U N I V E R S I D A D E D E S Ã O P A U L O

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

GISELE FÁTIMA MORAIS NUNES

Avaliação da modificação da composição e textura de um produto obtido por transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja

Lorena

2008

GISELE FÁTIMA MORAIS NUNES

Avaliação da modificação da composição e textura de um produto obtido por transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Dr. Júlio César dos Santos

Lorena

2008

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

Catalogação na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Nunes, Gisele Fátima Morais
Avaliação da modificação da composição e textura de um produto obtido por transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja / Gisele Fátima Morais Nunes; orientador Júlio Cesar dos Santos.-- Lorena, 2008.

126 f: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Lipase 2. Imobilização 3. Transesterificação enzimática 4. Gordura de leite. 5. Óleo de soja. 6. Textura. I. Título.

577.152.9 - CDU

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me fortalecer permitindo superar todos os obstáculos.

Ao Júlio meu orientador pela orientação, amizade, paciência, disponibilidade, confiança, pelas discussões e pelo apoio, obrigada.

À Prof[a]. Heizir Ferreira de Castro, por sua presença em meu trabalho, pelas sugestões e disponibilidade, meus sinceros reconhecimentos.

Ao Rafael meu amor, meu companheiro, que tanto me ajudou, agradeço por sua presença marcante em minha vida sempre, em tudo, em todos os momentos.

Aos meus pais, Amaro e Edna por terem me dado a vida, por sempre me apoiarem, por todo o carinho e compreensão.

À minha querida tia Celina por ser uma das grandes responsáveis pela minha formação acadêmica e por seus grandes incentivos.

À minha vó Maria que sempre está muito presente em minha vida.

Ao meu irmão Rodrigo pelo carinho mesmo distante.

À minha querida irmã Ana, e aos meus sobrinhos Pedro e Helena, tão distantes e tão presentes, pela compreensão nos momentos ausentes e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão André pelo apoio e estímulo constantes, pelo exemplo que é, e por acreditar sempre no meu potencial.

Aos meus sogros, Graça e Odilon por serem minha segunda família e sempre me acolherem nos momentos difíceis.

À minha querida amiga irmã Ariela. Por sempre estar ao meu lado, pela ajuda carinhosa e companheirismo, você foi muito importante na realização deste trabalho, ele também é seu.

À minha querida amiga Tininha, pelos anos de convivência em nossa casa, pelo carinho de irmã e pelo incentivo constante.

Ás amigas Poli e Pati que estiveram sempre presentes, me apoiando com carinho.

Aos colegas do nosso grupo de trabalho pela ajuda e convivência diária. Em especial à Josiane que também contribuiu para esse trabalho.

Ao professor Shigue pelas análises de DSC e reologia.

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

À CAPES 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 modificação da composição e textura de um produto obtido por transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja.** 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2008.

As características nutricionais de produtos alimentícios têm sido cada vez mais valorizadas pelo mercado consumidor em função da constante preocupação com os efeitos dos alimentos na saúde. O sucesso de um produto alimentício no mercado, entretanto, depende também de suas características físicas, tais como espalhabilidade, aparência e impressões sensoriais dos alimentos na boca. Estas características desempenham papel fundamental no processamento industrial e na aceitabilidade do produto pelo consumidor. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja na composição e na textura do produto alimentício obtido, empregando como catalisador lipase de *Aspergillus niger* previamente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano–álcool polivinílico. Em uma primeira etapa, as matérias-primas foram caracterizadas quanto à umidade, índices de acidez, saponificação, peróxido e iodo, propriedades reológicas e térmicas. Em seguida, os materiais de partida foram misturados em diferentes proporções seguindo um planejamento experimental estatístico de misturas, e empregados nas reações de transesterificação. As variáveis resposta foram os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido, as propriedades de textura consistência e dureza, e o grau de transesterificação. Os resultados obtidos mostraram que os índices de acidez, saponificação, peróxido e iodo apresentaram uma dependência linear em função da fração mássica de gordura de leite tanto para a mistura das matérias-primas como para os produtos transesterificados. Com relação às propriedades de textura, modelos estatísticos foram compostos e permitiram verificar que a transesterificação promoveu uma diminuição tanto da consistência quanto da dureza nas misturas contendo proporções superiores a 50% de gordura de leite. As misturas preparadas com frações de gordura inferiores a este valor praticamente não sofreram alterações de textura após a reação. A avaliação da composição dos produtos obtidos demonstrou que as amostras correspondentes à gordura de leite pura e às misturas contendo 67 e 75% desta, apresentaram modificações no perfil de triacilgliceróis (TAGs), mostrando de forma geral diminuição na concentração dos TAGs C_{34}-C_{38} e C_{54} e aumento dos TAGs C_{24}-C_{30} e C_{44}-C_{50}. A reação empregando gordura de leite pura resultou em um grau de transesterificação (5,20%) mais elevado em relação ao óleo puro (3,33%), o que pode estar diretamente relacionado à especificidade da enzima pelos ácidos graxos presentes nesta gordura. O grau de transesterificação mais elevado (10,75%) foi obtido para a mistura contendo 67% de gordura de leite. Os resultados indicaram que a transesterificação de misturas contendo 50-67% de gordura de leite resultou em produtos com melhores propriedades de textura (espalhabilidade) sob temperatura de refrigeração em comparação à manteiga, à gordura de leite ou à simples mistura física com igual composição, sendo os valores de consistência e dureza pelo menos 32% menores em comparação à manteiga. Portanto, o desenvolvimento experimental deste trabalho permitiu demonstrar a viabilidade da transesterificação enzimática de uma mistura contendo elevados teores de gordura de leite, o que resultou na preservação de parte de suas características organolépticas, obtendo-se como resultado um produto com melhores características de textura (maior espalhabilidade) e nutricionais (maior teor de ácidos graxos insaturados).

Palavras-chave: Lipase. Imobilização. Transesterificação enzimática. Gordura de leite. Óleo de soja. Textura.

ABSTRACT

NUNES, G. F. M. **Evaluation of the modification on the composition and texture of a product obtained by enzymatic transesterification of milkfat with soybean oil.** 2008.126f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2008.

The nutritional food characteristics have been highly considered by consumers due to the constant worries with their effects on health. However, the success of a new food product in the market depends also on its physical characteristics, such as spreadability, appearance and mouthfeel. These properties are very important for industrial processing and acceptability of the product by the consumer. In this context, the objective of present project was to assess the effect of the enzymatic transesterification of milkfat with soybean oil on the composition and texture of the obtained product. For this reaction *Aspergillus niger* lipase previously immobilized in polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix was chosen as catalyst. The work was carried in three steps. Firstly, raw materials were characterized regarding their humidity, acid, saponification, peroxide and iodine indexes, rheological and thermal properties. Following these, raw materials were mixed at different proportions according to a statistical mixture factorial design and used as substrate in the transesterification reactions. The response variables were acid, saponification, iodine and peroxide indexes, texture properties (consistency and hardness) and transesterification yields. Acid, saponification, peroxide and iodine indexes showed a linear dependence on the milkfat mass fraction for both physical raw materials blends and transesterified products. Regarding the texture properties, statistical models were composed and allowed verifying that the transesterification reaction decreased both consistency and hardness for substrates containing more than 50% of milkfat. No alteration in these properties was noted for substrates containing lower milkfat fraction. The evaluation of the product compositions showed that samples containing pure milkfat and mixtures containing 67 to 75% of milkfat yielded modifications in the triacylglycerols profile (TAGs) such as decreased on the C_{34}-C_{38} and C_{54} TAGs concentrations and increased on the C_{24}-C_{30} and C_{44}-C_{50} TAGs concentrations. Reactions carried with pure milkfat resulted in higher transesterification yield (5.20%) as compared with pure soybean oil (3.33%), and this was related to the specificity of the enzyme for fatty acids presented in the milkfat. The highest transesterification yield (10.75%) was obtained for mixtures containing 67% of milkfat. Theses results indicated that the transesterification reactions of substrates containing 50-67% of milkfat gave products having better properties regarding the texture (more spreadability) under cooling temperature than butter, milkfat or simple physical blend at the same composition. Consistency and hardness values were at least 32% lower than data for butterfat. Therefore, the proposed experimental work allowed demonstrating that the enzymatic transesterification of a mixture containing high milkfat levels besides partially preserving the milkfat organoleptic characteristics also rendering a product with better texture (higher spreadability) and nutritional properties (higher amount of unsaturated fatty acids).

Keywords: Lipase. Immobilization. Enzymatic transesterification. Milkfat. Soybean oil. Texture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação da reação entre uma molécula de glicerol e três diferentes ácidos graxos para a formação do triglicerídeo (MOUSTAFA; STAUFFER, 1997). As letras R_1, R_2 e R_3 representam a cadeia carbônica dos ácidos graxos ligados nas três posições do glicerol (sn-1, sn-2 e sn-3). 15

Figura 2.2. Estrutura química dos ácidos graxos saturados (a) e insaturados(b) (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). 16

Figura 2.3. Isômeros posicionais dos ácidos graxos poliinsaturados. 17

Figura 2.4 - Formas estruturais dos isômeros cis/trans encontradas ácidos graxos insaturados. 18

Figura 2.5.Concentração em ácidos graxos trans em alimentos (BERTOLINO et al., 2006).. 19

Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases (CARVALHO et al., 2003). 23

Figura 2.7. Etapas envolvidas na formação do POS-PVA ("R" representa o grupo alquil) (SANTOS et al., 2008). 27

Figura 2.8. (a) Ativação do POS-PVA com metaperiodato de sódio; (b) Imobilização do POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio (SANTOS et al., 2008). 27

Figura 2.9. Produtos resultantes da reação de transesterificação de diferentes triglicerídeos por catálise (a) química ou enzimática com lipase não específica e (b) enzimática com lipase 1,3 específica (As letras A, B e C representam os diferentes resíduos de ácidos graxos que são redistribuídos nas moléculas dos triacilgliceróis) (CARVALHO et al., 2003). 29

Figura 2.10. Formas de empacotamento de gorduras. (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002; HARTEL, 2001). 41

Figura 2.11. Curvas características de fluidos newtonianos (a) e (b); pseudopláticos (c) e (d); dilatantes (e) e (f); tixotrópicos (g) e (h) e reopéxicos (i) e (j). 43

Figura 3.1. Representação esquemática do reator empregado nas reações de transesterificação da gordura de leite com óleo de soja. 49

Figura 3.2. Representação esquemática do sistema montado para determinação do índice de saponificação. 51

Figura 3.3. Alterações de coloração que ocorrem durante a titulação para obtenção do Índice de Iodo das amostras. 53

Figura 3.4. Sensor em forma de cone, acrílico, com ponta não truncada e ângulo de 45º utilizado para a análise de consistência das amostras..... 56

Figura 3.5. Sonda de fio cortante utilizada para a análise de dureza das amostras. 57

Figura 4.1. Redução da viscosidade (%) do óleo de soja e da gordura de leite a cada variação de 10ºC na temperatura. 68

Figura 4.2. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura, obtidas por análise de calorimetria exploratória diferencial, da fusão do óleo soja (a) e da gordura de leite(b). Na figura, Ti refere-se à temperatura inicial de fusão e Tf refere-se à temperatura final de fusão. 72

Figura 4.3. Resultados Experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de acidez (a), saponificação (b), iodo (c) e peróxido (d) em função da fração mássica de gordura de leite na mistura física das matérias-primas. 81

Figura 4.4. Resultados Experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de saponificação (a), iodo (b) e peróxido (c) em função da fração mássica de gordura de leite nos produtos transesterificados. 81

Figura 4.5. Modelos ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de saponificação (a), iodo (b), e peróxido (c) em função da fração mássica de gordura de leite para a mistura das matérias-primas e para aos produtos transesterificados. 82

Figura 4.6. Curva caracterítica de força em função do tempo obtida em testes de consistência da mistura contendo 67% de gordura de leite e 33% de óleo de soja, à temperatura de 10ºC. 84

Figura 4.7. Curva de força em função da profundidade de corte utilizada para a determinação da dureza da mistura contendo 67% de gordura de leite e 33% de óleo de soja, à temperatura de 10ºC. 85

Figura 4.8. Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite na mistura física das matérias-primas. 90

Figura 4.9. Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite nos produtos transesterificados. 90

Figura 4.10. Modelos ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite, para a mistura das matérias-primas comparativamente aos produtos transesterificados. 91

Figura 4.11. Composição TAGs das misturas de gordura de leite e óleo de soja contendo, percentualmente, 100:0; 75: 25; 67:33; 50:50; 33:67; 25:75 e 0:100 desses componentes, respectivamente. 92

Figura 4.12. Concentrações de trigicerídeos (em número de carbonos) obtidos para as misturas físicas e produtos transesterificados da gordura de leite e o óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico para as amostras contendo 0%(a) e (b), 25% (c) e 33%(d) de gordura de leite. 93

Figura 4.13.Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para o grau de transesterificação dos produtos...98

Figura 4.14. Grau de hidrólise das amostras retiradas do meio recional ao longo do tempo para as reações de transesterificação da mistura de gordura de leite e óleo de soja nas seguintes proporções, respectivamente: 0:100 (—■—) e (—●—);25:75 (—▲—);33:67 (—▼—);50:50 (—◆—);67:33 (—+—);75:25 (—×—);100:0 (—*—), (—--—) e (—|—).....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição em ácidos graxos da gordura do leite (% em massa). 21

Tabela 2.2. Alguns setores de aplicações potenciais de lipases. 24

Tabela 2.3. Classificação das lipases de acordo com sua especificidade 25

Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite. 31

Tabela 2.5. Composição em ácidos graxos do óleo de soja (% em massa) 39

Tabela 2.6. Classificação de óleos e gorduras de acordo com sua natureza cristalina. 41

Tabela 2.7. Métodos mais empregados para a modificação da textura da manteiga. 44

Tabela 3.1. Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. 46

Tabela 3.2 – Planejamento estatístico de misturas. 48

Tabela 3.3. Condições operacionais para quantificação de triglicerídeos por cromatografia gasosa. 57

Tabela 4.1. Umidade, teor de gordura, sólidos não gordurosos, índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das matérias-primas empregadas em comparação aos valores estabelecidos pela legislação brasileira. 60

Tabela 4.2. Índice de comportamento do óleo de soja e da gordura de leite obtidos nas diferentes temperaturas estudadas e coeficientes de correlação de ajuste dos dados à lei de potência. 67

Tabela 4.3. Viscosidades do óleo de soja e da gordura de leite em diferentes temperaturas observadas no presente trabalho, comparativamente a valores encontrados na literatura. 68

Tabela 4.4. Parâmetros de ajuste dos dados obtidos para a gordura de leite, nas temperaturas de 20 e 25ºC, ao modelo de Casson e os correspondentes coeficientes de correlação do ajuste. 69

Tabela 4.5. Parâmetros da equação de Arrhenius ajustada para os dados de viscosidade em função da temperatura para o óleo de soja e a gordura de leite avaliados. 70

Tabela 4.6. Temperatura inicial de fusão (T_i), temperatura final de fusão (T_f), faixa de temperatura de fusão (ΔT) e entalpia de fusão (ΔH_f) do óleo de soja da gordura de leite, obtidos por calorimetria exploratória diferencial. 74

Tabela 4.7. Caracteríticas da lipase de *A. niger* livre e imobilizada em POS-PVA. 76

Tabela 4.8. Índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das misturas físicas da gordura de leite com óleo de soja e dos respectivos produtos transesterificados correspondentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico. 78

Tabela 4.9. Análise de variância para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das misturas físicas da gordura de leite com óleo de soja e dos respectivos produtos transesterificados correspondentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico. 79

Tabela 4.10. Equações que representam os modelos estatíticos ajustados para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido em função da fração mássica das matérias-primas*... 80

Tabela 4.11. Consistência e dureza, obtidas sob temperatura de 10ºC, para as misturas físicas de gordura de leite e óleo de soja e para os produtos transesterificados correspondentes referentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico. 86

Tabela 4.12.Avaliação de margarinas e "shortenings" por meio de sua consistência. 87

Tabela 4.13. Análise de variância para consistência e dureza (sob temperatura de 10ºC) das misturas físicas de gordura de leite e óleo de soja e produtos transesterificados correspondentes referentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico. 88

Tabela 4.14. Equações que representam os modelos estatíticos ajustados para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido em função da fração mássica das matérias-primas*... 89

Tabela 4.15. Grau de transesterificação dos produtos resultantes da reação entre a gordura de leite e óleo de soja para os experimentos conduzidos de acordo com o planejamento. 96

Tabela 4.16 – Análise de variância para o grau de transesterificação (correspondente às 72h de processo) dos produtos da reação da gordura de leite com óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico. 97

Tabela 4.17. Consistência e dureza de misturas físicas entre gordura de leite e óleo de soja e os respectivos produtos transesterificados obtidos no presente trabalho em relação à manteiga. 100

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AOCS	American Oil Chemists' Society
CGS	Conteúdo de gordura sólida
CLA	Conjugated linoleic acid (Ácido linoléico conjugado)
DSC	Diferencial Scanning Calorimetry (Calorimetria exploratória diferencial)
GL	Grau de liberdade
HDL	High Density Lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
MQ	Média Quadrática
PEG	Polietilenoglicol
POS-PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
PVA	Álcool polivinílico
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
SQ	Soma Quadrática
TAGs	Triacilgliceróis
TEOS	Tetraetilortossilicato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15

2.1. Óleos e gorduras e sua importância na alimentação humana 15

2.1.1. Definições 15
2.1.2. Gorduras trans 17
2.1.3. Gordura de leite 20

2.2. Modificação da gordura de leite empregando lipases 22
2.2.1. Lipases e suas aplicações 22
2.2.2. Transesterificação enzimática da gordura de leite 28

2.3. Modificação das propriedades físicas da gordura de leite 39
2.3.1. Ponto de fusão 40
2.3.2.Polimorfismo 40
2.3.3. Conteúdo de gordura sólida (CGS) 42
2.3.4. Reologia e Textura 42

3.1. Materiais 45
3.1.1. Matérias-primas 45
3.1.2. Enzima 45
3.1.3. Outros materiais e reagentes 45

3.2. Principais Equipamentos 46

3.3. Procedimento experimental 46
3.3.1. Separação da Gordura de leite 46
3.3.2. Obtenção do suporte 47
3.3.3. Ativação do suporte 47
3.3.4. Imobilização da lipase 47
3.3.5. Planejamento Estatístico 48
3.3.6. Condições reacionais da transesterificação da gordura do leite com óleo de soja 49

3.4. Métodos de Análise 50
3.4.1. Umidade e voláteis das matérias-primas 50
3.4.2. Teor de gordura e sólidos não gordurosos 50
3.4.3. Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres 50
3.4.4. Índice de saponificação 51
3.4.5. Índice de iodo 52
3.4. 6. Índice de peróxido 53
3.4.7. Viscosidade 54
3.4.8.Calorimetria exploratória diferencial 55
3.4.9. Consistência 55
3.4.10. Dureza 56
3.4.11. Quantificação dos triglicerídeos das reações de transesterificação da gordura do leite com óleo de soja 57
3.4.12. Grau de Transesterificação (T, %) nas reações com gordura de leite e óleo de soja . 57
3.4.13. Grau de hidrólise (H, %) 58

3.4.14. Determinação das características do biocatalisador *58*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **60**

4.1. Caracterização físico-química e reológica das matérias-primas **60**
4.1.1. Umidade, teor de gordura e sólidos não gordurosos *61*
4.1.2. Índice de acidez *61*
4.1.3. Índice de saponificação *62*
4.1.4. Índice de iodo *63*
4.1.5. Índice de peróxido *65*
4.1.6. Viscosidade *66*
4.1.7. Análise do comportamento térmico das matérias-primas *71*

4.2. Avaliação das propriedades físico-químicas, de composição e de textura dos produtos obtidos por transesterificação da gordura de leite com óleo de soja catalisada por lipase de Aspergillus niger **75**
4.2.1. Características do sitema imobilizado *75*
4.2.2. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática nas propriedades físico-químicas do produto obtido *77*
4.2.3. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática nas propriedades de textura do produto obtido *83*
4.2.4. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática na composição do produto obtido *91*
4.2.5. Avaliação global dos resultados obtidos *100*

5. CONCLUSÕES **102**

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS **105**

REFERÊNCIAS **106**

APÊNDICES **116**

1. INTRODUÇÃO

A busca por alimentos mais saudáveis e com características desejáveis tem motivado pesquisas que visam o desenvolvimento de processos de transformação adequados para modificação das propriedades de matérias-primas naturais. Esta busca, aliada aos esforços para o estabelecimento de processos ecologicamente não agressivos, como as rotas enzimáticas de produção, está entre os temas de pesquisa mais estudados da atualidade.

Entre os alimentos apreciados pelo consumidor encontra-se a gordura de leite, um alimento ao qual se atribui sabor e aroma peculiares e agradáveis. A redução do consumo deste tipo de gordura na dieta humana, como também de outras gorduras animais, foi recomendada nas últimas décadas em função da grande 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 chamado "colesterol ruim") no organismo e conseqüentemente ao aumento do risco das doenças cardiovasculares. Em função disso, a manteiga foi substituída por produtos como margarinas ou cremes vegetais, os quais são obtidos a partir de diversos óleos, por um processo atrativo do ponto de vista econômico: a hidrogenação parcial. Recentemente, entretanto, novas descobertas indicam que a gordura obtida pela hidrogenação parcial de óleos vegetais possui considerável quantidade de ácidos graxos insaturados na configuração "*trans*", os quais têm sido apontados como mais danosos à saúde que os ácidos graxos saturados, principalmente com respeito à elevação dos níveis de colesterol no sangue. Isso é devido ao fato da gordura *trans* conduzir não apenas ao aumento no teor de LDL, mas também à redução da liporpoteína de alta densidade (HDL – "High Density Lipoprotein", o chamado "coleterol bom"), resultando em uma elevação da relação LDL/HDL mais significativa do que a ingestão de ácidos graxos saturados, e conseqüentemente, em um efeito adverso à saúde mais acentuado. Em função destas descobertas, tem-se buscado a substituição do processo de hidrogenação parcial por vias de produção que não resultem na formação de isômeros *trans*.

Os aspectos nutricionais, entretanto, não são suficientes para a aceitabilidade do produto sendo que, muitas vezes, alimentos capazes de resultar em grandes benefícios à saúde são preteridos pelo consumidor em função de propriedades físicas e organolépticas inadequadas. Entre essas, as propriedades de textura são importantes para a aceitabilidade de um alimento pelo consumidor. Especificamente para manteigas, margarinas e produtos

similares, a análise de textura inclui a avaliação de características como espalhabilidade, aparência e as diversas impressões sensoriais do alimento na boca, que são úteis para sua adequação aos vários usos.

Uma alternativa interessante que pode eliminar a formação de isômeros *trans*, preservando as características organolépticas desejáveis da gordura de leite é a sua transesterificação com óleos vegetais. Além disso, esta alternativa inclui a redução na quantidade total de ácidos graxos saturados presentes no produto, o que conduz a uma melhora nutricional. Pode ainda conferir à manteiga boas propriedades de espalhabilidade sob temperatura de refrigeração doméstica, mantendo as características nutricionais importantes da gordura de leite como a presença de ácidos linoléicos conjugados, os quais têm efeito anticarcinogênico.

A reação de transesterificação pode ser realizada por via química ou enzimática, sendo esta última mais vantajosa, por permitir a obtenção de produtos específicos se forem utilizadas enzimas reogiosseletivas e por utilizar condições de reação mais suaves (temperatura e pressão reduzidas), o que conduz a menores alterações nas características organolépticas da manteiga. Esta via faz uso de lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) como biocatalisadores, uma classe de enzimas versáteis, capazes de atuar em substratos insolúveis em água e de catalisarem diferentes reações, tais como hidrólise, esterificação, interesterificação (alcoólise, acidólise e transesterificação).

Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja na composição e na textura do produto alimentício obtido, empregando como catalisador a lipase de *Aspergillus niger,* previamente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano – álcool polivinílico obtido pela técnica sol-gel. Avaliou-se, com o auxílio de um planejamento de misturas, a influência da proporção entre as matérias-primas nas propriedades do produto. As variáveis resposta foram os índices de acidez, saponificação, peróxido e iodo, a consistência e a dureza, além do grau de transesterificação obtido para cada reação. Considerou-se como resultado desejável a obtenção de um produto que incoporasse parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes no óleo de soja, mas que mantivesse as caracteríticas organolépticas da manteiga e apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos e gorduras e sua importância na alimentação humana

2.1.1. Definições

Os óleos e gorduras são substâncias essenciais para uma dieta saudável. Eles desempenham diferentes papéis no organismo humano, pois são fonte de energia, de fosfolipídios e esteróis; contêm ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico); auxiliam no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E, e K) pelo intestino, além de conferirem sabor agradável aos alimentos (AUED-PIMENTEL et al., 2003; LAWSON, 1995; MORETTO; FETT, 1998).

As fontes de óleos e gorduras podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Seus componentes mais expressivos são os triglicerídeos, que são ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos (TURATTI; GOMES; ATHIÉ, 2002) . Suas propriedades químicas e físicas dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos (AG) (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002), uma vez que estes representam em média 95% da massa molecular dos triacilgliceróis (TAGs) (MORETTO; FETT, 1998).

Na Figura 2.1 está representada a reação entre uma molécula de glicerol e três diferentes ácidos graxos para a formação do triglicerídeo.

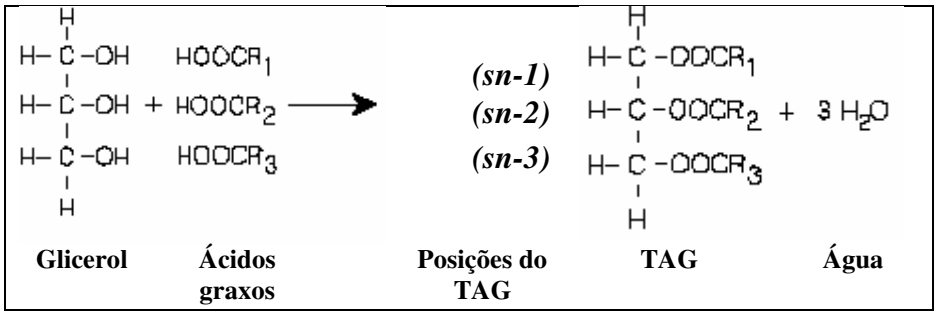


Figura 2.1. Representação da reação entre uma molécula de glicerol e três diferentes ácidos graxos para a formação do triglicerídeo (MOUSTAFA; STAUFFER, 1997). As letras R_1, R_2 e R_3 representam a cadeia carbônica dos ácidos graxos ligados nas três posições do glicerol (*sn-1, sn-2 e sn-3*).

No Brasil, o termo "gordura" refere-se a materiais que possuem um ponto de fusão acima de 20ºC, enquanto que o termo "óleo" refere-se a substâncias cujo ponto de fusão está abaixo desta temperatura (VISENTAINER; FRANCO, 2006). Isso se deve ao fato de que as

gorduras são compostas principalmente de ácidos graxos saturados enquanto os óleos compõem-se em sua maior parte de ácidos graxos insaturados (FIRESTONE, 2006).

Ácidos graxos saturados são aqueles em que os átomos de carbono estão ligados entre si por ligações simples (ligação σ) (MORETTO; FETT, 1998). Eles estão dispostos em uma cadeia linear (como pode ser observado na Figura 2.2.a) a qual possibilita que as moléculas de triglicerídeos compostas por estes ácidos sejam facilmente empacotadas umas sobre as outras, formando uma massa compacta. Este fato explica porque as gorduras saturadas são tão consistentes a temperatura ambiente (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002).

Os ácidos graxos insaturados são aqueles que possuem em sua configuração ligações simples (ligação σ) e duplas (ligação π) entre os átomos de carbono. Eles podem ser subdivididos em dois grupos: os monoinsaturados, que possuem apenas uma dupla ligação e os poliinsaturados, que possuem duas ou mais duplas ligações (MORETTO; FETT, 1998). Estes ácidos graxos, dependendo de sua isomeria geométrica, podem estar dispostos em forma de arcos por apresentarem "dobras" em sua estrutura, devido à presença das duplas ligações (como pode ser observado na Figura 2.2.b) e, portanto as moléculas de triglicerídeos por eles compostas não se encaixam perfeitamente umas sobre as outras. Como conseqüência, os triglicerídeos formados por estes ácidos possuem baixos pontos de fusão, o que explica que sejam líquidos à temperatura ambiente (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). Além disso, a presença de duplas ligações na estrutura desses ácidos os torna mais suscetíveis à oxidação, podendo reagir com hidrogênio, oxigênio e outros elementos (LAWSON, 1995).

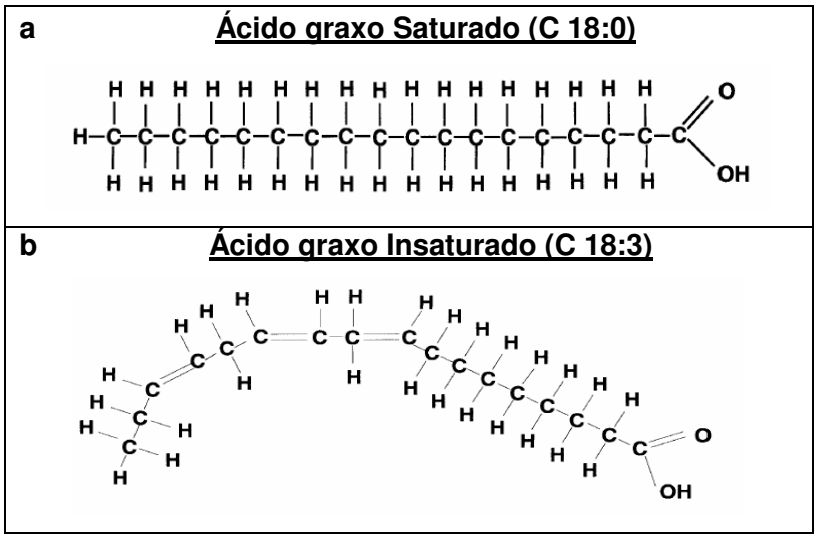


Figura 2.2. Estrutura química dos ácidos graxos saturados (a) e insaturados (b) (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados também podem ser diferentes devido à posição da dupla ligação entre carbonos, apresentando isomeria posicional (Figura 2.3). Embora as ligações duplas normalmente ocorram em uma posição não conjugada, podem também serm encontradas nesta forma, ou seja, alternadas por uma ligação simples como mostra a Figura 2.3. Óleos e gorduras que possuem ácidos graxos com duplas ligações em posições conjugadas são mais suscetíveis à oxidação que os não conjugados (LAWSON, 1995).

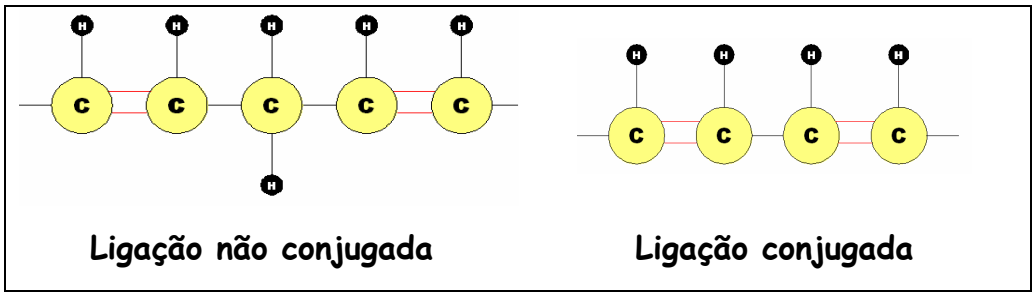


Figura 2.3. Isômeros posicionais dos ácidos graxos poliinsaturados.

Para obtenção de produtos com bons atributos físicos aliados a boas qualidades nutricionais, com características específicas para determinadas aplicações, diversificados meios para a modificação de óleos e gorduras têm sido estudados. A estrutura básica dos triglicerídeos pode ser redesenhada por mudanças químicas nos ácidos graxos (hidrogenação), pelo fracionamento da ligação éster (hidrólise) ou mesmo pela reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo (transesterificação química ou enzimática) (DE CASTRO et al., 2004).

2.1.2. Gorduras trans

Gorduras *trans* são aquelas que possuem ácidos graxos insaturados com ao menos uma dupla ligação na configuração *trans*, ou seja, na qual dois átomos de hidrogênio, ligados aos átomos de carbono adjacentes a insaturação, estão em direções opostas, de forma diagonal, contrariamente a geometria *cis*, na qual os átomos de hidrogênio estão localizados de forma paralela, do mesmo lado do plano (COSTA; BRESSAN; SABARENSE, 2006; LARQUÉ; ZAMORA; GIL, 2001; MORETTO; FETT, 1998). Na Figura 2.4 podemos observar as formas estruturais dos isômeros *cis/trans*. A maioria dos ácidos graxos insaturados ocorre na natureza na configuração geométrica *cis*, pois as enzimas envolvidas na síntese dos ácidos

graxos são seletivas para esta configuração (AUED-PIMENTEL et al., 2003; MARTIN; MATSHUSHITA; SOUZA, 2004).

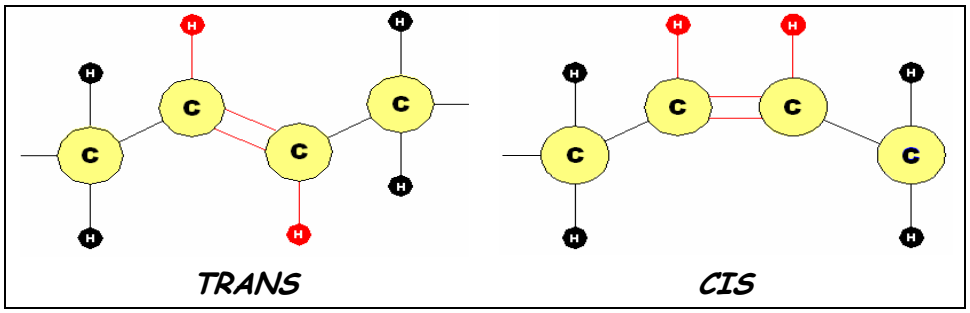


Figura 2.4 - Formas estruturais dos isômeros *cis/trans* encontradas ácidos graxos insaturados**.**

A introdução dos ácidos graxos *trans* em quantidades consideráveis na dieta humana iniciou-se com a utilização do processo de hidrogenação de óleos e gorduras. Estes ácidos estão presentes também, em pequenas quantidades, na gordura do leite e em outras gorduras de origem animal, devido à hidrogenação biológica no estômago dos ruminantes (LARQUÉ; ZAMORA; GIL, 2001). As gorduras parcialmente hidrogenadas são as maiores fontes destes ácidos, sendo encontradas em um grande número de alimentos processados como margarinas e produtos de panificação (AUED-PIMENTEL et al., 2003; LARQUÉ; ZAMORA; GIL, 2001), contribuindo com cerca de 80 a 90% de todos os isômeros *trans* provenientes da dieta (BERTOLINO et al., 2006; LARQUÉ; ZAMORA; GIL, 2001; MARTIN; MATSHUSHITA; SOUZA, 2004). Na Figura 2.5 pode-se observar a concentração em ácidos graxos *trans* em alguns alimentos. Dentre os produtos apresentados, a margarina obtida por hidrogenação contém maior concentração de gorduras *trans* em sua composição.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas sugerindo que os ácidos graxos *trans* são tão ou mais danosos à saúde do que os ácidos graxos saturados, principalmente no que diz respeito à elevação dos níveis de colesterol no sangue e conseqüentemente ao aumento do risco das doenças cardiovasculares (AUED-PIMENTEL et al., 2003; WARDLAW, 2002).

O consumo de calorias provenientes de ácidos graxos *trans* tem sido relacionado ao aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL, “Low Density Lipoprotein”) e à redução da lipoproteína de alta densidade (HDL, “High Density Lipoprotein”) no plasma, resultando em uma elevação da relação LDL/HDL mais significativa do que a ingestão de ácidos graxos saturados, e conseqüentemente, em um efeito adverso à saúde mais acentuado. (AUED-PIMENTEL et al., 2003; BERTOLINO et al., 2006; WARDLAW, 2002). Segundo Martin,

Matshushita e Souza (2004) foi observado em estudos que o acréscimo de uma unidade nesta relação está associado à ascensão em cerca de 50% do risco de doenças cardiovasculares.

