39	0,40
esteárico	C 18:0	10,96	10,79	10,10	9,54	10,63	9,48	9,90	9,85	8,01	10,46	9,21	8,03	6,78
<i>trans</i> eláidico	C 18:1	2,78	2,31	2,31	2,31	1,87	1,87	1,87	1,61	1,61	1,39	1,39	1,39	1,39
oléico	C 18:1	22,25	23,38	25,56	28,62	24,45	29,97	39,51	27,22	34,91	25,57	30,81	35,73	40,96
<i>trans</i> t-linoléico	C 18:2	0,16	0,13	0,13	0,13	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08
linoléico	C 18:2	1,87	9,22	6,87	5,19	16,13	12,56	15,99	17,68	11,76	23,49	19,46	15,67	11,64
<i>trans</i> t-linolênico	C 18:3	0,15	0,12	0,16	0,19	0,10	0,17	0,23	0,12	0,22	0,07	0,14	0,21	0,28
linolênico	C 18:3	0,28	0,25	0,86	1,56	0,22	1,53	2,79	0,82	2,75	0,18	1,50	2,74	4,06
octadecatetreenoico	C 18:4	0,84	0,70	0,70	0,70	0,56	0,56	0,56	0,49	0,49	0,42	0,42	0,42	0,42
araquídico	C 20:0	0,16	0,17	0,20	0,24	0,19	0,25	0,36	0,22	0,32	0,20	0,27	0,33	0,39
eicosenoico	C 20:1	0,13	0,12	0,19	0,27	0,11	0,26	0,40	0,17	0,39	0,10	0,24	0,38	0,53
behênico	C 22:0	0,09	0,09	0,11	0,13	0,08	0,13	0,18	0,10	0,17	0,07	0,12	0,17	0,21
erúico	C 22:1	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,03	0,01	0,03	0,00	0,01	0,03	0,04
lignocérico	C 24:0	0,06	0,05	0,06	0,07	0,04	0,07	0,09	0,05	0,09	0,04	0,06	0,08	0,11
nervônico	C 24:1	0,06	0,05	0,06	0,07	0,04	0,06	0,08	0,04	0,07	0,03	0,05	0,07	0,09
Total		100,00	100,00	99,00	100,00	100,00	101,00	117,00	99,00	99,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Saturados		68,82	61,45	59,89	58,68	54,51	52,00	53,47	49,05	44,99	47,14	44,38	41,77	39,01
Insaturados		31,18	38,55	39,11	41,32	45,49	49,00	63,53	49,95	54,01	52,86	55,62	58,23	60,99

*Proporção mássica (gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará).

Tabela 4.22 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para as blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica.

		tipo de TAG			
		SSS	SSI	SII	III
100:0:0	NIE	34,65	44,24	18,55	2,56
	EIE	32,46	44,51	20,07	2,97
83:0:17	NIE	28,98	39,37	21,53	10,11
	EIE	23,16	43,72	27,41	5,71
83:8:8	NIE	28,87	38,04	19,70	12,39
	EIE	22,10	43,42	28,34	6,14
83:17:0	NIE	28,76	36,88	18,42	15,95
	EIE	20,18	42,73	30,07	7,03
67:0:33	NIE	23,65	34,79	24,33	17,22
	EIE	16,19	40,55	33,84	9,41
67:17:17	NIE	23,44	32,45	21,58	23,53
	EIE	13,65	38,58	36,35	11,42
67:33:0	NIE	23,22	32,60	24,43	36,54
	EIE	9,54	34,03	40,43	16,00
58:08:33	NIE	20,53	30,88	24,09	23,50
	EIE	12,16	37,16	37,84	12,84
58:33:08	NIE	20,20	27,21	19,51	32,08
	EIE	9,38	33,80	40,58	16,24
50:0:50	NIE	17,98	29,92	27,32	24,78
	EIE	10,46	35,25	39,53	14,76
50:17:33	NIE	17,76	27,42	24,20	30,61
	EIE	8,73	32,87	41,21	17,20
50:33:17	NIE	17,55	25,07	21,28	36,10
	EIE	7,28	30,49	42,51	19,72
50:50:0	NIE	17,33	22,58	18,16	41,93
	EIE	5,93	27,85	43,56	22,67

*Proporção mássica (gordura de leite: óleo de castanha-do-pará); S = Saturado; I = Insaturado.
NIE = não interesterificado; EIE = enzimaticamente interesterificado.

Com relação à presença dos TAGs III, observou-se que após a reação as reduções mais acentuadas, ou seja, 56%, 56% e 52%, aconteceram para as blendas contendo 67:33:0, 83:17:0 e 67:17:17 em porcentagem mássica de (gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará) respectivamente, correspondendo às blendas que apresentavam as mais elevadas proporções de gordura de leite e mais baixas proporções de óleo de castanha-do-pará.

A maior formação de espécies intermediárias SSI e IIS, que pode ser associada ao aumento da funcionalidade tecnológica e melhora das propriedades sensoriais dos produtos, foram de 75%, 59% e 58%, valores observados para os produtos provenientes

das blendas com 50:50:0, 58:33:8 e 50:33:17 em porcentagem mássica de gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará, respectivamente, ou seja, nos produtos das blendas que continham as concentrações mais baixas de gordura de leite e mais elevadas de óleo de canola.

A Tabela 4.23 apresenta a consistência das blendas e dos produtos interesterificados, sob temperatura de 10°C.

Tabela 4.23 – Consistência (10°C) para as blendas ternárias de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará não interesterificadas (NIE) e para seus respectivos produtos interesterificados (EIE) obtidos nos experimentos conduzidos segundo planejamento estatístico de misturas.

Ensaio	Teor (% m/m)			Consistência (gf/cm ²)	
	gordura de leite	óleo de canola	óleo de castanha-do-pará	blenda NIE	produto* EIE
1	50	50	0	453,72	74,14
2	67	0	33	2423,70	1248,18
3	100	0	0	7183,63	6770,43
4	58	8	33	2022,77	1234,44
5	83	8	8	4550,26	2443,57
6	100	0	0	6140,96	5894,52
7	83	0	17	5868,43	3770,73
8	58	33	8	1934,10	420,51
9	50	33	17	349,35	99,64
10	67	17	17	2601,34	1198,36
11	50	0	50	383,74	196,32
12	50	17	33	458,47	175,76
13	67	0	33	3244,26	1392,8
14	50	50	0	581,83	56,34
15	67	33	0	2033,74	1029,42
16	50	0	50	562,26	234,87
17	83	17	0	5135,65	2798,25

*Valores obtidos em 24h de reação.

Na Tabela 4.23 verifica-se que os valores de consistência das misturas variaram de 349,34 a 11514 gf/cm², e que esta mesma propriedade para os produtos interesterificados encontra-se na faixa de 56,34 a 6770,43 gf/cm².

Todas as amostras apresentaram redução da consistência após a reação. As menores reduções de consistência (6% e 4%) foram observadas para os produtos provenientes do meio contendo 100% de gordura de leite, o que pode ser diretamente relacionado as baixas variações nas concentrações dos TAGs quanto ao grau de saturação (Tabela 4.22).

As reduções mais acentuadas da consistência em relação às misturas iniciais, 90%, 78% e 72%, foram obtidas para os produtos provenientes das blendas contendo 50:50:0, 58:33:8 e 50:33:17 em porcentagem mássica de gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará, respectivamente, ou seja, nos produtos das blendas que possuíam as maiores proporções de óleo de canola e as menores concentrações de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará, o que pode estar associado as reduções nas concentrações de TAGs SSS que ocorreram nestes produtos. Os demais produtos contendo de 58 a 83% de gordura de leite apresentaram reduções de consistência entre 36 e 62%.

Comparando os dados da Tabela 4.23, referentes às blendas NIE aos critérios estabelecidos por Haighton (1959) (Tabela 4.6), nota-se que todas as blendas reacionais contendo a partir de 58% de gordura de leite (ensaios 2 a 8, 10, 13, 15 e 17) podem ser classificadas segundo Haighton como “muito duras”, pois apresentam consistência acima de 1500 gf/cm². As blendas dos ensaios 1, 9, 11, 12, 14 e 16, todas contendo menor proporção de gordura de leite (50%), apresentaram consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) para produtos com satisfatória plasticidade (200 a 800 gf/cm²), o que pode estar associado às quantidades quase equilibradas das espécies de TAGs responsáveis pela estrutura (SSS+SSI) e pela maciez (III+IIS) do produto (Tabela 4.22).

Com relação aos produtos, fazendo-se uma comparação entre os dados de consistência mostrados na Tabela 4.23 e os critérios estabelecidos por Haighton (1959) (Tabela 4.6), observa-se que os produtos dos ensaios 8, 11 e 16, cujas blendas reacionais continham 58:33:17, 50:0:50 e 50:0:50 de gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará respectivamente, foram os únicos que apresentaram consistência entre 200 a 800 gf/cm², o que pode estar associado ao fato destes produtos também terem apresentado quantidades quase equilibradas das espécies de TAGs responsáveis pela estrutura (SSS+SSI) e pela maciez (III+IIS) do produto (Tabela 4.22).

Os produtos provenientes das blendas contendo 67% de gordura de leite, em geral, apresentaram consistências entre 1000 e 1500 gf/cm² sendo considerados, conseqüentemente, como “muito duros”, mas estando ainda no “limite de espalhabilidade”. Os demais produtos provenientes de blendas com as menores proporções de gordura de leite 50:50:0, 50:33:17 e 50:0:50 apresentaram valores de consistência inferiores a 100gf/cm², sendo por isso considerados como produtos “muito macios e não espalháveis”.

Os produtos cujas blendas iniciais continham proporções mais altas de gordura de leite (100 a 83%) apresentaram consistência muito elevada (>1500) sendo classificados, portanto, como “muito duros”.

Com o objetivo de otimizar as reações de interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite/óleo de canola/ óleo de castanha-do-pará, os valores de consistência das blendas NIE e dos produtos EIE (Tabela 4.23) foram ajustados por regressão múltipla a modelos empíricos, representados pelas Equações 4.11 e 4.12 respectivamente, nos quais foram considerados apenas os fatores estatisticamente significativos para os modelos gerados, conforme análise de variância apresenta na Tabela 4.24.

$$Y_1 = 6975 \cdot X_1 - 6135 \cdot X_2 - 5586 \cdot X_3 \quad (4.11)$$

$$Y_2 = 6252 \cdot X_1 + 6448 \cdot X_2 + 1592 \cdot X_3 - 24908 \cdot X_1 \cdot X_2 - 14549 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (4.12)$$

Em que: Y_1 representa a consistência das blendas NIE; Y_2 representa a consistência dos produtos EIE; X_1 representa o teor de gordura de leite; X_2 representa o teor de óleo de canola; X_3 representa o teor de óleo de castanha-do-pará.

