



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARILENE DE MORI MORSELLI RIBEIRO

**INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE GIRASSOL ALTO
OLÉICO COM TRIACILGLICERÓIS SATURADOS DE
CADEIA LONGA**

CAMPINAS

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARILENE DE MORI MORSELLI RIBEIRO

**INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR
DE ÓLEO DE GIRASSOL ALTO OLÉICO COM TRIACILGLICERÓIS SATURADOS
DE CADEIA LONGA**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a LIRENY APARECIDA GUARALDO GONÇALVES
Coorientador: Dr. RENATO GRIMALDI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARILENE DE MORI MORSELLI RIBEIRO E ORIENTADA PELA PROF^a DR^a LIRENY APARECIDA GUARALDO GONÇALVES

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Ribeiro, Marilene De Mori Morselli, 1960-
R354i Interesterificação enzimática de lipídios estruturados a partir de óleo de girassol alto oleico com triacilgliceróis saturados de cadeia longa / Marilene De Mori Morselli Ribeiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2016.

Orientador: Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Coorientador: Renato Grimaldi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lipídios estruturados. 2. Interesterificação enzimática. 3. Migração acil. 4. Óleo de girassol alto oleico. 5. *Crambe abyssinica*. I. Gonçalves, Lirenny Aparecida Guaraldo. II. Grimaldi, Renato. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Enzymatic interesterification of structured lipids from high-oleic sunflower oil with long-chain saturated triglycerides

Palavras-chave em inglês:

Structured lipids

Enzymatic Interesterification

Acyl migration

High-oleic sunflower oil

Crambe abyssinica

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves [Orientador]

Andréa Madalena Maciel Guedes

Juliana Neves Rodrigues Ract

Kelly Moreira Bezerra Gandra

Luiz Antonio Gioielli

Data de defesa: 26-09-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (orientadora)
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Dra. Andréa Madalena Maciel Guedes (membro titular)
EMBRAPA

Profa. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract (membro titular)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Profa Dra. Kelly Moreira Bezzerra Gandra (membro titular)
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli (membro titular)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Profa. Dra. Ana Paula Badan Ribeiro (membro suplente)
Faculdade de Engenharia de Alimentos/DTA – UNICAMP

Dra. Paula Speranza (membro suplente)
Faculdade de Engenharia de Alimentos/DEPAN – UNICAMP

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso (membro suplente)
Instituto de Química – UNIFAL-MG

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho aos meus pais, e aos meus dois amores.

Almir e Marina pelo grande amor, paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

Nesses quatro anos de curso de doutorado fiz muitas viagens de São Paulo a Campinas e muitas pessoas compartilharam comigo este momento único da minha vida. Dessa forma, gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente, devo agradecer a Deus, pela vida e sabedoria e por sempre me iluminar e me guiar, o bom pastor.

Aos meus queridos e amados, Almir e Marina, esposo e filha, que aguentaram firmes noites de incentivos, paciência e suporte durante o trabalho desta tese.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais, Otorina De Mori e Orlando Morselli *in memoriam*, pela sólida formação dada por toda vida, meus eternos agradecimentos. Aos meus sogros, Fleury e Edna *in memoriam* e minha cunhada Heloísa que me deu abrigo em Campinas e incentivo.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Lireny Aparecida Gonçalves, grande profissional e uma pessoa extremamente generosa, dedicada, humilde, que sempre norteou este trabalho com sua forma inteligente e criativa, acreditando na interação da academia e empresa.

Ao meu coorientador Dr. Renato Grimaldi, pela atenção, apoio e colaboração na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Chiu Ming por estar sempre disposto ensinar e ser meu querido amigo em todas as horas. Agradeço de coração por todos os momentos que passamos juntos e pela nossa eterna amizade.

Aos membros desta banca examinadora, pelas correções e sugestões feitas neste trabalho.

Á dedicada Isabela M. Silvestre, pelo auxílio com os experimentos, análises e constante disponibilidade em ajudar.

Ao João P. de Sá Neto, pela colaboração e grande ajuda com experimentos e análises.

Um agradecimento especial e de coração deve ser feito à Katrina, excelente técnica, auxiliando nos experimentos com muita dedicação.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula B. Ribeiro pela amizade, por todo apoio atenção e atenção.

À Marcella, Ingrid, Pricila e Alaide pela convivência diária e informações referentes às análises.