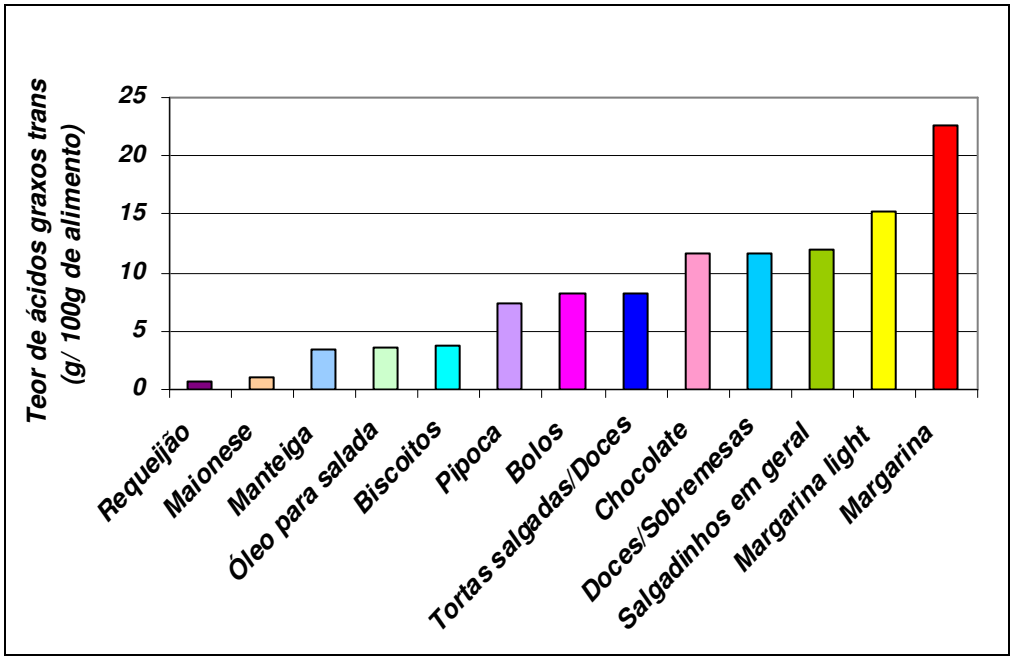


Figura 2.5. Concentração em ácidos graxos *trans* em alimentos (BERTOLINO et al., 2006).

Outros estudos mais recentes revelam que a associação entre a ingestão de gorduras *trans* e a incidência de doenças cardiovasculares não está ainda bem estabelecida e uma das explicações para esta inconsistência pode ser devido a fonte desses isômeros, já que as doenças coronárias estão interligadas muito mais a ingestão das gorduras *trans* provenientes do processo de hidrogenação parcial do que àquelas advindas de produtos de origem animal (ROY; FERLAY; CHILLIARD, 2006).

A diferença entre os ácidos graxos *trans* provenientes de gordura animal e os de gordura hidrogenada manufaturada não se refere apenas às quantidades, mas também está relacionada ao tipo de isômero predominantemente encontrado em cada uma delas. Entre os ácidos graxos *trans* resultantes do processo de biohidrogenação, há o predomínio do ácido vacênico (C18:1–11t), enquanto na gordura que sofre hidrogenação prevalece o ácido elaídico (C18:1–9t). O ácido elaídico é considerado o principal competidor do ácido linoléico no metabolismo humano, podendo esta ação refletir-se sobre a redução do número de receptores de lipoproteína de baixa densidade, contribuindo para o aumento de seus níveis plasmáticos (CHIARA; SICHIERI; CARVALHO, 2003).

Além das doenças cardiovasculares, a ingestão de gorduras *trans* têm sido correlacionada à incidência de outros malefícios à saúde como o aparecimento de asmas e alergias em crianças (TORRES; CASAL; OLIVEIRA, 2002; ZEGARSKA; PASZCZYK; BOREJSZO, 2005), a ocorrência de diabetes em adultos (ZEGARSKA; PASZCZYK; BOREJSZO, 2005) e a inibição do metabolismo de ácidos graxos essenciais influenciando o desenvolvimento infantil (CHIARA et al., 2002; COSTA; BRESSAN; SABARENSE, 2006; MARTIN; MATSHUSHITA; SOUZA, 2004).

Baseada em estudos recentes, a Organização Mundial da Saúde recomenda que o consumo máximo deste tipo de gordura não deve ser superior a 1% das calorias totais ingeridas (BERTOLINO et al., 2006).

Os produtos originados de óleos hidrogenados começaram a ser produzidos durante a metade do século dezenove na Europa, objetivando-se substituir a manteiga que era um produto de alto valor agregado (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). Contudo, diante de todos os inconvenientes recentemente descobertos, causados pela ingestão de gorduras provenientes de óleos vegetais hidrogenados, a gordura de leite tem tido destaque novamente em diversos estudos (BRYS et al., 2006; BRYS; WIRKOWSKA; KOWALSKI, 2006; RONNE et al., 200; ZHANG; MU; XU, 2006).

2.1.3. Gordura de leite

O leite tem sido descrito como um dos alimentos naturais mais próximos da perfeição, devido particularmente a sua elevada densidade de nutrientes, incluindo proteínas, gorduras, açúcares, minerais e vitaminas. Com relação em especial à gordura do leite, além de ser uma importante fonte de lipídeos na dieta, atribui-se a ela maravilhoso sabor e aroma, e qualidade superior nas diversas impressões sensoriais do alimento na boca (BALCÃO; MALCATA, 1998).

A gordura do leite é uma mistura de mais de 100.000 tipos de triacilgliceróis nos quais estão distribuídos cerca de 400 diferentes ácidos graxos, sendo provavelmente a mais complexa de todas as gorduras naturais. Essa composição tão variada é responsável por propriedades organolépticas, físicas e nutricionais exclusivas (BALCÃO; MALCATA, 1998). Este alimento é uma mistura de fases sólidas e líquidas, sendo completamente sólido em

temperaturas de - 40ºC e completamente líquido em temperaturas de 38°C (RODRIGUES; GIOELLI, 2003). A Tabela 2.1 apresenta a composição em ácidos graxos da gordura de leite segundo Firestone (2006).

Durante algum tempo a gordura de leite foi apontada como prejudicial à saúde por conter quantidades razoáveis de colesterol e ácidos graxos saturados, os quais têm implicação no aumento de doenças cardiovasculares, sendo este fator relevante para a substituição da manteiga por outros produtos. O efeito hipercolesterolêmico da gordura de leite na dieta de humanos é associado principalmente com os resíduos dos ácidos láurico, mirístico e palmítico (BACÃO; MALCATA, 1998).

Tabela 2.1. Composição em ácidos graxos da gordura do leite (% em massa).

Ácidos Graxos		**Composição Gordura do Leite (%)**
Butírico	**C 4:0**	2,8 – 4,0
Capróico	**C 6:0**	1,4 – 3,0
Caprílico	**C 8:0**	0,5 – 1,7
Cáprico	**C 10:0**	1,7 – 3,2
Láurico	**C 12:0**	2,2 – 4,5
Mirístico	**C 14:0**	5,4 – 14,6
Miristoléico	**C 14:1**	0,6 – 1,6
Palmítico	**C 16:0**	25,0 – 41,0
Palmitoléico	**C 16:1**	2,0 – 6,0
Esteárico	**C 18:0**	6,0 – 11,0
Oléico	**C 18:1**	18,7 – 33,4
Linoléico	**C 18:2**	0,9 – 3,7
Linolênico	**C 18:3**	0,5
Saturados		45,0 – 83,0
Insaturados		22,7 – 45,2

Deve-se realçar, entretanto, que a gordura de leite possui componentes benéficos e importantes para a manutenção da saúde e prevenção de doenças. Nela encontram-se quantidades apreciáveis de ácidos linoléicos conjugados (Conjugated Linoleic Acid - CLA), um grupo de ácidos graxos que desempenham importantes efeitos à saúde, incluindo o combate a diabetes e a obesidade e a modulação do sistema imunológico e do crescimento ósseo (LOCK; BAUMAN, 2004). Outro componente da gordura de leite é o ácido butírico que tem sido sugerido como potente inibidor da proliferação de células cancerosas e indutor

da diferenciação e apoptose de diferentes linhagens destas células (ORCHEL et al., 2005; WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003).

As características nutricionais, todavia, não são suficientes para a aceitabilidade de um produto, sendo também fundamental que se considerem aspectos como as propriedades físicas e organolépticas de um alimento.

Contrariamente a margarina, a manteiga tem uma faixa de plasticidade limitada, comportando-se como um sólido pouco empalhável à temperatura de refrigeração (entre 0 e 10ºC), enquanto que a temperatura ambiente (20 – 25ºC) há separação do óleo e exsudação. Sua espalhabilidade ideal ocorre por volta dos 15ºC, temperatura na qual seu conteúdo de gordura sólida está em torno de 30% (MARANGONI; ROUSSEAU 1999; RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003).

Buscando-se obter um produto que alie os atributos organolépticos e de composição da gordura de leite, mas que contenha menores quantidades de ácidos graxos saturados e que possua melhor espalhabilidade à temperatura de refrigeração, diversos estudos tem sido realizados objetivando-se sua modificação. Dentre os processos em estudo, pode-se destacar a interesterificação, a qual pode ser química ou enzimática (NOOR LIDA et al., 2002; SILVA; GIOIELLI, 2006). Nesse último caso, lipases de diferentes fontes podem ser utilizadas (LAI et al., 2000; RONNE et al., 2005).

2.2. Modificação da gordura de leite empregando lipases

2.2.1. Lipases e suas aplicações

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) e atuam catalisando a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol em meio aquoso ou a reação inversa em meio orgânico. Estes biocatalisadores são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas (DE CASTRO et al., 2004; REETZ, 2002). As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento e serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes (CARVALHO et al., 2003).

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 esterificação e interesterificação (alcoólise, acidólise e transesterificação) (PANDEY et al., 1999). Estas reações podem ser observadas esquematicamente na Figura 2.6.

HIDRÓLISE

$$R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R' + H_2O \rightarrow R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH + HO-R'$$

ESTERIFICAÇÃO

$$R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH + HO-R' \rightarrow R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R' + H_2O$$

INTERESTERIFICAÇÃO

Acidólise (reação de éster com ácido)

$$R_1-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R' + R_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH \rightarrow R_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R' + R_1-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH$$

Alcoólise (reação de éster com álcool)

$$R'-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_1 + HO-R_2 \rightarrow R'-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_2 + HO-R_1$$

Transesterificação (reação de éster com éster)

$$R_1-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_1' + R_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_2' \rightarrow R_1-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_2' + R_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-R_1'$$

Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases (CARVALHO et al., 2003).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, podem ser estáveis em meios não-aquosos e apresentam especificidade

(regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade). Estas enzimas têm sido extensivamente investigadas com relação as suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Como as lipases são ativas em condições suaves de reação, sua utilização elimina custos requeridos por reações que são conduzidas a altas temperaturas e pressões. Além disso, devido a sua especificidade, elas eliminam custos direcionados aos processos de recuperação e separação, visto que conduzem à obtenção de produtos específicos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A diversidade de propriedades das lipases propicia a utilização comercial destas enzimas em diferentes campos, incluindo os setores de óleos e gorduras, alimentos, resolução de misturas racêmicas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), detergentes, indústria de papel entre outros (JAGUER; DIJKSTRA; REETZ, 1999), conforme exemplos mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Alguns setores de aplicações potenciais de lipases.

Setor	Aplicação
Óleos e gorduras	Modificação de óleos e gorduras.
Produção de polímeros biodegradáveis	Produção de poliésteres biodegradáveis.
Têxtil	Remoção de lubrificantes, resultando em fibras com grande poder de absorção, melhores para o tingimento.
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras.
Fármacos, agroquímicos e pesticidas	Resolução de misturas racêmicas.
Processamento de alimentos	Processamento e melhora da qualidade de alimentos e modificação de aromas.
Medicina	Ferramentas de diagnóstico auxiliando a indicação da presença de certas infecções ou doenças.
Cosméticos	Obtenção de produtos altamente puros que não requerem separação.
Processamento de chás	Melhoramento de aromas.
Couro	Remoção de gorduras do couro.
Tratamento de efluentes	Utilizada em lodo ativado entre outros processos aeróbios para a remoção de camadas de gordura.
Biodegradação de óleos	Tratamento de hidrocarbonetos e polímeros orgânicos.
Polpa e papel	Eliminação de manchas, melhorando o processo de branqueamento.
Combustível	Produção de biodiesel

Fonte: (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Considerando as aplicações industriais, a especificidade das lipases é um fator muito importante. Segundo Carvalho et al. (2003) e De Castro et al. (2004), as lipases são classificadas em três diferentes grupos de acordo com sua especificidade, conforme mostrado na Tabela 2.3. A versatilidade das lipases, entretanto, pode ser mais bem explorada quando são previamente estabilizadas por técnicas como a imobilização. Enzimas imobilizadas são mais estáveis em uma ampla faixa de condições reacionais (pH, temperatura), além de contribuir para redução do custo do produto final, devido à facilidade de recuperação do sistema e posterior reutilização (SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2003; SOARES et al., 1999).

Para o desenvolvimento de um sistema imobilizado com bom desempenho dois fatores devem ser considerados: o método e o suporte para imobilização. Diversos procedimentos para a imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos nos últimos anos, objetivando-se a redução da perda de atividade biocatalítica durante o processo de imobilização e conseqüentemente a diminuição do custo extra da imobilização, pelo uso mais efetivo da atividade catalítica retida na matriz de imobilização (TISCHER; KASCHE, 1999).

Tabela 2.3. Classificação das lipases de acordo com sua especificidade

Lipase	Atuação	Exemplos
Não específicas	Catalisam a hidrólise de TAGs gerando ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório.	*Candida cylindracea* *Penicilium cyclopium,* *Staphylococcus aureus* *Corynebacterium acnes,* *Pseudomonas fluorescens*
1,3 específicas	Catalisam a hidrolise de TAGs gerando ácidos graxos livres provenientes especificamente das posições sn-1 e sn-3.	*Mucor miehei* *Rhizopus oryzae* *Aspergillus niger* *Rhizopus delemar* Lipase pancreática *Penicillium roquefortii*
Ácido graxo específicas	Catalisam a hidrólise de tipos específicos de ácidos graxos nas moléculas de TAGs.	*Geotrichum candidum*

Fonte: (CARVALHO et al., 2003; DE CASTRO et al., 2004).

A imobilização pode ocorrer por adsorção (ligação física) ou ligação covalente (ligação química) da enzima a um material insolúvel, por ligações cruzadas por meio do uso de um reagente multifuncional, pelo confinamento da enzima em matrizes de géis poliméricos

ou por encapsulação em membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; FABER, 1997; SOLDI, 2004). Dentre os métodos de imobilização mencionados, pode-se destacar o método de ligação covalente que é o mais difundido e pesquisado. Como a ligação formada entre a enzima e o suporte por este método é forte, o derivado imobilizado obtido é estável, o que não permite que a enzima se solte do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica (ZANIN; MORAES, 2004).

A seleção de um suporte apropriado para imobilização de enzimas é muito importante, pois a eficiência de um sistema imobilizado é dependente tanto da natureza do suporte, quanto de sua ligação com a proteína. Um bom suporte deve ser resistente à contaminação, ter boa resistência mecânica, ser estável termicamente e estar disponível comercialmente por um custo razoável (ATIA et al., 2003). Em especial para lipases, uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido utilizadas como suporte de imobilização (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Em estudos recentes no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL, USP) foi desenvolvida uma matriz híbrida, pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O produto resultante, polissiloxano – álcool polivinílico (POS-PVA) é um composto que combina atributos físico-químicos de material orgânico e inorgânico (BRUNO et al., 2005). Este material tem sido utilizado com sucesso para imobilização de diferentes fontes de lipases tais como: Pancreática (PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005; PAULA et al., 2007a), *Candida rugosa* (PAULA et al, 2008; SANTOS et al, 2008a) e *P. fluorescens* (PAULA et al., 2007b). A síntese desta matriz envolve três etapas conforme mostrado na Figura 2.7. Tendo em vista os resultados promissores obtidos no Laboratório de Biocatálise da EEL, USP, selecionou-se essa matriz para imobilização da lipase que será utilizada no desenvolvimento do presente trabalho.

Para unir a enzima ao suporte através de ligação covalente é necessária a utilização de agentes de ativação que são compostos que modificam quimicamente a superfície deste suporte possibilitando a ligação. Dentre os agentes mais utilizados estão o glutaraldeído, epicloridrina, carbonildiimidazol e metaperiodato de sódio. Para o desenvolvimento do presente trabalho foi selecionado o metaperiodato de sódio como agente de ativação, composto que oxida a superfície do suporte, resultando em grupo aldeído capaz de ligar-se

covalentemente à enzima, conforme mostrado na Figura 2.8. Esta seleção foi baseada no bom desempenho mostrado por este agente de ativação para uso em reações catalisadas por lipase em meio orgânico (SANTOS et al., 2008a).

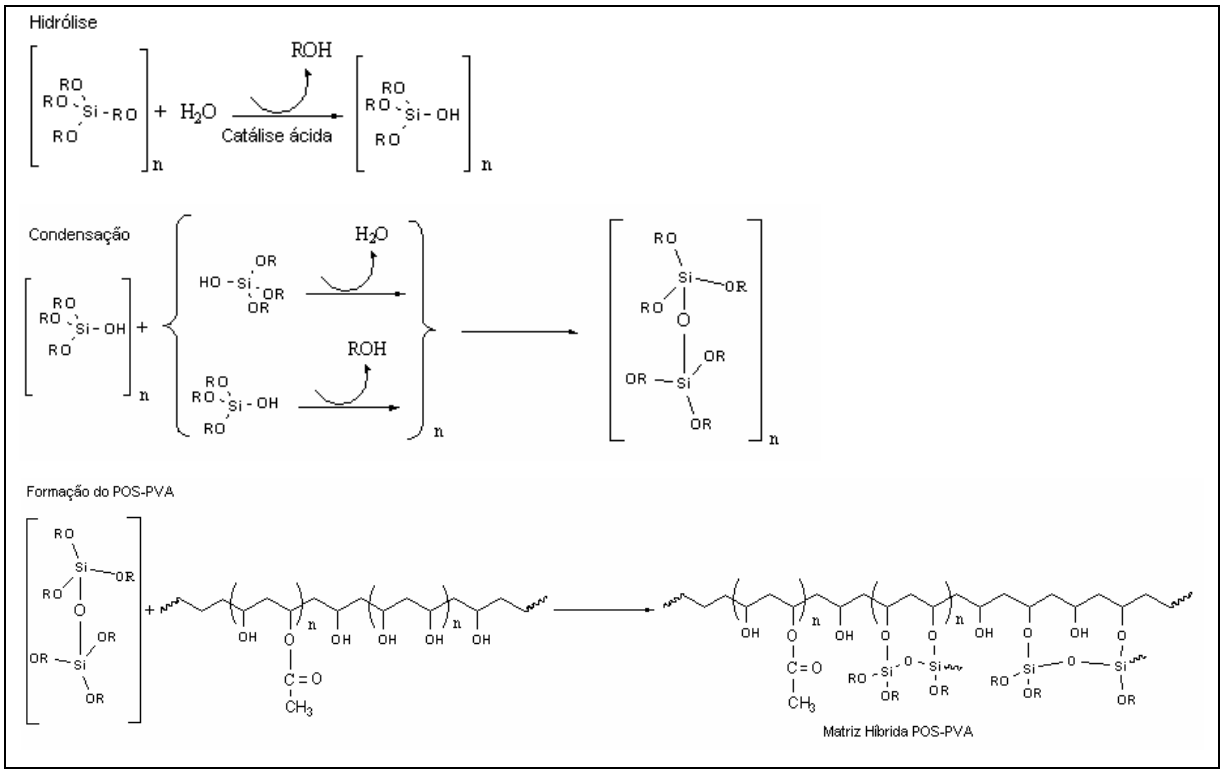


Figura 2.7. Etapas envolvidas na formação do POS-PVA ("R" representa o grupo alquil) (SANTOS et al., 2008a).

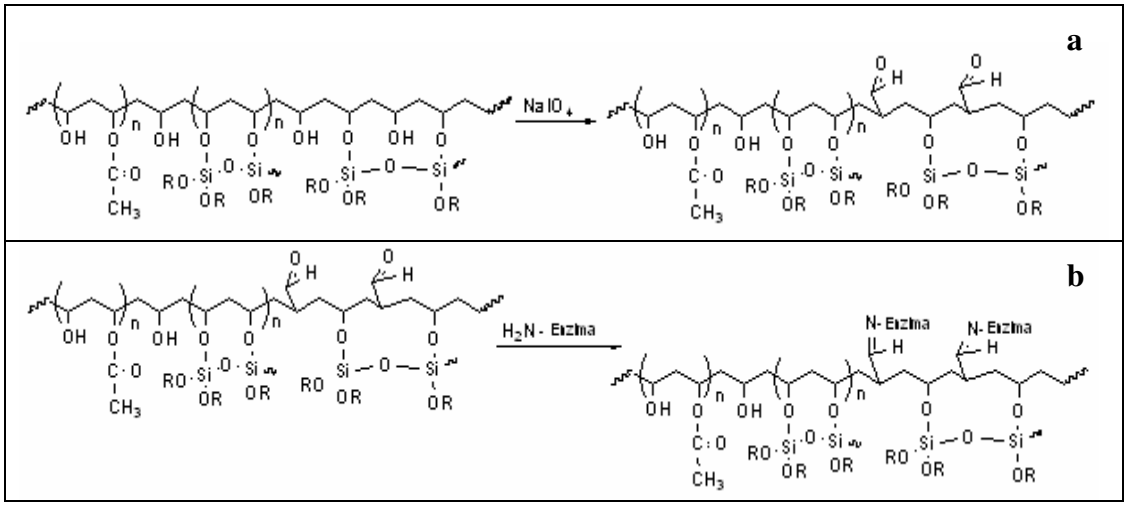


Figura 2.8. (a) Ativação do POS-PVA com metaperiodato de sódio; (b) Imobilização do POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio (SANTOS et al., 2008a).

2.2.2. Transesterificação enzimática da gordura de leite

A transesterificação consiste de uma reação que promove a troca e redistribuição dos resíduos de ácidos graxos entre os triacilgliceróis até que um equilíbrio termodinâmico seja alcançado, resultando em produtos que apresentam a mesma composição em ácidos graxos, porém com diferente composição em triacilgliceróis e, conseqüentemente, com diferentes características físicas e nutricionais (LAWSON, 1995; NOOR LIDA et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2001).

Nutricionalmente, a transesterificação promove benefícios quando comparada à hidrogenação, pois o processo de rearranjo dos ácidos graxos não altera sua isomeria ou seu grau de insaturação (NOOR LIDA et al., 2002), o que leva a geração de produtos com quantidade reduzida ou livre de isômeros trans e que podem possuir maiores concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (MARTIN; MATSHUSHITA; SOUZA, 2004).

A reação de transesterificação pode ser catalisada por via química ou enzimática. A via química, em geral, utiliza como catalisador sódio metálico e metilato de sódio (DE CASTRO et al., 2004; GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002) e leva a uma redistribuição aleatória dos ácidos graxos na cadeia do triacilglicerol, sob altas temperaturas e pressões. A via enzimática faz uso de lipases como biocatalisador, nela, os ácidos graxos podem ser redistribuídos de forma aleatória empregando-se lipases não específicas ou podem ser redistribuídos em posições características, quando enzimas específicas são utilizadas (DE CASTRO et al., 2004; RODRIGUES; GIOELLI, 2003). Na Figura 2.9 são apresentados esquemas dos produtos resultantes da reação de transesterificação de diferentes triglicerídeos por catálise química ou enzimática.

Ambas vias, química ou enzimática, podem ser utilizadas na indústria de óleos e gorduras para a fabricação de margarinas e “shortenings” (SILVA; GIOIELLI, 2006). Entretanto, deve-se destacar que a via enzimática possui vantagens se comparada à química, tais como a reogioespecifidade que permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final (D’AGOSTINI, 2001) e condições de reação mais suaves (temperaturas e pressões reduzidas) que podem ser menos prejudiciais às qualidades organolépticas da manteiga (RODRIGUES; GIOELLI, 2003; RONNE et al., 2005).

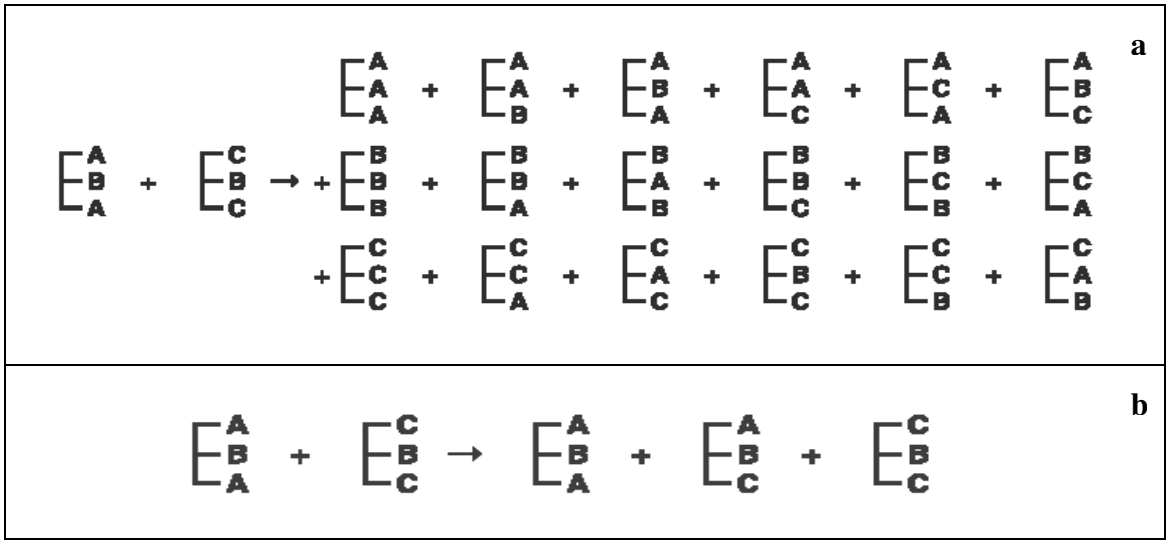


Figura 2.9. Produtos resultantes da reação de transesterificação de diferentes triglicerídeos por catálise (a) química ou enzimática com lipase não específica e (b) enzimática com lipase 1,3 específica (As letras A, B e C representam os diferentes resíduos de ácidos graxos que são redistribuídos nas moléculas dos triacilgliceróis) (CARVALHO et al., 2003).

Na literatura foram encontrados diversos estudos que relatam a transesterificação enzimática da gordura de leite, utilizando diferentes fontes de lipases, reagentes de transesterificação e condições de reação. Na Tabela 2.4 são apresentados alguns desses trabalhos com seus principais resultados.

Os trabalhos envolvendo a transesterificação enzimática da gordura de leite iniciaram-se a partir da segunda metade da década de 80 (KALO et al., 1986, 1988; KALO; HUOTARI; ANTILA, 1989a, 1989b). Na Tabela 2.4 pode se verificar que nos primeiros trabalhos desenvolvidos a reação era realizada com a gordura de leite pura e que apenas a partir dos anos 90 outros materiais foram misturados a ela para a transesterificação (FOGLIA; PETRUSO; FEAIRHELLER, 1993; YU; RIZVI; ZOLLWEGF, 1992).

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 que catalisavam a transesterificação da gordura de leite e como suportes, empregavam celite (KALO et al., 1986, 1988; KALO; HUOTARI; ANTILA, 1989a, 1989b, 1990; YU; RIZVI; ZOLLWEGF, 1992; FOGLIA; PETRUSO; FEAIRHELLER, 1993) e polipropileno (BALCÃO et al, 1998; ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a, 1998b, 1999; MARANGONI; ROUSSEAU, 1999). Nos trabalhos desenvolvidos a partir do ano 2000, observa-se o uso predominantemente de enzimas já adquiridas comercialmente na forma imobilizada (NOR HAYATI; AMINAH;

MAMOT, 2000; LIEW et al., 2001a; BRYS et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006; WIRKOWSKA; BRYS; KOWALSKI, 2005a, 2005b; RONNE et al., 2005; BRYS; WIRKOWSKA ; KOWALSKI, 2006; ZHANG; MU; XU, 2006).

As enzimas mais empregadas para catálise da reação em estudo foram as lipase de *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus arrhizus* e *Candida antarctica.* Alguns autores avaliaram o uso de diferentes fontes de lipase comparativamente, tais como Kalo et al. (1988) que utilizaram as lipase *Mucor miehei* e *Aspergillus niger*, obtendo resultados em composição de triacilgliceróis para ambas as fontes de enzima semelhantes, mesmo a temperaturas de trabalho diferentes e com distintas técnicas de imobilização, enquanto que no trabalho desenvolvido por Lai et al. (2000) sete diferentes fontes de lipases foram empregadas e apresentaram resultados distintos uma das outras sendo a lipase de *Pseudomonas* sp. a que demonstrou o melhor desempenho para a catálise da reação da gordura de leite produzindo o mais elevado grau de transesterificação.

Os estudos realizados envolvendo as reações de transesterificação enzimática da gordura de leite foram conduzidos em sua maioria em reatores do tipo batelada com agitações que variam de 100 a 400rpm. Destaque pode ser dado aos trabalhos recentes realizados por Ronne et al. (2005) e Zhang, Mu, Xu, (2006) nos quais as reações foram conduzidas em reatores do tipo leito empacotado e por Balcão et al. (1998) no qual um reator do tipo fibra oca foi empregado.

Como condições reacionais, estudos mostram que essa reação pode ser conduzida em temperaturas que oscilam desde 35 até 80ºC e em pH que varia de 6 a 8. O uso de solvente é variável e quando presente, os mais comumente utilizados são o hexano e isooctano. Pode ser destacado o estudo realizado por Yu, Rizvi, Zollwegf (1992) no qual utilizaram como solvente o dióxido de carbono supercrítico que é empregado nos setores de alimentos e farmacêutico. Comparado aos solventes líquidos ele não é tóxico e possui baixa viscosidade e altas taxas de difusão e transferência de massa, propriedades que são adequadas para reações enzimáticas.

Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite.

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
C. cilyndracae imobilizada por adsorção em Celite	Gordura de Leite Anidra	As reações foram realizadas em frascos agitados, sem ou com solvente (hexano) a 60ºC.	Em relação à composição houve uma redução dos TAGs C_{36} e C_{38} e uma elevação dos TAGs C_{44} e C_{50}. Os produtos obtidos por catálise química e enzimática foram bastante similares em composição, visto que a lipase empregada não apresentou especificidade. Entretanto, a gordura transesterificada com biocatalisador apresentou-se mais macia devido à presença dos mono e diglicerídeos formados.	KALO et al., 1986
M. miehei (Lipozyme TM) *A. niger* imobilizada por adsorção em Celite	Gordura de Leite Anidra	As reações foram realizadas em frascos agitados, com isooctano como solvente, a temperatura de 35ºC para lipase de *A.niger* e 60ºC para lipase de *M. miehei.*	Os produtos de reação apresentaram composição em TAGs diferentes da Gordura de Leite antes da transesterificação, porém apresentaram composições semelhantes para a reação catalisada por ambas as lipases. Os resultados revelaram que as enzimas estudadas não são específicas sob as condições de reação empregadas. O conteúdo de gordura sólida foi mais baixo para os produtos da reação catalisada pela lipase de *M.miehei* devido ao mais alto grau de hidrólise ocorrido nesta reação.	KALO et al., 1988
P. fluorescens imobilizada por adsorção em Celite	Gordura de Leite Anidra	Variação da quantidade de água do meio reacional.	Os produtos de reação apresentaram composição em TAGs diferentes da Gordura de Leite antes da transesterificação, porém apresentaram composições semelhantes para a reação realizada sob diferentes condições reacionais. Os resultados mostraram que o conteúdo de produtos hidrolisados é fortemente dependente da quantidade de água presente no meio reacional.	KALO; HUOTARI; ANTILA, 1989a
P.fluorescens imobilizada por adsorção em Celite	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada em um meio com solvente (isooctano), com baixa quantidade de água e sob diferentes temperaturas.	Os produtos de reação apresentaram composição em TAGs similares para a reação realizada sob as diferentes temperaturas estudadas, concluindo-se, portanto que a temperatura de reação não afetou a posição especifica de rearranjo dos AG no TAGs.	KALO; HUOTARI; ANTILA, 1989b

TAGs = Triacilgliceróis
AG = Ácidos Graxos

Continua Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
P. fluorescens imobilizada em Celite	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada em um meio com baixo conteúdo de água, sem ou com solvente (isooctano), sob temperaturas de 40, 50 e 60ºC.	Os produtos de reação apresentaram composição em TAGs similares para a transesterificação realizada sob diferentes temperaturas e meios reacionais (com e sem solvente). Apresentaram também propriedades de fusão semelhantes.	KALO; HUOTARI; ANTILA, 1990
C. cilyndracae imobilizada em Celite	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Canola (1:1)	A reação foi realizada a 40ºC, sob pressão de 30MPa e com dióxido de carbono supercrítico como solvente (SC- CO_2).	Os produtos obtidos apresentaram um aumento da concentração dos TAGs C_{42}-C_{50} e C_{54}, em relação a mistura física das matérias primas, que apresentava maior concentração dos TAGs C_{52}-C_{56} do Óleo de Canola e C_{32}-C_{38} da Gordura de Leite.	YU; RIZVI; ZOLLWEGF, 1992
M. miehei (Lipozyme) *R. delemar* imobilizada em Celite *G. candidum* imobilizada em AcurelEP 100	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Girassol enriquecido com ácido oléico	A reação foi realizada em frascos agitados (100rpm) a 60ºC.	O grau de hidrólise das misturas de gordura/óleo foi dependente da quantidade de água inicial no meio reacional. O tempo de reação foi dependente das diferentes fontes de enzimas utilizadas, mas não da temperatura empregada. Os diferentes tipos de lipases permitiram um aumento ou um decréscimo no conteúdo de gordura sólida (CGS) das misturas após a transesterificação.	FOGLIA; PETRUSO; FEAIRHELLER, 1993
P. putida *A. niger* *R. oryzae*	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada em um sitema de microemulsão.	Os resultados mostraram que a lipase de *A. niger* teve o mais alto rendimento de interesterificação (26%) e que a lipase de *R. oryzae* apresentou o menor rendimento (4%). A lipase de *A. niger* foi também a que mostro mais elevado decréscimo (17%) dos ácidos graxos de cadeia longa hipercolesterôlemicos (C12:0, C14:0 e C16:0) na posição sn-2. A lipase de *P. putida* foi a que se demonstrou menos favorável às mudanças em posições específicas.	PABAI; KERMASHA; MORIN, 1995

TAGs = Triacilgliceróis
CGS = Conteúdo de gordura sólida

Continuação Tabela 2.4.. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
P. fluorescens imobilizada em vidro poroso	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada a 42ºC por 120h, sem e com solvente (hexano).	A composição em TAGs dos produtos obtidos foi distinta da composição da matéria-prima, pois houve um decréscimo dos TAGs C_{36}-C_{42} e um aumento nos TAGs C_{48}-C_{50}. O produto apresentou temperatura de fusão e CGS mais baixo que o apresentado pela Gordura de Leite.	LEE; SWAISGOOD, 1997
Mucor javanicus imobilizada por adsorção em fibras de polipropileno	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada a 40ºC sem solvente em um reator de fibra oca.	O produto resultante da transesterificação apresentou uma faixa de temperatura de fusão mais ampla que a Gordura de Leite antes da reação. O total de TAGs saturados decresceu 2,2%, enquanto que os TAGs C_{28}-C_{46} (que contém dois ou três resíduos de ácidos láurico, mirístico ou palmítico) decresceram 13%. Os TAGs da Gordura de Leite transesterificada têm cerca de 10,9% menos resíduos de ácido láurico, 10,7% menos resíduos de ácido mirístico e 13,6% menos resíduos de ácido palmítico que a Gordura de Leite original.	BALCÃO et al, 1998
Rhizopus arrhizus imobilizada por adsorção em polipropileno	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Óleo de Canola (90:10), (80:20), (70:30) e (60:40)	A reação foi realizada em um meio isento de solvente, sob diferentes condições de temperatura (40-60ºC), pH (6-8) e conteúdo inicial de água (0,1-1,0%).	As mudanças mais marcantes na composição em TAGs ocorreram dentro das primeiras 24h de reação. Para misturas com maior proporção de Óleo de Canola, maiores alterações no conteúdo de TAGs foram observadas. A reação de transesterificação teve seu melhor desempenho com um conteúdo de água de 0,35%. A taxa de hidrólise inicial foi linearmente dependente do conteúdo inicial de água na faixa de 0 – 0,55% de água. Os AG livres predominantes foram C18:1 e C16:0.	ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a
R. arrhizus imobilizada por adsorção em polipropileno	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Óleo de Canola (90:10), (80:20), (70:30) e (60:40)	A reação foi realizada em um meio livre de solvente, sob diferentes condições de temperatura (40-60ºC), pH (6-8) e conteúdo inicial de água (0,1-1,0%).	Os produtos da reação apresentaram um perfil de CGS em função da temperatura mais baixos que o das misturas não transesterificadas. O ponto de gota ("dropping point") como função da proporção de Óleo de Canola decresceu para as misturas após a reação de forma mais acentuada que para as misturas não transesterificadas. Tanto a mistura física da Gordura de Leite com o Óleo de Canola quanto a transesterificação destas matérias-primas diminuíram a dureza da Gordura de Leite de forma não linear. Para os produtos da reação esta diminuição foi mais acentuada durante as primeiras 12h. A análise de difratometria por raioX revelou a predominância de cristais na forma β' e pequena porção de cristais na forma β para todas as amostras analisadas, sendo que para as amostras resultantes da transesterificação a presença de cristais β foi mais acentuada que para as amostras não transesterificadas.	ROUSSEAU; MARANGONI, 1998b