Tabela 4.24 – Análise de Variância (ANOVA) para os modelos ajustados representando a consistência das blendas ternárias e produtos das reações de interesterificação catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, realizadas de acordo com planejamento de misturas.

	Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Consistência blendas NIE	Modelo	8,02 x 10 ⁷	2	4,01 x 10 ⁷	185,44	< 0,0001*
	Mistura linear	8,02 x 10 ⁷	2	4,01 x 10 ⁷	185,44	< 0,0001*
	Erro residual	3,03 x 10 ⁶	14	2,16 x 10 ⁵		
	Falta de ajuste	2,12 x 10 ⁶	10	2,12 x 10 ⁵	0,9390	0,5771
	Erro puro	9,04 x 10 ⁵	4	2,26 x 10 ⁵		
	R²	0,9636				
Consistência produtos EIE	Modelo	6,54 x 10 ⁷	4	1,63 x 10 ⁷	136,06	< 0,0001*
	Mistura linear	6,12 x 10 ⁷	2	3,06 x 10 ⁷	254,56	< 0,0001*
	$X_1 \cdot X_2$	3,11 x 10 ⁶	1	3,11 x 10 ⁶	25,90	0,0003*
	$X_1 \cdot X_3$	1,29 x 10 ⁶	1	1,29 x 10 ⁶	10,74	0,0066*
	Erro residual	1,44 x 10 ⁶	12	1,20 x 10 ⁵		
	Falta de ajuste	1,05 x 10 ⁶	8	1,31 x 10 ⁵	1,33	0,4175
	Erro puro	3,95 x 10 ⁵	4	9,87 x 10 ⁴		
	R²	0,9784				

*p<0,05: significativo ao nível de confiança de 95%;

X_1 : gordura de leite; X_2 : óleo de canola; X_3 : óleo de castanha-do-pará.

A Tabela 4.24 revela que os modelos obtidos para a consistência das blendas NIE e produtos EIE (Equações 4.11 e 4.12) foram estatisticamente significativos, sem falta de ajuste, ao nível de confiança de 95%, e que mais de 96% da variabilidade experimental pode ser explicada por estes modelos (R^2 de 0,9636 e 0,9784), sendo portanto validados de acordo com os critérios de Moldaviski e Cohen (1996).

Os modelos estatísticos obtidos para consistência das blendas NIE e dos produtos EIE são representados nas Figuras 4.32a e 4.32b, em diagramas triangulares, nos quais são indicadas as curvas de nível (linhas ligando pontos de resposta de igual valor). Os diagramas triangulares permitem encontrar uma mistura ótima ou escolher entre misturas alternativas, dependendo de considerações econômicas ou de outra ordem, como disponibilidade das matérias-primas (HARE, 1974; CHIU, 2006; RACT, 2006).

Na Equação 4.11 é possível perceber através do sinal negativo dos coeficientes referentes aos óleos de canola e castanha-do-pará, que a adição destes componentes à gordura de leite causa um efeito antagônico na consistência das blendas resultantes, o que pode ser explicado pela presença nestes óleos de grande quantidade de TAGs III (Tabela 4.4) que possuem baixos pontos de fusão (-14 a 1°C) (SILVA; GIOIELLI, 2006). Verifica-se ainda que, para as blendas NIE, somente os componentes individuais influenciaram esta variável, tendo em vista que, as interações entre os componentes das misturas não foram significativas, o que é um comportamento característico de uma mistura perfeita. Segundo Simões, Gioielli e Oliveira (2000), D'Agostini (2001) e Chiu (2006), quando uma propriedade tomada como resposta define um modelo perfeito de misturas, as linhas no diagrama triangular (Figura 4.32 a) são retas paralelas e equidistantes para os mesmos intervalos de variação, significando que a propriedade é proporcional à quantidade de cada componente na mistura.

Na Equação 4.12, que representa o modelo para as consistências dos produtos EIE, é possível observar que, após a reação, os três componentes individuais gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, têm um efeito positivo na consistência dos produtos. As interações entre o óleo de canola e o óleo de castanha, e entre os três componentes da mistura não foram estatisticamente significativas. As interações binárias entre gordura de leite e o óleo de canola e entre gordura de leite e óleo de castanha-do-pará foram significativas, com sinais negativos, caracterizando um efeito antagônico, típico de interações eutéticas entre gorduras. A interação eutética tende a ocorrer quando os componentes diferem em volume molecular e forma polimórfica, mas não acentuadamente

no ponto de fusão. No sistema eutético, a solubilidade no estado sólido não é completa. O sistema eutético é o mais comumente encontrado em misturas de gorduras, sendo exemplos as misturas PPP/StStSt, POST/POP, StOSt/StStO, POST/PStO e PPP/StOSt (D'AGOSTINI, 2001; TIMMS, 1984), onde P=ácido palmítico; St=ácido esteárico; O=ácido oléico.

Na Figura 4.32b observa-se que onde há depressão mais acentuada, maior o efeito eutético, e conseqüentemente, menor a consistência dos produtos, pois a incompatibilidade entre as gorduras no estado sólido dificulta a cristalização (CHIU 2006, D'AGOSTINI et al., 2001; TIMMS, 1984).

Verifica-se ainda na Figura 4.32a, que o vértice no topo do triângulo equilátero corresponde à gordura de leite de leite pura e os dois vértices na parte inferior do triângulo correspondem às misturas contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola (lado esquerdo) ou 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará (lado direito). Os pontos sobre o lado esquerdo do triângulo representam as misturas binárias entre a gordura de leite e óleo de canola, enquanto que os pontos sobre o lado direito do triângulo representam as misturas binárias entre a gordura de leite e o óleo de castanha-do-pará. Os pontos sobre a base do triângulo representam todas as misturas ternárias que possuem 50% de gordura de leite.

Na região interna do triângulo encontram-se os pontos referentes as demais blendas ternárias, e para a determinação da proporção dos componentes de qualquer ponto interno, devem ser traçadas retas paralelas aos três lados do triângulo e a proporção de cada componente é lida nos lados do triângulo, no cruzamento das respectivas paralelas opostas a cada vértice (CRUISE, 1966; GOMIDE, 1968; SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998). Os pontos destacados em vermelho representam as blendas estudadas no presente trabalho.

Na Figura 4.32b verifica-se que blendas e produtos com maiores valores de consistência podem ser obtidos em reações provenientes de meios com maior proporção de gordura de leite (região próxima aos vértices superiores dos triângulos), enquanto que os menores valores de consistência podem ser obtidos em reações com blendas com baixo teor de gordura de leite (região próxima às bases dos triângulos).

Para melhor visualização das condições reacionais que podem resultar na obtenção de blendas e produtos com consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) para “*spreads*” com espalhabilidade satisfatória (200 a 8000 gf/cm²) foram construídos os gráficos de contorno, como mostrados nas Figuras 4.33 (a, b).

Figura 4.32 – Diagrama triangular em curvas de nível correspondentes às consistências das blendas NIE (a) e dos produtos EIE (b) das reações de interesterificação enzimática de blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, realizadas segundo um planejamento de misturas.

Figura 4.33 – Diagrama triangulares correspondentes aos gráficos de contorno das consistências blendas NIE (a) e dos produtos EIE (b) das reações de interesterificação enzimática de blendas ternárias contendo gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, realizadas segundo um planejamento de misturas.

Nas Figuras 4.33 (a,b) observa-se que apenas nas condições delimitadas pela região marcada em amarelo, tanto as blendas, quanto os produtos apresentam consistência na faixa desejável (200 a 8000 gf/cm²), ou seja, em blendas com proporção de gordura de leite próxima à 50%, e produtos obtidos de blendas com proporção de gordura de leite variando entre 50 a 67%. Após a reação houve aumento das possibilidades de combinações de blendas dentro da faixa estudada que podem fornecer produtos com satisfatória consistência (entre 200 a 800gf/cm²), ou seja, a reação possibilita a utilização de blendas que contenham maiores proporção de gordura de leite, e que mesmo assim apresentam consistências na faixa desejada, o que auxilia no aproveitamento de seu sabor e aroma.

As Figuras 4.33 (a, b) também possibilita observar que, em comparação à simples mistura física das matérias-primas, os produtos interesterificados mostraram a possibilidade de maior incorporação de óleo de castanha-do-pará em relação ao óleo de canola, o que pode resultar em aroma diferenciado e mais agradável proveniente do óleo de castanha-do-pará, já que o óleo de canola é inodor.

Para confirmar os modelos obtidos para consistência das blendas e produtos, dentro da faixa de proporções dos três componentes, indicadas pelo gráfico de contorno dos produtos como adequada, foi selecionada a blenda contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará, situada ao centro desta faixa. Nesta condição selecionada para a confirmação dos modelos (blenda 56:22:22), foram também monitorados os índices de acidez e peróxido, composição em TAGs quanto ao grau de saturação, consistência (10°C) e conteúdo de gordura sólida dos produtos a cada 3h e os resultados são apresentados na seção 4.5.2 (Figuras 4.34 a 4.39). A caracterização do derivado imobilizado utilizado nestas reações com relação à umidade, atividade hidrolítica (em azeite de oliva) e rendimento de imobilização encontram-se no APÊNDICE C (Tabela 6).

4.5.2. Confirmação dos modelos obtidos e acompanhamento das modificações físico-químicas ocorridas no produto da interesterificação enzimática da blenda ternária gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará ao longo do tempo.

A Figura 4.34 mostra o teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos nas reações de interesterificação da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará. É possível observar que houve tendência de aumento no teor de ácidos graxos livres até 6 h de reação,

sendo que após este tempo este teor oscilou entre 6,77 e 10,19%. Estes resultados são um pouco superiores aos obtidos para os produtos da interesterificação das blendas binárias contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola e contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará.