TAGs = Triacilgliceróis
CGS = Conteúdo de Gordura Sólida
AG = Ácidos graxos

Continuação Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
R. arrhizus imobilizada por adsorção em polipropileno	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Óleo de Canola (90:10), (80:20), (70:30) e (60:40)	Conforme descrito por Rousseau e Marangoni, 1998a.	A transesterificação da Gordura de Leite levou a um decréscimo dos TAGs $C_{32} – C_{42}$ e um aumento dos TAGs $C_{44} – C_{54}$. O CGS da Gordura de Leite e da mistura (80:10) após a reação enzimática reduziu para todas as temperaturas estudadas. A dureza e o módulo de estocagem da Gordura de Leite e das misturas acima de (70:30) decresceram com a interesterificação. A porção relativa de cristais na forma β' das misturas decresceu ligeiramente após a reação.	MARANGONI; ROUSSEAU, 1999
R. arrhizus imobilizada por adsorção em polipropileno	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Óleo de Canola (80:20)	A reação foi realizada em frascos agitados a temperatura de 50ºC.	Os produtos transesterificados por via enzimática apresentaram uma redução no CGS na faixa de 5 – 40ºC e uma redução dos pontos de amolecimento ("softening points") comparativamente as amostras não transesterificadas. A análise de textura por cone de penetração revelou que os produtos da reação enzimática apresentaram um aumento na profundidade de penetração do cone em relação às amostras antes da reação.	ROUSSEAU; MARANGONI, 1999
Rhizomucor miehei (Lipozyme IM)	Gordura de Leite Anidra e Estearina de Palma "mole" e "dura"	A reação foi realizada em frascos agitados (250 rpm) sob temperatura de 60-70ºC	A análise por calorimetria diferencial exploratória indicou que a transesterificação reduziu o número de picos distintos de fusão e a entalpia de fusão. Foi observado um decréscimo no CGS na faixa de temperatura de 25 – 40ºC. A composição em AG mostrou que a funcionalidade da Gordura de Leite pode ser melhorada devido ao enriquecimento de AG saturados de cadeia longa provenientes tanto da Estearina de Palma "mole" quanto "dura".	NOR HAYATI; AMINAH; MAMOT, 2000
A. niger, *R. miehei,* *R. javanicus,* *Rhizopus niveus,* *Alcaligenes* sp. P*seudomonas* sp. *Candida rugosa* Todas imobilizadas em Celite	Gordura de Leite Anidra e Estearina de Palma (60:40)	As reações foram realizadas em frascos agitados, (200 rpm), sem solvente, a 60ºC.	Os resultados indicaram que a lipase de P*seudomonas* sp. produziu o mais alto grau de transesterificação (33,9%) seguida pela lipase de *R. miehei* (32,3%). A maior quantidade de AG livres foi liberada pela reação catalisada por lipase de *Pseudomonas* sp. (2,61%) seguida pelas lipases de *Alcaligenes* (2,56%) e *R. miehei* (2,18%).	LAI et al., 2000

TAGs = Triacilgliceróis
CGS = Conteúdo de Gordura Sólida
AG = Ácidos Graxos

Continuação Tabela 2.4.. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
R. miehei (células integras não viáveis) *R. miehei* (Lipozyme IM60)	Gordura de Leite Anidra e Oleína de Palma (100:0), (70:30), (60:40) (50:50) e (0:100)	As reações foram realizadas em frascos agitados (200 rpm), a 60ºC.	Os resultados indicaram que ambas as enzimas foram capazes de produzir misturas com um novo perfil de TAGs, que apresentaram geralmente um ponto de deslizamento e CGS mais baixos. Os termogramas obtidos por calorimetria diferencial exploratória indicaram mudanças na composição cristalina dos TAGs e uma alteração nos TAGs de mais baixos pontos de fusão. A Lipozyme IM60 produziu maior rendimento de transesterificação (43–51%) que a lipase da biomassa fúngica (22–34%).	LIEW et al., 2001a
R. miehei (células íntegras)	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Oleína de Palma (70:30)	As reações foram realizadas em frascos agitados (200 rpm), a 60ºC.	Os resultados indicaram que a emulsão preparada usando a mistura transesterificada exibe um comportamento reológico diferente da Gordura de Leite pura e da mistura não modificada. O perfil de freqüência de varredura mostrou que as emulsões com a Gordura de Leite e a mistura transesterificada apresentaram valor de módulo complexo (G*) mais elevado que seu valor antes da reação, o que indicou que estas emulsões são predominantemente elásticas.	LIEW et al., 2001b
Candida antarctica (Novozyme 435)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Colza	A reação foi realizada a 60ºC por 2 e 8h.	Tanto transesterificação química quanto a enzimática aumentaram o conteúdo de AG livres e de frações polares (mono e diglicerídeos), entretanto a via química foi a que apresentou os teores mais elevados.	BRYS et al., 2004

TAGs = Triacilgliceróis
CGS = Conteúdo de Gordura Sólida
AG = Ácidos Graxos

Continuação Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
R. miehei (Lipozyme RM-IM)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Colza	A reação foi realizada por 2, 4 e 8h, nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80ºC.	Após a transesterificação houve uma elevação do conteúdo AG livres e da fração polar. O CGS e a temperatura de fusão dos TAGs resultantes da reação decresceram quando comparados aos da mistura inicial das matérias-primas.	BRYS et al., 2005a
C.antarctica (Novozyme 435)	Gordura de Leite Anidra	A reação foi realizada por 2, 4 e 8h, nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80ºC.	Após a transesterificação houve uma elevação do conteúdo AG livres e da fração polar (mono e diglicerídeo). O CGS e a temperatura de fusão dos TAGs resultantes da reação foram mais elevados quando comparados aos da matéria-prima. A interesterificação melhorou as propriedades físicas da gordura de leite sem afetar a composição global dos AG.	BRYS et al., 2005b
R. miehei (Lipozyme RM-IM) *C. antarctica* (Novozyme 435)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Girassol (1:1)	A reação foi realizada por 8h a temperatura de 70ºC.	Os produtos transesterificados apresentaram um decréscimo da estabilidade oxidativa em comparação a mistura inicial das matérias-primas. Esse decréscimo foi mais relevante quando catalisador químico foi utilizado e menos acentuado na reação em que Lipozyme RM- IM foi empregada como biocatalisador.	WIRKOWSKA ; BRYS ; KOWALSKI, 2005a
R. miehei (Lipozyme RM-IM) *C. antarctica* (Novozyme 435)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Colza (1:1)	A reação foi realizada por 8h a temperatura de 70ºC.	Os produtos transesterificados apresentaram um decréscimo da estabilidade oxidativa em comparação a mistura inicial das matérias-primas.	WIRKOWSKA ; BRYS ; KOWALSKI, 2005b

CGS = Conteúdo de Gordura Sólida
TAGs = Triacilgliceróis
AG = Acido Graxos

Conclusão Tabela 2.4. Exemplos de estudos realizados empregando a transesterificação enzimática de gordura de leite

Biocatalisador	Matérias-primas	Condições reacionais	Principais Resultados	Referência
Thermomyces lanuginosus (Lipozyme TL IM) *T. lanuginosus* imobilizada em Accurel EP100 *R. miehei* (Lipozyme RM-IM) *C.antarctica* (Novozyme 435) *Burkholderia cepacia* (Lipase PS-C-I) *B. cepacia* (Lipase PS-D-I)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Colza (70:30)	A reação em batelada foi realizada em frascos agitados, (400 rpm), a 50ºC. A reação contínua foi realizada em um reator de leito empacotado a 60ºC.	As seis lipases imobilizadas foram avaliadas nas reações em batelada, sendo as Lipozymes TM IM e RM IM escolhidas para os estudos adicionais no reator contínuo de leito empacotado. A lipase TM IM realizou a reação de forma mais rápida, tendo quase atingido o equilíbrio em um tempo de residência de 30 min, enquanto que a lipase RM IM demandou um tempo de residência de 60 min. Em relação aos AG da posição sn-2, observou-se uma redução do conteúdo de AG saturados (C14:0 e C16:0) e um aumento dos AG de cadeia longa saturados e insaturados (C18:0 e C18:1).	RONNE et al., 2005
C. antarctica (Novozyme 435)	Gordura de Leite Anidra e Óleo de Girassol (1:1) (1:3) (3:1)	A reação foi realizada por 2, 4 e 8h a temperatura de 70ºC e 80ºC.	Após a transesterificação houve uma elevação do conteúdo AG livres para todas as misturas. O CGS e a temperatura de fusão dos produtos resultantes da reação foram dependentes da composição da mistura antes do processo.	BRYS et al., 2006 BRYS ; WIRKOWSKA ; KOWALSKI, 2006
T. lanuginosus (Lipozyme TL IM)	Gordura de Leite Anidra Gordura de Leite Anidra e Óleo de Colza (70:30)	A reação foi realizada em um reator de leito empacotado a 70ºC.	O trabalho demonstrou a viabilidade da aplicação de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para o monitoramento da reação de transesterificação da Gordura de Leite com Óleo de Colza.	ZHANG; MU; XU, 2006

AG = Ácidos Graxos
CGS = Conteúdo de Gordura Sólida

Os métodos de análise mais utilizados para avaliação dos produtos resultantes da transesterificação enzimática da gordura de leite são cromatografia em fase gasosa para quantificação dos mono, di e triacilgliceróis, ressonância magnética nuclear (RMN) para a quantificação do conteúdo de gordura sólida, titulação para a determinação do conteúdo de ácidos graxos livres e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para análise do comportamento térmico dos produtos transesterificados. Destaque pode ser dado ao estudo desenvolvido por Zhang, Mu, Xu (2006), no qual uma nova abordagem é dada ao monitoramento da reação aplicando-se a espectroscopia de infravermelho para a análise.

Dentre as matérias-primas em estudo para a transesterificação com a gordura de leite deve-se realçar a utilização de óleos vegetais, visto que a transesterificação de misturas entre gorduras sólidas e óleos vegetais pode formar produtos com excelentes propriedades. A mistura de manteiga com óleos vegetais como os de milho, canola, girassol, soja entre outros, que são líquidos à temperatura de refrigeração, conduz à formação de produtos que equilibram características nutricionais, organolépticas e físicas desejáveis, com custos de produção reduzidos (RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003).

A soja é uma cultura de extrema importância para o agronegócio brasileiro, sendo que o Brasil, em 2005, foi responsável por 24,59% da produção mundial, perdendo apenas para os EUA, que produz cerca de 40% da produção mundial de soja (AMARAL; JAIGOBIND; JAIGOBIND, 2006). Neste contexto, entre as diversas possibilidades de óleos para transesterificação com gordura do leite destaca-se o óleo de soja. Além da importância econômica da soja, este óleo tem grande importância em relação aos aspectos nutricionais, pois apresenta potencial para o aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados, visto que sua composição é rica nos mesmos (Tabela 2.5), ao contrário do observado com a gordura de leite (FIRESTONE, 2006). Esses ácidos graxos têm sido associados ao decréscimo do nível de colesterol no sangue e, conseqüentemente, ao risco de doenças coronárias, bem como à diminuição na probabilidade de desenvolvimento de tumores (McGRADY, 1994). O óleo de soja apresenta quantidades expressivas dos ácidos graxos essenciais linoléico e linolênico, os quais têm sido apontados como fundamentais na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares, além de possuir outras atuações importantes na hipertensão arterial, diabetes, artrites e doenças autoimunes. Esses ácidos graxos são também empregados em terapia farmacológica, potencializando o efeito de certas drogas, e no crescimento e no desenvolvimento de crianças (CARVALHO et al., 2003).

A Tabela 2.5 apresenta a composição em ácidos graxos do óleo de soja segundo Firestone (2006).

Tabela 2.5. Composição em ácidos graxos do óleo de soja (% em massa)

Ácidos Graxos		Composição Óleo de soja (%)
Láurico	**C 12:0**	0 – 0,1
Mirístico	**C 14:0**	0 – 0,2
Palmítico	**C 16:0**	9,7 – 13,3
Palmitoléico	**C 16:1**	0 – 0,2
Esteárico	**C 18:0**	3 – 5,4
Oléico	**C 18:1**	17,7 – 28,5
Linoléico	**C 18:2**	49,8 – 57,1
Linolênico	**C 18:3**	5,5 – 9,5
Araquídico	**C20:0**	0,1 – 0,6
Gadoléico	**C20:1**	0 – 0,3
Eicosadienóico	**C20:2**	0 – 0,1
Behênico	**C22:0**	0,3 – 0,7
Erúcico	**C22:1**	0 – 0,3
Lignocérico	**C24:0**	0 – 0,4
Saturados		13,1 – 20,3
Insaturados		73 – 96

2.3. Modificação das propriedades físicas da gordura de leite

As propriedades físicas de óleos e gorduras têm grande importância, pois em geral elas é que determinam sua adequação para as diversas aplicações (TIMMS, 1985). Dentre os vários meios para a modificação de óleos e gorduras, destaca-se a transesterificação, reação na qual o rearranjo dos resíduos de ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis tem promovido a obtenção de produtos com novas propriedades físicas (KARABULUT; TURAN; ERGIN, 2004; SILVA; GIOELLI, 2006).

Alguns fatores como grau de insaturação, comprimento de cadeia e formas isoméricas dos ácidos graxos, estrutura molecular dos triglicerídeos e processamento exercem forte influência nas características físicas de óleos e gorduras (LAWSON, 1995). Dentre estas características destacam-se ponto de fusão, polimorfismo, conteúdo de gordura sólida, reologia e textura.

2.3.1. Ponto de fusão

O ponto de fusão é a temperatura na qual uma gordura sólida se torna um óleo líquido. Cada ácido graxo puro possui um ponto de fusão específico (LAWSON, 1995). Porém, como as gorduras são misturas de muitos componentes elas exibem uma ampla faixa de temperaturas de fusão não apresentando uma temperatura definida (TIMMS, 1985).

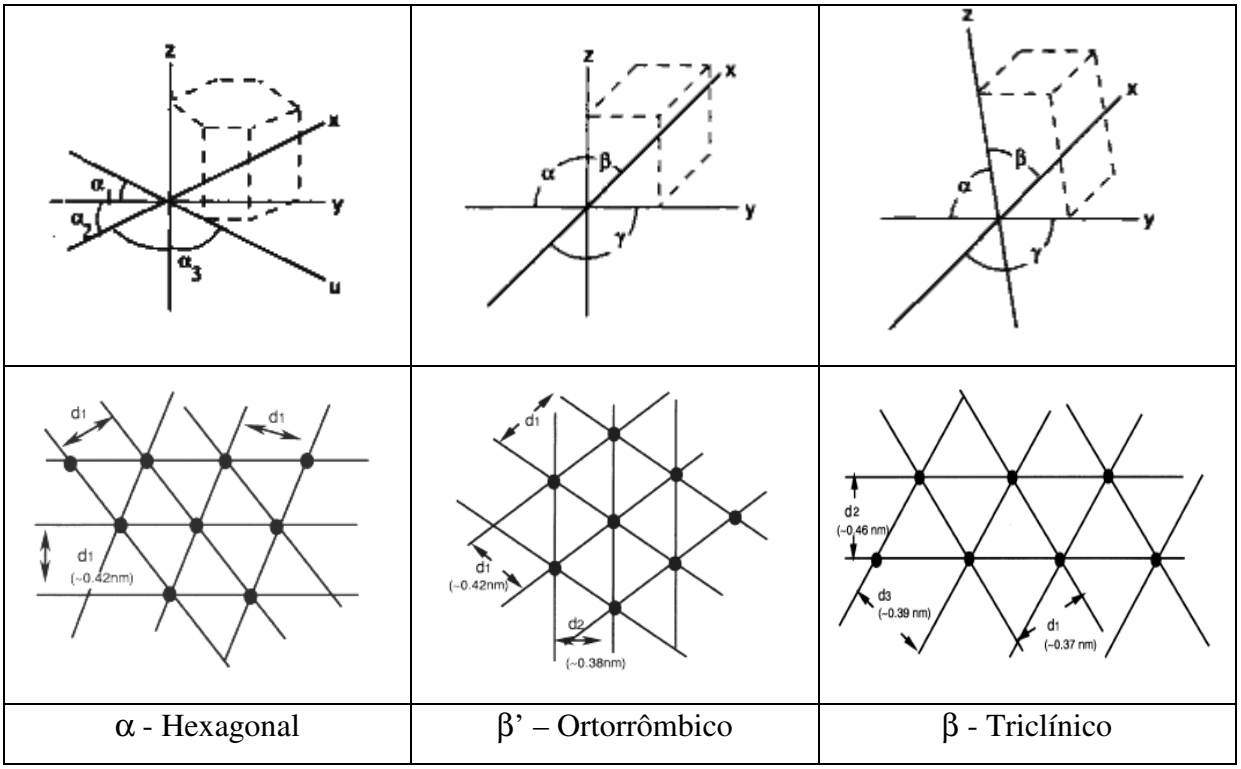
Os seguintes fatores são importantes na determinação do comportamento térmico e do ponto de fusão de um produto: comprimento de cadeia, grau de insaturação e isomeria dos ácidos graxos (MORRETO; FETT, 1998).

Gorduras que consistem essencialmente de ácidos graxos saturados de cadeia longa tem geralmente um ponto de fusão mais elevado de que aquelas que possuem um alto conteúdo de ácidos graxos insaturados ou saturados de cadeia curta (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002).

Os ácidos graxos insaturados podem apresentar distintas formas isoméricas com diferentes temperaturas de fusão. Por exemplo, o ácido oléico (*cis*) e seu isômero geométrico o ácido elaídico (*trans*) não apresentam o mesmo ponto de fusão. O ácido oléico é líquido a temperaturas abaixo da ambiente enquanto o elaídico é sólido nas mesmas condições. Isso pode ser explicado pelo fato de que a molécula do isômero *trans* é mais linear, o que facilita seu empacotamento cristalino e conduz conseqüentemente a um ponto de fusão mais elevado (LAWSON, 1995).

2.3.2.Polimorfismo

Outra importante característica de óleos e gorduras é a fase cristalina ou polimorfismo (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). Polimorfismo relaciona-se a capacidade das moléculas de se arranjarem em cristais por diferentes formas de empacotamento. As três principais formas das gorduras são conhecidas como α (alfa), β'(beta-prima) e β (beta) (DEMAN, 1992) listadas por ordem crescente de estabilidade termodinâmica (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). As configurações α, β' e β referem-se aos empacotamentos das gorduras na forma hexagonal (espaçamento de 0,42nm), ortorrômbico (espaçamento de 0,42-0,43 e 0,37-0,40nm) e triclínico (espaçamento de 0,46nm), respectivamente (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002), conforme mostrado na Figura 2.10.



α - Hexagonal	β' – Ortorrômbico	β - Triclínico

Figura 2.10. Formas de empacotamento de gorduras. (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002; HARTEL, 2001).

A estrutura do cristal pode variar com a fonte de óleo, com os procedimentos de fabricação e temperamento e com as condições de estocagem (LAWSON, 1995). A classificação de alguns óleos e gorduras de acordo com sua natureza cristalina pode ser observada na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Classificação de óleos e gorduras de acordo com sua natureza cristalina.

β (beta)	**β'(beta-prima)**	**α (alfa)**
Óleo de soja	Óleo de algodão	Acetoglicerois
Óleo de cártamo	Óleo de palma	
Óleo de girassol	Sebo	
Óleo de gergilim	Óleo de peixe (arenque)	
Óleo de amendoim	Óleo de peixe (savelha)	
Óleo de milho	Óleo de baleia	
Óleo de canola	Óleo de colza	
Óleo de oliva	Gordura de leite (manteiga)	
Óleo de coco	Banha de porco modificada	
Óleo de palmiste	Óleo de sardinha	
Banha de porco		
Manteiga de cacau		

Fonte: (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002).

Em relação às condições de estocagem, se uma gordura é rapidamente resfriada ela tende a compor pequenos cristais na forma alfa. Porém esta configuração geralmente não é muito estável, convertendo-se rapidamente para forma beta-prima que apresenta cristais firmes e, por isso, mais desejáveis de serem obtidos na fabricação de margarinas e "shortenings" (LAWSON, 1995).

2.3.3. Conteúdo de gordura sólida (CGS)

O conteúdo de gordura sólida é uma estimativa do percentual de gordura de um produto que se encontra no estado sólido a uma determinada temperatura. Está associado a muitas propriedades de gorduras, como consistência, firmeza, plasticidade (SIMÕES; GIOELLI, 2000) aparência geral, facilidade de empacotamento, características organolépticas, facilidade de espalhabilidade e exsudação do óleo, exercendo, portanto grande influência na adequação dos óleos e gorduras para aplicações específicas (KARABULUT; TURAN; ERGIN, 2004).

2.3.4. Reologia e Textura

Reologia pode ser definida como a ciência que estuda o comportamento sob deformação e fluxo dos materiais, não importando se este está em estado sólido, líquido ou gasoso. Este estudo é feito através da análise das respostas (deformação ou tensão) do material a uma dada solicitação mecânica (deformação ou tensão) (BRETAS; D'AVILLA, 2005).

Um determinado fluido que possui a relação entre tensão e taxa de deformação igual a uma constante, independentemente do tempo e da deformação, é classificado como Newtoniano (Figura 2.11a). Para líquidos viscosos essa constante de proporcionalidade é chamada de viscosidade Newtoniana. Contrariamente, fluidos que apresentam uma curva de fluxo não linear, ou seja, fluidos nos quais a viscosidade é dependente do tempo ou da deformação, são chamados de não-Newtonianos (BRETAS; D'ÁVILA, 2005; FERREIRA et al., 2005).

Um sistema não newtoniano pode ser pseudoplástico apresentando uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 2.11b) ou dilatante no qual a viscosidade aumenta com a elevação da taxa de cisalhamento (Figura 2.11c). Pode ser também tixotrópico, no qual a viscosidade diminui se o sistema é mantido sob uma taxa de

cisalhamento constante ou reopéxico no qual ocorre o efeito contrário, ou seja, a viscosidade aumenta se o sistema for mantido sob taxa constante (Figura 2.11b). A tixotropia e a reopexia são efeitos dependentes do tempo (DANTAS et al., 2006).

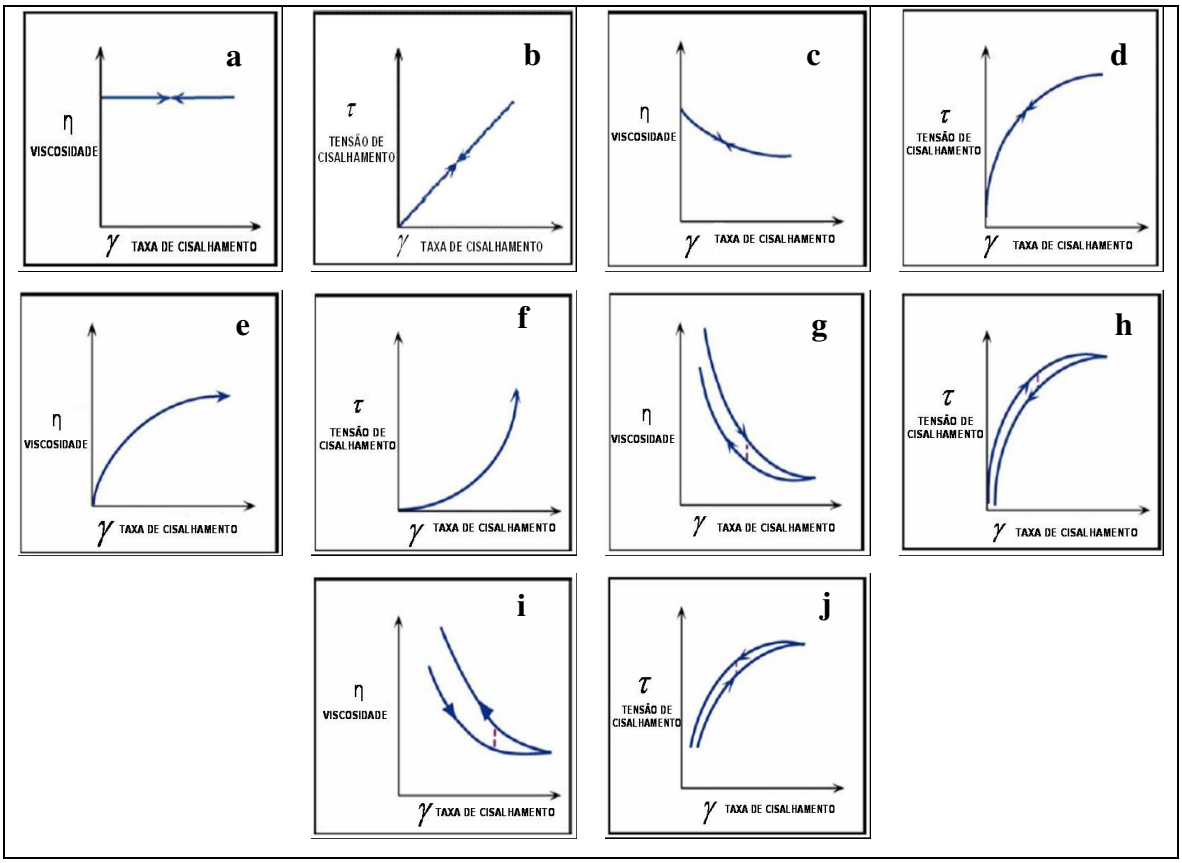


Figura 2.11. Curvas características de fluidos newtonianos (a) e (b); pseudopláticos (c) e (d); dilatantes (e) e (f); tixotrópicos (g) e (h) e reopéxicos (i) e (j).

De extrema importância também é a ligação entre as propriedades mecânicas de alimentos e sua textura (LEWIS, 1996). De acordo com Rosenthal (1999), o termo textura relaciona-se a todos os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto que podem ser detectados por meio de receptores mecânicos ou pelos sentidos humanos (tato, visão, audição).

Dentre as propriedades de textura mais estudadas no setor de óleos e gordura estão a consistência (RODRIGUES, GIOIELLI, ANTON, 2003; SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998), a dureza e a espalhabilidade (WRIGTH et al., 2001).

Em especial, o segmento que envolve o estudo das características de textura de lipídeos do leite tem sido dominado pela necessidade de melhorar a espalhabilidade da

manteiga à temperatura de refrigeração (WRIGTH et al., 2001). Muitos autores já realizaram trabalhos relacionados à caracterização destas propriedades na manteiga. Dentre estes, alguns relatam diversas propriedades desse produto alimentício, mostrando a importância da relação entre suas propriedades reológicas com sua microestrutura e composição química (SKULA; RIZVI, 1996; WRIGHT et al., 2001).

No que se refere à modificação das propriedades de textura da gordura do leite, diversos tratamentos têm sido testados. A Tabela 2.7 apresenta os métodos mais comumente empregados para a modificação da textura da manteiga.

Tabela 2.7. Métodos mais empregados para a modificação da textura da manteiga.

Alteração na composição da manteiga	Tratamentos aplicados durante a fabricação	Tratamentos aplicados depois da agitação da manteiga
Regulação da alimentação da vaca: -suplementação com óleos de grãos - óleos insaturados encapsulados	Métodos de fabricação: Convencional comparado ao processo contínuo	Condições de estocagem: - tempo - temperatura
Mistura com insaturado	Agitação do creme durante a refrigeração	Trabalhos mecânicos
Fracionamento da gordura de leite	Taxa de refrigeração	
Interesterificação da gordura de leite - química - enzimática	Reciclagem Adição de cristais de grãos	
Outras mudanças - teor de água - teor de ar - adição de surfactantes	Processo de amadurecimento do creme	

Fonte: (WRIGHT et al., 2001).

Muitos trabalhos que relacionam a transesterificação enzimática da gordura de leite com as características físicas do produto obtido têm sido desenvolvidos, porém poucos trabalhos enfatizam as análises de textura e /ou reologia (LIEW et al., 2001b; MARAGONI; ROUSSEAU, 1999; ROUSSEAU; MARAGONI, 1998b; ROUSSEAU; MARAGONI, 1999). Rousseau e Marangoni (1998b) estudaram a interesterificação enzimática da mistura de gordura do leite e óleo de canola para avaliar o potencial da lipase como um agente modificador da textura da manteiga. Os estudos concluíram que este processo é uma ferramenta viável para modificar as propriedades relógicas deste produto, pois esta reação levou a diminuição da dureza e do caráter sólido da gordura do leite pela queda na quantidade de sólidos presentes e uma pequena mudança na estrutura da rede cristalina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias-primas

Como matérias-primas, foram utilizadas gordura do leite e óleo de soja. A gordura de leite foi obtida a partir de fusão completa de manteiga comercial (Paulista Extra sem sal, adquirida em um mercado local) sob temperatura de 50-65°C em forno de microondas para desfazer a emulsão, seguida de centrifugação e separação da fase aquosa. O óleo de soja comercial (Liza Tipo 1 Extra filtrado 5 vezes, adquirido em um mercado local) foi utilizado sem tratamento adicional.

3.1.2. Enzima

Neste trabalho foi utilizada lipase microbiana de *Aspergillus niger* (Lipase A, Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão), com atividade declarada pelo fabricante maior que 12000 U/g.

3.1.3. Outros materiais e reagentes

O suporte foi preparado pela técnica sol-gel, empregando como precursor Tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). Os outros reagentes utilizados foram: Hexano p.a. (Reagen Chemical Co, São Paulo, Brasil); Acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha); Etanol comercial 95%; goma arábica em pó pura e Polietilenoglicol – PEG-1.500, ambos da marca Synth (adquiridos da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) e metaperiodato de sódio p.a. (Nuclear, Casa da Química, Diadema/SP, Brasil). Azeite de oliva comercial (baixa acidez, grau comercial) foi utilizado para determinação da atividade hidrolítica. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.2. Principais Equipamentos

Na Tabela 3.1 constam os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 3.1. Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Análise e/ou Ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Separação da gordura de leite	Centrífuga	Modelo Centra CL2, Thermo IEC (Thermo IEC, Waltham / MA, EUA)
Teor de umidade das matérias-primas	Estufa de secagem	Modeleo 315 – SE (FANEM, São Paulo, SP, Brasil)
Viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVII+ Pro (Brookfield Viscometers Ltd, Middleboro, MA, USA)
	Reômetro	Modelo LVDVIII+ (Brookfield Viscometers Ltd Middleboro, MA, USA)
Perfil de fusão e Conteúdo de gordura sólida	Calorímetro Exploratório Diferencial	Modelo Q 10 (TA Instruments New Castle, DE, USA)
Ativação do suporte e imobilização da enzima	Banho termostatizado com agitação	Modelo 145 Marconi (MARCONI, Piracicaba, SP, Brasil).
Teor de umidade da enzima	Balança de secagem acoplada com lâmpada de infra vermelho	Modelo ID 50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil).
Atividade hidrolítica	Titulador automático	Modelo 794 BASIC TITRINO Metrohm (Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo, SP, Brasil).
Condicionamento das amostras para análise de textura	Incubadora de temperatura controlada	Tipo B.D.O. (Adamo Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
Textura (Consistência e Dureza)	Analisador de Textura	Modelo QTS 25 (Brookfield, Middleboro, MA, USA)
Composição em TAG	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800 VARIAN (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA).

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Separação da Gordura de leite

Para a separação da gordura de leite a manteiga comercial foi fundida em forno microondas (55 – 62ºC). Durante a fusão, a amostra foi homogeneizada a cada 10s de

aquecimento e sua temperatura foi medida com um termômetro para que não ultrapassasse a faixa desejada. Em seguida o béquer com a amostra foi mantido em banho de glicerina (55 – 62ºC), para que houvesse a decantação da fase aquosa. A amostra foi então centrifugada sob 1900 x g por 10 min, sendo separada, com auxílio de uma pipeta volumétrica, a fase gordurosa da fase aquosa. A gordura de leite obtida foi armazenada em frascos de vidro com tampa, sob -18°C, para posterior utilização.

3.3.2. Obtenção do suporte

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008), pela mistura de 5mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (p/v). Essa mistura foi aquecida a 60 ºC, sob agitação, com adição de três gotas de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25ºC por 48 h até a completa solidificação (formação da rede interpenetrada de polissiloxano e álcool polivinílico, POS-PVA). O composto foi então triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler (adquirida da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH.

3.3.3. Ativação do suporte

Foi adotada a metodologia descrita por Carneiro da Cunha et al. (1999), conforme segue: o suporte foi suspenso numa solução aquosa 0,5M de metaperiodato de sódio, na proporção de 1 g de suporte: 10 mL $NaIO_4$. A mistura foi mantida sob agitação durante 90 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Em seguida, o suporte foi filtrado sob vácuo e lavado em abundância com água destilada e tampão fosfato pH 8,0. Após a lavagem, o sólido foi levado à estufa (60 ºC) por 24 h, para então ser utilizado no procedimento de imobilização.

3.3.4. Imobilização da lipase

O suporte ativado 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 foi removido. Ao suporte, adicionou-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 (4ºC, 24h). A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo, com posterior lavagem com hexano. Foram quantificados os teores de umidade e atividade enzimática do derivado imobilizado obtido.

3.3.5. Planejamento Estatístico

Para o estudo das interações em misturas binárias da gordura de leite com óleo de soja foi realizado um planejamento estatístico de mistura. Foram efetuados 10 experimentos, e a fração mássica dos componentes utilizada na preparação de cada mistura pode ser observada na Tabela 3.2, na qual a gordura do leite é representada por X_1 e o óleo de soja é representado por X_2, sendo que $X_1 + X_2 = 1$. As misturas das matérias-primas foram preparadas e, quando necessário em função da presença de gordura de leite, fundidas sob temperatura de 55-62°C em forno de microondas. Em seguida, foram armazenadas em frascos de vidro com tampa e mantidos a -18°C, para posterior utilização.

Tabela 3.2 – Planejamento estatístico de misturas**.**

Misturas	**Fração mássica dos**	
	X_1	X_2
1	0	1
2	0	1
3	0,25	0,75
4	0,33	0,67
5	0,50	0,50
6	0,67	0,33
7	0,75	0,25
8	1	0
9	1	0
10	1	0

X_1 = gordura de leite; X_2 = óleo de soja.

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 os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido, a consistência e a dureza das misturas e dos produtos transesterificados em estudo e o grau de transesterificação alcançado em cada reação. Os resultados obtidos foram aplicados a um modelo de regressão múltipla e os coeficientes deste modelo foram gerados pelo programa estatístico, que apresentou também seus níveis de significância e análise de variância.

3.3.6. Condições reacionais da transesterificação da gordura do leite com óleo de soja

A transesterificação da gordura de leite com o óleo de soja foi realizada em batelada, em reatores cilíndricros de 90ml encamisados (Figura 3.1) carregados com 40 g de meio reacional, composto por uma mistura de gordura de leite e óleo de soja nas proporções mássicas segundo planejamento experimental de misturas (Tabela 3.2). À mistura reacional, foi adicionado sistema imobilizado na proporção de 20% em relação à massa total de mistura reacional. Os reatores foram mantidos sob agitação magnética, em atmosfera inerte de nitrogênio e à temperatura de 45°C. Foram avaliadas algumas características e propriedades específicas do produto obtido, tais como: índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido, consistência e dureza, teor de ácidos graxos livres e composição em triglicerídeos.

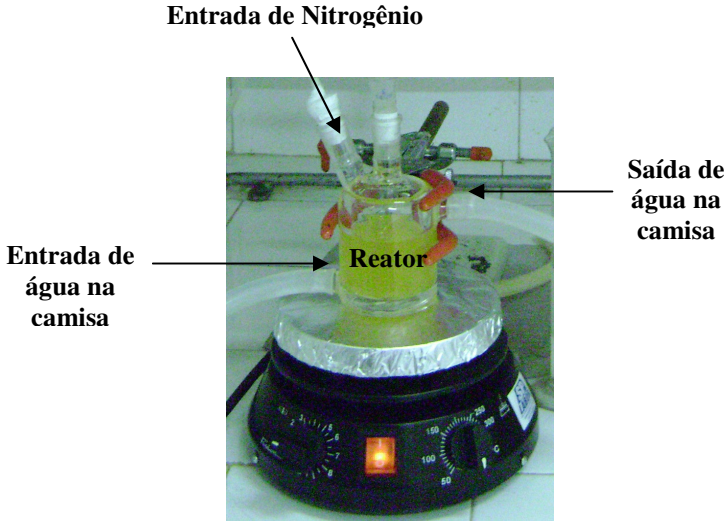


Figura 3.1. Representação esquemática do reator empregado nas reações de transesterificação da gordura de leite com óleo de soja.