Figura 4.34 – Teor de ácidos graxos livres em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

A Figura 4.35 dispõe graficamente os resultados dos índices de peróxidos nas amostras da reação de interesterificação da blenda ternária (56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará) ao longo do tempo. Os resultados obtidos variaram de 1,73 a 2,71 meq/kg. Estes resultados foram menores que os obtidos para os produtos da interesterificação da blenda binária (50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará), o que pode ser explicado pelo fato de que, quase 80% da blenda ternária é constituída por gordura de leite e óleo de canola, que apresentaram baixos valores de peróxidos (< 0,56 meq/kg). Porém, esses valores foram ainda superiores ao valor estabelecido para a manteiga de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1996), a qual admite até 1 meq/kg.

Figura 4.35 – Índice de peróxido em função do tempo dos produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

Similar ao comportamento descrito para os produtos da blenda binária (50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará) houve redução dos valores de peróxidos ao longo do tempo, o que pode ser devido a uma possível acilação dos hidroperóxidos por ácidos graxos livres, catalisada pela lipase quando submetidas a determinadas temperaturas por longos períodos (Giet et al., 2009).

A Tabela 4.25 apresenta a composição em ácidos graxos da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará empregada na reação de interesterificação. Essa composição foi obtida por média ponderada com base nos dados da Tabela 4.2. Como pode ser observado, os três ácidos graxos mais expressivos presentes nesta blenda foram o palmítico (proveniente da gordura de leite e óleo de castanha-do-pará), o linoléico (oriundo dos dois óleos vegetais) e o oléico (derivado dos três componentes) apresentando-se com 21,01%, 15,68% e 31,95%, respectivamente.

Tabela 4.25 – Composição em ácidos graxos (% molar) da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificadas.

Ácidos Graxos		blenda 56:22:22*
butírico	C 4:0	1,93
capróico	C 6:0	1,69
caprílico	C 8:0	0,97
cáprico	C 10:0	1,85
láurico	C 12:0	1,98
mirístico	C 14:0	6,36
pentadecanóico	C 15:0	0,68
palmítico	C 16:0	21,01
palmitoléico	C 16:1	1,22
margárico	C 17:0	0,29
<i>cis</i> -10-heptadecenóico	C 17:1	0,43
esteárico	C 18:0	8,90
<i>trans</i> elaídico	C 18:1	1,56
oléico	C 18:1	31,95
<i>trans</i> t-linoléico	C 18:2	0,09
linoléico	C 18:2	15,68
<i>trans</i> t-linolênico	C 18:3	0,17
linolênico	C 18:3	1,90
octadecatetreenóico	C 18:4	0,47
araquídico	C 20:0	0,28
eicosenóico	C 20:1	0,29
behênico	C 22:0	0,14
erúcico	C 22:1	0,02
lignocérico	C 24:0	0,07
nervônico	C 24:1	0,06
Total		100,00
Saturados		46,16
Insaturados		53,84

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de canola

A Tabela 4.26 apresenta a composição da blenda ternária, contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará, empregada nas reações de interesterificação e do respectivo produto interesterificado obtido, segundo teores de triacilgliceróis dos tipos trissaturados (SSS), dissaturado-monoinsaturados (SSI), di-insaturados-monossaturado (IIS) e tri-insaturados (III).

Tabela 4.26 – Composição em triacilgliceróis (TAGs) segundo grau de saturação para a blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% óleo de castanha-do-pará antes e após a interesterificação enzimática catalisada por lipase *sn*-1,3 específica.

blenda 56:22:22*		
tipo de TAG	NIE	EIE
SSS	19,69	9,83
SSI	28,41	34,42
IIS	22,24	40,14
III	29,66	15,60
Total	100,00	100,00

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará;
 NIE = não interesterificado; EIE = enzimaticamente interesterificado.
 S = Saturado; I = Insaturado.

Após a reação foi constatado que houve redução de 50 % da concentração dos TAGs SSS e redução de 47%, da concentração dos TAGs III, com simultâneo aumento de 47%, das espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS. Como discutido anteriormente, a diminuição dos TAGs SSS e III, e a elevação da quantidade de espécies intermediárias de TAGs S₂I e I₂S, obtida através da interesterificação enzimática, possibilita o aumento da funcionalidade tecnológica e melhora das propriedades sensoriais dos produtos, fazendo com que tenham maior potencial para serem aplicados como base em alimentos (RODRIGUES; GIOIELLI, 2003).

A Figura 4.36 apresenta a variação da consistência dos produtos da interesterificação da blenda ternária (56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará) em função do tempo.

Os valores de consistência dos produtos variaram de 235 até cerca de 938 gf/cm². Verifica-se tendência de redução da consistência nas primeiras 6 h de reação, com suave aumento em 18 e 24h, sendo este comportamento similar ao obtido para os produtos provenientes da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará (Figura 4.26).

Os produtos obtidos em 3, 6, 12, 18 e 24 h de reação apresentaram valores de consistência dentro da faixa estabelecida por Haighton (1959) (200 a 800gf/cm²) para uma gordura com satisfatória espalhabilidade (Tabela 4.6).

Figura 4.36 – Consistência em função do tempo para os produtos obtidos na reação de interesterificação da blenda contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzida sob temperatura de 45°C.

O resultado de consistência obtido para a blenda reacional não interesterificada, 1335,92gf/cm², foi similar ao valor predito pelo modelo das blends NIE (Equação 4.11), 1327,20gf/cm², e está dentro da faixa prevista (1040,78 – 1613,63 gf/cm²) para um intervalo de confiança de 95%.

Observou-se ainda que, o resultado de consistência obtido em 24 h de reação, 491,98 gf/cm², foi também próximo do valor predito pelo modelo dos produtos (Equação 4.12), 408,83gf/cm², e está dentro da faixa prevista (188,75– 628,90gf/cm²) para um intervalo de confiança de 95%.

A Figura 4.37a mostra o termograma de fusão, em função da temperatura, obtido por DSC, para a gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará, utilizados como matérias-primas, comparativamente ao termograma obtido para a blenda reacional ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará antes da interesterificação. A Figura 4.37b mostra o efeito da reação enzimática sobre o perfil térmico dos produtos ao longo do tempo de reação.

Figura 4.37 – Curvas de fluxo de calor em função da temperatura para (a) gordura de leite, óleo de canola, óleo de castanha-do-pará e blenda contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada (NIE) e para (b) os produtos obtidos ao longo do tempo na interesterificação desta blenda catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae*.

Para blenda não interesterificada (Figura 4.37a) é possível observar a presença de três eventos endotérmicos: pico “A” (2,5°C) proveniente dos óleos de canola e castanha-do-pará, e picos “B” e “C” (9,7 e 28,7°C, respectivamente), oriundos da gordura. Verifica-se ainda que apenas a adição dos óleos à gordura conduziu à diminuição da amplitude dos picos “B” e “C” e ao aumento da amplitude do pico “A”.

A análise dos termogramas presentes na Figura 4.37b mostra que, após a reação, ocorreu um leve deslocamento do pico “A” para temperaturas mais altas e aumento de sua amplitude, promovendo a formação de um pico mais estreito e agudo. Para o pico “B” houve também deslocamento para temperaturas mais altas, com aumento de sua amplitude até 12h de processo, e após este tempo este parâmetro diminuiu em 18 e 24 h de reação. O pico “C” permaneceu praticamente na mesma temperatura, apresentando apenas diminuição de sua amplitude ao longo do processo. Os produtos interesterificados apresentaram, em geral, faixas de fusão semelhantes a da blenda não interesterificada.

Através dos termogramas de fusão de DSC (Figura 4.37), foi obtido o conteúdo de gordura sólida para os produtos interesterificados provenientes da blenda reacional ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará e os resultados são apresentados graficamente na Figura 4.38, em função da temperatura, comparativamente aos valores obtidos para a blenda não interesterificada (0h) e para gordura de leite.

Os resultados encontrados para conteúdo de gordura sólida indicam que tanto a gordura de leite, quanto a blenda não interesterificada e os produtos de reação, mostraram menores conteúdos em função do aumento da temperatura de análise.

Comparando-se os conteúdos de gordura sólida da gordura de leite aos da blenda não interesterificada, verifica-se que o acréscimo dos óleos de canola e castanha-do-pará à gordura de leite resultou na redução deste parâmetro para todas as temperaturas de análise. Observou-se que a 10°C a blenda não interesterificada já apresentava teor de sólidos ideal para um “*spread*” a esta temperatura (32%) segundo os critérios apresentados por O’Brien (2004), porém a esta mesma temperatura esta blenda não apresentou consistência dentro da faixa (200 a 800) para um “*spread*” com boa espalhabilidade, sendo considerada segundo os critérios de Haighon (1959) como um material “*muito duro, no limite de espalhabilidade*”. Além disso, à blenda ternária NIE segundo os critérios de O’Brien (2004) à 20°C apresentou conteúdo de sólidos muito baixo (~1%) apresentando, portanto, tendência à migração de óleo nesta temperatura.

Figura 4.38 – Conteúdo de gordura sólida em função da temperatura para a blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará não interesterificada e os produtos provenientes da interesterificação desta blenda mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo de reação obtido por DSC, comparativamente a gordura de leite.

Após a reação observou-se que em temperaturas de análise abaixo de 15°C, os produtos apresentaram menor conteúdo de gordura sólida em comparação a blenda não interesterificada, enquanto que para temperaturas acima deste valor, com exceção do produto obtido em 18 h de reação, o teor de sólidos foi maior para os produtos interesterificados. Isso ocorreu por causa do surgimento de novas espécies intermediárias de TAGs SSI e IIS (Tabela 4.26) formados pelo rearranjo ocasionado pela interesterificação.

Dentre os produtos obtidos ao longo do tempo, observou-se que de forma geral, os produtos que apresentaram melhor plasticidade de acordo com os critérios mostrados por O'Brien (2004) foram aqueles obtidos em 3, 6, 12 e 24h de reação. Isso porque estes produtos possuem teores de sólido ideais para um “spread” a 10°C (próximos de 30%), apresentam boa resistência a migração do óleo a 20°C (sólidos > 10%) e teor de sólidos próximos a zero a 30°C mostrando serem, portanto, adequados para aplicações nesta temperatura, já que neste caso não apresentam arenosidade na boca. Desta forma, nas condições avaliadas, 3 h foi um tempo de reação adequado para se obter produtos

interesterificados com propriedades de espalhabilidade (consistência entre 200 a 800gf/cm²) e plasticidade requeridas (critérios de O'BRIEN, 2004).

A Figura 4.39 mostra a correlação entre os dados de conteúdo de gordura sólida e consistência, dos produtos das reações de interesterificação da blenda ternária (56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará) em função do tempo.

Figura 4.39 – Relação linear entre os valores de conteúdo de gordura sólida e consistência, ambos a 10°C, para os produtos interesterificados, provenientes da blenda ternária contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará, nos diferentes tempos reacionais.

A partir da linearização dos dados experimentais (Figura 4.39) foi possível obter a Equação 4.13, com $R^2 = 0,93652$, em que CGS = conteúdo de gordura sólida (%).

$$\text{Consistência} = -2094,75 + 101,74 \cdot \text{CGS} \quad (4.13)$$

De acordo com esta equação, produtos que apresentem valores de conteúdo de gordura sólida entre 22,5 e 28% proporcionarão consistência dentro da faixa de 200–800gf/cm², faixa estabelecida por Haighton (1959) para “*spreads*” com espalhabilidade satisfatória.

4.6. Interesterificação das blendas binárias contendo 65% gordura de leite e 35% de óleo de canola e 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará assistida por irradiação de micro-ondas

Estudos da literatura têm mostrado que o uso de reatores de micro-ondas como fonte de aquecimento de reações enzimáticas pode possibilitar a obtenção de produtos em menores tempos de reação e com rendimentos superiores aos obtidos com fonte de aquecimento convencional (DA RÓS; CASTRO; DE CASTRO, 2009a; DA RÓS; CASTRO; DE CASTRO, 2009b; FANG, HUANG, XI, 2008; FANG, SUN, FANG, 2008). Especificamente com relação à interesterificação enzimática da gordura de leite com óleos vegetais, não há ainda na literatura relatos de reações desenvolvidas sob aquecimento por irradiação de micro-ondas.

As Figuras 4.40 (a, b) mostram comparativamente o teor de ácidos graxos livres dos produtos das reações de interesterificação das blendas binárias contendo gordura de leite com óleo de canola, e gordura de leite com óleo de castanha-do-pará, realizadas sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas, nas quais verifica-se uma tendência de aumento dos teores de ácidos graxos livres até 4 h de processo para ambos os sistemas reacionais.

Na Figura 4.40a é possível notar que para a blenda contendo óleo de canola os teores de ácidos graxos livres obtidos sob irradiação de micro-ondas foram menores que os obtidos por aquecimento convencional, o que pode estar diretamente relacionado à umidade presente nos derivados imobilizados (APÊNDICE C – Tabela 7), que foi superior para o derivado imobilizado empregado na reação realizada sob aquecimento convencional.

A Figura 4.40b mostra que para a blenda binária contendo óleo de castanha-do-pará o teor de ácidos graxos livres foi bastante semelhante para a reação realizada sob ambos os sistemas de aquecimento, o que pode estar relacionado ao fato do derivado imobilizado em ambos os sistemas ter apresentado a mesma umidade (APÊNDICE C – Tabela 7).

As Figuras 4.41 e 4.42 mostram o perfil em TAGs, segundo número de carbonos, obtido por cromatografia gasosa, para os produtos obtidos nas interesterificações das blendas binárias contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola, e 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, respectivamente, realizadas sob aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas.

Figura 4.40 – Teor de ácidos graxos livres dos produtos das reações de interesterificação das blendas binárias contendo (a) 65% de gordura de leite e 35% óleo de canola e (b) 50% de gordura de leite e 50% de óleo de canola, realizadas sob aquecimento convencional (—■—) e por irradiação de micro-ondas (—■—).

a **b**

Figura 4.41 – Concentração de TAGs, quanto ao número de carbonos, dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% óleo de canola, realizadas sob (a) aquecimento convencional e (b) irradiação de micro-ondas. Na Figura Col: Colesterol.

a

b

Figura 4.42 – Concentração de TAGs, quanto ao número de carbonos, dos produtos das reações de interesterificação da blenda binária contendo 50% de gordura de leite e 50% óleo de castanha-do-pará, realizadas sob (a) aquecimento convencional e (b) irradiação de micro-ondas. Na Figura Col: Colesterol.

Na Figura 4.41 verifica-se que para a blenda binária contendo óleo de canola comparando-se a composição dos produtos interesterificados à composição da blenda inicial das matérias-primas, os lipídeos estruturados obtidos em reações regidas pelas diferentes fontes de aquecimento possuem composições ligeiramente distintas. Para os produtos obtidos sob aquecimento convencional ocorreu a diminuição no teor dos TAGs C₅₄ com simultâneo aumento no teor dos TAGs C₃₆-C₅₂, enquanto que para a reação realizada sob aquecimento por irradiação de micro-ondas, observou-se uma diminuição menos expressiva dos TAGs C₅₄ com aumento apenas nos TAGs C₄₆-C₅₂.

Para a blenda binária contendo óleo de castanha-do-pará, na Figura 4.42, comparando-se a composição dos produtos interesterificados à composição da blenda inicial das matérias-primas, pode-se notar que os lipídeos estruturados obtidos em reações conduzidas por ambas as fontes de aquecimento possuem composições muito semelhantes. De forma geral, ocorreu a diminuição no teor dos TAGs C₃₄-C₄₄ e C₅₄ com simultâneo aumento no teor dos TAGs C₄₈-C₅₂.

Para avaliar quantitativamente as mudanças ocorridas nas concentrações dos TAGs dos produtos obtidos, foi calculado o grau de interesterificação das amostras ao longo do tempo de reação e os resultados são apresentados na Figura 4.43.

Observando-se a Figura 4.43 é possível notar que a interesterificação realizada sob ambos os aquecimentos, para as duas blends binárias estudadas, apresentaram graus de interesterificação semelhantes. Uma explicação para este comportamento pode ser relacionada ao meio reacional apolar (gordura de leite e óleo de canola ou gordura de leite e óleo de castanha-do-pará), que prejudica a interação das micro-ondas com o substrato e enzima, não havendo, portanto aumento no rendimento da reação, o qual foi praticamente o mesmo obtido para a reação realizada sob aquecimento convencional.

De acordo com Fang, Huang e Xia (2008) em reações de esterificação em meios não aquosos, quando são utilizados substratos altamente polares, mais energia de micro-ondas é absorvida que em meios contendo substratos apolares, e esta absorção é que pode causar algum efeito dito não-térmico, que neste caso seria responsável pela aceleração da reação. Fang, Sun e Xia (2008) afirmam que substratos polares ao serem submetidos ao aquecimento sob irradiação de micro-ondas, sofrem aumento de suas entropias acelerando a oscilação entre as moléculas, aumentando por isso as probabilidades de colisões entre estas e consequentemente a taxa de reação.

a **b**

Figura 4.43 – Grau de interesterificação para os produtos obtidos nas reações de interesterificação da blenda binária contendo (a) 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola e (b) 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob temperatura de 45°C, por aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas

Réjasse et al. (2006) observou que a reação de alcoólise entre butirato de etila e butanol, em um sistema isento de solvente, catalisada pela lipase de *Candida antarctica* livre, apresentou a mesma taxa de conversão e rendimento de reação para o processo realizado sob ambos os aquecimentos.

Leadbeater, Stencel e Wood (2007), ao estudar a transesterificação entre acetoacetato de metila e álcoois primários, empregando tolueno (apolar) como solvente, catalisada pela lipase de *Candida antarctica*, constataram que a reação realizada sob irradiação de micro-ondas não apresentou diferenças quando comparada à realizada sob aquecimento convencional.

Em outro estudo realizado por De Souza et al. (2009) observou-se que nas reações de resolução cinética catalisadas por 5 diferentes lipases, usando ciclohexano (apolar) como solvente, observou que, sob condições onde o efeito térmico foi minimizado ao máximo, não houve diferença entre as reações realizadas sob irradiação de micro-ondas e sob aquecimento convencional, sendo obtidos tempos de reação, rendimentos e seletividades (excesso enantiomérico) muito próximas.

A Figura 4.44 apresenta a consistência dos produtos da interesterificação obtidos nas reações de interesterificação da blenda binária contendo 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola e 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará conduzidas sob aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas.

A Figura 4.44a mostra que para a blenda contendo 65% de gordura de lei e 35% de óleo de canola a atuação do derivado imobilizado sob aquecimento convencional foi mais efetiva na redução da consistência da blenda NIE, alcançando valores da ordem de 47%, enquanto o produto obtido por irradiação de micro-ondas apresentou redução de apenas 29%, mostrando que, apesar dos graus de interesterificação dos produtos obtidos por ambos os sistemas serem semelhantes, as pequenas diferenças na composição em TAGs (Figura 4.41) e no teor de ácidos graxos livres no meio reacional (Figura 4.40a) resultaram em produtos com distintas propriedades de textura.

Para a blenda contendo 50% de gordura de lei e 50% de óleo de castanha-do-pará, como pode ser observado na Figura 4.44b, a atuação do derivado imobilizado sob ambos os aquecimentos foi muito semelhante na redução da consistência da blenda NIE, alcançando valores da ordem de 78%, confirmando os resultados também semelhantes de composição em TAGs (Figura 4.42) e graus de interesterificação (Figura 4.43b) dos produtos obtidos por ambos os sistemas.

Figura 4.44 – Consistência dos produtos obtidos em 12 h das reações de interesterificação das blendas binárias contendo (a) 65% de gordura de leite e 35% de óleo de canola e (b) 50% de gordura de leite e 50% de óleo de castanha-do-pará, catalisadas pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA, conduzidas sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas.

5. CONCLUSÕES

O presente projeto teve como objetivo avaliar as características de produtos obtidos por interesterificação de blendas binárias e ternárias de gordura de leite com óleos de canola e castanha-do-pará, mediada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em sílica – álcool polivinílico (SiO₂-PVA). Considerou-se desejável obter um produto que, ao incorporar parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes nos óleos, apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios, e com base nos dados relatados neste trabalho pôde-se concluir que:

- As propriedades das matérias-primas selecionadas estavam em acordo com as normas estabelecidas pela legislação brasileira, indicando que possuíam qualidade adequada para serem empregadas nas reações propostas, entretanto o índice de peróxido quantificado para o óleo de castanha-do-pará da ordem de 4,57 meq/kg interferiu na obtenção de produtos interesterificados dentro dos limites recomendados para uso em formulações alimentícias.