3.4. Métodos de Análise

3.4.1. Umidade e voláteis das matérias-primas

A determinação do teor de umidade e voláteis na gordura de leite e óleo de soja foi realizada medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida de amostra (cerca de 5g) em estufa a 105°C até massa constante, conforme descrito pela instrução normativa n° 22 (BRASIL, 2003).

3.4.2. Teor de gordura e sólidos não gordurosos

A determinação do teor de gordura e sólidos não gordurosos da manteiga foi feita com base na determinação do teor de umidade e voláteis seguida de extração por solvente (hexano) da gordura presente na amostra dessecada e medida da massa do resíduo, conforme descrito pela instrução normativa n° 22 (BRASIL, 2003).

3.4.3. Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres

O índice de acidez ou teor de ácidos graxos livres das amostras foi determinado de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, em um erlenmeyer, pesou-se cerca de 2,0 g da amostra e anotou-se a massa. Adicionou-se então 25ml da mistura de éter etílico e álcool etílico 95% preparada na proporção 2:1 em volume. Em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Para a determinação do índice de acidez, o resultado foi calculado através da relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada (Equação 3.1). O teor de ácidos graxos livres foi determinado com base no número de mols de hidróxido de potássio consumidos (Equação 3.2).

$$\textbf{Índice de Acidez (mgKOH/g)} = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \qquad \textbf{Equação 3.1}$$

$$\textbf{teor de ácidos graxos livres} = \frac{V_{amostra} \cdot C_{base} \cdot d_{mistura}}{m_{amostra}} \qquad \textbf{Equação 3.2}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL); MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol); C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L); $d_{mistura}$ = densidade da mistura(g/ml); $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.4.4. Índice de saponificação

O índice de saponificação das matérias-primas foi determinado de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação em um balão de fundo redondo pesou-se cerca de 2,0 g da amostra e anotou-se a massa. Adicionou-se 20ml de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (4%m/v) previamente preparada e acoplou-se o balão a um condensador de refluxo. Levou-se a mistura à ebulição por 30 min, sob agitação magnética e aquecimento (aproximadamente 95ºC mantida em banho de glicerina) conforme esquema apresentado na Figura 3.2. Em seguida, transferiu-se o conteúdo do balão para um erlenmeyer e titulou-se com solução de ácido clorídrico, de concentração 0,5M, previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O mesmo procedimento foi realizado com o branco (20mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio). O resultado foi calculado como sendo a quantidade de álcali em miligramas necessária para saponificar um grama de amostra (Equação 3.3).

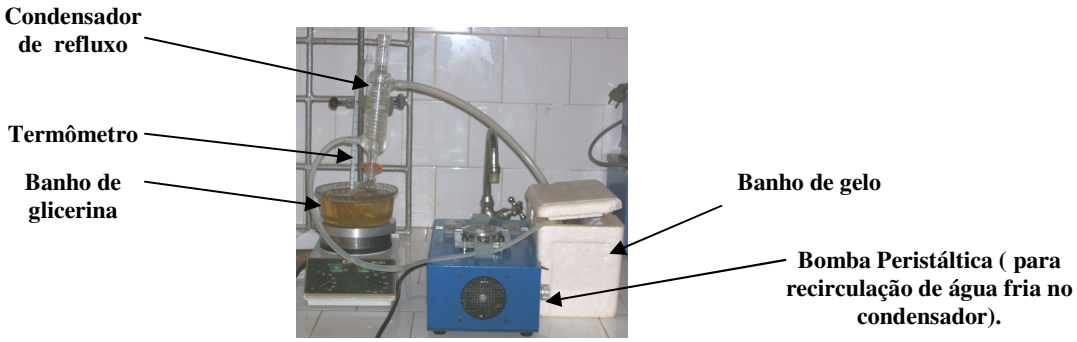


Figura 3.2. Representação esquemática do sistema montado para determinação do índice de saponificação.

$$\textbf{Índice de saponificação (mgKOH/g)} = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{base} \times C_{HCl}}{m_{amostra}} \qquad \textbf{Equação 3.3}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL); MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol); C_{HCL} = Concentração molar da solução de HCl (mol/L) ; $m_{amostra}$= Massa de amostra (g).

3.4.5. Índice de iodo

O índice de iodo das matérias-primas foi determinado pelo Método de Hübl de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, pesou-se em um erlenmeyer aproximadamente 0,25g da amostra em balança analítica e anotou-se a massa. Adicionou-se 10mL de clorofórmio (solvente) e 20mL de uma mistura de volumes iguais de solução alcoólica de iodo 5%m/v e solução alcoólica de cloreto de mercúrio 6%m/v, preparada de 12 a 24h antes de ser utilizada. Deixou-se proceder a reação por 30 min no escuro, agitando-se ocasionalmente. Em seguida, adicionou-se 100mL de água e 10mL de solução de iodeto de potássio (15%). Titulou-se o excesso de I_2 com solução de tiossulfato de sódio (reação representada pela Equação 3.4) de concentração 0,1M (previamente padronizada com dicromato de potássio) até coloração amarela (Figura 3.3c). Durante a titulação manteve-se agitação constante (agitador magnético). Adicionou-se 1mL de solução indicadora de amido (1,0%) e continuou-se a titulação até descoloração da solução (Figura 3.3f). O mesmo procedimento foi realizado com o branco (10mL de clorofórmio + 20mL de solução de iodo). O resultado foi calculado com base na quantidade em gramas de iodo absorvidos por 100g de gordura ou óleo (Equação3.5).

$$2Na_2S_2O_4 \quad + \quad I_2 \quad \rightarrow \quad Na_2S_4O_6 \quad + \quad 2NaI$$

Equação 3.4. Reação do Iodo com Tiossulfato de sódio.

Figura 3.3. Alterações de coloração que ocorrem durante a titulação para obtenção do Índice de Iodo das amostras.

$$\textbf{Índice de Iodo (g I}_2\textbf{/g)} = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{I_2} \times C_{tio} \times 0{,}1}{2 \times m_{amostra}} \qquad \textbf{Equação 3.5}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL); V_{branco} = Volume de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL) MM_{I2} = Massa Molar do I_2 (253,8g/mol); C_{tio} = Concentração molar da solução de tiossulfato de sódio (mol/L); $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.4. 6. Índice de peróxido

O índice de peróxido das matérias-primas foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da AOCS (2004). Para esta determinação, pesou-se em um erlenmeyer aproximadamente 5g da amostra em balança analítica e anotou-se a massa. Adicionou-se 50mL da mistura ácido acético – isooctano (3:2 v/v) e 0,5mL de uma solução de Iodeto de potássio saturada, deixando-se reagir por 1 min sob agitação constante. Em seguida, adicionou-se 30mL de água e titulou-se o I_2 formado com solução de tiossulfato de sódio (Equação 3.4), de concentração 0,01N (previamente padronizada com dicromato de potássio), até coloração amarela. Adicionou-se 1,0mL de solução indicadora de amido (1,0%), 0,5mL de Lauril sulfato de sódio (10%m/v) e prosseguiu-se a titulação até descoloração da solução. Durante a titulação manteve-se agitação constante (agitador magnético). O mesmo procedimento foi realizado com o branco (50mL da mistura ácido acético – isooctano + 0,5mL da solução de Iodeto de potássio saturada). O resultado foi calculado com base na quantidade, em miliequivalentes, de peróxido por 1000g de amostra Equação 3.6.

$$\textbf{Índice de Peroxido (meq/kg)} = \frac{(\mathbf{V_{amostra}} - \mathbf{V_{branco}}) \times \mathbf{C_{tio}} \times 1000}{\mathbf{m_{amostra}}} \qquad \textbf{Equação 3.6}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL); V_{branco} = Volume de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL); C_{tio} = Concentração molar da solução de tiossulfato de sódio (mol/L); $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.4.7. Viscosidade

Os valores de viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em dois diferentes equipamentos. Viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII+ (cone CP 42) foi utilizado para as medidas de viscosidade do óleo de soja nas temperaturas de 20-60°C e da gordura de leite nas temperaturas 40-60°C. Reômetro LVDVIII+ (splindle SC4-31 e SC4-18) foi utilizado para as medidas de viscosidade da gordura de leite nas temperaturas 20-35°C. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 3.7), conforme descrito por Freitas et al. (1998) para verificação de possíveis desvios do comportamento Newtoniano. Para fluidos Newtonianos, a viscosidade foi determinada com base na inclinação da curva de tensão em função da taxa de deformação.

$$\tau = K \cdot \gamma^{n} \qquad \textbf{Equação 3.7}$$

Em que: τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o índice de comportamento do fluido e K é o índice de consistência.

Fez-se também o ajuste da dependência da viscosidade com a temperatura de acordo com a Equação de Arrhenius (Equação 3.8) conforme descrito por Ibarz e Barbosa-Cánovas (2003).

$$\mu = \mu_0 \cdot e^{\frac{Ea}{R \cdot T}} \qquad \textbf{Equação 3.8}$$

Em que: μ_0 é um parâmetro da equação, Ea é a energia de ativação do escoamento, R é a constante dos gases ideais e T é a temperatura absoluta.

3.4.8. Calorimetria exploratória diferencial

As análises térmicas da gordura de leite e do óleo de soja foram realizadas em um Calorímetro exploratório diferencial (TA Intruments, Modelo Q10), tendo por base o método oficial Cj 1-94 da AOCS (2004). A calibração do aparelho foi feita empregando *n*-decano (m.p. –29.66°C, ΔH_f 202,09 J/g) e índio (m.p. 156.60°C, ΔH_f 28,45 J/g), como padrões de referência. A confirmação da calibração foi efetuada com metil estearato. Antes de realizar a análise, a gordura de leite foi fundida em estufa a 50ºC.

Aproximadamente 5 mg de amostra (óleo ou gordura) foram pesados em balança analítica dentro de um cadinho de alumínio hermeticamente selado. Outro cadinho hermético, vazio, foi utilizado como referência. A amostra foi então alocada dentro do aparelho e aquecida rapidamente a 80ºC, 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 (N_2), a amostra foi resfriada a uma taxa de 5°C/min até -60°C (gordura de leite) ou -90ºC (óleo de soja). 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 80ºC, obtendo-se seu perfil de fusão. A análise dos termogramas permitiu obter as temperaturas de fusão das amostras, bem como sua entalpia de fusão.

3.4.9. Consistência

A consistência das amostras foi determinada utilizando texturômetro Brookfield Modelo QTS-25 controlado com auxílio do software Texture Pro (version 2.1). As amostras foram aquecidas em forno microondas (55 – 62ºC) para fusão completa dos cristais, e condicionadas em formas cúbicas de silicone (aresta de 25mm) O condicionamento foi efetuado por 48h em incubadora sob temperatura controlada (10ºC) para recristalização da gordura. Foi utilizada a sonda TA15, correspondente a um cone acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45º (Figura 3.4). Os testes foram conduzidos nas seguintes condições: retorno ao início, distância: 10mm, velocidade: 120mm/min , tempo: 5s, determinação da força em compressão (gf), duplicata.

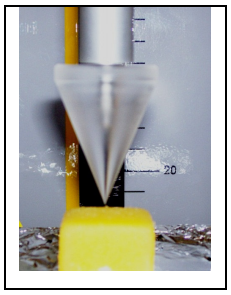


Figura 3.4. Sensor em forma de cone, acrílico, com ponta não truncada e ângulo de 45º utilizado para a análise de consistência das amostras.

As amostras foram analisadas quanto ao "yield value" que foi calculado através da Equação 3.9, proposta por Haighton (1959).

$$C = K \cdot \frac{W}{p^{1.6}} \qquad \textbf{Equação 3.9}$$

Em que: C = "yield value" (gf/cm^2), K = fator dependente do ângulo do cone (para 45º, 4700), W = força máxima em compressão (gf), para tempo de 5s, p = profundidade de penetração (0,1mm).

3.4.10. Dureza

A dureza das amostras foi determinada de acordo com a norma ISO 16305/ IDF 87, utilizando-se texturômetro Brookfield Modelo QTS-25, controlado com o auxílio do software Texture Pro (version 2.1). As amostras foram aquecidas em forno microondas (55 – 62ºC) para fusão completa dos cristais, e condicionadas em formas cúbicas de silicone (aresta de 25mm), por 48h em incubadora sob temperatura controlada (10ºC) para recristalização da gordura. Foi utilizada a sonda de fio cortante TA26 (Figura 3.5). Os testes foram conduzidos nas seguintes condições: retorno ao início, distância: 18mm, velocidade: 60mm/min, determinação da força em compressão (gf), duplicata. Os resultados foram expressos como sendo a força média entre as distâncias de 8 e 16mm percorridas pela sonda.

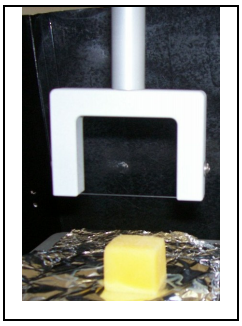


Figura 3.5. Sonda de fio cortante utilizada para a análise de dureza das amostras.

3.4.11. Quantificação dos triglicerídeos das reações de transesterificação da gordura do leite com óleo de soja

Para a análise de triglicerídeos obtidos nas reações de transesterificação, empregou-se um método de análise baseado na metodologia da comunidade européia (PRECHT; MOLKENTIN, 1997). A adaptação feita na metodologia foi especialmente relacionada à rampa de temperatura, modificada para introdução de um padrão interno. A Tabela 3.3 apresenta as condições empregadas no presente trabalho.

Tabela 3.3. Condições operacionais para quantificação de triglicerídeos por cromatografia gasosa**.**

Padrão interno (PI)	Tetradecano
Características da 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).
Rampa de aquecimento da coluna	70°C por 1min; seguido de aquecimento até 210°C numa taxa de 50°C/ min, mantendo-se constante por 1 min; seguido de aquecimento até 340ºC numa taxa de 6°C/ min, mantendo-se constante por 4 min.
Temperatura do Injetor	370ºC
Temperatura do Detector	350ºC
Gás de arraste	Nitrogênio, utilizado em fluxo constante 40 mL/min.

3.4.12. Grau de Transesterificação (T, %) nas reações com gordura de leite e óleo de soja

O grau de transesterificação das reações entre gordura do leite e óleo de soja foi calculado de acordo com a Equação 3.10:

$$\mathbf{T(\%)} = \frac{\sum (\mathbf{TAG}_{\mathbf{A}})_{\mathbf{t}} - \sum (\mathbf{TAG}_{\mathbf{A}})_{0}}{\sum (\mathbf{TAG}_{\mathbf{D}})_{0}} \cdot 100 \qquad \textbf{Equação 3.10}$$

Em que: TAG_A = concentração (mM) dos triglicerídeos cuja concentração a umentou durante a reação; TAG_D = concentração (mM) 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.

3.4.13. Grau de hidrólise (H, %)

O grau de hidrólise das reações de transesterificação da gordura do leite com óleo de soja foi calculada de acordo com a Equação 3.11, com base na determinção do teor de ácidos graxos livres (seção 3.4.3).

$$\mathbf{H(\%)} = \frac{\mathbf{AG_f}}{\mathbf{AG_t}} \times 100 \qquad \textbf{Equação 3.11}$$

Em que: AG_f = concentração total de ácidos graxos formados na reação (mM); AG_t = concentração total de ácidos graxos que poderiam ser liberados, considerando-se hidrólise total dos triglicerídeos presentes no meio reacional (mM).

3.4.14. Determinação das características do biocatalisador

3.4.14.1. Umidade

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

3.4.14.2. Atividade hidrolítica

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite : água) e 4 mL de pH tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o

sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, a 37ºC por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática (0,5 mg/mL, preparada em solução tampão pH 7,0) ou 0,1 g do derivado imobilizado, mantendo-se o sistema reacional sob agitação, a 37 ºC, por 5 minutos. 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 KOH (0,05N). O excesso de KOH foi titulado com HCl (0,05N) utilizando-se um titulador automático, sendo o ponto de equivalência determinado empregando-se o modo "titulação dinâmica" do aparelho (DET, "Dynamic Equivalence point Titration"). A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 3.12:

$$\mathbf{A(U/g)} = \frac{(\mathbf{V_b} - \mathbf{V_a}) \times \mathbf{C_{HCl}} \times 10^6}{\mathbf{t} \times \mathbf{m}} \qquad \textbf{Equação 3.12}$$

Em que: V_b = volume do branco (L); V_a = volume da amostra (L); C_{HCl} = concentrção da solução de ácido clorídrico (mol/L); t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

3.4.14.3. Rendimento de imobilização (η)

O rendimento de imobilização foi calculado usando a Equação 3.13:

$$\eta(\%) = \frac{\mathbf{U} \times 100}{\mathbf{U_0}} \qquad \textbf{Equação 3.13}$$

Em que: Uo = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização; U= unidades de atividade hidrolítica total presente no suporte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da avaliação das propriedades do produto transesterificado obtido a partir da mistura, em diferentes proporções, da gordura de leite com óleo de soja, estas matérias-primas foram caracterizadas com relação às suas propriedades fisico-químicas, reológicas e térmicas conforme relatado na seção 4.1.

4.1. Caracterização físico-química e reológica das matérias-primas

Inicialmente as matérias-primas foram caracterizadas quanto à umidade, índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.1. Para a manteiga foi analisado também o teor de gordura e de sólidos não gordurosos.

Tabela 4.1. Umidade, teor de gordura, sólidos não gordurosos, índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das matérias-primas empregadas em comparação aos valores estabelecidos pela legislação brasileira.

Características	**Óleo de Soja**		**Manteiga**	
	Observado	**Legislação** (BRASIL, 2006)	**Observado**	**Legislação** (BRASIL, 1996)
Umidade e voláteis (%)	0,09	**≤ 0,10**	15,25	**máx. 16**
Teor de Gordura (%)	---	**---**	83,05	**mín. 82**
Sólidos não gordurosos (%)	---	**---**	1,69	**máx. 2**
Índice de Acidez	0,10*	**≤ 0,20***	2,58**	**máx. 3****
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	195,92	**189 – 195**	222,32	**218 – 325**
Índice de Iodo (g I_2/ 100g)	120,60	**124 – 139**	29,62	**28 – 38**
Índice de Peróxido (meq/ 1000g)	0,48	**≤ 2,5**	não detectado	**máx. 1**

*mg KOH/g ; ** mmol/100g. Os valores de umidade, teor de gordura e de sólidos não gordurosos foram determinados para a manteiga obtida comercialmente sem nenhum tratamento prévio. Os demais índices foram determinados para a gordura de leite obtida a partir da fusão completa da manteiga comercial seguida por separação da fase aquosa.

A seguir são discutidos os resultados apresentados na Tabela 4.1.

4.1.1.Umidade, teor de gordura e sólidos não gordurosos

Segundo Grandi (2001), entende-se por manteiga o produto resultante da batedura de creme de leite fresco ou fermentado pela adição ou não de fermento lático selecionado, ao qual se incorpore ou não sal (cloreto de sódio). A manteiga é uma suspensão de água (fase descontínua) em gordura (fase contínua).

Conforme apresentado na Tabela 4.1, a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) estabelece os valores de no mínimo 82% de teor de gordura, no máximo 16% de umidade e voláteis e 2% de extrato seco não gorduroso para manteiga. Sendo assim, a matéria-prima analisada apresentou estas propriedades de acordo com o indicado na legislação, tendo 83,05% de gordura, 15,25% de umidade e voláteis e 1,69% de sólidos não gordurosos. Os resultados obtidos condizem também com o indicado por Grandi (2001) que diz que a manteiga possui em sua composição em média 83% de gordura e 16% de água e por Cecchi (2003) que relata que a manteiga apresenta 81% de gordura e 15% de umidade.

Para óleo de soja o teor de umidade determinado (0,09%) enquadra-se na faixa de valor da legislação brasileira (BRASIL, 2006), que estabelece um máximo de 0,10% de umidade e voláteis para óleo de soja refinado tipo I.

É importante a determinação da umidade das matérias-primas em estudo, pois esta característica está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição (CECCHI, 2003). Além disso, a umidade influencia também o processo de transesterificação, pois para que ocorra a troca entre os ácidos graxos dos triglicerídeos presentes é fundamental que o teor de água no meio reacional seja reduzido. Sabe-se que uma pequena quantidade de água é necessária para manutenção da atividade enzimática (LAMBOURSAIN et al., 1996), mas uma quantidade um pouco mais elevada favorece a reação de hidrólise, com a formação de ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, ao invés do rearranjo dos triglicerídeos.

4.1.2.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 intimamente relacionada com a qualidade da matéria-prima, o processamento e, principalmente, com as condições de conservação do produto (MORETTO; FETT, 1998). 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 molar (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2006).

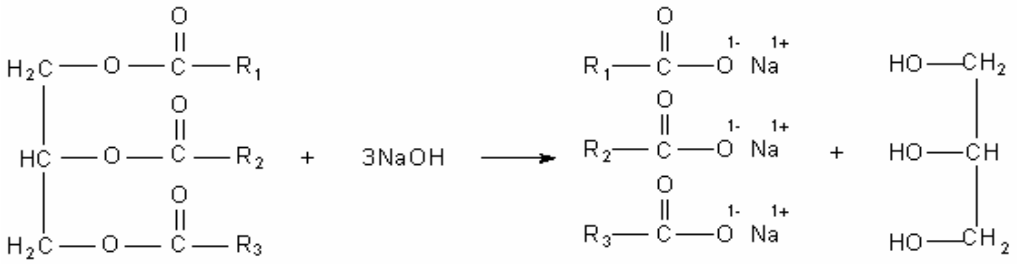
O índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para neutralizar os ácidos livres presentes em um grama de óleo ou gordura. Pode ser expresso também em mililitros de solução normal por cento (V/m) (MORRETO; FETT, 1998), em porcentagem (em massa) de 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 gorda (BRASIL, 1996).

Para gordura de leite analisada, o valor de acidez apresentado na Tabela 4.1 (2,58 mmol/100g) está dentro do previsto pela legislação, que estabelece um valor máximo de 3 mmol/100g (BRASIL, 1996).

O óleo de soja avaliado apresentou índice de acidez de 0,10 mg KOH/g sendo este valor correspondente à metade do valor máximo estipulado pela legislação brasileira (BRASIL, 2006), e, portanto bastante satisfatório.

4.1.3.Índice de saponificação

A saponificação consiste de uma reação entre um óleo ou gordura, sob aquecimento, com uma solução alcalina (hidróxido de sódio ou de potássio), da qual resultam glicerol e sais alcalinos de ácidos graxos (sabões) de acordo com a reação representada pela Equação 4.1 (MORRETO; FETT, 1998).



Equação 4.1. Reação de saponificação de um triacliglicerol.

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 necessários 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 à massa molar dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis. Isso acontece porque, para uma mesma massa de amostra, a quantidade de grupos carboxílicos será maior em triaciligliceróis com ácidos graxos de baixa massa molecular e, conseqüentemente, o consumo de base será maior. 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 avaliada apresentou índice de saponificação de 222,32 mg KOH/g, compreendido na faixa de valores estabelecida pela legislação brasileira, (218 – 325 mg KOH/g) (BRASIL, 2006) e na faixa indicada por Firestone (2006) (210 – 232 mg KOH/g). É importante ressaltar ainda que, o resultado encontrado também é próximo ao apresentado por Cecchi (2003) (225mg KOH/g).

O índice de saponificação do óleo de soja analisado foi 195,92 mg KOH/g, sendo este valor bem próximo ao máximo estipulado pela legislação (BRASIL, 2006), que estabelece uma faixa de 189 – 195 mg KOH/g.

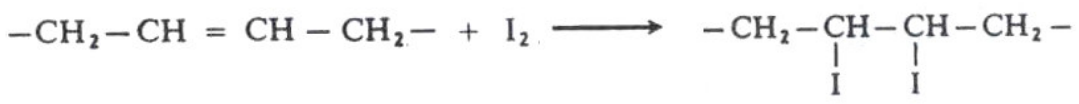
O óleo de soja apresentou, conforme esperado, menor índice de saponificação que a gordura de leite, visto que esta apresenta em sua composição maior quantidade de ácidos graxos de baixa massa molecular que o óleo em estudo.

4.1.4.Índice de iodo

Uma determinação analítica importante para os especialistas em óleos e gorduras é a medida da insaturação. Essa determinação é importante para a classificação de óleos e gorduras e para o controle de alguns processos. O método geralmente utilizado é a medida do índice de iodo (CECCHI, 2003).

Este índice é definido como a quantidade em gramas de iodo absorvidos por 100g de gordura ou óleo. Sob determinadas condições, o iodo pode ser quantitativamente introduzido nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados dos triglicerídeos (Equação 4.2), razão pela

qual, quanto mais insaturado um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior também será o índice de iodo (MORETTO; FETT, 1998).



Equação 4.2. Introdução dos átomos de iodo aos pontos de insaturação do ácido graxo

Para a gordura de leite analisada o índice de iodo determinado foi 29,62g I_2/ 100g estando de acordo com a faixa estabelecida pela legislação brasileira que varia entre 28 e 38g I_2/ 100g (BRASIL, 1996), com Firestone (2006) que estabelece valores entre 26 e 40g I_2/ 100g (para a gordura de leite) e com Cecchi (2003) que apresenta uma faixa de 25 – 42 gI_2/ 100g (para manteiga).

O óleo de soja avaliado apresentou índice de iodo de 120,60g I_2/ 100g, enquadrando–se, portanto, nas faixas de valores apresentados por Firestone (2006), entre 118 e 139g I_2/ 100g, por Knothe (2002), entre 120 e 143g I_2/ 100g e por Cecchi (2003) entre 120 e 141g I_2/ 100g para este óleo. Porém, o resultado observado está um pouco abaixo da faixa estabelecida pela legislação brasileira, entre 124 – 139g I_2/ 100g (BRASIL, 2006). Esta diferença de valores encontrados pode ser devido aos diferentes métodos utilizados para avaliação desse índice, Wijs para a legislação brasileira e Hübl para o presente trabalho.

Para cada óleo existe um intervalo característico de índice de iodo, cujo valor também está relacionado com o método empregado em sua determinação. Em geral, este índice é determinado pelo método de Wijs, que utiliza solução de tricloreto de iodo, mas pode também ser determinado pelo método de Hanus, que emprega o monobrometo de iodo, ou pelo método de Hübl, no qual se utiliza solução de iodo e cloreto de mercúrio. Os métodos de Hübl e Wijs são utilizados em laboratórios oficiais de vários países, enquanto que o método de Hanus é empregado em laboratórios de indústrias e nas análises para fins comerciais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). No presente estudo optou-se por utilizar o método de Hübl, considerando-se a disponibilidade dos reagentes em nosso laboratório e também que o método de Wijs emprega reagentes mais tóxicos.

O índice de iodo do óleo de soja em estudo apresentou, conforme esperado, valor mais elevado que o encontrado para a gordura de leite, visto que esta apresenta em sua composição uma quantidade menor de ácidos graxos insaturados.

4.1.5.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; STAUFEER, 1997). A oxidação pode alterar o aroma e a qualidade nutricional de alimentos e produzir compostos tóxicos, os quais podem conduzir a menor aceitabilidade dos produtos pelo cosumidor (MIN; BOFF, 2002).

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 (Equação 4.3). Estas substâncias são geralmente assumidas como peróxidos ou outros produtos similares provenientes da oxidação de óleos e gorduras (AOCS, 2004). Devido à ação fortemente oxidante, os peróxidos orgânicos no início da rancificação, atuam sobre o iodeto de potássio, liberando iodo que é titulado com tiossulfato de sódio, em presença de amido como indicador (MORETTO; FETT, 1998).

$$ROOH + 2H^+ + 2KI \rightarrow I_2 + ROH + H_2O + 2K^+$$

Equação 4.3. Reação entre os peróxidos presentes na amostra e Iodeto de potássio sob condições de análise do índice de peróxido.

Para a gordura de leite analisada o índice de peróxido não foi detectado, o que pode significar que não existam produtos provenientes de oxidação na manteiga empregada. O óleo de soja avaliado apresentou um índice de peróxido de 0,48 meq/1000g, sendo este valor cinco vezes menor que o valor máximo (2,5 meq/1000g) estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2006). Estes resultados indicam que as matérias-primas em estudo apresentaram um baixo grau de oxidação.

Pode ainda ser destacado que o óleo de soja apresentou índice de peróxido maior que o da gordura de leite, o que era esperado, pois ele possui maior número de ácidos graxos insaturados em sua composição que a manteiga e, portanto, é mais susceptível à oxidação.

Em geral, os resultados de caracterização físico-química das matérias-primas em estudo estavam em grande parte de acordo com as normas brasileiras, o que indicou que possuíam qualidade adequada para serem empregadas na continuidade do projeto.

4.1.6. Viscosidade

Viscosidade é uma medida da resistência ao deslizamento das moléculas de um fluido devido à fricção interna (FERREIRA et al, 2005; LAWSON, 1995). Para óleos, em geral, ela se eleva com o aumento do comprimento da cadeia dos ácidos graxos e decresce com o aumento da insaturação destes ácidos (MORRETO; FETT, 1998; TIMMS, 1985) e com o aumento da temperatura (TIMMS, 1985).

No presente trabalho, as viscosidades do óleo de soja e da gordura de leite foram avaliadas em um viscosímetro cone-placa ou, para a gordura de leite sob temperaturas abaixo de 40ºC, em um reômetro do tipo cilindros concêntricos. Para avaliar a influência da temperatura e verificar os possíveis desvios do comportamento Newtoniano, as viscosidades foram medidas a cada temperatura em função da rotação do cone (viscosímetro) ou do cilindro (reômetro), o que permitiu o ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação de acordo com a lei de potência (Equação 3.7). As curvas de ajuste dos dados a esta lei, para cada temperatura, são apresentadas no APÊNDICE A. Os resultados de índice de comportamento do óleo de soja e da gordura de leite obtidos para as diferentes temperaturas estudadas, bem como os coeficientes de correlação de ajuste dos dados à lei de potência são apresentados na Tabela 4.2.

Observa-se que os dados obtidos foram bem ajustados à lei de potência, visto que os coeficientes de correlação são iguais a 1 ou próximos a este valor. Pode ser observado também que o óleo de soja apresentou comportamento newtoniano para todas as temperaturas estudadas, visto que os valores de índice de comportamento (n) obtidos para este óleo foram próximos da unidade. Isto está de acordo com Gunstone (2002), que afirma que óleos e gorduras comportam-se como fluidos Newtonianos na maioria das situações, exceto para condições de alta pressão.

Tabela 4.2. Índice de comportamento do óleo de soja e da gordura de leite obtidos nas diferentes temperaturas estudadas e coeficientes de correlação de ajuste dos dados à lei de potência.

Temperatura (ºC)	Óleo de soja		Gordura de leite	
	Índice de comportamento (n)	R^2	Índice de comportamento	R^2
20	1,02	0,9999	0,71	0,9963
25	0,99	1,0000	0,84	0,9999
30	1,00	1,0000	0,99	1,0000
35	1,00	1,0000	0,99	0,9999
40	1,01	1,0000	1,00	0,9998
45	1,01	1,0000	1,01	0,9999
50	1,00	1,0000	1,01	1,0000
55	1,01	0,9998	1,00	0,9999
60	1,01	0,9999	0,99	0,9999

Para a gordura de leite analisada o comportamento newtoniano foi observado apenas para a faixa de temperatura de 30 – 60ºC, na qual os valores de índice de comportamento (n) também foram próximos da unidade. Entretanto, para as temperaturas de 20 e 25ºC, a gordura de leite apresentou índices de comportamento (n) menores que 1, caracterizando-se como um fluido pseudoplástico. De fato, comportamento não Newtoniano tem sido observado abaixo do ponto de fusão devido à presença de cristais de gordura (TIMMS 1985).

Para a faixa de temperaturas em que o óleo de soja (20 – 60ºC) e a gordura de leite (30 – 60ºC) comportaram-se como fluidos newtonianos, a viscosidade (μ) foi assumida como sendo equivalente à inclinação da curva de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3 e as curvas correspondentes a estes resultados encontram-se no APÊNDICE B.

Na Tabela 4.3, observa-se que os valores de viscosidade obtidos tanto para o óleo de soja quanto para a gordura de leite foram similares aos observados por outros autores. O resultado de viscosidade obtido para a gordura de leite a 50ºC (22,25mPa.s) se assemelha ao relatado por Rousseau, Hill e Marangoni (1996) (24,73 mPa.s) para a gordura de leite a mesma temperatura, quando utilizado um reômetro de placas paralelas. Para o óleo de soja, observa-se que os resultados de viscosidade determinados neste trabalho são próximos aos reportados por Timms (1985). É importante ressaltar ainda que o valor de viscosidade encontrado para óleo de soja, a 25ºC (51,60mPa.s) se aproxima do valor relatado por Gunstone (2002) (50,09mPa.s) para a viscosidade deste óleo à mesma temperatura.

Tabela 4.3. Viscosidades do óleo de soja e da gordura de leite em diferentes temperaturas observadas no presente trabalho, comparativamente a valores encontrados na literatura.

Temperatura (ºC)	Viscosidade (mPa.s)			
	Óleo de Soja		Gordura de leite	
	Presente trabalho	TIMMS, 1985	Presente trabalho	ROUSSEAU; HILL; MARANGONI, 1996
20	68,20	63,60	----	----
25	53,63	51,60	----	----
30	42,24	43,10	48,40	----
35	35,16	36,80	38,10	----
40	28,87	31,70	32,69	----
45	24,85	26,80	26,26	----
50	20,06	22,50	22,25	24,73
55	17,94	----	17,12	----
60	15,80	----	15,69	----

A análise dos resultados mostrados na Tabela 4.3 permitiu também a construção do gráfico apresentado na Figura 4.1, que mostra a redução da viscosidade das matérias-primas a cada variação de 10ºC na temperatura.

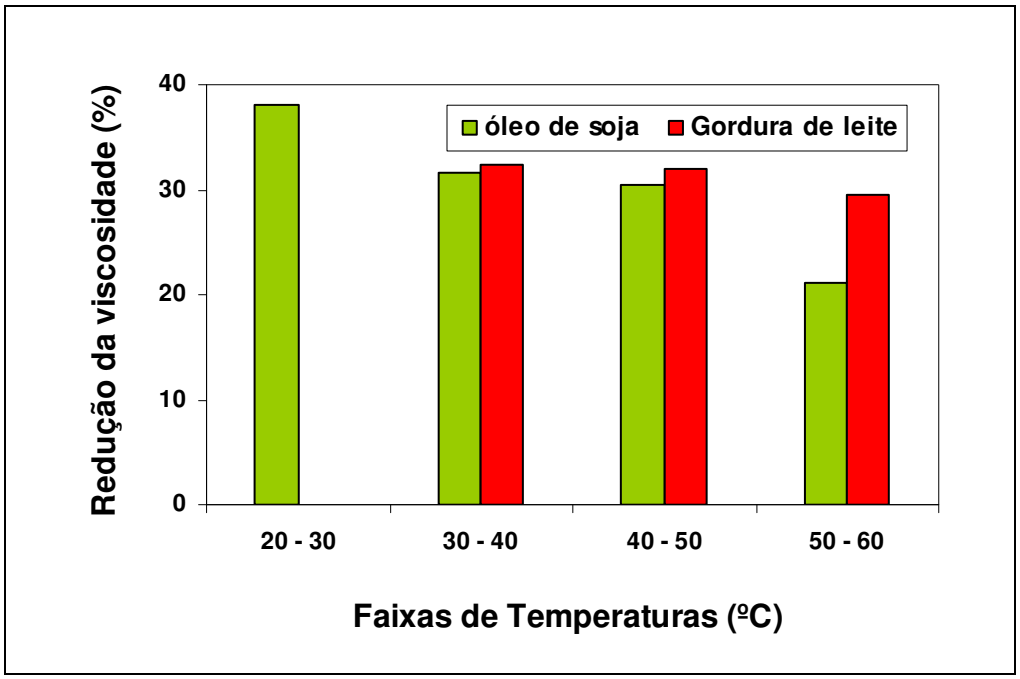


Figura 4.1. Redução da viscosidade (%) do óleo de soja e da gordura de leite a cada variação de 10ºC na temperatura.

O gráfico da Figura 4.1 indica uma tendência de diminuição no valor de viscosidade, tanto para o óleo quanto para a gordura, entre 20 e 40% a cada aumento de 10°C na temperatura. Esta diminuição está de acordo com Timms (1985), que relata que a viscosidade de um óleo reduz aproximadamente 30% a cada aumento de 10ºC na temperatura.