- Entre os procedimentos testados para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em SiO₂-PVA, foi selecionado o método por adsorção física em função da simplicidade da metodologia, baixo custo e por não envolver o uso de agentes químicos tóxicos que poderiam limitar sua aplicação na obtenção de produtos alimentícios. A metodologia desenvolvida resultou ainda na obtenção de derivado imobilizado ativo que demonstrou bom desempenho em todas as reações efetuadas.

- A otimização das condições reacionais para realização da reação de interesterificação enzimática das blendas binárias de gordura de leite e óleo de canola e gordura de leite e óleo de castanha-do-pará foram determinadas por meio de planejamento composto central com face centrada. A influência das variáveis temperatura (X₁) (45–65°C) e teor de gordura no meio reacional (X₂) (50–80%) foi avaliada simultaneamente,

considerando como variáveis-resposta o grau de interesterificação (GI) e a consistência dos produtos. Para cada tipo de blenda, foram estabelecidos modelos empíricos que favorecem a obtenção de produtos com satisfatória consistência (entre 200 e 800gf/cm²).

- Para as blends binárias de gordura de leite e óleo de canola, o grau de interesterificação (Y_1) foi influenciado pelos efeitos principais dos fatores temperatura (X_1) e teor de gordura de leite (X_2). O modelo proposto: $Y_1 = 20,42 + 1,92 \cdot X_1 - 2,04 \cdot X_2$ foi estatisticamente significativo e sem falta de ajuste ao nível de confiança de 95%, ($R^2 = 0,7046$). A consistência (Y_2) foi influenciada apenas pelo efeito principal e quadrático do teor de gordura de leite (X_2 e X_2^2). O modelo proposto: $Y_2 = 502,00 + 856,67 \cdot X_2 + 364,67 \cdot X_2^2$, foi também estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95% e sem falta de ajuste ($R^2 = 0,9180$). Os produtos interesterificados que atendem o parâmetro desejado foram obtidos empregando-se meio contendo 65% de gordura de leite, 35 % de óleo de canola, incubados a 45°C por 12 h. Nessas condições foram obtidos produtos com consistência de 700 gf/cm² e grau de interesterificação de 14,05%.

- Para as blends binárias de gordura de leite e óleo de castanha-do-pará apenas os valores de consistência, foram ajustados a um modelo empírico, pois para o grau de interesterificação, não foi observada influência significativa para nenhum dos fatores avaliados. A consistência dos produtos interesterificados foi influenciada pelo efeito principal da temperatura (X_1), pelos efeitos principal e quadrático do teor de gordura de leite (X_2 e X_2^2), e pela interação destes dois fatores ($X_1 \cdot X_2$). O modelo gerado: $Y = 1678,80 - 447,83 \cdot X_1 + 1420,17 \cdot X_2 + 238,37 \cdot X_2^2 - 271,27 \cdot X_1 \cdot X_2$ foi estatisticamente significativo, sem falta de ajuste, ao nível de confiança de 95% ($R^2 = 0,9853$). Os produtos interesterificados que atendem o parâmetro desejado foram obtidos empregando-se meio contendo 50% de gordura e 50% do óleo, incubados a 45°C por 24 h. Nessas condições foram obtidos produtos com consistência de 400 gf/cm² e grau de interesterificação de 11,71%.

- Reações de interesterificação de blendas ternárias de gordura de leite, óleo de canola e óleo de castanha-do-pará foram efetuadas de acordo com um planejamento de misturas, constituído de 17 experimentos visando avaliar a influência da proporção de cada componente da blenda na consistência do produto interesterificado. Os valores de consistência das blendas NIE e dos produtos EIE foram ajustados por regressão múltipla a modelos empíricos, nos quais foram considerados apenas os fatores estatisticamente significativos.

Para a consistência das blendas (Y_1), o modelo matemático foi composto considerando-se que esta variável-resposta foi influenciada apenas pelo teor dos componentes individuais gordura de leite (X_1), óleo de canola (X_2) e óleo de castanha-do-pará (X_3).

$$Y_1 = 6975 \cdot X_1 - 6135 \cdot X_2 - 5586 \cdot X_3$$

Para a consistência dos produtos interesterificados (Y_2) o modelo matemático foi composto considerando-se que esta variável-resposta foi influenciada pelo teor dos componentes individuais gordura de leite (X_1), óleo de canola (X_2) e óleo de castanha-do-pará (X_3), bem como pelas interações do teor de gordura de leite com cada óleo avaliado ($X_1 \cdot X_2$; $X_1 \cdot X_3$).

$$Y_2 = 6252 \cdot X_1 + 6448 \cdot X_2 + 1592 \cdot X_3 - 24908 \cdot X_1 \cdot X_2 - 14549 \cdot X_1 \cdot X_3$$

Os modelos obtidos foram estatisticamente significativos, sem falta de ajuste, ao nível de confiança de 95% (R^2 de 0,9636 e 0,9784, para blendas e produtos, respectivamente). Na faixa de variação investigada, produtos interesterificados com satisfatória consistência e plasticidade (634 gf/cm²) podem ser obtidos com uso de blendas contendo 56% de gordura de leite, 22% de óleo de canola e 22% de óleo de castanha-do-pará incubadas por 3 h a 45°C.

- O desempenho das reações enzimáticas conduzidas sob aquecimento convencional e não convencional (irradiação de micro-ondas) foi avaliado para as blends binárias nas condições previstas pelo planejamento composto central, não sendo observada interferência das micro-ondas na atuação da enzima, obtendo-se produtos interesterificados com similares valores de consistência.

De uma forma geral, o trabalho desenvolvido permitiu selecionar as condições de processo que possibilitaram a incorporação, no produto alimentício obtido, de ácidos graxos insaturados e essenciais, os quais apresentam efeitos benéficos à saúde, contendo ainda elevado teor de gordura de leite, o que permite aproveitar suas características sensoriais e nutricionais desejadas. Tanto para as misturas binárias quanto para as ternárias o processo de interesterificação mostrou-se fundamental para a modulação das características de plasticidade do produto obtido.

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 óleos de canola e castanha-do-pará em misturas binárias e ternárias;
- Uso de nariz eletrônico para caracterização do produto alimentício obtido por interesterificação enzimática de gordura de leite;
- Estudo de processos de desodorização do produto alimentício obtido por interesterificação enzimática de gordura de leite;
- Testar as condições experimentais estabelecidas para as blendas binárias e ternárias em reatores de leite empacotado visando aumentar a produtividade do processo.

REFERÊNCIAS

- 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.; 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; Em: J. CABRAL, M.S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. cap. 5, p. 121 – 140.
- ALI, A. R. M.; DIMICK, P.S. Thermal analysis of palm mid-fraction, cocoa butter and milk fat blends by differential scanning calorimetry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 7, p. 299–302, 1994.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. AOCS Press, 2004.
- ANTONIOSI FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais por meio de métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 1995.
- ANTUNES, J. M.; BROCHADO, M. L. **Produção de canola é tema do Dia de Campo na TV**. Embrapa Disponível em: <http://www.Embrapa.br/imprensa/noticias/2011/abril/2a-semana/producao-de-canola-e-tema-do-dia-de-campo-na-tv/>. Acessado em: 14 de agosto de 2011.
- ARAÚJO, L. A.; MELO, W. S.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. Avaliação das propriedades de óleos regionais da Amazônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 17., 14 a 17 de Setembro de 2008, Recife/ PE.
- ATIA, K. S.; EL-ARNAOUTY, M. B.; ISMAIL, S. A.; DESSOUKI, A. M. Characterization and application of immobilized lipase enzyme on different radiation grafted polymeric films: Assessment of the immobilization process using spectroscopic analysis. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, p.155–167, 2003.
- AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; CRUZ, J. M. M.; KUMAGAI, E. E.; CORRÊA, D. U. O. Ácidos graxos saturados versus ácidos graxos *trans* em biscoitos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 131-137, 2003.
- AUGUSTIN, M. A.; VERSTEEG, C. Milk fat: Physical, Chemical and Enzymatic modification. In: FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer Science, 2006. cap. 8.

BACHU, P.; GIBSON, J. S.; SPERRY, J.; BRIMBLE, M. A. The influence of microwave irradiation on lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p.1618–1624, 2007.

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.; MALCATA, F.X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 2, p. 309-341, 1998.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p. 15–29, 2001.

BENTES-GAMA, M. M.; VIEIRA, A. H.; LIMA, L. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; DA SILVA, A. P. F. F. **Ocorrência de populações naturais de espécies não-madeireiras em Rondônia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2007.

BLACK, M. J.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. Brassica-oilseeds. In: **THE ENCYCLOPEDIA** of Seeds: Science, Technology and Uses. Oxford shire (UK): CABI Publishing, 2006. p.46.

BOURLIEU, C.; BOUHALLA, S.; LOPEZ, C. Review: Biocatalyzed modifications of milk lipids: Applications and potentialities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n.10, p. 1-12, 2009.

BOURNER, M. **Food texture and viscosity, concept and measurement**. 2nd. San Diego: Academic Press, 2002, 427p.

BRADDOO, S.; RATH, P.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.51, p. 115–120, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 1996.

BRASIL. Resolução RDC/ANVISA/MS nº 270, de 22 setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1.

BRYN, J.; GRUCZYNSKA, E.; KOWALSKI, B.; TARNOWSKA, K. Interesterification of milk fat and rapeseed oil mixtures. **Zywnosc**, v.11, n. 3 (Supl.), p.18-26, 2004.

BRYN, J.; GRUCZYNSKA, E.; WIRKOWSKA, M.; KOWALSKI, B.; GOZDOWSKI, D. Properties of enzymically transesterified mixtures of milk fat and rapeseed oil. **Tłuszcze Jadalne**, v.40, n. 3/4, p.80-90, 2005a.

BRYN, J.; KOWALSKA, M.; WIRKOWSKA, M.; KOWALSKI, B. Properties of enzymically interesterified milk fat. **Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis**, v. 246, p. 23-32, 2005b.

BRYN, J.; WIRKOWSKA, M.; KOWALSKI, B. Interesterification of milk fat and sunflower oil mixtures in the presence of Novozym 435. **Zywnosc**, v.13, n. 2 (Supl.), 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. **Tluszcz Jadalne**, v. 41, n.1/2, p. 123-130, 2006.

CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA. **Óleo de Canola**. Disponível em: <http://www.campestre.com.br/oleo-de-canola.shtml/> Acessado em: 19 de agosto de 2011a.

CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA. **Óleo de Castanha**. Disponível em: <http://www.campestre.com.br/oleo-de-castanha-para.shtml/> Acessado em: 19 de agosto de 2011b.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed.rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R. M.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n.3, p. 181–205, 2000.