Para as temperaturas em que a gordura de leite comportou-se como fluido pseudoplástico (20 e 25ºC), porém com a existência de uma tensão mínima de escoamento, utilizou-se o Modelo de Casson (Equação 4.4) para o ajuste dos dados. Neste caso calculou-se a viscosidade plástica e o limite de escoamento de Casson. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.4 e as curvas correspondentes a estes resultados estão no APÊNDICE C. Optou-se por este modelo, pois, segundo Lannes, Medeiros e Amaral (2002), para muitos fluidos pseudoplásticos com uma tensão de cisalhamento inicial, as propriedades de fluxo podem ser caracterizadas pela equação de Casson. Além disso, de acordo com Branco e Gaspareto (2003), este modelo foi desenvolvido para uma suspensão de partículas interagindo em um meio newtoniano, exatamente como se acredita que a gordura de leite comporte-se nas temperaturas de 20 e 25ºC, considerando-se que os cristais de gordura em formação são partículas em suspensão e a parte da gordura ainda líquida (óleo) é um fluido newtoniano. Deve-se ressaltar também que este modelo foi empregado em diferentes estudos que utilizaram um reômetro do tipo cilindros concêntricos para a caracterização reológica de diversos alimentos, entre os quais o chocolate e a gordura de cupuaçu (COHEN; JACKIX, 2005; VISSOTO et al., 1999; VISSOTO; GOMES; BATISTA, 2005).

$$\sqrt{\gamma} = \frac{1}{\sqrt{\mu_{ca}}} \cdot \left(\sqrt{\tau} - \sqrt{\tau_{ca}}\right) \qquad \textbf{Equação 4.4}$$

Em que: γ = Taxa de deformação; μ_{ca} = Viscosidade Plástica de Casson; τ = Tensão de cisalhamento; τ_{ca} = Limite de escoamento de Casson.

Tabela 4.4. Parâmetros de ajuste dos dados obtidos para a gordura de leite, nas temperaturas de 20 e 25ºC, ao modelo de Casson e os correspondentes coeficientes de correlação do ajuste.

Temperatura (ºC)	**Gordura de leite**		
	μ_{ca} (mPa.s)	**τ_{ca} (Pa)**	**R^2**
20	769,60	0,3136	0,9989
25	382,08	0,1188	0,9996

Na Tabela 4.4 observa-se que os dados obtidos foram bem ajustados ao modelo proposto, visto que os valores dos coeficientes de correlação são próximos da unidade. Observa-se também que, com a diminuição da temperatura há um aumento tanto da viscosidade plástica de Casson (μ_{ca}), quanto do limite de escoamento de Casson (τ_{ca}). De acordo com Cohen e Jackix (2005), dentre os principais fatores que podem afetar a viscosidade plástica de Casson de um produto estão a temperatura e o conteúdo de gordura sólida.

Segundo Lai et al. (1999), a presença de um limite de escoamento indica a necessidade de uma tensão mínima de cisalhamento que deve ser excedida para que o fluido comece a escoar. Este fato tem sido interpretado pela existência de uma rede estrutural na qual as ligações devem ser quebradas para que o fluxo aconteça.

Para aplicações industriais o conhecimento da viscosidade plástica e do limite de escoamento de fluidos não newtonianos é muito importante, pois estes parâmetros influenciam o dimensionamento de tubulações e sistemas de bombeamento empregados para o transporte destes fluidos na planta de processamento (COHEN; JACKIX, 2005).

Como a dependência da viscosidade com a temperatura é geralmente expressa segundo a relação de Arrhenius (Equação 3.8), conforme descrito por Ibarz e Barbosa-Canovas (2003), os dados obtidos para o óleo de soja e para a gordura de leite nas temperaturas estudadas foram ajustados de acordo com esta equação, sendo os parâmetros desse ajuste apresentados na Tabela 4.5. As curvas do logaritmo natural da viscosidade em função do inverso da temperatura absoluta, para ambas as matérias-primas, utilizadas para obtenção destes resultados são apresentados no APÊNDICE D.

Tabela 4.5. Parâmetros da equação de Arrhenius ajustada para os dados de viscosidade em função da temperatura para o óleo de soja e a gordura de leite avaliados.

	Óleo de soja			**Gordura de leite**		
Parâmetros	**μ_0 (mPa.s)**	**Ea (kJ/mol)**	**R^2**	**μ_0 (mPa.s)**	**Ea (kJ/mol)**	**R^2**
	$3{,}21 \times 10^{-4}$	29,76	0,9954	$1{,}37 \times 10^{-4}$	32,16	0,9942

Na Tabela 4.5 observa-se que o ajuste dos dados de viscosidade em função da temperatura à relação de Arrhenius foi satisfatório, visto que os coeficientes de correlação encontrados estão próximos da unidade. Para a gordura de leite, apenas os dados obtidos na

faixa de temperatura em que ela comporta-se como um fluido newtoniano (30 – 60ºC) foram considerados na obtenção dos parâmetros apresentados na Tabela 4.5. Quando os dados de viscosidade em função da temperatura em 20 e 25ºC foram considerados, não foi obtido um ajuste satisfatório à relação de Arrhenius, visto que o coeficiente de correlação foi diferente da unidade.

Observa-se também, na Tabela 4.5, uma energia de ativação de escoamento (Ea) mais elevada para a gordura de leite em relação ao óleo de soja, o que sugere uma influência da temperatura na viscosidade ligeiramente maior para a gordura de leite (GRATÃO; BERTO; SILVEIRA JÚNIOR, 2004).

4.1.7. Análise do comportamento térmico das matérias-primas

Muitos estudos têm sido conduzidos para investigar o perfil térmico de óleos e gorduras (NOOR LIDA; SUNDRAM; IDRIS, 2006; SHEN et al., 2001; TAN; CHE MAN, 2000). Dentre as técnicas empregadas para esta investigação, destaca-se a análise por calorimetria exploratória diferencial ("Diferencial Scanning Calorimetry" – DSC), que é uma técnica termo-analítica amplamente utilizada para avaliar vários componentes de alimentos (NASSU; GONÇALVES, 1999). 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).

As curvas de fluxo de calor em função da temperatura, obtida por análise de calorimetria exploratória diferencial, da fusão do óleo de soja e da gordura de leite são apresentadas na Figura 4.2.

Na Figura 4.2a verifica-se a presença de dois picos endotérmicos nas temperaturas de -36,76ºC e -23,72ºC. Este resultado é próximo ao obtido por Tan e Che Man (2000). Estes autores realizaram um estudo do comportamento térmico de vários óleos empregados para fins alimentícios. Para o óleo de soja, a curva de fluxo de calor de fusão por temperatura obtida no presente trabalho é semelhante à apresentada por eles, sendo as temperaturas dos dois picos endotérmicos, no caso do trabalho destes autores, -39,60ºC e -25,57ºC.

O perfil térmico obtido para o óleo de soja está de acordo também com o previsto por Nassu e Gonçalves (1999), que relatam que este óleo tem uma curva característica de fusão em torno de -25ºC.

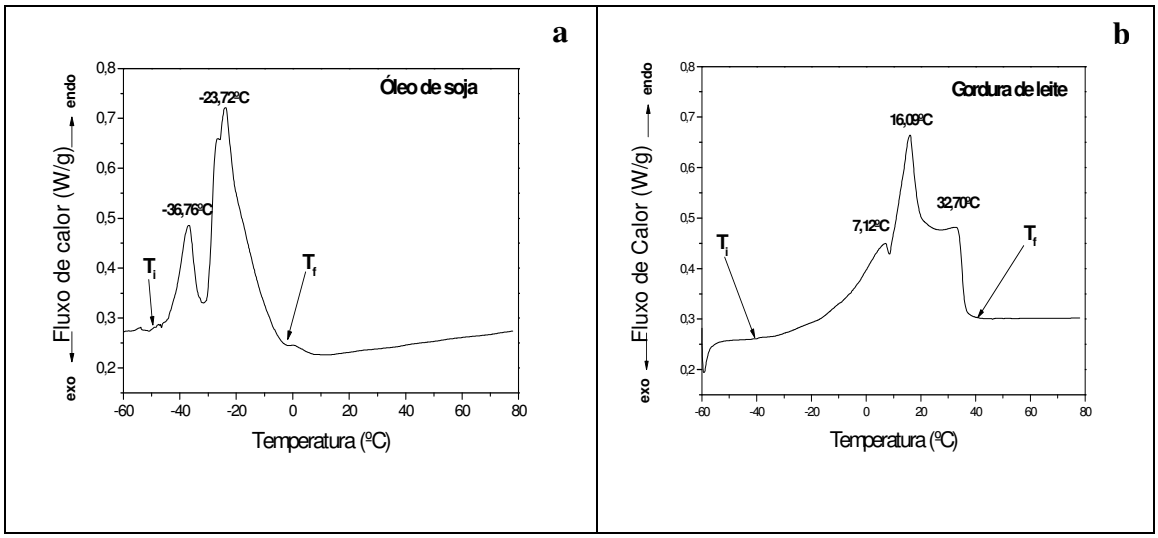


Figura 4.2. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura, obtidas por análise de calorimetria exploratória diferencial, da fusão do óleo soja (a) e da gordura de leite (b). Na figura, Ti refere-se à temperatura inicial de fusão e Tf refere-se à temperatura final de fusão.

Na Figura 4.2b observa-se a presença de picos endotérmicos, nas temperaturas de 7,12ºC e 16,09ºC e um platô entre 20ºC e 32,70ºC. Este resultado está de acordo com o relatado por Hunt e Buckin (2000), que relacionam a interpretação das medidas obtidas por calorimetria exploratória diferencial para a gordura de leite à existência de três espécies de fusão predominantes de baixa fusão (em torno de 281K ou 8ºC), de média fusão (entre 281 e 293K, ou seja, entre 8 e 20ºC) e de alta fusão (acima de 293K, ou acima de 20ºC).

Diversos autores estudaram o comportamento de fusão da gordura de leite através da análise de calorimetria exploratória diferencial (TEN GROTENHUIS et al., 1999; SELLAPAN e AKOH, 2001; SHEN et al, 2001).

A curva de fluxo de calor da gordura de leite em função da temperatura obtida no presente trabalho tem perfil semelhante à observada por Ten Grotenhuis et al. (1999), que obtiveram picos endotérmicos em 5ºC e 15ºC (máximo) e um platô de 20 a 35ºC. Esta mesma curva é diferente da observada por Shen et al., (2001), pois no estudo realizado por estes autores foi determinada a presença de um pico máximo em aproximadamente 12ºC, de dois pequenos picos em torno de 3 e 7 ºC, e um platô entre 15 e 34ºC. Eles relatam que as diferenças de perfis térmicos da gordura de leite encontradas em distintos estudos podem ser explicadas por diferentes composições e históricos térmicos das amostras, ou mesmos as condições utilizadas na análise de calorimetria exploratória diferencial, que afetam a cristalização da gordura de leite.

De acordo com Tan e Che Man (2000), a complexidade do perfil térmico de óleos e gorduras é essencialmente devido à grande variedade de triacilgliceróis como seus principais constituintes. Nas curvas de fusão de óleos e gorduras obtidas por calorimetria exploratória diferencial, características complexas não são facilmente interpretadas, e isto é conseqüência do fenômeno de polimorfismo de óleos e gorduras que é fortemente dependente do histórico térmico das amostras (CONI et al., 1994).

Como óleos e gorduras são uma mistura de muitos componentes, eles exibem uma ampla faixa de fusão ao invés de uma temperatura claramente definida. O ponto de fusão de uma gordura é, portanto, uma propriedade empírica relacionada a um método experimental de determinação e não uma propriedade física, como o ponto de fusão de um componente puro (TIMMS, 1985).

O ponto de fusão de gorduras pode ser determinado por vários métodos, tais como: ponto de deslizamento ("slip point"), ponto de amolescimento ("softening point"), ponto de gota ("dropping point") ou ainda por análise de calorimetria exploratória diferencial (NASSU; GONÇALVES, 1999).

O ponto de fusão determinado por esta última técnica pode ser considerado como a temperatura inicial do pico principal presente na curva de fusão de um óleo ou gordura. Esta temperatura pode ser determinada pela extrapolação até a linha de base da parte mais inclinada do pico (AOCS, 2004; CEBULA; SMITH, 1992). Entretanto, existem outras considerações para obtenção deste resultado por esta técnica de análise. Alguns autores consideram como ponto de fusão a temperatura na qual o fenômeno de fusão termina, ou seja, quando todos os cristais no estado sólido se tornam líquidos (NASSU; GONÇALVES, 1999).

No presente trabalho, assim como Nassu e Gonçalves (1999), considerou-se como ponto de fusão a temperatura na qual ocorre a fusão completa de todo o material cristalino presente nas matérias-primas em estudo, ou seja, a temperatura na qual termina o último pico presente na curva que representa o perfil de fusão das amostras.

A análise das curvas apresentadas na Figura 4.2 permitiu obter os resultados de temperatura inicial de fusão (T_i), temperatura final de fusão (T_f), faixa de temperatura de fusão (ΔT) e entalpia de fusão (ΔH_f) para o óleo de soja e gordura de leite em estudo, estes resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Temperatura inicial de fusão (T_i), temperatura final de fusão (T_f), faixa de temperatura de fusão (ΔT) e entalpia de fusão (ΔH_f) do óleo de soja da gordura de leite, obtidos por calorimetria exploratória diferencial.

	T_i (ºC)	T_f (ºC)	ΔT (ºC)	ΔH_f (J/g)
Óleo de Soja	-46,46	-3,19	43,27	88,09
Gordura de leite	- 31,73	40,51	72,24	98,36

Para o óleo de soja o ponto de fusão estimado foi -3,19ºC, resultado que está próximo ao obtido por Nassu e Gonçalves (1999) (-5,18ºC), que também utilizaram a calorimetria exploratória diferencial para determinar o ponto de fusão do óleo de soja desodorizado.

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 de temperatura inicial de fusão -46,46ºC e de faixa de temperatura de fusão 43,27ºC são semelhantes aos obtidos por Tan e Che Man (2000), sendo que estes autores obtiveram como temperatura inicial de fusão para óleo de soja -46,11ºC e como faixa de temperatura de fusão 47,75ºC.

Para a gordura de leite a fusão teve início em -31,73ºC e seu ponto final foi 40,51ºC, sendo a faixa total de temperatura de fusão 72,24ºC, muito mais elevada que para o óleo de soja (43,27ºC), o que pode ser explicado pela maior complexidade de composição da gordura de leite.

Embora existam muitos dados de calores de fusão de triglicerídeos puros reportados na literatura, existem limitados dados referentes aos calores de fusão de óleos e gorduras naturais e, sendo assim, as entalpias de fusão do óleo de soja e da gordura de leite foram calculadas. Este cálculo foi realizado através da integração da curva de calor específico do óleo de soja e da gordura de leite em função da temperatura (APÊNDICE E). Os resultados de entalpia encontrados foram 88,09J/g para o óleo de soja e 98,36J/g gordura de leite, conforme apresentado na Tabela 4.6.

A entalpia total associada à fusão da gordura de leite é próxima à relatada por Timms (1985), que apresenta como faixa de valores de entalpia de fusão para a gordura de leite de 74,11 – 93,37kcal/kg. Entretanto este o resultado é diferente do obtido por Shen et al. (2001) 70,60J/g. Acredita-se que a diferença de valores possa ser devido as diferentes composições da gordura de leite bem como as distintas condições de análise.

Segundo Tan e Che Man (2000), por meio da aplicação de técnicas estatísticas e matemáticas os dados obtidos por calorimetria exploratória diferencial podem ser utilizados para várias outras medidas. Dentre estas se destacam o conteúdo de gordura sólida, a detecção

de outras gorduras "estranhas" presentes em gorduras animais e em manteiga, a estimativa da quantidade de saturações presentes em misturas transesterificadas e a quantificação do índice de iodo em óleos.

4.2. Avaliação das propriedades físico-químicas, de composição e de textura dos produtos obtidos por transesterificação da gordura de leite com óleo de soja catalisada por lipase de *Aspergillus niger*

Após a caracterização inicial das matérias-primas, selecionou-se a lipase de *Aspergillus niger*, para catalisar a reação de transesterificação da gordura de leite com óleo de soja. Esta enzima, adquirida em grau alimentício com o nome comercial Lipase A, (Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão), tem sido relatada em trabalhos da literatura para a catálise desta reação (KALO et al, 1988; PABAI; KERMASHA; MORIN, 1995; LAI et al., 2000). A caracterização do biocatalisador é apresentada na seção 4.2.1.

4.2.1. Características do sitema imobilizado

A lipase de *Aspergillus niger* é uma enzima de fonte microbiana que hidroliza ácidos graxos nas posições 1,3 do triglicerídeo, e pode ser utilizada em reações de transesterificação (MARANGONI, 2002). Na literatura esta lipase tem sido relatada para a transesterificação de gordura de leite em diferentes estudos. Kalo e colaboradores (1988), por exemplo, estudaram o comportamento desta lipase, obtida comercialmente na forma livre e posteriormente imobilizada em celite por adsorção, na transesterificação da gordura leite dissolvida em solvente (issoctano), sob temperatura de 35ºC, em frascos agitados, determinando que a enzima atuou de forma não especifica sob as condições reacionais analisadas. Em outro estudo, Pabai, Kermasha e Morin (1995) investigaram o desempenho da lipase de *A. niger,* obtida por um processo fermentativo em laboratório, comparativamente a lipases de outras fontes, na transesterificação da gordura de leite em um sistema de microemulsão. Nesse trabalho esta enzima foi a que atingiu o maior grau de transesterificação (26%), sendo comprovado seu potencial para substituição de ácidos graxos hipercolesterolêmicos (C12:0, C14:0 e C16:0) na posição sn-2 da gordura de leite por ácidos graxos hipocolesterolêmicos (C18:0 e C18:1).

No presente trabalho, a lipase de *A. niger* foi imobilizada por ligação covalente em POS-PVA para aplicação na transesterificação da gordura de leite com óleo de soja. Na

Tabela 4.7 são apresentadas os valores de umidade e atividade hidrolítica da lipase de *A. niger* livre e imobilizada em POS-PVA, bem como o rendimento de imobilização.

Tabela 4.7. Caracteríticas da lipase de *A. niger* livre e imobilizada em POS-PVA.

	Umidade (%)	**Atividade Hidrolítica (U/g)**	**Rendimento de imobilização (%)**
Livre	13,39	26567,19	----
Imobilizada	14,60	1682,32	34,91

Conforme pode ser observado, a umidade do sistema imobilizado foi cerca de 15%. O conhecimento da umidade do sistema é de grande importância, especialmente para aplicações em esterificações e interesterificações em meios não aquosos (YADAV; DEVI, 2004). Neste caso, elevados teores de água podem resultar em reações de hidrólise, ao invés da formação do produto de interesse (XU, 2003).

Pode-se observar ainda na Tabela 4.7 que cerca de 35% da atividade hidrolítica da lipase foi retida no suporte após o processo de imobilização. Isso significa que parte da atividade foi perdida durante este procedimento, fato bastante comum em trabalhos com enzimas (PAULA, 2008; SANTOS, 2008b). Cao, Langen e Roger (2003), relatam que a imobilização de enzimas em um suporte na maior parte dos casos leva a uma perda de mais de 50% de sua atividade. Esta perda de atividade pode ser explicada como sendo resultado da interação da enzima com o suporte, bem como por efeitos de transferência de massa.

De acordo com do Georgio e Hubbell (1993), as características cinéticas da enzima imobilizada são afetadas por sua proximidade ao suporte, sendo que a natureza e extensão desses efeitos dependem do processo de imobilização. Ainda segundo estes autores, três formas de interação podem ser distingüidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e; (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima. Apesar de todos esses possíveis efeitos que resultam em redução de atividade de enzimas submetidas a procedimentos de imobilização, deve-se destacar que a necessidade destes procedimentos é justificada pelo aumento da estabilidade, possibilidade de recuperação e uso contínuo do biocatalisador e

outras vantagens associadas ao uso enzimas imobilizadas (CAO; LANGEN; ROGER. 2003; MATEO et al, 2007). Além disso, para uso em meio orgânico a imobilização é muitas vezes um procedimento necessário para possibilitar a distribuição homogênea da lipase no reator, uma vez que esta é insolúvel nestes meios e tende a formar aglomerados.

Como forma de avaliar as modificações nas propriedades físico-químicas, de textura e de composição do produto obtido na reação de transesterficação da gordura de leite com óleo de soja catalisada pela lipase de *A. niger*, os materiais de partida foram misturados em diferentes proporções seguindo um planejamento experimental estatístico de misturas. As variáveis resposta foram os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido, as propriedades de textura, consistência e dureza e o grau de transesterificação calculado através da composição em TAGs da mistura e dos produtos. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

4.2.2. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática nas propriedades físico-químicas do produto obtido

Os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das misturas físicas da gordura de leite com óleo de soja e dos respectivos produtos transesterificados, referentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico, são apresentados na Tabela 4.8.

A análise dos resultados indicou que, tanto para a mistura das matérias-primas quanto para os produtos transesterificados, os índices apresentaram uma dependência linear com o aumento da fração mássica de gordura de leite, sendo possível o ajuste de modelos que não apresentaram falta de ajuste e foram estatisticamente significantes a um nível de confiança de 95%. Isso pode ser observado na Tabela 4.9, na qual é apresentada a análise de variância correspondente. Há exceção apenas para o índice de acidez do produto transesterificado, para o qual não foi possível o ajuste de um modelo linear satisfatório, ou seja, o mesmo não foi significante e apresentou falta de ajuste. Neste caso, testaram-se também os modelos quadrático e cúbico, não havendo, no entanto, um ajuste satisfatório.

Tabela 4.8. Índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das misturas físicas da gordura de leite com óleo de soja e dos respectivos produtos transesterificados correspondentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

Experimento	Fração mássica		Variáveis Resposta							
	Gordura de Leite	Óleo de soja	Índice de acidez (mgKOH/g)		Índice de saponificação (mgKOH/g)		Índice de Iodo ($gI_2/100g$)		Índice de peróxido (meq/1000g)	
			Mistura	Produto	Mistura	Produto	Mistura	Produto	Mistura	Produto
1	**0**	**1**	0,15	7,66	187,56	190,03	117,99	120,65	1,71	1,87
2	**0**	**1**	0,16	5,20	192,08	192,79	122,48	121,09	1,89	2,24
3	**0,25**	**0,75**	0,38	4,87	198,23	201,68	97,13	99,72	1,30	2,24
4	**0,33**	**0,67**	0,37	2,77	199,29	199,32	90,43	91,18	1,20	1,49
5	**0,50**	**0,50**	0,49	3,00	204,08	205,64	77,70	77,70	1,03	1,68
6	**0,67**	**0,33**	0,56	8,68	202,88	212,71	61,73	62,47	0,54	1,49
7	**0,75**	**0,25**	0,63	3,69	205,05	214,85	54,36	55,59	0,32	0,93
8	**1**	**0**	0,87	4,25	215,32	224,85	31,27	32,00	0,19	0,56
9	**1**	**0**	0,90	4,55	216,54	226,11	34,41	32,04	0,28	0,46
10	**1**	**0**	0,92	4,36	221,48	223,09	33,20	34,69	0,19	0,54

Tabela 4.9. Análise de variância para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido das misturas físicas da gordura de leite com óleo de soja e dos respectivos produtos transesterificados correspondentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

		Mistura					**Produto**				
		SQ	**GL**	**MQ**	**F**	**P**	**SQ**	**GL**	**MQ**	**F**	**p**
Índice de acidez	**Modelo**	0,72	1	0,72	367,1	<0,0001*	1,85	1	1,85	0,48	0,5064
	Erro residual	0,016	8	$1,965 \times 10^{-3}$			30,58	8	3,82		
	Falta de ajuste	0,014	5	$2,879 \times 10^{-3}$	6,50	0,0772	27,51	5	5,50	5,37	0,0985
	Erro puro	$1,329 \times 10^{-3}$	3	$4,429 \times 10^{-4}$			3,07	3	1,02		
	R^2	**0,9787**					0,0570				
Índice de saponificação	**Modelo**	991,92	1	991,92	90,52	0,0001*	1538,71	1	1538,71	434,59	<0,0001*
	Erro residual	87,67	8	10,96			28,33	8	3,54		
	Falta de ajuste	53,70	5	10,70	0,94	0,5577	19,91	5	3,98	1,42	0,4107
	Erro puro	34,17	3	11,34			8,41	3	2,80		
	R^2	**0,9188**					**0,9819**				
Índice de iodo	**Modelo**	10642,38	1	10642,38	4635,7	<0,0001*	10882,88	1	10882,88	13619,43	<0,0001*
	Erro residual	18,37	8	2,30			6,39	8	0,80		
	Falta de ajuste	3,30	5	0,66	0,13	0,9740	1,54	5	0,31	0,19	0,9470
	Erro puro	15,07	3	5,02			4,885	3	1,62		
	R^2	**0,9983**					**0,9994**				
Índice de peróxido	**Modelo**	3,63	1	3,63	231,67	<0,0001*	3,69	1	3,69	52,62	<0,0001*
	Erro residual	0,13	8	0,016			0,56	8	0,070		
	Falta de ajuste	0,10	5	0,021	2,77	0,2153	0,49	5	0,097	3,95	0,1439
	Erro puro	0,022	3	$7,432 \times 10^{-3}$			0,074	3	0,025		
	R^2	**0,9666**					**0,8680**				

Na Tabela: SQ – soma quadrática; GL – grau de liberdade; MQ – média quadrática. *p< 0,05.

De acordo com os valores de R^2 obtidos, mais de 91% da variabilidade experimental pode ser explicada pelos modelos lineares relativos aos índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido para as misturas físicas das matérias-primas. Observa-se também que, para os produtos transesterificados, mais de 98% da variabilidade experimental pode ser explicada pelos modelos relativos aos índices de saponificação e iodo e mais de 87% no caso do índice de peróxido.

Os modelos estatísticos obtidos para cada índice para as misturas e para os produtos transesterificados são representados pelas equações da Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Equações que representam os modelos estatíticos ajustados para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido em função da fração mássica das matérias-primas*

Variável	Mistura	Produto transesterificado
Índice de acidez	$\mathbf{0{,}86} \cdot \mathbf{X_1} + \mathbf{0}{,}15 \cdot \mathbf{X_2}$	
Índice de saponificação	$\mathbf{216{,}15} \cdot \mathbf{X_1} + \mathbf{189{,}58} \cdot \mathbf{X_2}$	$\mathbf{223{,}92} \cdot \mathbf{X_1} + 190{,}84 \cdot \mathbf{X_2}$
Índice de iodo	$\mathbf{32{,}91} \cdot \mathbf{X_1} + \mathbf{1}19{,}93 \cdot \mathbf{X_2}$	$\mathbf{33{,}12} \cdot \mathbf{X_1} + 121{,}11 \cdot \mathbf{X_2}$
Índice de peróxido	$\mathbf{0{,}14} \cdot \mathbf{X_1} + \mathbf{1{,}75} \cdot \mathbf{X_2}$	$\mathbf{0{,}62} \cdot \mathbf{X_1} + 2{,}24 \cdot \mathbf{X_2}$

*X_1 e X_2 correspondem às frações mássicas de gordura de leite e óleo de soja, respectivamente.

O ajuste dos dados experimentais aos modelos pode ser melhor visualizado nas Figuras 4.3(a-d) e 4.4(a-c), na qual são apresentados os resultados observados para cada índice estudado em comparação aos resultados preditos pelos modelos ajustados para as misturas e para os produtos transesterificados, respectivamente.

Observa-se que o ajuste dos dados experimentais de cada índice em relação à variação na quantidade de gordura de leite presente nas misturas fisicas das matérias-primas é representado por uma reta, o que indica que a interação entre os componentes da mistura não interfere nas respostas estudadas. Este resultado era esperado, e mostra que houve apenas interação física entre os componentes da mistura, sem qualquer alteração química apreciável nas condições experimentais. Os resultados foram similares aos obtidos por Rodrigues (2002) ao estudar a mistura entre gordura de leite e óleo de milho. Naquele estudo o autor concluiu que a mistura física entre os componentes indicou o ajuste dos dados a modelos lineares para os índices de acidez, saponificação e iodo.

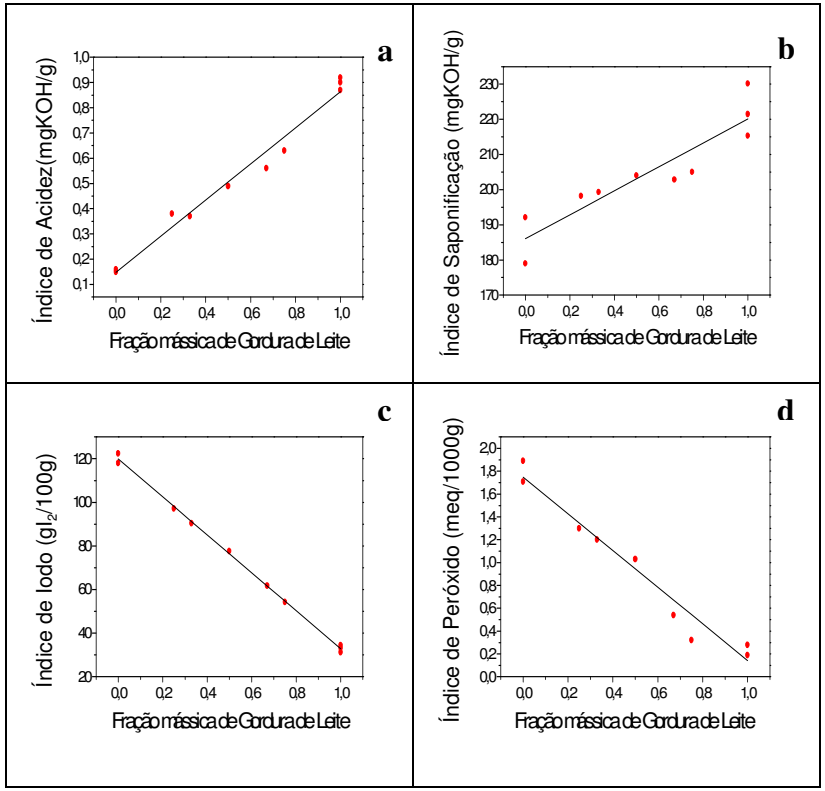


Figura 4.3. Resultados Experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de acidez (a), saponificação (b), iodo (c) e peróxido (d) em função da fração mássica de gordura de leite na mistura física das matérias-primas.

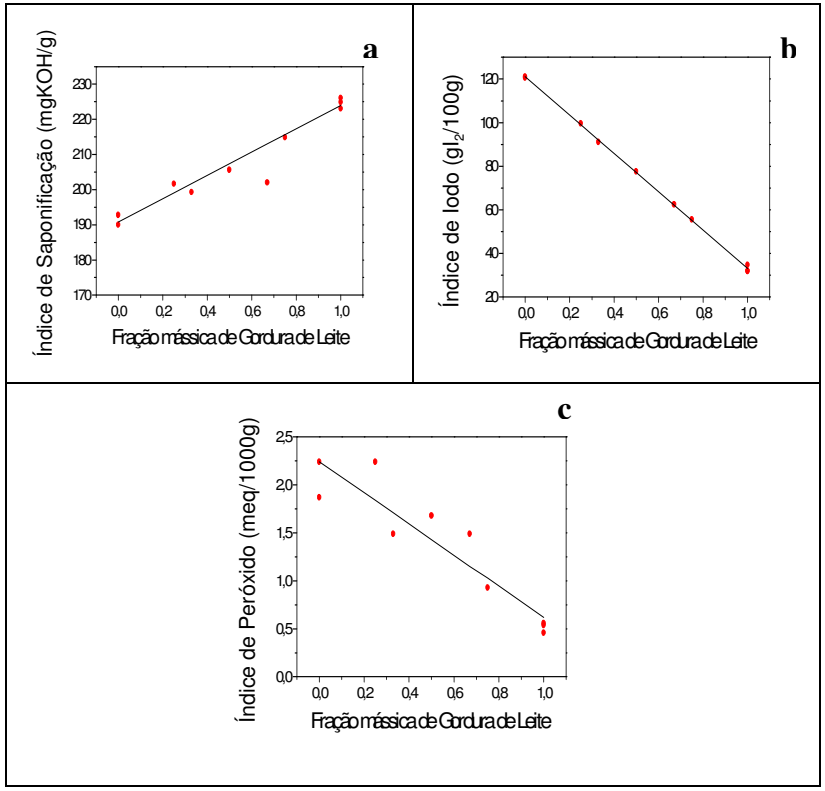


Figura 4.4. Resultados Experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de saponificação (a), iodo (b) e peróxido (c) em função da fração mássica de gordura de leite nos produtos transesterificados.

Para os produtos transesterificados, os ajustes dos dados experimentais para os valores dos índices de saponificação, iodo e peróxido em relação à variação da quantidade de gordura de leite presente nas misturas, também podem ser representados por uma reta.

Na Figura 4.5(a-c) é feita uma comparação dos modelos obtidos para as misturas e produtos transesterificados referentes aos índices de saponificação, iodo e peróxido.

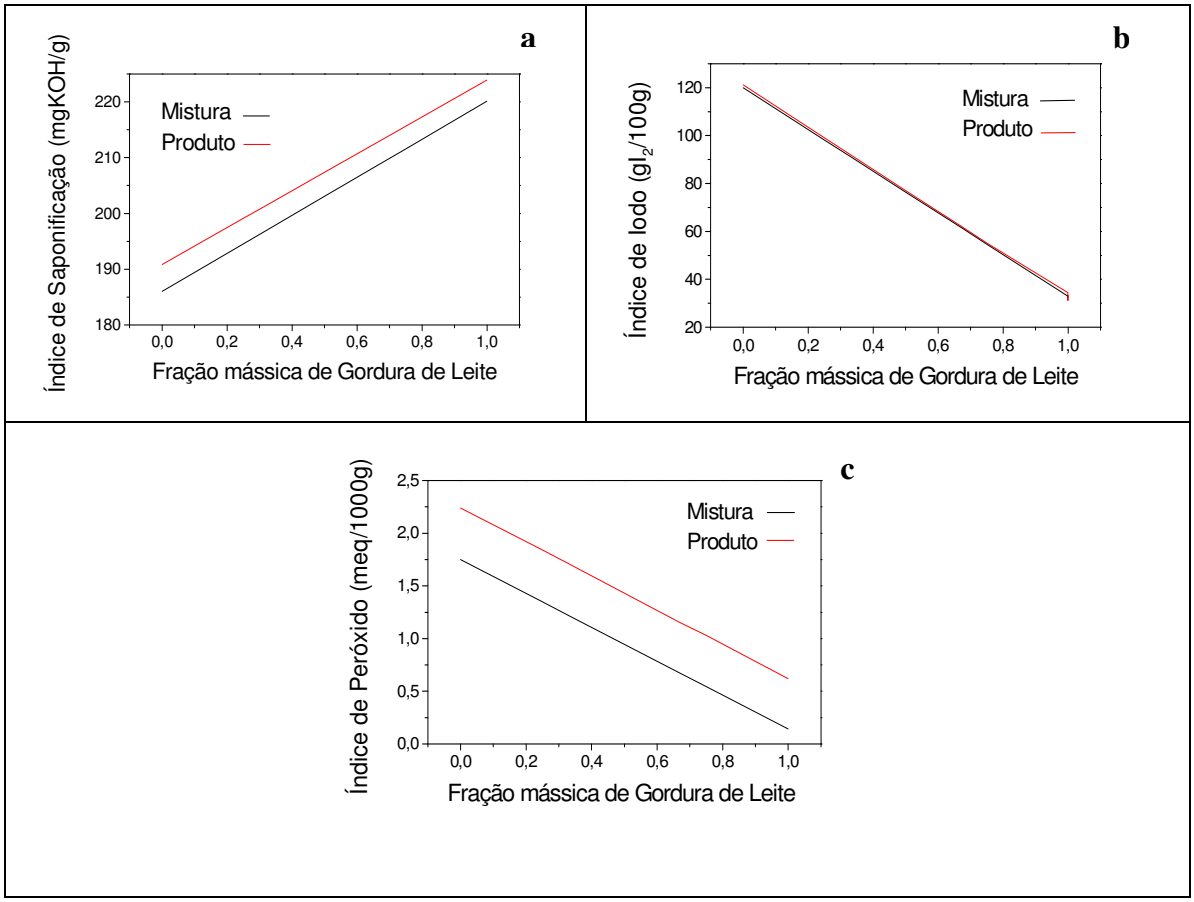


Figura 4.5. Modelos ajustados segundo planejamento estatístico para os índices de saponificação (a), iodo (b), e peróxido (c) em função da fração mássica de gordura de leite para a mistura das matérias-primas e para os produtos transesterificados.

Observa-se que os modelos obtidos para os índices de saponificação e iodo da mistura das matérias-primas e dos produtos transesterificados são semelhantes. Além disso, pode-se verificar que, para o caso do índice de iodo, houve sobreposição dos modelos, indicando que a reação não provocou qualquer alteração neste índice. No caso do índice de saponificação, embora não seja observada perfeita sobreposição dos modelos, a diferença entre os valores preditos é desprezível (menores que 3%). Isto ocorreu porque a transesterificação é uma reação que promove somente a troca e redistribuição dos resíduos de ácidos graxos entre os

triacilgliceróis, resultando em produtos que apresentam a mesma massa molecular e a mesma composição em ácidos graxos, porém com diferente composição em TAGs (NOOR LIDA et al., 2002).

O mesmo não foi observado para os índices de peróxido e acidez, sendo que para este último não foi possível o ajuste satisfatório de um modelo. Isso se deve ao fato de que as mudanças na estrutura química obtidas através da reação influenciam estas duas respostas.

Os índices de peróxido dos produtos transesterificados foram pelo menos 30% superiores aos observados para as misturas correspondentes, indicando que reações de oxidação ocorreram paralelamente à transesterificação.

Os índices de acidez dos produtos transesterificados também foram superiores aos resultados obtidos para as mesmas combinações de gordura e óleo não transesterificada. Isto demonstra a ocorrência de hidrólise parcial dos triglicerídeos, também indicada pela presença de odor característico de ácidos graxos livres. Neste caso, a presença de umidade no sistema imobilizado, embora inferior a 15%, pode explicar a ocorrência de hidrólise.

4.2.3. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática nas propriedades de textura do produto obtido

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 devem ser nem muito firmes nem muito macias, não devem ser viscosas, gordurosas, escamosas, ou quebradiças (SHERMAN, 1976).

Neste trabalho, dentre as propriedades de textura foram selecionadas, para avaliar os produtos transesterificados, a consistência e a dureza, cujos valores apresentam 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 et al., 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 vastamente 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 uma 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 a mostrada na Figura 4.6, e o valor desta força é utilizado para o cálculo da consistência como "yield value", conforme Equação 3.9.

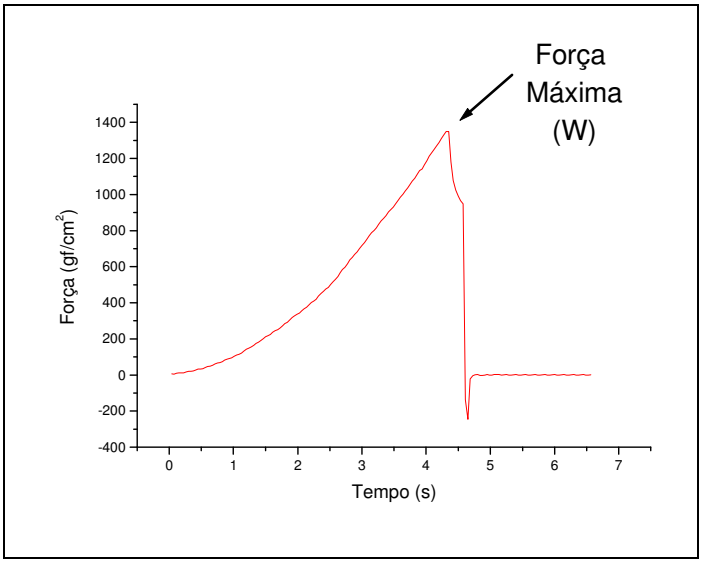


Figura 4.6. Curva caracterítica de força em função do tempo obtida em testes de consistência da mistura contendo 67% de gordura de leite e 33% de óleo de soja, à temperatura de 10ºC.

Outros aparelhos para medir a textura incluem examinadores especiais de espalhabilidade e sondas de fio cortante (DEMAN, 1976), sendo esta última empregada para medida da dureza das amostras em estudo neste trabalho.

Dureza é uma característica de um produto que dispõe uma resistência substancial à deformação ou quebra (BOURNER, 2002). A sonda de fio cortante pode ser utilizada sob velocidade constante para cortar amostras de produtos derivados de leite. Uma grande vantagem é que a área da amostra em contato com o fio é constante durante todo o teste, o que minimiza os efeitos de fricção e adesão entre o produto e a superfície da célula de teste (VOISEY; DEMAN, 1976).

Uma curva característica de força em função da profundidade de corte da sonda utilizada em um teste de dureza de gordura é mostrada da Figura 4.7. Nesse caso, a dureza foi expressa como sendo a força média exercida para cortar a amostra, entre 8 e 16 mm de profundidade, a temperatura de 10ºC.

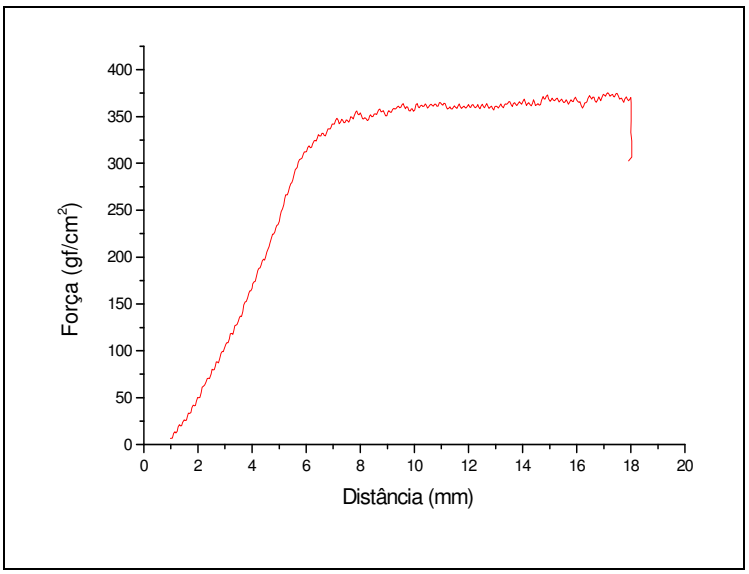


Figura 4.7. Curva de força em função da profundidade de corte utilizada para a determinação da dureza da mistura contendo 67% de gordura de leite e 33% de óleo de soja, à temperatura de 10ºC.

A plasticidade de uma gordura, assim como a viscosidadede, é influenciada pela temperatura da amostra e, por isso, é importante mencionar a temperatura de teste, bem como os detalhes sobre as condições experimentais (KLEINERT, 1976).

A consistência e a dureza das misturas e produtos transesterificados, sob temperatura de 10ºC, são apresentadas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Consistência e dureza, obtidas sob temperatura de 10ºC, para as misturas físicas de gordura de leite e óleo de soja e para os produtos transesterificados correspondentes referentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

Amostra	Proporção mássica		Variáveis			
	Gordura de Leite	Óleo de soja	Consistência (gf/cm^2)		Dureza (gf)	
			Mistura	Produto	Mistura	Produto
1	**0**	**1**	0	0	0	0
2	**0**	**1**	0	0	0	0
3	**0,25**	**0,75**	0	0	0	0
4	**0,33**	**0,67**	85	145	0	0
5	**0,50**	**0,50**	988	1211	82	56
6	**0,67**	**0,33**	3743	2134	309	169
7	**0,75**	**0,25**	4419	4405	506	300
8	**1**	**0**	9391	6932	1250	827
9	**1**	**0**	11514	8146	1216	882
10	**1**	**0**	10231	7593	1069	671

Na Tabela 4.11 é possível notar que a consistência das misturas varia de 0 a 11514 gf/cm^2 e que esta mesma propriedade para os produtos transesterificados encontra-se na faixa de 0 a 8146 gf/cm^2. A dureza das misturas variou de 82 a 1250 gf, enquanto que para os produtos transesterificados este intervalo variou de 56 a 882gf.

Observa-se que para as amostras contendo de 75 a 100% e 67 a 100% de óleo não foi possível determinar a consistência e a dureza, respectivamente. Isso se deve ao fato de que estas misturas apresentam-se fluidas na temperatura analisada, o que impossibilitou a detecção pelos sensores. Nestes casos, atribuiu-se o valor zero para estas propriedades.

Apenas a adição de óleo de soja à gordura de leite conduziu a diminuição de pelo menos 57% (mistura 7) tanto em sua consistência quanto em sua dureza. Estes resultados se devem ao fato de que o acréscimo de um óleo líquido à gordura de leite causa uma diluição de sua rede cristalina e, conseqüentemente, a formação de uma rede cristalina estruturalmente mais frágil (RODRIGUES, GIOIELLI, ANTON, 2003).

As amostras contendo 33 a 50% de gordura de leite apresentaram um aumento de sua consistência após a transesterificação, enquanto que as amostras contendo de 67 a 100% de gordura de leite apresentaram uma diminuição da consistência depois da reação. Para a propriedade dureza observou-se um aumento após a reação em todas as amostras estudas.

Haighton (1959) estabeleceu critérios através dos quais é possível comparar as amostras analisadas em função da propriedade subjetiva de espalhabilidade, sendo estes critérios mostrados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. 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 Tabela 4.11 referentes às misturas aos critérios da Tabela 4.12, nota-se que a gordura de leite pura (misturas 8, 9 e 10) pode ser classificada segundo Haighton (1959) como "muito dura", pois apresentou, em média, consistência de 10379 gf/cm^2, enquanto que a mistura 5 contendo 50% de gordura de leite, apresentou valor de consistência entre 800 e 1000 gf/cm^2, podendo assim ser classificada como um material duro, mas que é "satisfatoriamente espalhável".

Em relação aos critérios estabelecidos por Haighton (1959), o produto contendo 37% de gordura de leite apresentou uma consistência entre 100 e 200 gf/cm^2, sendo, portanto "macio, mas já espalhável", enquanto que o valor de consistência do produto contendo 50% de gordura de leite encontra-se na faixa de 1000 a 1500gf/cm^2, podendo assim ser classificado como "muito duro, mas que ainda está no limite de espalhabilidade". Os demais produtos contendo de 67 a 100% de gordura têm resultados de consistência maiores que 1500gf/cm^2, sendo assim considerados como materiais "muito duros".

Com relação à análise estatística das propriedades de textura, observou-se que tanto a consistência quanto a dureza das misturas e dos produtos transesterificados apresentaram uma dependência quadrática com o aumento da fração mássica de gordura de leite. Os modelos obtidos não apresentaram "falta de ajuste" e foram estatisticamente significantes a um nível de confiança de 95%. Isso pode ser observado na Tabela 4.13, na qual é apresentada a análise de variância correspondente.

Tabela 4.13. Análise de variância para consistência e dureza (sob temperatura de 10ºC) das misturas físicas de gordura de leite e óleo de soja e produtos transesterificados correspondentes referentes aos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

		Mistura					**Produto**				
		SQ	**gl**	**MQ**	**F**	**p**	**SQ**	**gl**	**MQ**	**F**	**p**
Consistência	**Modelo**	$1{,}942 \times 10^{8}$	2	$9{,}711 \times 10^{7}$	246,76	<0,0001*	$1{,}025 \times 10^{8}$	2	$5{,}126 \times 10^{7}$	246,76	<0,0001*
	Mistura linear	$1{,}658 \times 10^{8}$	1	$1{,}658 \times 10^{7}$	421,23	<0,0001*	$8{,}988 \times 10^{7}$	1	$8{,}988 \times 10^{7}$	401,66	<0,0001*
	$X_1 . X_2$	$2{,}845 \times 10^{7}$	1	$2{,}845 \times 10^{7}$	72,28	<0,0001*	$1{,}263 \times 10^{7}$	1	$1{,}263 \times 10^{7}$	56,44	<0,0001*
	Erro residual	$2{,}755 \times 10^{6}$	7	$3{,}935 \times 10^{5}$			$1{,}566 \times 10^{6}$	7	$2{,}238 \times 10^{5}$		
	Falta de ajuste	$4{,}691 \times 10^{5}$	4	$1{,}173 \times 10^{5}$	0,15	0,9488	$8{,}276 \times 10^{5}$	4	$2{,}069 \times 10^{5}$	0,84	0,5806
	Erro puro	$2{,}860 \times 10^{5}$	3	$7{,}619 \times 10^{5}$			$7{,}388 \times 10^{5}$	3	$2{,}463 \times 10^{5}$		
	R^2	**0,9860**					**0,9849**				
Dureza	**Modelo**	$2{,}552 \times 10^{6}$	2	$1{,}276 \times 10^{6}$	336,47	<0,0001*	$1{,}157 \times 10^{6}$	2	$5{,}787 \times 10^{5}$	125,68	<0,0001*
	Mistura linear	$2{,}115 \times 10^{6}$	1	$2{,}115 \times 10^{6}$	557,65	<0,0001*	$9{,}377 \times 10^{5}$	1	$9{,}377 \times 10^{5}$	203,64	<0,0001*
	$X_1 . X_2$	$4{,}372 \times 10^{5}$	1	$4{,}372 \times 10^{5}$	115,29	<0,0001*	$2{,}197 \times 10^{5}$	1	$2{,}197 \times 10^{5}$	47,72	0,0002*
	Erro residual	26543,77	7	3791,97			32232,95	7	4604,71		
	Falta de ajuste	8017,00	4	2004,25	0,32	0,8473	8272,29	4	2068,07	0,26	0,8876
	Erro puro	18526,77	3	6175,59			23960,67	3	7986,89		
	R^2	**0,9897**					**0,9729**				

Na Tabela: SQ – soma quadrática; GL – grau de liberdade; MQ – média quadrática. *p< 0,05.

A Tabela 4.13 mostra que a falta de ajuste para os modelos relativos tanto à consistência quanto à dureza apresentou valores de p acima de 0,05, o que demonstrou que não foi significativa para ambas as variáveis. Nota-se que para as duas propriedades, tanto o termo correspondente à mistura linear quanto os termos que representam a interação quadrática dos componentes, apresentaram valores de p inferiores a 0,05, o que indica que estes termos são significativos para o modelo e que há interações entre os componentes da mistura que interferem nas repostas estudadas. Observando-se os valores de R^2 na Tabela 4.13, verifica-se que pelo menos 97% da variabilidade experimental pode ser explicada pelos modelos ajustados para a mistura das matérias-primas e produtos transesterificados.

Os modelos estatísticos obtidos para as propriedades de textura das misturas e produtos transesterificados são representados pelas equações da Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Equações que representam os modelos estatíticos ajustados para os índices de acidez, saponificação, iodo e peróxido em função da fração mássica das matérias-primas*.

Variável	Mistura	Produto transesterificado
Consistência	$\mathbf{1}0336 \cdot \mathbf{X_1} + 74 \cdot \mathbf{X_2} - 15716 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2}$	$7596 \cdot \mathbf{X_1} - 2{,}6 \cdot \mathbf{X_2} - 10472 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2}$
Dureza	$\mathbf{1170} \cdot \mathbf{X_1} + 18 \cdot \mathbf{X_2} - 1948 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2}$	$\mathbf{782} \cdot \mathbf{X_1} + 18 \cdot \mathbf{X_2} - 1381 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2}$

*X_1 e X_2 correspondem às frações mássicas de gordura de leite e óleo de soja, respectivamente.

Observa-se que os coeficientes relativos à interação entre os componentes nos modelos obtidos são negativos, mostrando que a mesma correspondeu a um efeito antagônico às respostas avaliadas.

O ajuste dos dados experimentais aos modelos pode ser melhor visualizado nas Figuras 4.8 (a-b) e Figuras 4.9 (a-b), nas quais são apresentados os resultados observados para ambas as propriedades de textura estudadas em comparação aos resultados preditos pelos modelos ajustados para as misturas e produtos transesterificados, respectivamente. Conforme pode ser notado a dureza teve uma tendência de variação similar à observada para a consistência, tanto para a mistura quanto para os produtos transesterificados.

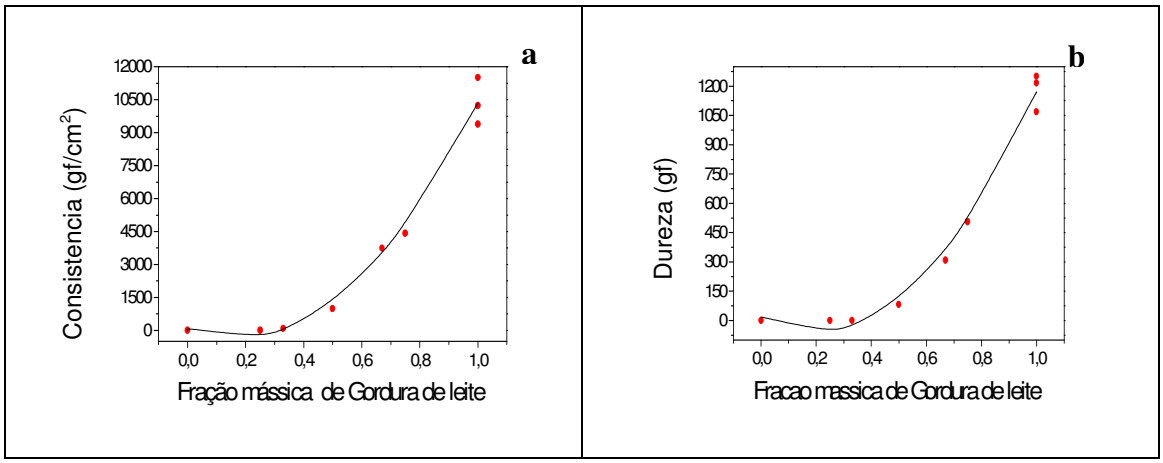


Figura 4.8. Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite na mistura física das matérias-primas.

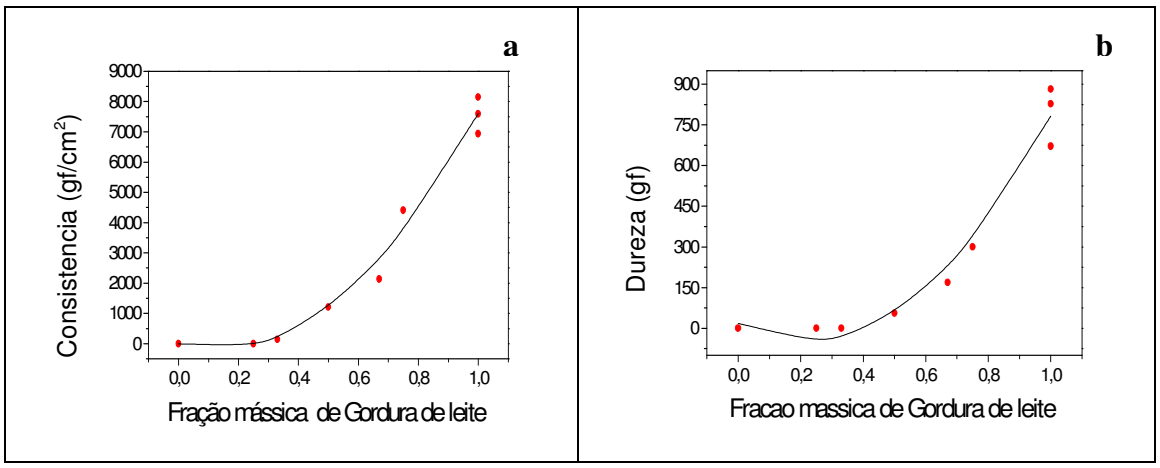


Figura 4.9. Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite nos produtos transesterificados.

A fim de verificar os efeitos da transesterificação nas propriedades de textura dos produtos estudados, foram construídos os gráficos apresentados na Figura 4.10(a-b), nos quais podem ser observados, comparativamente, os modelos obtidos para consistências e dureza das misturas e produtos transesterificados, respectivamente.

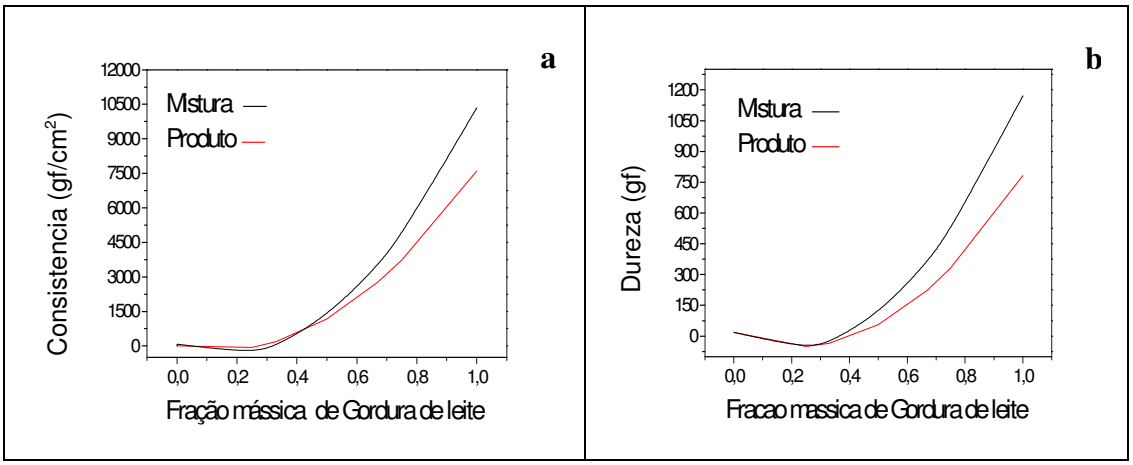


Figura 4.10. Modelos ajustados segundo planejamento estatístico para consistência (a) e dureza (b) em função da fração mássica de gordura de leite, para a mistura das matérias-primas comparativamente aos produtos transesterificados.

Na Figura 4.10 nota-se que a transesterificação promoveu uma diminuição tanto da consistência quanto da dureza nas misturas que possuem mais de 50% de gordura de leite em sua composição, sendo que as misturas que contém frações de gordura abaixo dessa porcentagem, praticamente não sofreram alterações nessas propriedades após a reação.

Acredita-se que as diferenças nas propriedades de textura sejam devido às distintas composições em triacilgliceróis observadas para o produto em relação à mistura. Sabe-se que a composição em triacilgliceróis pode ser responsável pela formação de diferentes tipos de cristais durante o processo de resfriamento e recristalização da gordura, influenciando fortemente a textura do produto. Os triglicerídeos da gordura de leite contêm ácidos graxos de cadeia curta e média e cristalizam na forma beta-prima, enquanto o óleo de soja contém ácidos graxos de cadeia longa e tende a cristalizar na forma beta. Assim, na seção a seguir é discutida a composição em TAGs dos produtos transesterificados comparativamente às misturas correspondentes.

4.2.4. Avaliação do efeito da transesterificação enzimática na composição do produto obtido

Na Figura 4.11 é apresentado o perfil de triacilglicerídeos (TAGs), com base no número total de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes, na gordura de leite e no óleo de soja, bem como nas misturas dessas matérias-primas nas diferentes proporções estudadas neste trabalho.

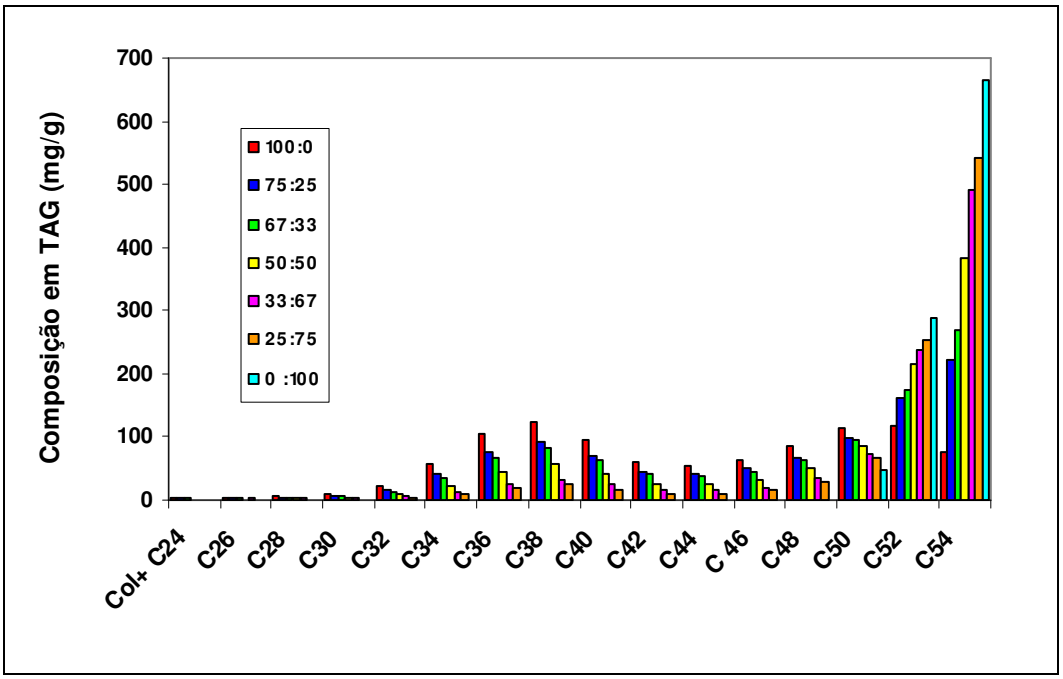


Figura 4.11. Composição TAGs das misturas de gordura de leite e óleo de soja contendo, percentualmente, 100:0; 75: 25; 67:33; 50:50; 33:67; 25:75 e 0:100 desses componentes, respectivamente.

Verifica-se que apenas a adição de óleo de soja à gordura de leite conduziu à redução da concentração dos triglicerídeos C_{30} a C_{50} e ao aumento da concentração dos triglicerídeos de C_{52} e C_{54}, característicos desse óleo.

A Figura 4.12 (a-j) mostra as concentrações de triglicerídeos das misturas físicas e produtos transesterificados da gordura de leite com o óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

As amostras 1 e 2 correspondem ao óleo de soja puro, enquanto que as amostras 3, 4 e 5 correspondem às misturas com 25, 33, e 50% de gordura de leite respectivamente. Ao observar a Figura 4.12 fica evidente que para estas amostras não há grandes mudanças no perfil de TAGs comparando-se as misturas aos produtos transesterificados. Isso se reflete também nos resultados de textura (consistência e dureza), tendo em vista que estatisticamente para amostras cuja fração mássica de gordura de leite é inferior a 0,50 tanto a consistência quanto a dureza mostram praticamente os mesmos resultados para as misturas e produtos transestificados, como já discutido na seção anterior 4.2.3.

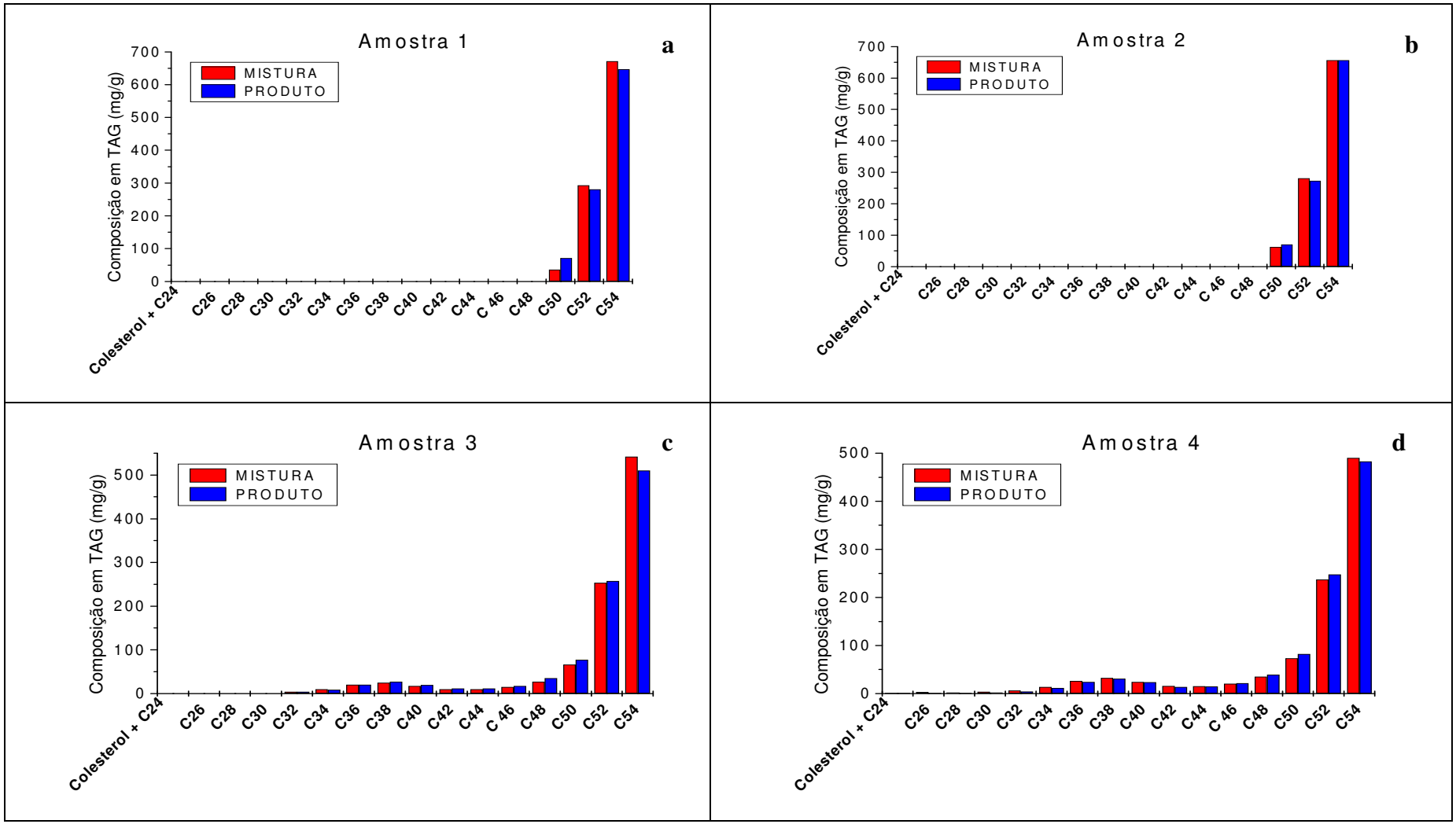
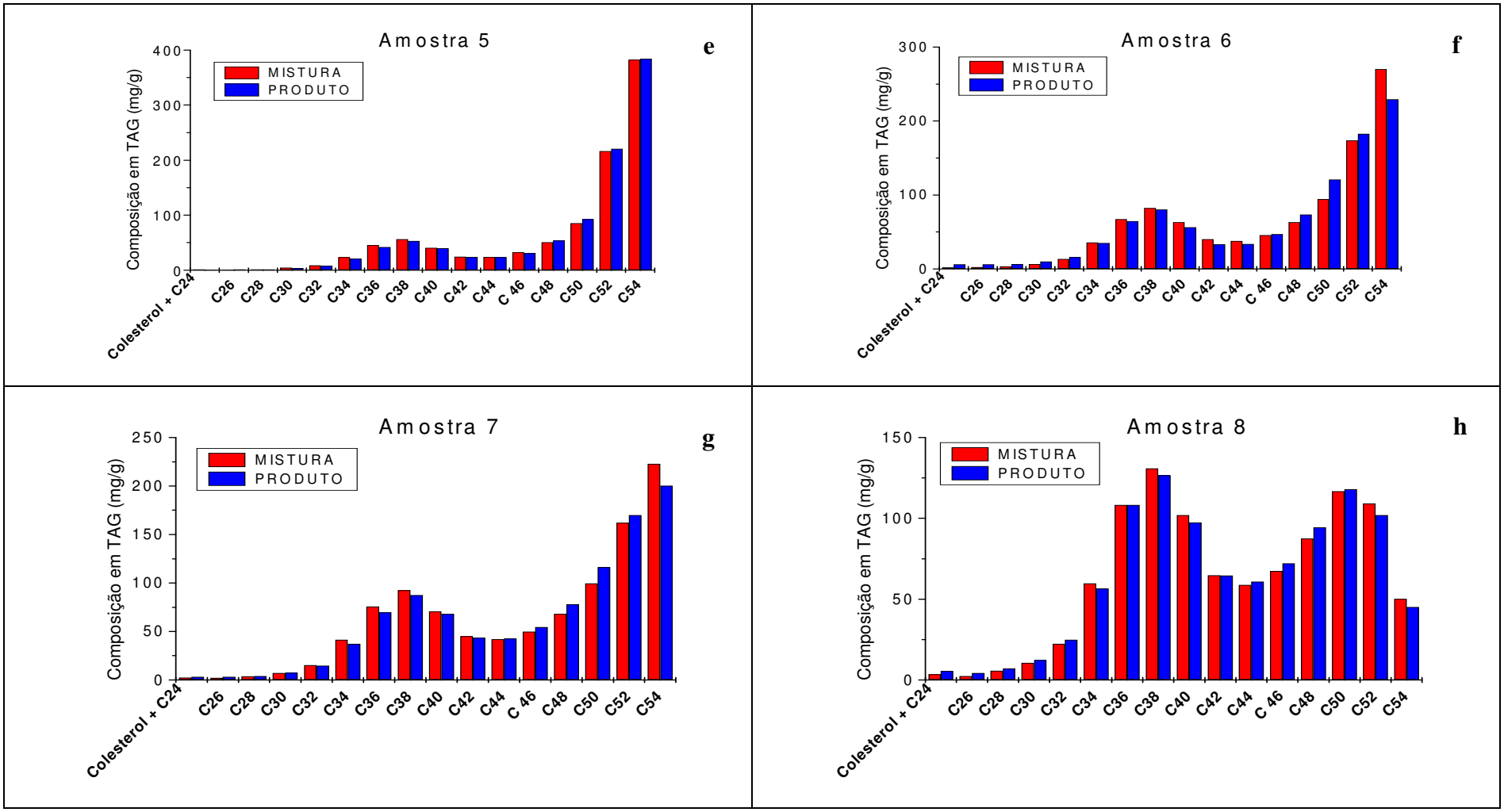
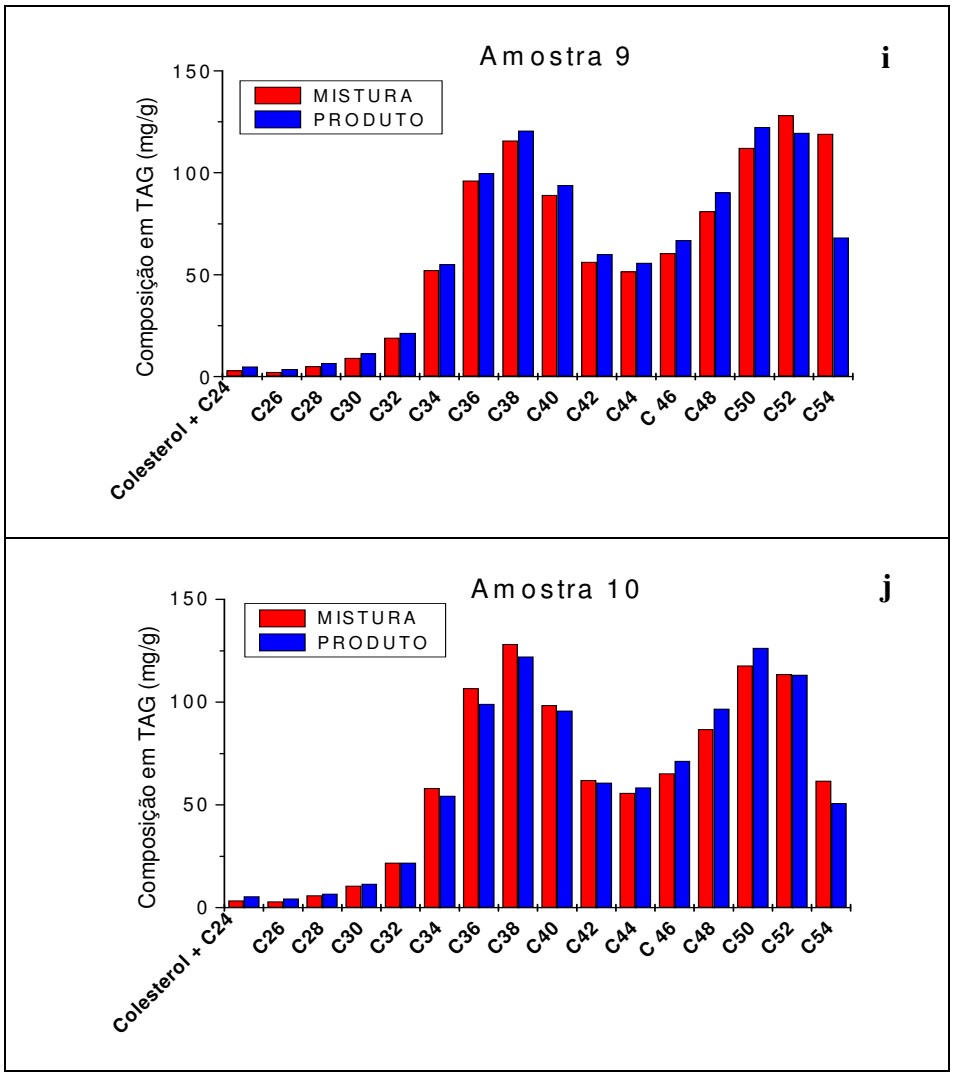


Figura 4.12. Concentrações de trigicerídeos (em número de carbonos) obtidos para as misturas físicas e produtos transesterificados da gordura de leite e o óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico para as amostras contendo 0%(a) e (b), 25% (c) e 33%(d) de gordura de leite.



Continua Figura 4.12. Concentrações de trigicerídeos (em número de carbonos) obtidas para as misturas físicas e produtos transesterificados da gordura de leite e o óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico para as amostras contendo 50%(e), 67%(f), 75%(g) e 100%(h) de gordura de leite.