CHIU, C.M. **Síntese de lipídeos estruturados por interesterificação de gordura de frango e triacilgliceróis de cadeia média**. 2006. 178 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v.16, n. 11, p. 1347–1361, 2006.

COUTINHO, V. F. **Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) no estado nutricional de praticante de capoeira em relação ao selênio**. 2003. 176f. Tese (Doutorado) Ciência dos Alimentos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COUVREUR, S.; HURTAUD, C.; LOPEZ, C.; DELABY, L.; PEYRAUD, J. L. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1956–1969, 2006.

CRUISE, D. R. Plotting the composition of mixtures on simplex coordinates. **Journal of Chemical Education**, v.43, n.1, p. 30-33, 1966.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídeos estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. 2001. 167 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

D'AGOSTINI, D.; FERRAZ, R.C.; GIOIELLI, L.A., SOTERO SOLIS, V.E. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación de las mezclas binarias y ternarias de las grasas de palma, semilla de palma y triglicéridos de cadena media. **Grasas y Aceites**, v. 52, fasc. 3-4, p. 214-22, 2001.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, M. B. A.; DE CASTRO, H. F. Otimização da etanólise do óleo de babaçu por via enzimática conduzida no reator de micro-ondas Discover empregando a técnica do planejamento experimental. In SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAFERM, 17, 2 a 5 de Agosto de 2009. Natal/ RN, 2009a.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, M. B. A.; DE CASTRO, H. F. Síntese enzimática de biodiesel sob irradiação de micro-ondas via etanólise do óleo de palma. In SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS – SHEB, 9, 23 a 27 de novembro de 2009. Maringá /PR. 2009b.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n. 4, p.623-630, 2004.

DE CASTRO, H. F., ZANIN, G. M., MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. Em: BON, E. P. S., FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6.

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 GREYT, W. F. J.; KELLENS, M. J. Improvement of the nutritional and Physicochemical properties of milk fat. In: GUNSTONE, F. D. **Structured and modified lipids**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. cap. 11.

DE GREYT, W.; HUYGHEBAERT, A.; KELLENS, M. Chemical and physicochemical modification of lipids. In: CHRISTOPHE, A. B. **Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use**. Washington: AOCS PRESS, 1998. cap.1.

DE SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C.; KROUTIL, W.; KAPPE, C. O. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **The Journal of Organic Chemistry**, v.74, p. 6157–6162, 2009.

DE SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: Uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 497-506, 2011.

DEMAN, J.M. Texture of fats and fat products. In: DEMAN, J.M.; VOISEY, P.W.; RASPER, V.F.; STANLEY, D.W. **Rheology and texture in food quality**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, 1976. p. 355 – 381.

DEMAN, J.M. ; DEMAN, L. Texture of fats. In: MARANGONI, A.G.; NARINE, S.S. **Physical Properties of Lipids**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. cap. 7, p.191–217.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook**, 3rd ed, Berlin: SpringerProduktions-Gesellschaft, 1997.

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.

FANG, Y.; HUANG, W.; XIA, Y. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 306–310, 2008.

FANG, Y.; SUN, S.Y. ; XIA, Y. M. The weakened 1,3-specificity in the consecutive microwave assisted enzymatic synthesis of glycerides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, p. 6–11, 2008.

FASINA, O.O.; CRAIG-SCHMIDT, M.; COLLEY, Z.; HALLMAN H. Predicting melting characteristics of vegetable oils from fatty acid composition. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p. 1501–1505, 2008.

FERBERG, I.; CABRAL, L. C.; GONÇALVES, E. B.; DELIZA, R. Efeito das condições de extração no rendimento e qualidade do leite de castanha-do-brasil despelculada. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 75 – 88, 2002.

FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIENA, V. G.; AMARAL, S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. 2nd. Washington: AOCS PRESS, 2006. 237 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.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C.M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p.1068–1074, 2009.

FREITAS, S. P.; FREITAS-SILVA, O.; MIRANDA, I. C. ; COELHO, M. A. Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 14-17, 2007.

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.

GALLO NETTO, C. Pesquisa fornece subsídios para o produtor otimizar germinação de sementes de canola. **Jornal da Unicamp**, Edição 383, 2007.

GAMBOA, O. W. D.; GIOIELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 646 – 653, 2006.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Lipid shortenings: A review. **Food Research International**, v. 35, p. 1015–1048, 2002.

GIET, J.; AGUEDO, M.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J.; BLECKER, C.; LOGNAY, G. Enzymatic interesterification of anhydrous milk fat with rapeseed and/or linseed oil: oxidative stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p. 6787–6794, 2009.

GOMIDE, R. **Estequiometria industrial**. São Paulo: Cenpro, 1968, p.377-413.

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, S. K.; PRATAP, A. History, Origin, and Evolution. Em: GUPTA, S.K.; KADER, J.C.; DELSENY, M. **Advances in Botanical Research: Incorporating advances in plant pathology: Rapeseed breeding**. San Diego: Academic Press, v.45, 2007, cap. 1, p. 2–17.

HABULIN, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž.; Supercritical fluids as solvents for enzymatic reactions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 54, 667 – 677, 2007.

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.

HARE, L.B. Mixture designs applied to food formulation. **Food Technology**, v.28, n.3, p.50-62, 1974.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.

HAYES, B. L. The fundamentals of microwave heating. In:_____ **Microwave Synthesis: Chemical at the speed of light**. Matthews: CEM Publishing, 2002. 296p.

HAYLOCK, S.J.; DODDS, T.M. Ingredients from milk. Em: BECKETT, S.T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4th ed. United Kingdom: Blackwell publishing, 2009. cap. 4, p. 76–100.

HILLBRICK, G., AUGUSTIN, M. A. Milkfat characteristics and functionality: Opportunities for improvement. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, p.45–51, 2003.

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.

IBRAHIM, N. A.; NIELSEN, S. I. T.; WIGNESWARAN, V.; ZHANG, H.; XU, X. Online pre-purification for the continuous enzymatic interesterification of bulk fats containing omega-3 oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 95–98, 2008.

KALO, P.; HUOTARI H.; ANTILA, M. Chemical composition of butter fat interesterified with *Pseudomonas fluorescens* lipase at various temperatures. **Meijeritieteellinen Aikakauskirja**, v. 47, n. 1 p. 29-38, 1989b.

KALO, P.; HUOTARI, H.; ANTILA, M. *Pseudomonas fluorescens* lipase-catalysed interesterification of butter fat in the absence of a solvent. **Milchwissenschaft**, v. 45, n. 5, p. 281-285, 1990.

KALO, P.; HUOTARI, H.; ANTILA, M. *Pseudomonas fluorescens* lipase-catalysed interesterification butter fat. **Fett Wissenschaft Technologie**, v. 91, n. 7, p. 276-281, 1989a.

KALO, P.; KERNPPINEN, A. Mass spectrometric identification of triacylglycerols of enzymatically modified butterfat separated on a polarizable phenylmethylsilicone column. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 12, p. 1209–1217, 1993.

KALO, P.; PARVIAINEN, P.; VAARA, K.; ALI-YRRKO, S.; ANTILA, M. Changes in the triglyceride composition of butterfat induced by lipase and sodium methoxide catalyzed interesterification reactions. **Milchwissenschaft**, v. 41, n. 2, p.82-5, 1986.

KALO, P.; PERTTILA, M.; KEMPPINEN, A.; ANTILA, M. Modification of butter fat by interesterifications catalyzed by *Aspergillus niger* and *Mucor miehei* lipases. **Meijeritieteellinen Aikakauskirja**, v. 46, n. 1, p. 36-47, 1988.

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.

KONTKANEN, H.; ROKKA, S.; KEMPPINEN, A.; MIETTINEN, H.; HELLSTRÖM, J.; KRUUS, K.; MARNILA, P.; ALATOSSAVA, T.; KORHONEN, H. Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 3-13, 2011.

KRAUSE, A. J.; LOPETCHARA, K.; DRAKE, M. A. Identification of the characteristics that drive consumer liking of butter. **Journal Dairy Science**, v.90, p. 2091–2102, 2007.

KRAUSE, A. J.; MIRACLE, R. E.; SANDERS, T. H.; DEAN, L. L.; DRAKE M. A. The effect of refrigerated and frozen storage on butter flavor and texture. **Journal Dairy Science**, v. 91, p. 455–465, 2008.

LAI, O. M.; GHAZALI, H. M.; CHO, F.; CHONG, C.L. Enzymatic transesterification of palm stearin: anhydrous milk fat mixtures using 1,3-specific and non-specific lipases. **Food Chemistry**, v. 70, p. 221-225, 2000b.

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, p.215 – 219, 2000a.

LEADBEATER, N. E.; STENCEL, L. M.; WOOD, E. C., Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.5, p. 1052–1055, 2007.

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.

LIPP, M. (1995). Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: Application for studies of milk quality and adulteration. **Food Chemistry**, n.54, p.213-221.

LITZ, B.; OBERT, G.; SZILY, B. Examination of the correlation of butter spreadability and its fat conformation by DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 425–428, 2006.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; BENTES-GAMA, M. M.; FERREIRA, M. G. R.; MARTINS, E. P.; SILVA FILHO, E. P.; SOUZA, V. F.; MACEDO, R. S. Cultivo da castanha-do-brasil em Rondônia. **Embrapa Rondônia - Sistemas de Produção - Versão Eletrônica**, n. 7, 2005, ISSN 1807-1805.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, v. 39, n. 12, 2004.

LOPEZ, C.; BOURGAU, C.; LESIEUR, P.; RIAUBLAN, A.; OLLIVON, M. Milk fat and primary fractions obtained by dry fractionation 1. Chemical composition and crystallisation properties. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.144, n.1, p. 17–33, 2006.

LUBARY, M.; HOFLAND, G. W.; TER HORST, J. H. The potential of milk fat for the synthesis of valuable derivatives. **European Food Research and Technology**. v. 232, p. 1–8, 2011.

LUBARY, M.; TER HORST, J. H.; HOFLAND, G. W.; JANSSENS, P. J. Lipase-catalyzed ethanolysis of milk fat with a focus on short-chain fatty acid selectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.116–121, 2009.

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, 1998.