Conclusão Figura 4.12. Concentrações de trigicerídeos (em número de carbonos) obtidas para as misturas físicas e produtos transesterificados da gordura de leite e o óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico para as amostras contendo 100% (i) e (j) de gordura de leite.

As amostras 6 e 7 correspondem às misturas com 67 e 75% de gordura de leite respectivamente, enquanto que as amostras 8, 9 e 10 correspondem à gordura de leite pura. Observa-se na Figura 4.12 que a reação dessas misturas promoveu modificações no perfil de TAGs, conduzindo de forma geral à diminuição na concentração dos triglicerídeos C_{34}-C_{38} e C_{54} e ao aumento na dos triglicerídeos C_{24}-C_{30} e C_{44}-C_{50}, sendo que as maiores alterações foram observadas para as amostras 6 e 7.

Como forma de avaliar quantitativamente as mudanças ocorridas nas concentrações dos TAGs dos produtos obtidos, o grau de transesterificação das amostras após 72h de

reação foi calculado segundo a Equação 3.10 e os resultados são apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Grau de transesterificação dos produtos resultantes da reação entre a gordura de leite e óleo de soja para os experimentos conduzidos de acordo com o planejamento.

Amostra	Proporção mássica		Grau de transesterificação (%)
	Gordura de Leite	Óleo de soja	
1	**0**	**1**	3,67
2	**0**	**1**	3,00
3	**0,25**	**0,75**	5,75
4	**0,33**	**0,67**	3,90
5	**0,50**	**0,50**	6,67
6	**0,67**	**0,33**	10,75
7	**0,75**	**0,25**	7,55
8	**1**	**0**	4,74
9	**1**	**0**	5,73
10	**1**	**0**	5,15

Na Tabela 4.15 observa-se que o grau de transesterificação variou de 3,00 a 10,75%, sendo que os menores resultados foram apresentados para amostras 1 e 2 que continham apenas óleo de soja puro. Pode-se notar uma tendência de aumento do grau de transesterificação a medida que a concentração de gordura de leite cresce, até o ponto em que a mesma chega aos 67% (amostra 6) e este grau passa a decrescer novamente para as mais altas concentrações de gordura.

As amostras contendo gordura de leite pura apresentaram um grau de transesterificação mais elevado em relação ao óleo puro. Acredita-se que este fator esteja diretamente ligado à especificidade da enzima, que pode ser capaz de atuar de forma mais efetiva em substratos contendo ácidos graxos de cadeia curta e média, no caso a gordura de leite, em comparação a substratos nos quais os ácidos graxos de cadeia longa são as substâncias mais expressivas, tais como o óleo de soja. De acordo com Uhlig (1998) a atuação dessa enzima pode variar dependendo da isoenzima presente. Este autor mostra que as isoenzimas de *A. niger* cujo peso molecular está em torno de 31 kDa atuam de forma especifica em substratos que contém ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as lipases dessa mesma fonte cujo peso molecular está em torno de 19kDa agem de forma específica

em substratos que contém ácidos graxos de cadeia curta. Sendo assim, pode-se supor que as mudanças promovidas através da transesterificação no perfil de triglicerídeos e, consequentemente, na textura das misturas que continham maior porção de gordura de leite (amostras 6, 7, 8, 9 e 10) tenham ocorrido devido à ação especifica da enzima. Neste caso, pode-se explicar também porque as misturas contendo maior quantidade de óleo de soja não sofreram praticamente alterações em seu perfil de TAGs e em sua textura, já que esta enzima não atuaria nesse substrato.

O maior grau de transesterificação foi obtido para a mistura contendo 67% de gordura de leite. Esse é um resultado bastante interessante, pois mostra que é possível transesterificar misturas de gordura de leite com óleo de soja contendo um elevado conteúdo de gordura, o que preserva mais suas características organolépticas e permite também a obtenção de um produto com melhor espalhabilidade em comparação à simples mistura física com igual composição. Além disso, é interessante notar que o maior grau de reação foi obtido para uma mistura de gordura e óleo e não para gordura pura, o que permite a inserção ao produto dos ácidos graxos insaturados presentes em maior quantidade no óleo de soja em comparação à manteiga.

Com relação à análise estatística do grau de transesterificação dos produtos, os resultados obtidos indicaram uma dependência cúbica desta variável com o aumento da fração mássica de gordura de leite, com modelo estatisticamente significante a um nível de confiança de 95%. Isso pode ser observado na Tabela 4.16, na qual é apresentada a análise de variância correspondente.

Tabela 4.16 – Análise de variância para o grau de transesterificação (correspondente às 72h de processo) dos produtos da reação da gordura de leite com óleo de soja nos experimentos conduzidos de acordo com o planejamento estatístico.

	SQ	**gl**	**MQ**	**F**	**p**
Modelo	36,23	3	12,08	6,66	0,0245*
Mistura linear	4,89	1	4,89	2,70	0,1516
$\mathbf{X_1 \cdot X_2}$	20,00	1	20,00	11,02	0,0160*
$\mathbf{X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2)}$	9,83	1	9,83	5,42	0,0588
Erro residual	10,88	6	1,81		
Falta de ajuste	10,43	3	3,48	23,04	0,0142*
Erro puro	0,45	3	0,15		
$\mathbf{R^2}$	**0,7690**				

Na Tabela: SQ – soma quadrática; GL – grau de liberdade; MQ – média quadrática. *p< 0,05.

Observando-se o valor de R^2 na Tabela 4.16, pode-se notar que pelo menos 77% da variabilidade experimental pode ser explicada pelo modelo ajustado para o grau de transesterificação dos produtos, apesar da significância da falta de ajuste. O modelo estatístico obtido para esta variável é representado pela Equação 4.5.

$$\textbf{Grau de Transesterificação}\,(\%) = \mathbf{4{,}78} \cdot \mathbf{X_1} + 3{,}42 \cdot \mathbf{X_2} + 13{,}19 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2} + 19.89 \cdot \mathbf{X_1} \cdot \mathbf{X_2} \cdot \left(\mathbf{X_1} - \mathbf{X_2}\right) \quad \textbf{Equação 4.5}$$

Em que: X_1 = fração mássica de gordura de leite; X_2 = fração mássica de óleo de soja.

O ajuste dos dados experimentais ao modelo pode ser melhor visualizado na Figura 4.13, na qual são apresentados os resultados observados em comparação aos resultados preditos pelos modelos ajustados para o grau de transesterificação.

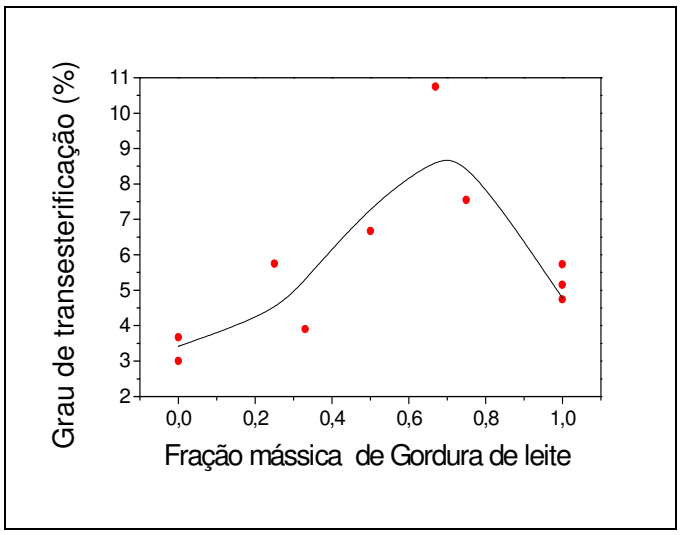


Figura 4.13. Resultados experimentais (pontos) e preditos pelos modelos (linhas cheias) ajustados segundo planejamento estatístico para o grau de transesterificação dos produtos.

Observa-se uma dependência não linear do grau de transesterificação em relação à proporção dos componentes nos produtos transesterificados, indicando que a variável em estudo é susceptível às interações entre a gordura de leite e o óleo de soja.

Um outro fator muito importante para a realização de reações de transesterificação enzimática e que pode interferir na concentração de triglicerídeos é a quantidade de água presente no meio reacional. Em ambientes cuja concentração de água é elavada há o predomínio de reações de hidrólise, enquanto que em ambientes com baixo conteúdo de

água é predominante a formação de ésteres. A transesterificação requer um balanço dessas duas reações para ser efetiva (ROSSEAU; MARANGONI, 1998). Sendo assim julgou-se interessante avaliar o grau de hidrólise das amostras retiradas do meio recional ao longo do tempo e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.14.

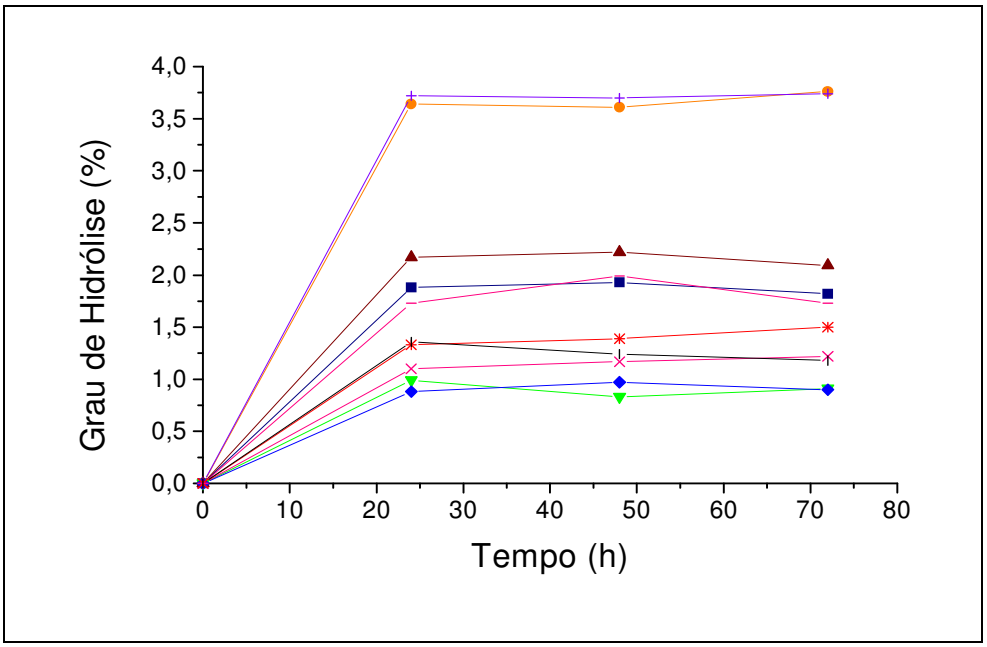


Figura 4.14. Grau de hidrólise das amostras retiradas do meio recional ao longo do tempo para as reações de transesterificação da mistura de gordura de leite e óleo de soja nas seguintes proporções, respectivamente: 0:100 (—■—) e (—●—);25:75 (—▲—);33:67 (—▼—);50:50 (—◆—);67:33 (—+—);75:25 (—×—);100:0 (—✳—), (— - —) e (— | —).

Observa-se uma tendência de aumento do grau de hidrólise até 24h de reação em todos os casos, sendo que após este tempo pode-se notar pouca variação nos valores do mesmo para todas as reações estudadas. Os maiores graus de hidrólise foram obtidos nas reações 2 e 6, cujos produtos continham 0 e 67% de gordura de leite, respectivamente. Os menores resultados de hidrólise foram obtidos para os produtos das reações 4 e 5, que continham frações mássicas de gordura de 0,33 e 0,50 nesta ordem. As demais reações apresentaram graus de hidrólise intermediários aos valores obtidos para os experimentos citados.

De forma geral, os produtos apresentaram um baixo grau de hidrólise, tendo este variado de 0,90 a 3,76% para as amostras retiradas em 72h de reação. Este resultado pode ser devido ao sistema inerte, com atmosfera seca, garantido através da inserção de nitrogênio gasoso ao meio reacional durante toda à reação e também pelo fato de que a

umidade do sitema imobilizado foi mantida abaixo de 15%, para assegurar que a quantidade de água no meio reacional fosse reduzida.

4.2.5. Avaliação global dos resultados obtidos

Considerando-se ser desejável a obtenção de um produto que, apesar de incoporar parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes no óleo de soja, mantivesse as caracteríticas organolépticas da manteiga e apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração, foi realizada uma análise global dos resultados obtidos visando-se a escolha da composição adequada da mistura transesterificada.

O produto com maior teor de gordura de leite, e que, assim, preserva em maior grau suas caracteríticas organolépticas, mas que ainda manteve-se na faixa de espalhabilidade conforme classificação de Haighton (1959) (Tabelas 4.11 e 4.12) corresponde ao material obtido a partir da mistura contendo 50% de cada matéria-prima. Porém, o produto obtido a partir da mistura contendo 67% de gordura de leite, cujo grau de transesterificação foi o mais elevado, apesar de apresentar valor de consistência dentro do nível considerado por Haighton como "muito duro" e "não espalhável", mostrou satisfatória espalhabilidade, sob temperatura de 10°C, quando observado visualmente e aplicado, com auxílio de uma faca, sobre alimentos tais como biscoito. Sendo assim, julgou-se interessante a comparação da consistência e dureza desses dois produtos com os resultados dessas mesmas propriedades obtidos para as misturas físicas das matérias-primas correspondentes, bem como os resultados obtidos para a manteiga comercial empregada como material de partida e para a gordura de leite anidra obtida a partir desta. Os dados correspondentes são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Consistência e dureza de misturas físicas entre gordura de leite e óleo de soja e os respectivos produtos transesterificados obtidos no presente trabalho em relação à manteiga.

	Manteiga	**Gordura de leite pura**	**50% de Gordura de leite**		**67% de Gordura de leite**	
			Mistura	**Produto**	**Mistura**	**Produto**
Consistência*	1,00	1,67	0,16	0,20	0,60	0,34
Dureza*	1,00	4,74	0,33	0,23	1,24	0,68

*valores relativos à manteiga

Conforme Tabela 4.17, a godura de leite apresenta valores de consistência e dureza mais elevados em comparação à manteiga, o que pode ser atribuído à presença de cerca de 16% de água nesta última. Com relação aos produtos obtidos, a transesterificação promoveu um aumento na espalhabilidade em comparação à manteiga e à gordura de leite pura, evidenciado pela redução nos valores de consistência e dureza. Para o produto contendo 67% de gordura, observa-se também que há redução nos valores destas propriedades em comparação à simples mistura física de óleo na gordura, a qual apresentava inclusive maior valor de dureza que a manteiga. Este resultado comprova a possibilidade de obtenção de um produto com melhor espalhabilidade, mantendo-se elevado teor de gordura de leite e, portanto, suas características sensoriais desejáveis. Além disso, observou-se visualmente que a reação de transesterificação melhorou o aspecto dos produtos em relação à simples mistura, resultando em produtos de aparência mais homogênea e menos granular. Estas observações indicaram que o produto obtido a partir da mistura com 67% de gordura de leite apresenta caracteríticas melhores que o obtido a partir da mistura com 50% de cada matéria-prima. Pode ser observado ainda nos dados da Tabela 4.17 que este produto apresentou uma redução de quase metade da consistência e da dureza após a reação em relação à mistura inicial.

A Tabela 4.12 foi desenvolvida por Haighton no ano de 1959 para produtos tais como margarina e “shortenings”, provenientes de produtos hidrogenados e, sendo assim esta Tabela foi utilizada neste trabalho como um parâmetro de comparação para obtenção de um material espalhavel. Entretanto, é importante destacar que esta tabela não foi feita fundamentada em produtos transesterificados à base de gordura de leite, e por isso podem existir divergências entre os parâmetros nela estabelecidos e os determinados sensorialmente em laboratório para produtos como o desenvolvido no presente tranbalho.

Assim, acredita-se que há necessidade de novos testes mais precisa da composição adequada a ser empregada nas reações. Com os resultados obtidos, pode-se indicar que a transesterificação de misturas contendo 50-67% de gordura de leite correspondeu ao mellhor produto, sendo esta faixa de composição a que resultou em um material mais espalhavel em comparação à manteiga ou à gordura de leite, porém com elevado teor desta.

5. CONCLUSÕES

O presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da transesterificação enzimática da gordura de leite com óleo de soja na composição e na textura do produto alimentício obtido, empregando como catalisador uma preparação de lipase previamente imobilizada em suporte híbrido polissiloxano – álcool polivinílico obtido pela técnica sol-gel. Considerou-se desejável a obtenção de um produto que, apesar de incoporar parte dos ácidos graxos insaturados e essenciais presentes no óleo de soja, mantivesse as caracteríticas organolépticas da manteiga e apresentasse boa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração. Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

✓ Com relação à caracterização das matérias-primas, observou-se que as mesmas apresentavam-se de acordo com as normas brasileiras, exceção feita ao índice de iodo para o óleo de soja, cujo valor foi um pouco menor que o estabelecido pela legislação;

✓ Quando avaliados em um planejamento estatístico de misturas, os índices de acidez, saponificação, peróxido e iodo apresentaram como resultado uma dependência linear com o aumento da fração mássica de gordura de leite tanto para a mistura das matérias-primas quanto para os produtos transesterificados. Para o índice de acidez do produto transesterificado, no entanto, não foi possível o ajuste de um modelo satisfatório. Os modelos obtidos para os índices de saponificação e iodo da mistura das matérias-primas e dos produtos transesterificados foram semelhantes, mostrando que a reação promoveu somente a troca e redistribuição dos resíduos de ácidos graxos entre os triacilgliceróis, resultando em produtos que apresentam a mesma massa molar e composição em ácidos graxos. Os índices de peróxido dos produtos transesterificados foram pelo menos 30% superiores aos observados para as misturas correspondentes, indicando que reações de oxidação ocorreram paralelamente à transesterificação. Os índices de acidez dos produtos transesterificados também foram superiores aos resultados obtidos para as mesmas combinações de gordura e óleo não transesterificada, o que demonstrou a ocorrência de hidrólise parcial dos triglicerídeos, também indicada pela presença de odor característico de ácidos graxos livres;

✓ Em relação à avaliação das propriedades de textura, foi observado que apenas a adição de óleo de soja à gordura de leite conduziu à diminuição de pelo menos 57% tanto em sua consistência quanto em sua dureza. Quando estudadas com o auxílio do planejamento estatístico, a consistência e a dureza das misturas e dos produtos transesterificados apresentaram uma dependência quadrática com o aumento da fração mássica de gordura de leite. Nos modelos obtidos, os coeficientes relativos à interação entre os componentes foram negativos, mostrando que a mesma correspondeu a um efeito antagônico às respostas avaliadas. Estatisticamente foi observado que a transesterificação promoveu uma diminuição tanto da consistência quanto da dureza nas misturas que possuem mais de 50% de gordura de leite em sua composição, sendo que as misturas que contém frações de gordura abaixo deste valor praticamente não sofreram alterações nessas propriedades após a reação;

✓ A avaliação da composição dos produtos obtidos por mistura e transesterificação permitiu observar que a simples adição de óleo de soja à gordura de leite conduziu à redução da concentração dos triglicerídeos C_{30} a C_{50} e ao aumento da concentração dos triglicerídeos de C_{52} e C_{54}. As amostras correspondentes ao óleo de soja puro e às misturas contendo 25, 33, e 50% de gordura de leite não apresentaram mudanças expressivas no perfil de TAGs comparando-se às misturas aos produtos transesterificados, enquanto que as amostras correspondentes à gordura de leite pura e às misturas com 67 e 75% de gordura de leite apresentaram modificações no perfil de TAGs, mostrando de forma geral diminuição na concentração dos triglicerídeos C_{34}-C_{38} e C_{54} e aumento na dos triglicerídeos C_{24}-C_{30} e C_{44}-C_{50};

✓ As amostras contendo gordura de leite pura apresentaram um grau de transesterificação mais elevado em relação ao óleo puro, o que pode estar diretamente ligado à especificidade da enzima por ácidos graxos de cadeia média. O maior grau de transesterificação foi obtido para a mistura contendo 67% de gordura de leite. Quando avaliado estatisticamente, o grau de transesterificação dos produtos apresentou uma dependência cúbica com o aumento da fração mássica de gordura de leite;

✓ No processo de transesterificação, observou-se uma tendência de aumento do grau de hidrólise até 24h de reação em todos os casos, permanecendo este praticamente constante após este tempo. De forma geral, os produtos apresentaram um baixo grau de hidrólise, o que está relacionado ao uso de atmosfera de nitrogênio isenta de umidade e à baixa umidade do derivado imobilizado empregado;

✓ Os resultados indicaram que a transesterificação de misturas contendo 50-67% de gordura de leite correspondeu ao melhor produto, sendo esta faixa de composição a que resultou em um material mais espalhável (sob temperatura de refrigeração) em comparação à manteiga ou à gordura de leite, porém com elevado teor desta.

De forma geral este trabalho demonstrou ser possível efetuar a tranesterificação de misturas de gordura de leite com óleo de soja contendo um elevado conteúdo de gordura, o que possibilita preservar grande parte de suas características organolépticas. Além disso, foi possível a obtenção de um material com melhor espalhabilidade sob temperatura de refrigeração em comparação à simples mistura física com igual composição. É interessante notar também que os melhores resultados foram obtidos para misturas de gordura e óleo e não para gordura pura, o que permitiu a incorporação no produto dos ácidos graxos insaturados presentes em maior quantidade no óleo de soja em comparação à manteiga.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Uso de ferramentas de análise sensorial para avaliação das propriedades organolépticas e da aceitabilidade do produto alimentício obtido por transesterificação enzimática;

- ✓ Avaliação do potencial de uso de outros óleos comestíveis disponíveis no Brasil para transesterificação enzimática com gordura de leite;

- ✓ Avaliação das condições reacionais visando à maximização do desempenho do processo;

- ✓ Avaliação do emprego de reações assistidas por microondas visando à diminuição no tempo de reação.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.; JAIGOBIND, S. J.; JAIGOBIND, A. G. A. **Dossiê técnico**: Óleo de soja. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS.** 5th Ed. AOCS Press, 2004..

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.

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.

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

BERTOLINO, C. N.; CASTRO, T. G.; SARTORELLI, D. S.; FERREIRA, S. R.G.; CARDOSO, M. A. Influência do consumo alimentar de ácidos graxos trans no perfil de lipídios séricos em nipo-brasileiros de Bauru, São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 22, n.2, p. 357-364, 2006.

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

BRANCO, I. G.; GASPARETTO, C. A. Comportamento reológico de suco de laranja concentrado congelado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.2, p.173-178, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa n° 49, de 22 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União,** Brasília, 26 de dezembro de 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos**, para Controle de **Leite** e Produtos **Lácteos** Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de1996.

BRETAS,R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de Polímeros Fundidos**. 2.ed. São Carlos: EdUFSCAR, 257p., 2005.

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

BRYS, 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.

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

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

BRYS, 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.

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

CAO, L.; LANGENY, L.; SHELDON, R.A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.387–394, 2003.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lipase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 6, p. 403-409, 1999,

CARVALHO, P. D.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M., Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CEBULA, D. J.; SMITH, K. W. Differential scanning calorimetry of confectionery fats: part li - effects of blends and minor components. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, n. 10, 1992.

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

CHIARA, V. L.; SICHIERI, R.; CARVALHO, T. S. F. Teores de ácidos graxos *trans* de alguns alimentos consumidos no Rio de Janeiro. **Revista de Nutrição**, v.16, n. 2, p.227-233, 2003.

CHIARA, V. L.; SILVA, R.; JORGE, R.; BRASIL, A. P. Trans Ácidos graxos *trans*: doenças cardiovasculares e saúde materno-infantil. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 341-349, 2002.

COHEN, K. O.; JACKIX; M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p.182-190, 2005.

CONI, E.; DI PASQUALE, M.; COPPOLELLI, P.; BOCCA, A. Detection of animal fats in butter by differential scanning calorimetry: A Pilot Study. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 71, n. 8, p.807 – 810, 1994.

COSTA, A. G. V.; BRESSAN, J.; SABARENSE, C. M. Ácidos graxos *trans*: Alimentos e efeitos na saúde. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n.1, 2006.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa.** 2001. 167f. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M.M.; SANTOS, I.M. G.; SOUZA, A.G. Avaliação da estabilidade térmica e reologia do biodiesel etílico e metílico obtido através da transestericação do óleo de milho. In: **Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, 1., 2006, Brasília, DF.

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.

DEMAN, J. M. X-ray diffraction spectroscopy in the study of fat polymorphism. **Food Research International**, v.25, p. 471 – 476, 1992.

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.

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

FERREIRA, E. E.; BRANDAO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista Escola de Minas**, v.58, n.1, p.83-87, Jan./Mar, 2005.

FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes.** 2.ed. 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, S. P.; SILVA F.C.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.127-130, 1998.

GEORGIO, G.; HUBBELL, J. A. Protein engineering. In: MCKETTA, J. J.**Encyclopedia of Chemical Processing and Design**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.142- 176.

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

GRANDI, J. G. Manteigas. In: AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDEL, W., LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 4, p.255-267.

GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; SILVEIRA JÚNIOR, V. Reologia do açúcar líquido invertido: Influência da temperatura na viscosidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.4, p. 652-656, 2004.

GUNSTONE, F. D. (Ed.) **Vegetable oils in food technology**: Composition, properties and uses. Blackwell, 2002. 337p.

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.

HARTEL, R. W. Struture of the solid state. In:_____. **Crystallization in Foods**. Gaithesburg: Aspen Publishers, 2001. p.13.

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

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.

IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology of foods products In: **Food preservation technology series:** Unit Operations in Foods Engineering. Boca Raton Florida: ECCR Press LLC, 2003. p.139.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, 1985. v.1.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology,** v. 53, p.315-351, 1999.

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.; 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.

KARABULUT, I.; TURAN, S.; ERGIN, G. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 3, p.224–229, 2004.

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.

KLEINERT, J. Rheology of chocolate. 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. 445 – 473.

KNOTHE, G. Review: Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 79, n. 9, p. 847 – 854, 2002.

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, 2000.

LAI, O. M.; GHAZALI, H.M.; CHO, F.; CHONG, C.L. Flow properties of table margarine prepared from lipase- catalysed transesterified palm stearin:palm kernel olein feedstock. **Food Chemistry**, v.64, p.221 – 226, 1999.

LAMBOURSAIN, L.; MARTY, A.; KERMASHA, S.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. Enzymatic transesterification of a triacylglycerol mixture: Application to butterfat modification. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1996, p. 678-682.

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L.; AMARAL,R. L. Formulação de "chocolate" de cupuaçu e reologia do produto líquido. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 463 – 469, n. 4, 2002.

LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. **Early Human Development,** v. 65, p. 31-41, 2001.

LAWSON, H. **Food Oils and Fats**: **technology, utilization, and nutrition**. London: Chapman &Hall, 1995, 339 p.

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.

LEWIS, M.J. Solid rheology and texture. In:_____**Physical Properties of Foods and Food Processing Systems.** Cambridge, England : Woodhead Pub., 1996, p.137 – 166.

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.; LA1, 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.

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.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. **Food Research International**, v. 31, n. 8, p. 595-599, 1999.

MARANGONI, A.G. Lipases: Struture, function and properties. In KUO, T. M; GARDNER, H. W. **Lipid Biotechnology**. United States of America: Marcel Dekker, 2002. p. 357 – 386.

MARTIN, C. A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Ácidos graxos *trans:* implicações nutricionais e fontes na dieta**. Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 361-368, 2004.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ- LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques – Review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451–1463, 2007.

McGRADY, J. More-healthful fats and oils. **Food Technology**, Nov, p. 148, 1994.

MIN, D.B.; BOFF, J.M. Lipid oxidaxion of edible oil. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B**Food Lipids**: Chemistry, nutrition, and biotechnology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

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.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L.A.G. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique. **Grasas y Aceites**, v.50, n.1, p.16 – 22, 1999.

NOOR LIDA, H.M.D.; SUNDRAMA, K.; SIEW, W.L.; AMINAH, A.; MAMOT, S. TAG Composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 1, p.1137 – 1144, 2002.

NOOR LIDA, H.M.D.; SUNDRAM, K.; IDRIS, N. A. DSC Study on the melting properties of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 83, n. 8, p.739 – 745, 2006.

NOR HAYATI , I; AMINAH, A., MAMOT, S. Melting Characteristic and solid fat content of milk fat and palm stearin blends before and after enzymatic interesterification. **Journal of Food Lipids**, v. 7, p.175-193, 2000.

ORCHEL, A.; D.ZEWICZ, Z.; PARFINIEWICZ, B.; WEGLARZ, L.; WILCZOK, T. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 3, p.490–498, 2005.

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.

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.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C, R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of micribial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v.65, n.2, p.252-254, 1999.

PAULA, A. V. **Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite com óleo de soja** 2008. 110p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena; Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.792-796, 2005.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with

glutaraldehyde and epichlorohydrin. In: VIII BIOTRANS 2007 – INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATIONS, Oviedo - ESPANHA. **Livro de Resumos**, 2007b. p.245

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007a.

PAULA, A. V.;. MOREIRA, A. B. R; BRAGA, L. P. ; DE CASTRO, H. F. BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.35 – 40, 2008.

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: Comission of the european communities, ECSC-EC-EAEC, 1997.

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

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.

RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A.; ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 226-233 , 2003.

RODRÍGUEZ, A.; CASTRO, E.; SALINAS, M. C.; LÓPEZ, R.; MIRANDA, M. Interesterification of tallow and sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 4, 431 – 436, 2001.

RONNE, T. H.; YANG, T.; MU, H.; JACOBSEN, C.; XU, X. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, p. 5617-5624, 2005.

ROSENTHAL, A. J. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In:____ **Food Texture:** Measurement and perception. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 1999, p.1 – 16.

ROUSSEAU, D.; HILL, A. R.; MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 3. Rheology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, n. 8, 983 – 989, 1996.

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. 2368-2374, 1998b.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The efects of interesterication on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil. **Food Research International**, v. 31, n. 5, p. 381-388, 1999.

ROY, A.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Production of butter fat rich in *trans*10-C18:1 for use in biomedical studies in rodents. **Reproduction, nutrition, development**, v. 46, n.2, p. 211–218, 2006.

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.; 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.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C. Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by lipozyme im60. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.2071-2076, 2001.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. CLEAs: An effective technique for enzyme immobilisation. **Speciality Chemicals Magazine**, v. 23, n. 6, p. 40-42, 2003.

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.

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.

SIMÕES, I. S.; GIOIELLI L.A. Interações em misturas binárias e ternárias de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n.1, 157 – 164, 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.

SKULA, A. e RIZVI, S.S.H. Relationship among chemical composition, microstructure and rheological properties of butter. **Milchwissenschaft,** v. 51, n. 3, p.144-147, 1996.

SOARES, C. M. F; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77/79, p.745-757, 1999.

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.

TEN GROTENHUIS, E.; VAN AKEN, G. A.; VAN MALSSEN, K.F.; SCHENK, H. Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time x-ray powder diffraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.9, p.1031 – 1039, 1999.

TIMMS, R. E. Physical properties of oils and mixtures of oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.2, 1985

TISCHER, W., KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends in Biotechnology,** v. 17, p. 326-335, 1999.

TORRES, D.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fatty acid composition of portuguese spreadable fats with emphasis on *trans* isomers. **European Food Research and Technology**, v.214, p. 108–111, 2002.

TURATTI, J. M.; GOMES, R.A.R.; ATHIÉ,I. **Lipídeos:** Aspectos funcionais e novas têndências. Campinas: ITAL, 2002. 69 p.

UHLIG, H. **Industrial Enzymes and Their Applications**. Traduzido por E. M. Linsmaier- Bednar. United States of America: John Wiley & Sons, 1998. 454 p.

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006. 120 p.

VISSOTTO, F. Z.; GOMES, C. R.; BATISTA, B. J. L Caracterização do comportamento reológico e da textura de chocolates sem sacarose. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.2, p. 107-111, 2005.

VISSOTTO, F. Z.; LUCCAS, V.; BRAGAGNOLO, N.; TURATTI, J. M.; GRIMALDI, R.; FIGUEIREDO, M. S. Caracterização físico-química e reológica de chocolates comerciais tipo cobertura elaborados com gorduras alternativas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1,2, p.139-148, 1999.

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.

VOISEY, P.W.; DEMAN, J.M. Applications of instruments for measuring food texture. In: DEMAN, J.M.; VOISEY, P.W.; RASPER, V.F.; STANLEY, D.W. **Rheology and texture in food quality.** Westport, Connecticut: Avi Publishing , 1976. p. 142 – 243.

WARDLAW, M.G**. Perspectives in nutrition**. 5th ed., St. Louis: Mc Graw Hill., 2002. p.266, v.612.

WILLIAMS, E. A.; COXHEAD, J. M.; MATHERS, J. C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p.107–115, 2003.

WIRKOWSKA, M.; BRYS, 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.; BRYS, J.; TARNOWSKA, K.; KOWALSKI, B.; GOZDOWSKI, D. Effect of transesterification on the antioxidant stability of mixtures of sunflower oil and milk fat. **Tluszcze Jadalne**, v. 40, n. 3/4, p. 91-98, 2005a.

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.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p .289–304, 2003.

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, 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.

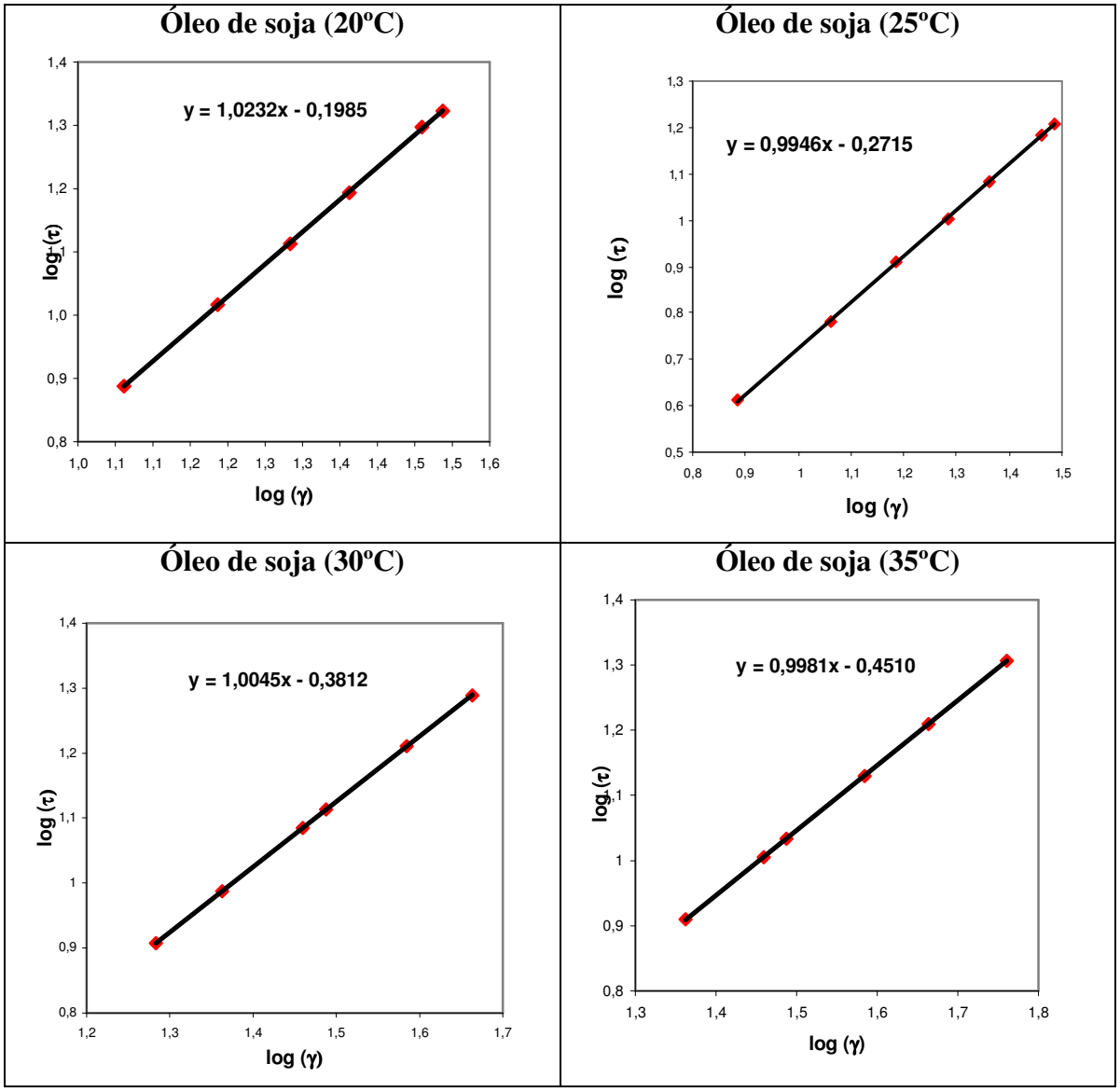
ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p.35-85.