MARCHIORI JR., O.; INOUE, M. H.; BRACCINI, A. L.; OLIVEIRA JR., R.S. AVILA, M. R.; LAWDER, M.; CONSTANTIN, J. Qualidade e produtividade de sementes de canola (*Brassica napus*) após aplicação de dessecantes em pré-colheita. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.2, p.253-261, 2002.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, T. **Sensory Evaluation Techniques**. New York: CRC, 2006. 464p.

MOLDAVISKI, N.; COHEN, S. Determinants of liposome partitioning in aqueous two-phase systems: Evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p. 529-537, 1996.

MOURAD, A. L. Principais culturas para obtenção de óleos vegetais combustíveis no Brasil. **Encontro de Energia no Meio Rural**, Ano 6, 2006.

MOUSTAFA, A.; STAUFFER, C. **Bakery fats**. Brussels: American Soybean Association, 1997. Disponível em: <http://www.asaim-europe.org/Library/library_e.htm>, acessado em 15 de maio de 2006.

MURAKAMI, A. E.; OKAMOTO, E.; MOREIRA, I; SCAPINELLO, C.; FURLAN, A. C.; CARDOSO, A. Farelo de canola na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia/ Brazilian Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.437- 44, 1995.

NASSU, R. T. **Estudo do comportamento térmico de óleo e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC)**. 1994. 93p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

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.

NEAS, E. D.; COLLINS, M. J. Microwave Heating: Theoretical concepts and equipment design. In: KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation: Theory and practice**. Washington: American Chemical Society, 1998.

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. Modificação bioquímica da gordura do leite. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 431- 437, 2010.

NUNES, G. S.; MARTY, J. L. Immobilization of enzymes on electrodes. Em: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed, Totowa: Humana Press, 2006, cap. 21.

O' BRIEN, R. D. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**. 2nd ed. New York: CRC Press LLC, 2004.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; RAGAZZI, S. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, v.29, n. 3, p.593-599, 2006.

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.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A.; Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.11, n. 6, p. 669-677, 1995.

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. Milk fat nutrition. In: TAMIME, A. Y. **Dairy Fats and Related Products**. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009. cap. 2.

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., NUNES, G. F. M., DE CASTRO, H. F., SANTOS, J. C. Interesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja usando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA: Avaliação das condições reacionais In SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS – IX SHEB, 9., 2009. Maringá/PR.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Avaliação da influência da quantidade de biocatalisador na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* em reator batelada. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 17, Foz do Iguaçu/PR, 2010c.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**. v. 65, p.117–121, 2010b.

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**, *In Press*, 2011. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02726.x.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; 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**, 160, p. 1146–1156, 2010a.

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 and Biotechnology**, v.82, p.281–288, 2007

PFEUFFER, M.; DE GREYT, W.; SCHOPPE, I., BARTH, C.A., HUYGHEBAERT, A. Effect of interesterification of milk fat on plasma lipids of miniature pigs. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 265 – 213, 1995.

PINSIRODOM, P.; PARKIN, K. L. Selectivity of potato tuber lipid acyl hydrolase toward long-chain unsaturated fat in esterification reactions with glycerol analogs in organic media. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 4, p. 335–340, 2003.

PORSGAARD, T.; OVERGAARD, J.; KROGH, A. L.; JENSEN, M. B.; GUO, Z.; MU, H. Butter blend containing fish oil improves the level of n-3 fatty acids in biological tissues of hamster. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7615-7619, 2007.

PORTE, A. Interesterificação enzimática na obtenção de substitutos da manteiga de cacau. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 115-126, 1999.

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.

PRZYBYSKI, R.; MAG, T. Canola/Rapessed oil. Em: GUNSTONE, F. D. (Ed.) **Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses**. Blackwell. p. 98 – 112, cap. 4, 2002.

QUEIROZ, N. **Síntese enantiosseletiva de amidas e ésteres catalisada por lipases**. 2002. 152 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2002.

RACCT, J. N. R. **Desenvolvimento de lipídeos estruturados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads**. 2006. 166 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RACCT, J. N. R.; GIOIELLI, L.A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em *spreads*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 1960-1965, 2008.

RAMAMURTHI, S.; MCCURDY, A.R. Interesterification: Current status and future prospects. In: PRZYBYLSKI, B.; E., McDONALD. **Development and processing of vegetable oils for human nutrition**. Washington: AOCS PRESS, 1995. p. 62-86. cap.6

REETZ, T. M. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p.145–150, 2002.

REGITANO- D'ARCE, M. A. B. Química básica dos lipídeos: reações características dos ácidos graxos. In OETTERER, M. REGITANO-'ARCE, M. A. B. SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole. 1ª ed., 2006, cap. 5, p.196 a 242.

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.

RÉJASSE, B.; BESSONEN, T.; LEGOY, M.D.; LAMARE, S. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 3703–3707, 2006.

RIBEIRO, A. P. B.; BASSO, R. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Effect of chemical interesterification on physicochemical properties and industrial applications of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Journal of Food Lipids**, v.16, p. 362–381, 2009a.

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, 2009e.

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**, v. 30, n. 5, p.1295-1300, 2007.

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, 2009d.

RIBEIRO, A. P. B.; MASUCHI, M. H.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G.; Interesterificação química de óleo de soja e óleo de soja totalmente hidrogenado: Influência do tempo de reação. **Química Nova**, v 32, p. 939-945, 2009c.

RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Zero *trans* fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. **Food Research International**, v.42, p. 401–41, 2009b.

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**, 2009f, doi: 10.1007/s12161-009-9073-4.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: A Review from the feedstocks to biodiesel production. SAGE-Hindawi: **Enzyme Research**, v.2011, Article ID 615803, p.1-16. doi:10.4061/2011/615803.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A.G. **Química de Alimentos** 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher: 2007.

RODRIGUES, J. N. **Reestruturação por Mistura e Interesterificação da Gordura do Leite com Óleo de Milho**. 2002. 119 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. **Food Research International**, v. 36, p.149–159, 2003.

RØNNE, T. H.; JACOBSEN, C.; XU, X. Deodorization of lipase-interesterified butterfat and rapeseed oil blends in a pilot deodorizer. **European Journal of Lipid Science and Technology**, n.108, p.182, 2006.

RØNNE, 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. **Modification of the physical and compositional properties of butter fat-canola oil blends by chemical and enzymatic interesterification**. 1997. 308 p. Thesis (Doctor) - Faculty of Graduate Studies - University of Guelph, 1997.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. Em **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. AKOH, C. C.; MIN, D. B. Boca Raton: CRC Press, 2008, p. 267 – 298, cap. 10.

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.

ROY, I.; GUPTA, M. N.; Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification, **Tetrahedron**, v.59, 5431-5436, 2003.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p.5–9, 2010.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 3/4, p. 219–228, 2006.

SAFARI, M.; KERMASHA, S. Interesterification of butterfat by commercial microbial lipases in a Cosurfactant-free microemulsion system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.9, p. 969 – 973, 1994.

SAFARI, M.; KERMASHA, S.; PABAI, F. Interesterification of butter fat by lipase from *Mucor miehei* in organic solvent media. **Food Biotechnology**, v.7, n.3, 265 – 273, 1993.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S.; Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com c supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, 1997.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, J. C; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008b.

SANTOS, J.C.; MIJONE, P.D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 61, p.229-236, 2008a.

SAXENA, R. K., ISAR, J.; SARAN, S.; KAUSHIK , R.; DAVIDSON, W.S.; Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. **Current Science**, v. 89, p. 1000-1003, 2005.

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.

SHAHIDI, F. Rapeseed and Canola: Global production and distribution. In: **CANOLA and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990, cap. 1.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J.P.D. Extraction and analysis of lipids. Em: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 5. p. 125 – 156.

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.

SHERMAN, P. The textural characteristics of dairy products. In DEMAN, J. M.; VOISEY, P.W.; RASPER, V. F.; STANLEY, D. W. **Rheology and texture in food quality**. Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, Inc., 1976. p. 382 – 404.

- SHIN, J.; AKOH, C. C.; LEE, K. 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, F. A.; MARSAIOLI JUNIOR, A. Estudo comparativo da conservação de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) seca por microondas e convencionalmente. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 387 – 404, 2004.
- SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 223 – 235, 2006.
- SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. Lipídios estruturados: Alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Química Nova**, v.32, n.5, p. 1253-1261, 2009.
- SIMÕES, I. S.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Influência da temperatura no coeficiente de fluxo de misturas de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. **Alimentos e Nutrição: Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 11, p.77-88, 2000.
- SIMÕES, I. S.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Consistência de mistura de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 325-330, 1998.
- SOLIS, V. S.; GIOIELLI, L. A.; POLAKIEWICZ, B. Hidrogenación e interesterificación del aceite de castaña de Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 3-4, p.192-197, 2001.
- SONG, X.; QI, X.; HAO, B.; QU, Y. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.1095–1101, 2008.
- SOUZA, I. F. **Cadeia produtiva de castanha-do-brasil**. 2006. 152p. Dissertação (Mestrado) Desenvolvimento Sustentável do Agronegócio – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás, Campo Grande/Brasília/ Goiânia, 2006.
- SOUZA, M. G.; VIEIRA, E. C.; OLIVEIRA, P. V. Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, sapucaia, xixá e castanha-do-pará por espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v.32, n. 6, p.1442-1446, 2009.
- STRUNZ, C. C.; OLIVEIRA, T. V.; VINAGRE, J. C.M.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHÃO R. C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v.28, p.151–155, 2008.
- SVENSSON, J.; ADLERCREUTZ, P. Identification of triacylglycerols in the enzymatic transesterification of rapeseed and butter oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 1 – 7, 2008.
- 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, E. F.; DOS SANTOS, A. P. B.; BASTOS, R.S.; PINTO, A. C.; KÜMMERLE, A. E.; COELHO, R. R. O uso de aparelhos de micro-ondas domésticos em aulas experimentais de química orgânica: nitração de salicilaldeído. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1603-1606, 2010.

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, cap. 2, p. 27–101.

TIMMS, R. E. Phase behaviour of fats and their mixtures. **Progress in Lipid Research**, v. 23, n.1, p.1–38, 1984.

TOMM, G. O.; SOARES, A. L. S.; DE MELLO, M. A. B.; DEPINÉ, D. E.; FIGER, E. Desempenho de genótipos de canola em Goiás, em 2004. **Comunicado Técnico on line 118 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2004, ISSN, 1517 – 4964. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co118.htm. Acessado em: 18 de abril de 2010.

TOMM, G. O.; TRENNEPOHL, J.; J. C. P., BONI; MORRIS, H.; TATSCH, R. A. Performance of canola genotypes in Mato Grosso do Sul, 2006, **Boletim de pesquisa e desenvolvimento on line 43 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** 2007, ISSN 1677-890. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp43.htm. Acessado em: 18 de abril de 2010.

TOMM, G.O. Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento on line 26, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2005, ISSN 1677-8901. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm. Acessado em: 18 de abril de 2010.

TRUCON, C. A **castanha-do-pará**. Doce Limão. Disponível em: <http://www.docelimao.com.br/site/linhaca/537-a-castanha-do-para.html/> Acessado em: 19 de agosto de 2010.

TURATTI, J. M.; GOMES, R. A. R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos: Aspectos Funcionais e Novas Tendências**. Campinas: ITAL, 69p, 2002.

VLIET, T. Rheological classification of foods and instrumental techniques. In: ROSENTHAL, A. J. **Food Texture: Measurement and perception**. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 1999, p.65 – 96.

WEETE, J. D. Microbial Lipases. G. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2008, cap. 26

WIJGA, A. H.; SMIT, H. A.; KERKHOF, M.; DE JONGSTE, J. C.; GERRITSEN, J.; NEIJENS, H. J.; BOSHIJZEN, H. C.; BRUNEKREEF, B. Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study. **Thorax**, v.58, p. 567 – 572, 2003.

WIRKOWSKA, M.; BRYŚ, J.; KOWALSKI, B. Antioxidant stability of interesterified blends of rapeseed oil and milk fat. **Zywnosc**, v.12, n. 2 (Supl.), p.265-274, 2005b.

WIRKOWSKA, M.; BRYŚ, J.; TARNOŃSKA, K.; KOWALSKI, B.; GOZDOWSKI, D. Effect of transesterification on the antioxidant stability of mixtures of sunflower oil and milk fat. **Tłuszcze Jadalne**, v. 40, n. 3/4, p. 91-98, 2005a.

WOERFEL, J.B. Formulation of soy oil products. **Grasas y Aceites**, v.46, p. 357-365, 1995.

WRIGTH, A. J.; MARANGONI, A. G.; The effect of minor components on milkfat crystallization, microstructure, and rheological properties. In: MARANGONI, A.G.; NARINE, S.S. **Physical Properties of Lipids**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. Cap 5, p.125–162.

WRIGTH, A. J.; SCANLON, R. W.; HARTEL, R. W.; MARGONI, A.G. Rheological properties of milkfat and butter. **Journal of Food Science**, v.66, n.8, p.1056-1071, 2001.

YADAV, G. D., LATHI, P. S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, 814–820, 2006.

YU, D.; WANG , Z.; CHEN, P.; JIN, L.; CHENG, Y.; ZHOU, J.; CAO, S. Microwave-assisted resolution of (R,S)-2-octanol by enzymatic transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 51–57, 2007.

YU, Z.; RIZVI, S. S. H.; ZOLLWEGF, J. A. Enzymatic esterification of fatty acid mixtures from milk fat and anhydrous milk fat with canola oil in supercritical carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 508-513, 1992.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p.35-85.

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 – Detalhamento do Programa Computacional 1, 2, 3 óleos utilizado para cálculo dos triacilgliceróis dos óleos vegetais (ANTONIOSI FILHO, 1995)*

Os resultados obtidos utilizando este programa estão apresentados na Tabela 4.3 (seção 4.1.6).

O programa computacional foi desenvolvido por Nelson Roberto Antoniosi Filho como tema de tese de doutorado e baseia-se em equações matemáticas que procuram prever a porcentagem molar dos triacilglicerídeos presentes em óleos gorduras vegetais, a partir da composição de ácidos graxos destas amostras, e que são a base da hipótese de distribuição 1,2,3-randômica.

Segundo essas equações matemáticas, se A, B e C são as porcentagens molares dos ácidos graxos A, B e C, então a porcentagem molar de triacilglicerídeos contendo somente um ácido, tal como o ácido graxo A, é:

$$\%AAA = \frac{A^3}{10000} \quad (1)$$

A porcentagem molar de triacilglicerídeos contendo 2 ácidos graxos diferentes, tais como A e B, é:

$$\%AAB = \frac{3.A^2.B}{10000} \quad (2)$$

A porcentagem molar de triacilglicerídeos contendo três ácidos graxos diferentes é:

$$\%ABC = \frac{6.A.B.C}{10000} \quad (3)$$

Usando as equações matemáticas descritas acima, o autor construiu um programa de computador, na linguagem TURBO-PASCAL (versão 5.0), com o objetivo de prever a composição triacilglicerídica de um óleo vegetal, a partir da composição de seus ácidos graxos, levando em consideração:

- O fato de que vários trabalhos utilizando a técnica de hidrólise via lipase pancreática têm estabelecido que a hidroxila C-2 do glicerol é preferencialmente acilada por ácidos graxos insaturados, e que as hidroxilas C-1 e C-3 das extremidades do glicerol são subseqüentemente aciladas pelos ácidos graxos remanescentes e por ácidos graxos insaturados não requeridos na posição C-2 do glicerol.

- A hidroxila C-3 do glicerol contém um ácido graxo com um grau de insaturação maior do que o apresentado pelo ácido graxo que ocupa a posição C-1 do glicerol. No caso de haver ácidos graxos com mesmo grau de insaturação ocupando as posições C-1 e C-3 do glicerol, admite-se que, dentre estes dois ácidos graxos, o de maior massa molecular estará ocupando a posição C-3.

* Referência: ANTONIOSI FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais por meio de métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 1995.

APÊNDICE B – Exemplo de cromatograma obtido na análise da composição em triacilgliceróis (TAGs) quanto ao número de carbonos por cromatografia gasosa.

Manteiga padrão

APÊNDICE C – Atividade hidrolítica (em azeite de oliva) da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-PVA por adsorção física utilizada como biocatalisador nas reações de interesterificação.

Tabela 1 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.3.1.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
Ensaio 1 _blenda 80:20* _45°C	9,02	4747	30,58
Ensaio 2 _blenda 80:20* _65°C	8,18	5104	32,52
Ensaio 3 _blenda 50:50* _45°C	9,02	4747	30,58
Ensaio 4 _blenda 50:50* _65°C	8,18	5104	32,52
Ensaio 5 _blenda 65:35* _55°C	9,65	5386	27,41
Ensaio 6 _blenda 65:35* _55°C	11,21	4975	31,97
Ensaio 7 _blenda 65:35* _55°C	8,18	4991	33,17
Ensaio 8 _blenda 80:20* _55°C	7,19	4937	25,89
Ensaio 9 _blenda 65:35* _65°C	6,37	4757	30,27
Ensaio 10 _blenda 50:50* _55°C	7,19	4937	25,89
Ensaio 11 _blenda 65:35* _45°C	10,10	4102	28,60
Média ± Desvio padrão	8,57 ±1,41	4889,73 ±322,33	29,76 ±2,64

*Proporção mássica gordura de leite:óleo de canola

Tabela 2 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.3.3.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
blenda 65:35*	7,97	4300	25,05

*Proporção mássica gordura de leite:óleo de canola

Tabela 3 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.4.1.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
Ensaio 1_blanda 80:20*_ 45°C	10,08	4794	30,58
Ensaio 2_blanda 80:20*_ 65°C	9,02	4052	27,69
Ensaio 3_blanda 50:50*_ 45°C	10,08	4794	30,58
Ensaio 4_blanda 50:50*_ 65°C	9,02	4052	27,69
Ensaio 5_blanda 65:35*_ 55°C	7,34	3977	27,25
Ensaio 6_blanda 65:35*_ 55°C	9,48	3789	25,21
Ensaio 7_blanda 65:35*_ 55°C	6,25	3709	24,23
Ensaio 8 _blenda 80:20*_ 55°C	9,48	3789	25,21
Ensaio 9 _blenda 65:35*_ 65°C	9,02	4052	27,69
Ensaio 10 _blenda 50:50*_ 55°C	9,48	3789	25,21
Ensaio 11_blanda 65:35*_ 45°C	10,08	4794	30,58
Média ± Desvio padrão	9,03 ±1,20	4144,64 ±434,52	27,45 ±2,35

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará

Tabela 4 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.4.3.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
blenda 50:50*	7,69	4479	26,94

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará

Tabela 5 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.5.1.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
Ensaio 1 _blenda 50:50:0*	5,61	4342	26,57
Ensaio 2 _blenda 67:0:33*	9,23	4848	28,40
Ensaio 3 _blenda 100:0:0*	5,61	4342	26,57
Ensaio 4 _blenda 58:8:33*	9,01	4392	27,41
Ensaio 5 _blenda 83:8:8*	9,23	4848	28,40
Ensaio 6 _blenda 100:0:0*	4,59	5213	33,14
Ensaio 7 _blenda 83:0:17*	9,01	4392	27,41
Ensaio 8 _blenda 58:33:8*	9,40	4236	26,33
Ensaio 9 _blenda 50:33:17*	9,23	4848	28,40
Ensaio 10 _blenda 67:17:17*	9,40	4236	26,33
Ensaio 11 _blenda 50:0:50*	9,01	4392	27,41
Ensaio 12 _blenda 50:17:33*	9,90	4616	30,30
Ensaio 13 _blenda 67:0:33*	9,90	4616	30,30
Ensaio 14 _blenda 50:50:0*	4,59	5213	33,14
Ensaio 15 _blenda 67:33:0*	5,61	4342	26,57
Ensaio 16 _blenda 50:0:50*	6,67	4489	29,49
Ensaio 17 _blenda 83:17:0*	6,67	4489	29,49
Média ± Desvio padrão	8,13 ±1,88	4533,55±288,43	28,65 ±2,13

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará

Tabela 6 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.5.2.

Derivado imobilizado	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
blenda 56:22:22*	8,33	4369	27,13

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de canola: óleo de castanha-do-pará

Tabela 7 – Biocatalisador utilizado nas reações de interesterificação apresentadas na seção 4.6.

Derivado imobilizado		Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de imobilização (%)
blenda binária com óleo de canola 65:35*	Convencional	7,97	4300	25,05
	Micro-ondas	4,36	3964	25,76
blenda binária com óleo de castanha-do-pará 50:50**	Convencional	8,33	3588	23,38
	Micro-ondas	8,33	3588	23,38

*Proporção mássica gordura de leite: óleo de canola

**Proporção mássica gordura de leite: óleo de castanha-do-pará