ZEGARSKA, Z.; PASZCZYK, B.; BOREJSZO, Z. Content of *trans* c18:1 and *trans* C18:2 isomers and *cis*9 *trans*11 C18:2 (CLA) in fat blends. **Journal of Food Lipids**, v. 12 , p. 275–285, 2005.

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.

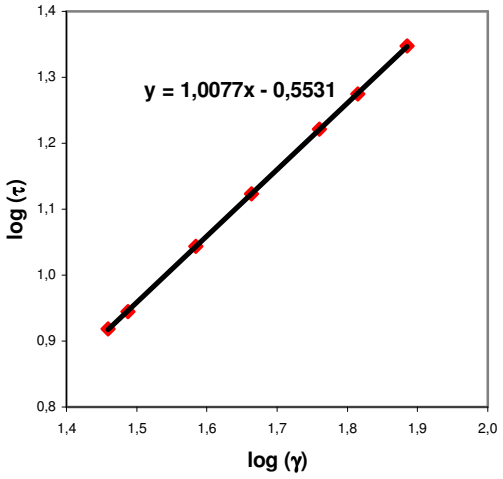
APÊNDICES

APÊNDICE A – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para as matérias-primas de acordo com a lei de potência para cada temperatura estudada.

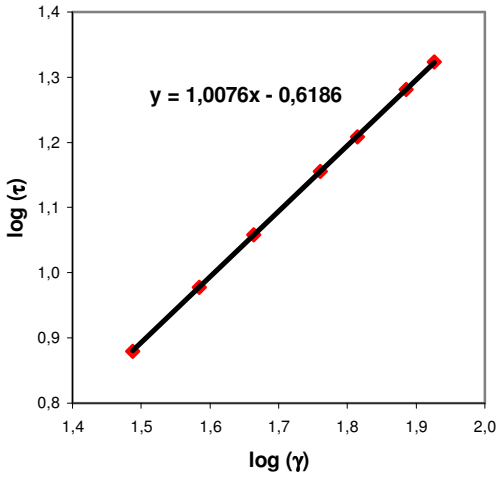


Continua APÊNDICE A – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para as matérias-primas de acordo com a lei de potência para cada temperatura estudada.

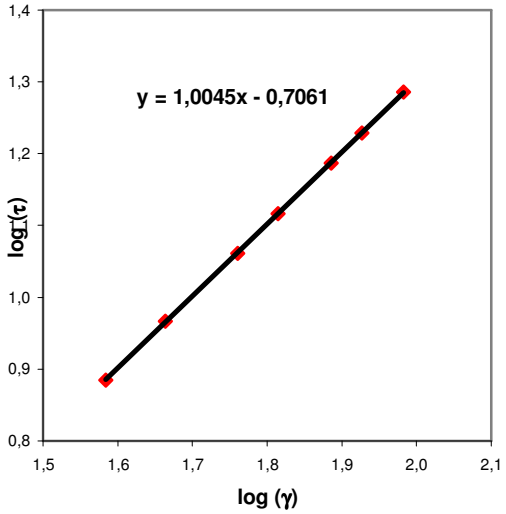
Óleo de soja (40ºC)



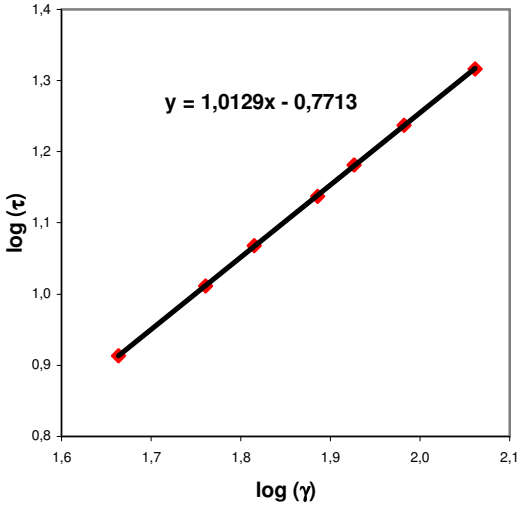
Óleo de soja (45ºC)



Óleo de soja (50ºC)

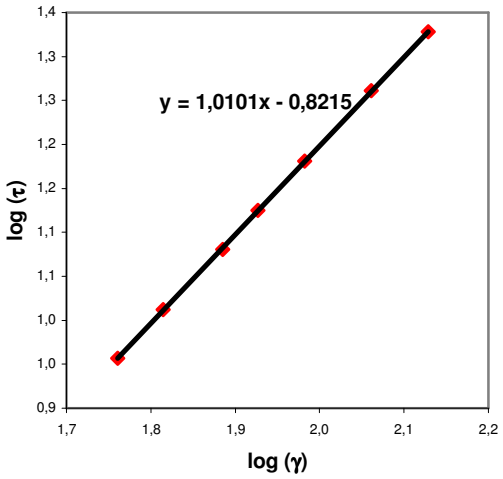


Óleo de soja (55ºC)

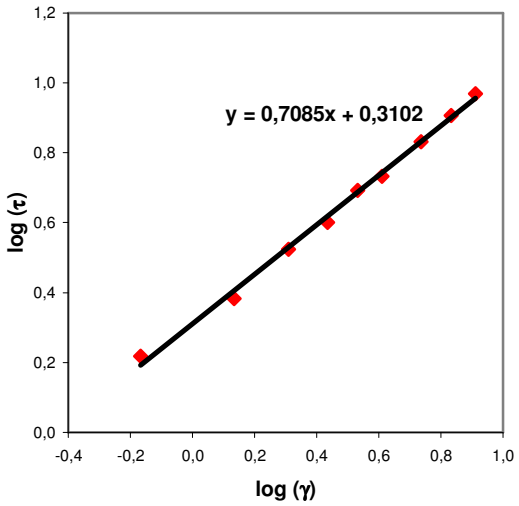


Continuação APÊNDICE A – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para as matérias-primas de acordo com a lei de potência para cada temperatura estudada.

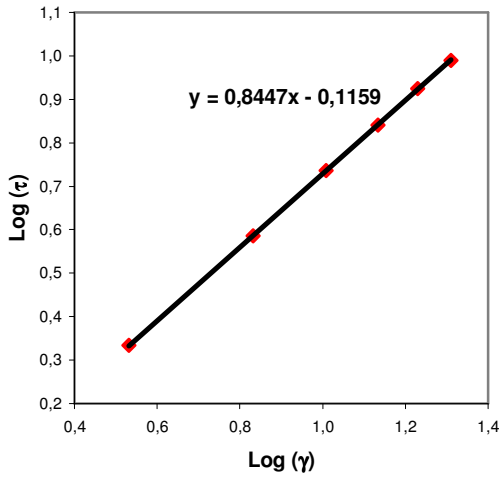
Óleo de soja (60ºC)



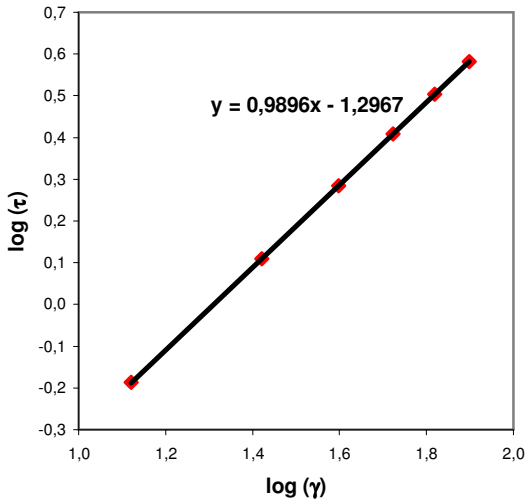
Gordura de leite (20ºC)



Gordura de leite (25ºC)

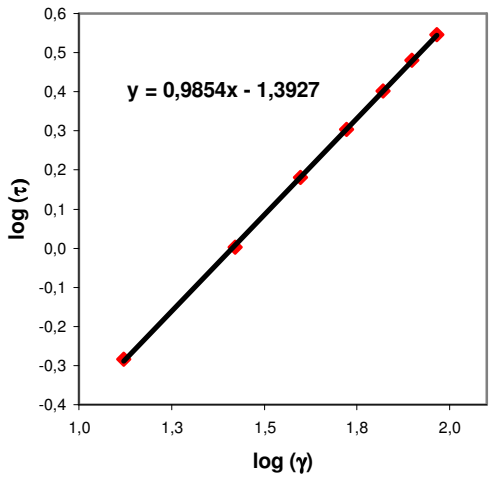


Gordura de leite (30ºC)

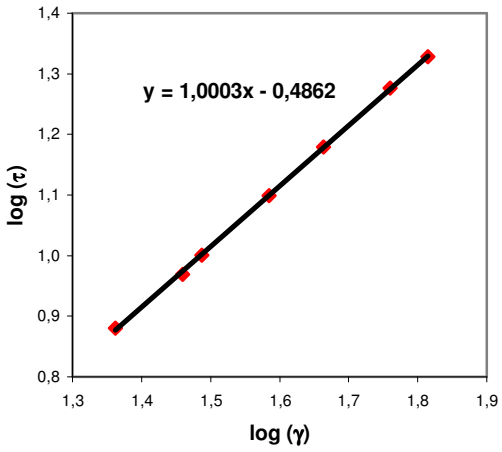


Continuação APÊNDICE A – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para as matérias-primas de acordo com a lei de potência para cada temperatura estudada.

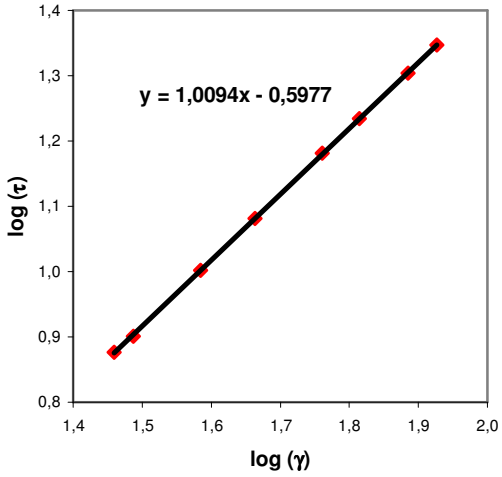
Gordura de leite (35ºC)



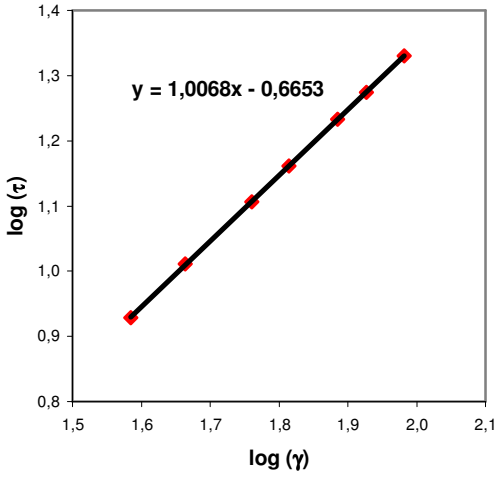
Gordura de leite (40ºC)



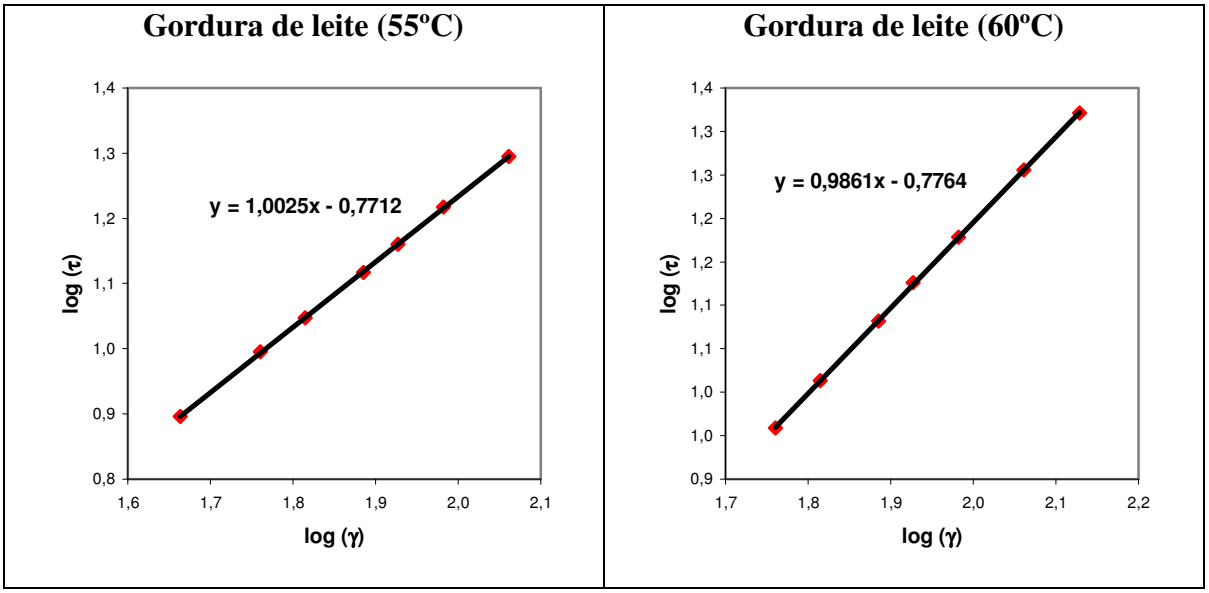
Gordura de leite (45ºC)



Gordura de leite (50ºC)

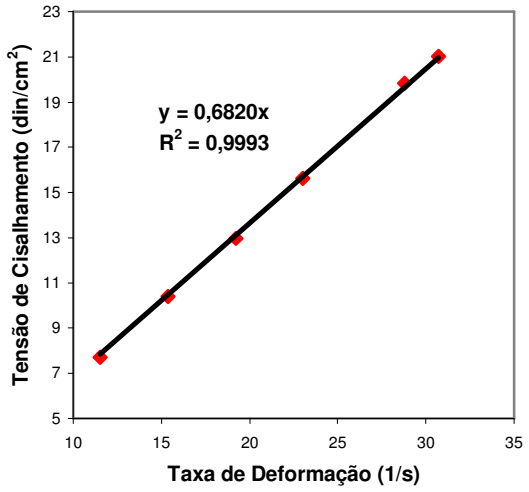


Conclusão APÊNDICE A – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para as matérias-primas de acordo com a lei de potência para cada temperatura estudada.

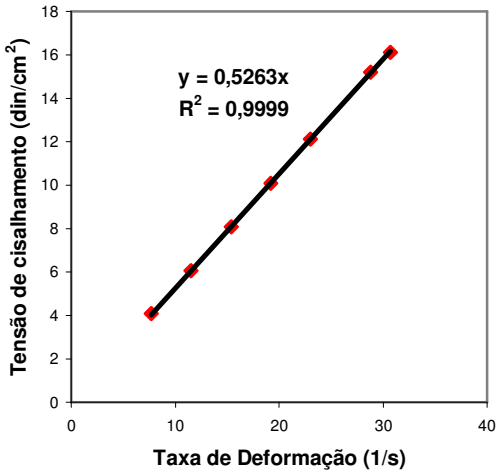


APÊNDICE B – Curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, obtidas para as matérias-primas na faixa de temperaturas em que se comportam como fluidos newtonianos (20 – 60ºC para o óleo de soja e 30 – 60ºC para a gordura de leite).

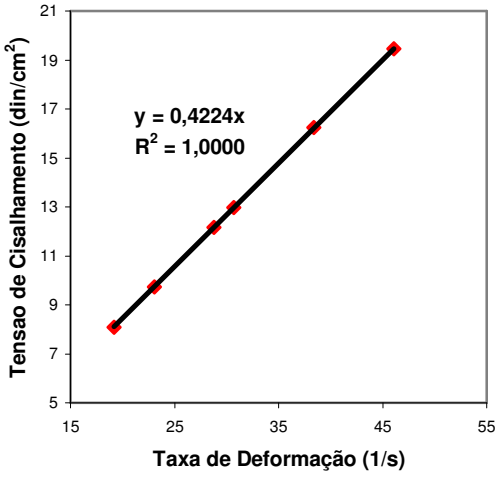
Óleo de soja (20ºC)



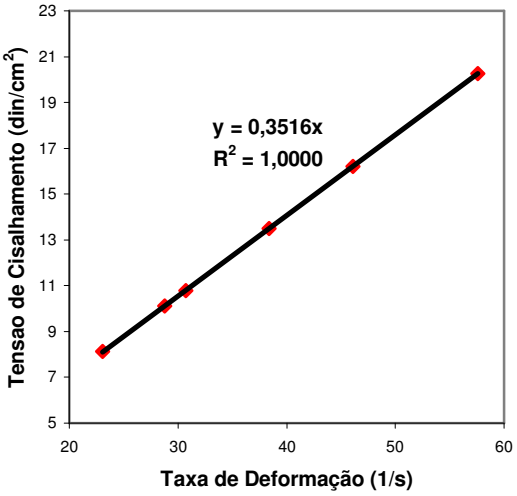
Óleo de soja (25ºC)



Óleo de soja (30ºC)

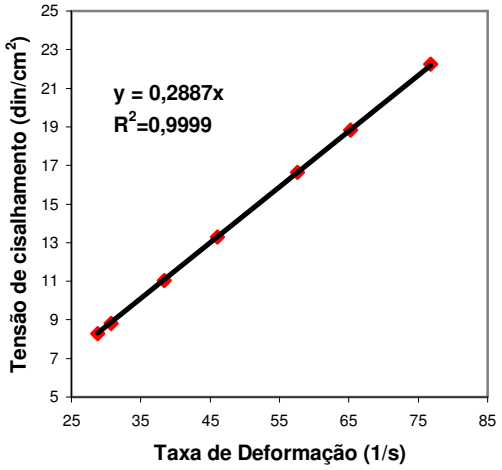


Óleo de soja (35ºC)

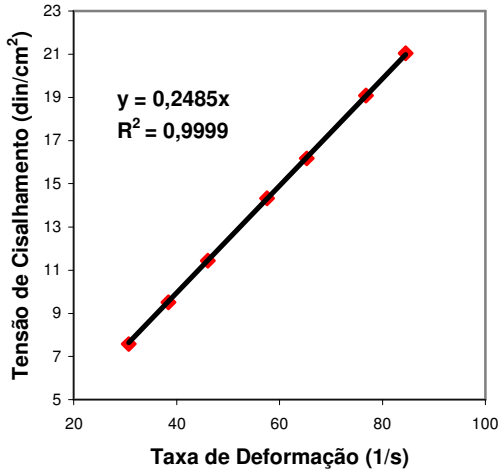


Continua APÊNDICE B – Curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação obtidas para as matérias-primas na faixa de temperaturas em que se comportam como fluidos newtonianos (20 – 60ºC para o óleo de soja e 30 – 60ºC para a gordura de leite).

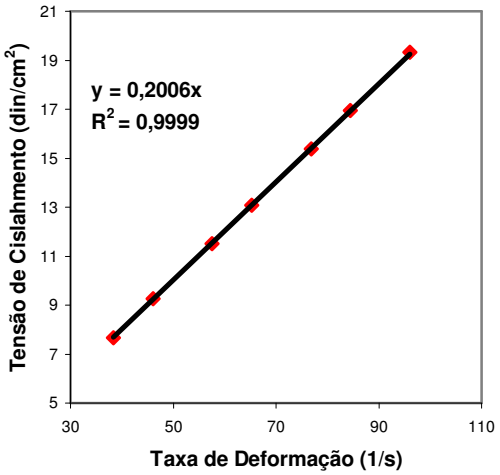
Óleo de soja (40ºC)



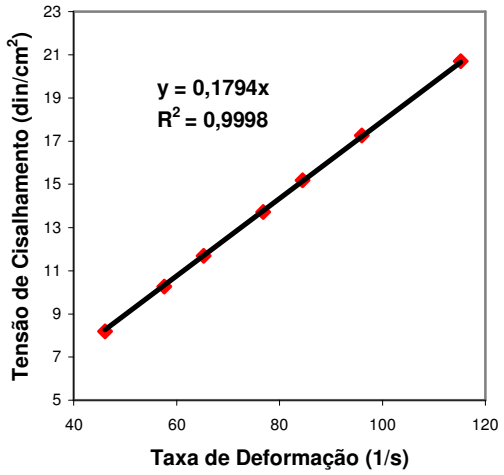
Óleo de soja (45ºC)



Óleo de soja (50ºC)

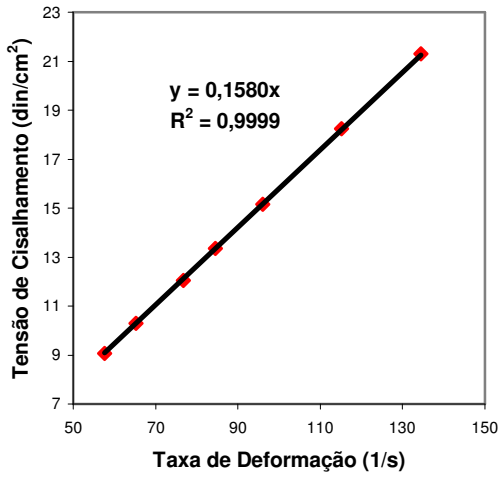


Óleo de soja (55ºC)

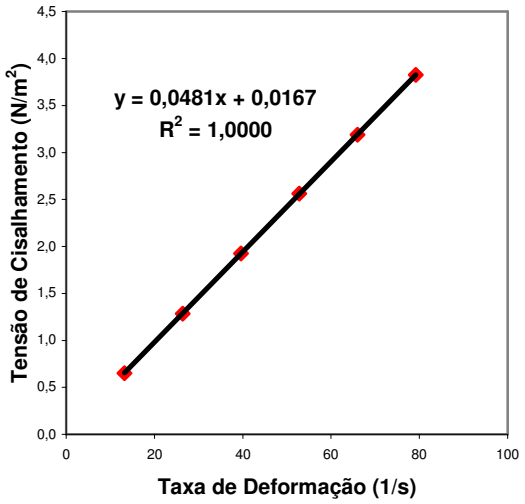


Continuação APÊNDICE B – Curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação obtidas para as matérias-primas na faixa de temperaturas em que se comportam como fluidos newtonianos (20 – 60ºC para o óleo de soja e 30 – 60ºC para a gordura de leite).

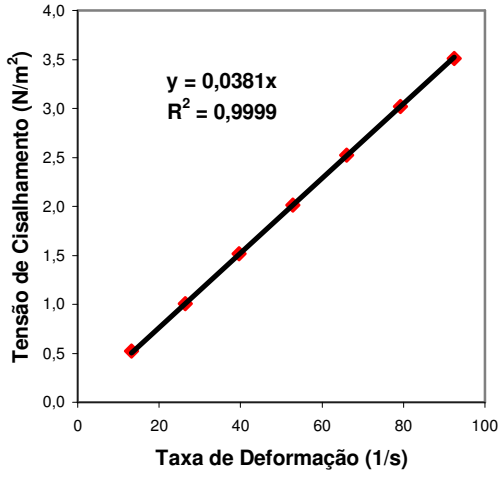
Óleo de soja (60ºC)



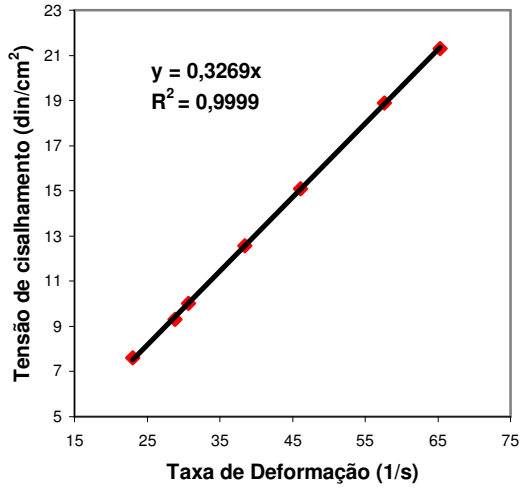
Gordura de leite (30ºC)



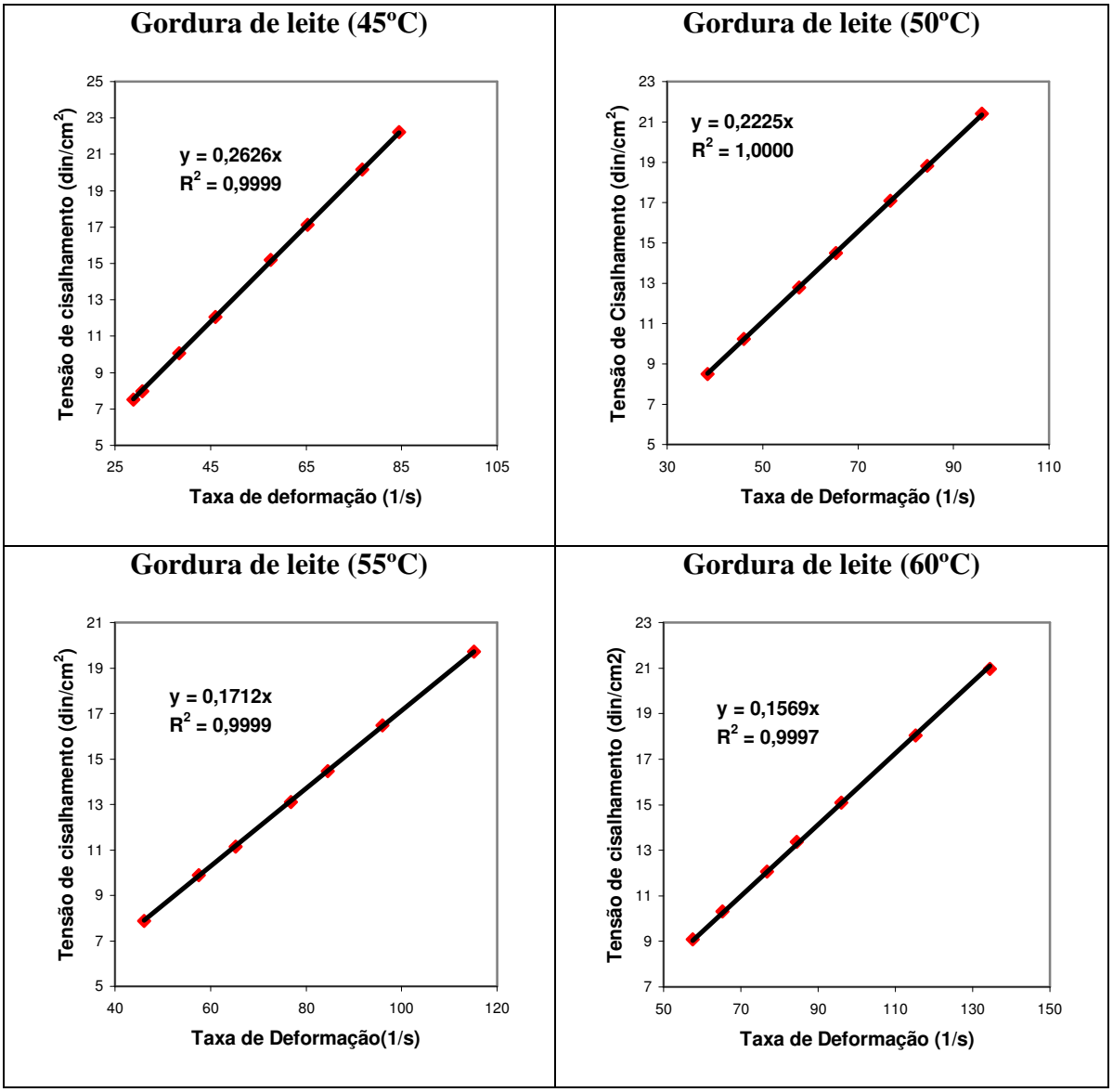
Gordura de leite (35ºC)



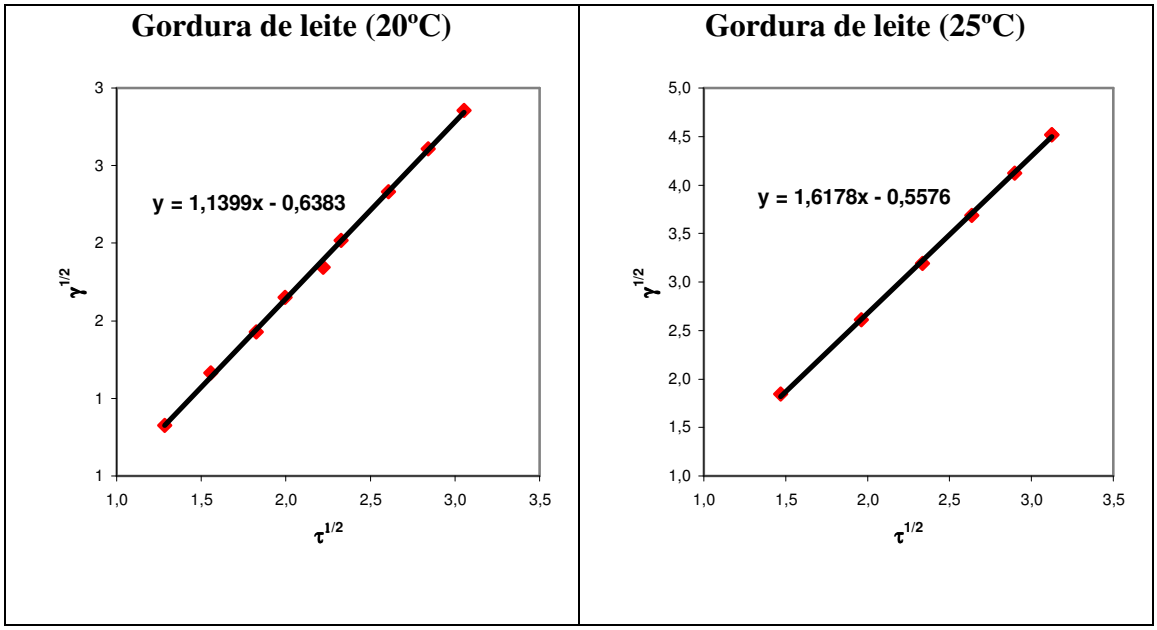
Gordura de leite (40ºC)



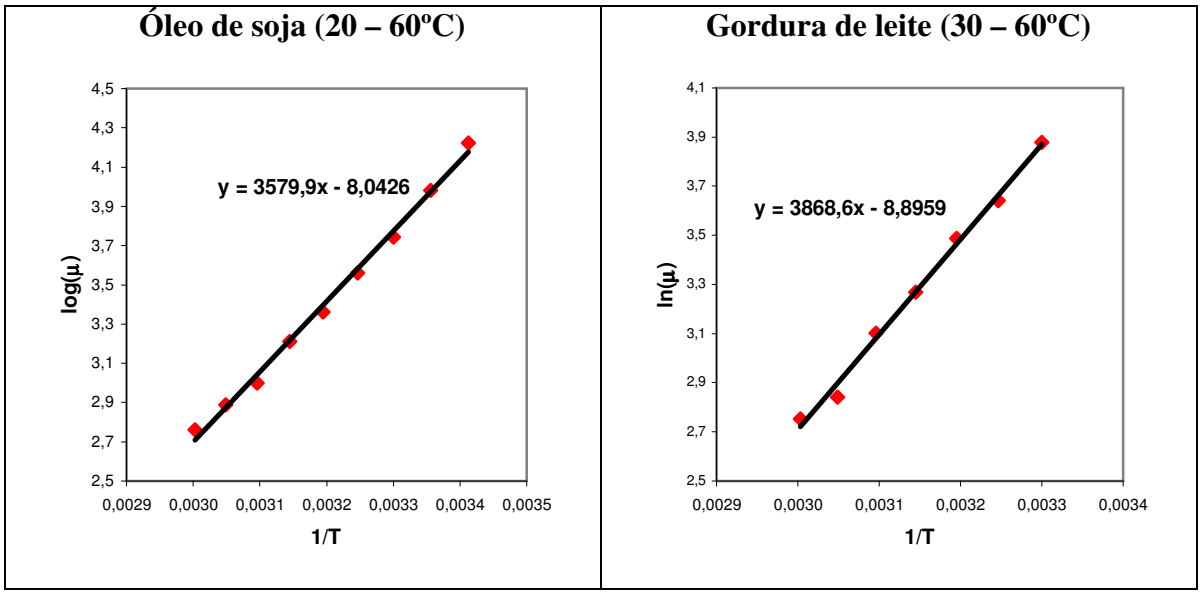
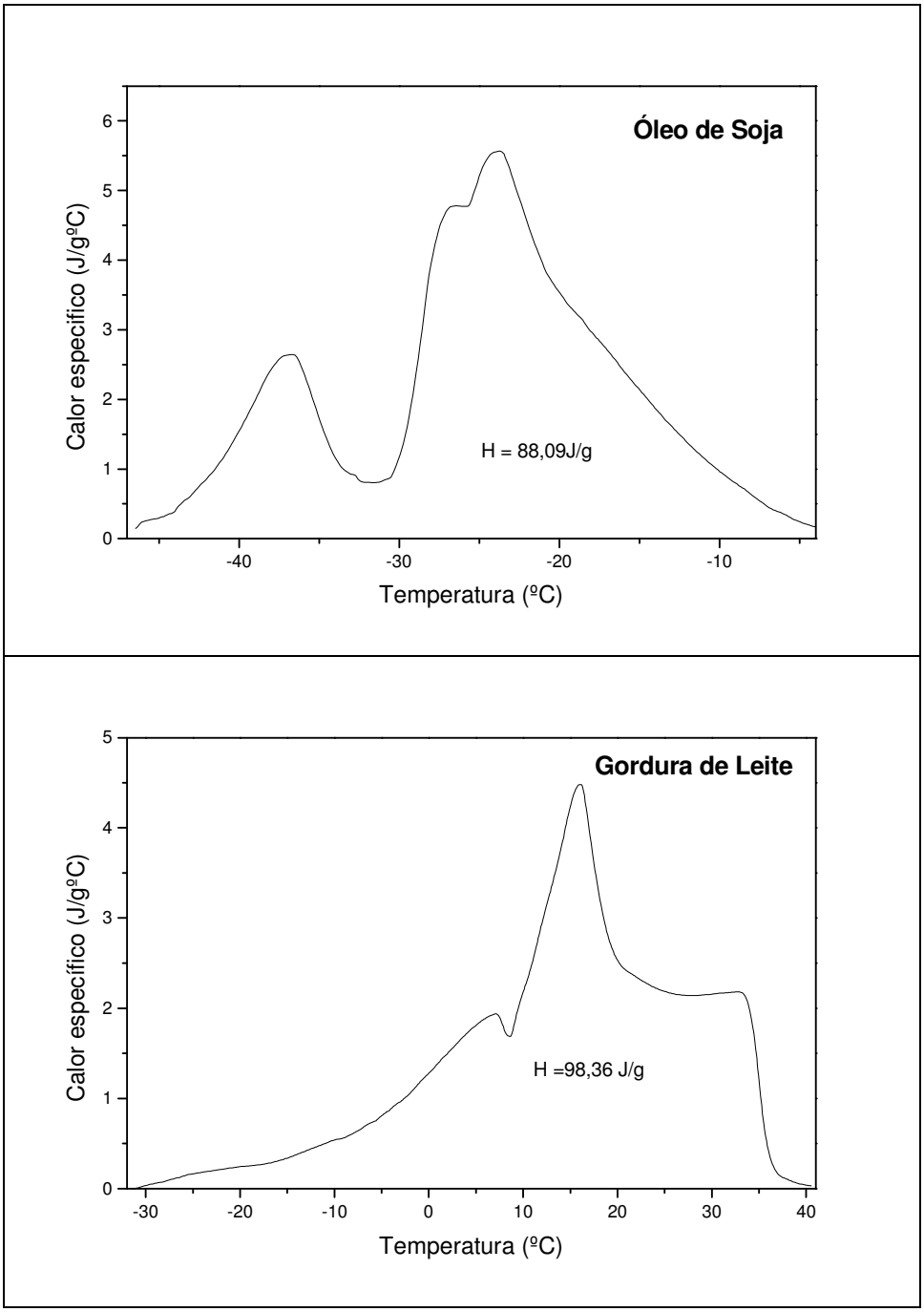
Conclusão APÊNDICE B – Curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação obtidas para as matérias-primas na faixa de temperaturas em que se comportam como fluidos newtonianos (20 – 60ºC para o óleo de soja e 30 – 60ºC para a gordura de leite).



APÊNDICE C – Curvas de ajuste dos dados de tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação (γ), obtidos para a gordura de leite em 20 e 25ºC, de acordo com o modelo de Casson



APÊNDICE D – Curvas do logaritmo natural da viscosidade (μ) em função do inverso da temperatura absoluta (T), para ambas as matérias-primas, utilizadas para obtenção dos parâmetros da equação de Arrhenius



APÊNDICE E – Curvas de calor específico do óleo de soja e da gordura de leite em função da temperatura obtidas por calorimetria exploratória diferencial. Estas curvas foram usadas na determinação da entalpia de fusão das matérias-primas em estudo.