À Prof^a. Dr^a Anita J. Marsaioli e ao Dr. Thiago I.B. Lopes, cujo auxílio foi fundamental para este trabalho com as análises de RMN ^{13}C . Pela grande gentileza e disponibilidade em discutir os resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Lisandro e seu aluno Guilherme, pela grande colaboração nos testes de difração de raio-X realizados no Instituto de Física da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Nelson R. Antoniosi Filho e sua aluna Dayane, pelo auxílio com as análises de composição de triacilgliceróis realizados no laboratório de métodos de extração e separação - LaMES - IQ – UFG.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

CERTEZA

De tudo ficaram 3 coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que precisamos continuar

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um novo caminho

Da queda, um passo de dança

Do medo, uma escada

Do sonho, uma ponte

Da procura, um encontro

Fernando Pessoa

RESUMO

A interesterificação enzimática é uma alternativa à interesterificação química para obtenção de lipídios estruturados. O lipídio obtido apresenta fusão específica às necessidades, preservando os nutrientes de maior valor no óleo, ausência de isomerização, especificidade e maior controle de processo com menor custo de energia. Neste trabalho foram desenvolvidos lipídios estruturados (LE) por interesterificação enzimática e química, utilizando misturas binárias em diferentes proporções (60:40, 50:50, 40:60 e 30:70) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) com 3 grupos distintos de óleos totalmente hidrogenados: soja (OSTH), girassol alto oléico (OGAOTH) e crambe (*Crambe abyssinica Hochst*) (OCTH). A interesterificação química foi realizada nas seguintes condições como comparação: a 100°C, 20 min de reação, 0,4% (m/m) de metóxido de sódio, sob agitação e vácuo. A interesterificação enzimática foi catalisada pela lipase *sn*-1,3 específica imobilizada *Thermomices lanuginosa* (Lipozyme TL IM) na dosagem de 7% a 70°C durante 9 horas com agitação de 300 rpm. Para este propósito, as misturas e as gorduras interesterificadas foram avaliadas a cada 3 horas, quanto à composição em ácidos graxos e triacilgliceróica, classes de lipídios, conteúdo de gordura sólida, isoterma de cristalização, comportamento térmico, distribuição regioespecífica de ácidos graxos nos triacilgliceróis (TAG), microestrutura e polimorfismo. As interesterificações química e enzimática proporcionaram considerável rearranjo das classes de TAG. Os lipídios estruturados obtidos apresentaram menor teor de TAG triessaturados e triinsaturados e maior de triacilgliceróis monoinsaturados-dissaturados e diinsaturados-monossaturados. O conteúdo de gordura sólida foi reduzido, bem como o ponto de fusão. O diâmetro médio dos cristais foi reduzido e a morfologia dos triacilgliceróis alterada. O monitoramento da reação demonstrou que houve menor migração do grupo acil nos ácidos graxos na posição *sn*-2 dos triacilgliceróis na catálise enzimática com 3 horas de reação. Os lipídios estruturados obtidos através da interesterificação enzimática podem ter amplas aplicações em gorduras especiais para produtos de confeitaria e padaria e como aditivo na cristalização de lipídios.

Palavras-chave: lipídios estruturados; interesterificação enzimática; migração acil; óleo de girassol alto oléico; *Crambe abyssinica*.

ABSTRACT

Enzymatic interesterification is an alternative to chemical interesterification to obtain structured lipids. The obtained lipid presents specific melting point for the needs, the highest value of nutrients in the oil, no isomerization, specificity and better process control with lower energy cost. In this study were developed structured lipids (SL) by enzymatic and chemical interesterification using binary blends in different ratios (60:40, 50:50, 40:60 and 30:70) of high oleic sunflower oil (HOSO) with 3 different groups of fully hydrogenated oils from: soybean (FHSO), high oleic sunflower (FHOSO) and crambe (*Crambe abyssinica Hochst*) (FHCO). The chemical interesterification was fulfilled by the following conditions as comparison: 100°C, 20 min of reaction, 0.4% (w / w) sodium methoxide with stirring under vacuum. The enzymatic interesterification was catalyzed by 7% *sn*-1,3 specific immobilized lipase *Thermomices lanuginosa* (Lipozyme TL IM) at 70°C for 9 h under 300 rpm agitation. For this purpose, the blends and interesterified fats were evaluated every 3 h, for fatty acids and triacylglycerol composition, lipid classes, solid fat content, isotherm crystallization, thermal behavior, regiospecific distribution of fatty acids in triacylglycerols (TAG), microstructure and polymorphism. The chemical and enzymatic interesterification provided considerable rearrangement of triglycerides classes. The structured lipids had lower content of trisaturated and triunsaturated and higher monosaturated-diunsaturated and disaturated-monounsaturated TAG. The solid fat content was reduced as well as the melting point. The average diameter of the crystals was reduced and the morphology of the TAG was modified. The monitoring of the reaction showed that there was less migration of the acyl group in the fatty acids in the *sn*-2 position of triacylglycerol in enzymatic catalysis with 3 h of reaction. The structured lipid obtained by enzymatic interesterification may have wide applications in special fats for confectionery/bakery products and as additives in lipid crystallization.

Keywords: structured lipids; enzymatic interesterification; acyl migration; high-oleic sunflower oil; *Crambe abyssinica*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO GERAL.....	19
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Lipídios.....	20
3.1.1. Lipídios e nutrição.....	20
3.1.2. Propriedades físico-químicas das gorduras.....	21
3.1.3. Polimorfismo e cristalização.....	22
3.1.4. Modificações em óleos e gorduras.....	24
3.1.4.1. Fracionamento.....	24
3.1.4.2. Hidrogenação.....	25
3.1.4.3. Interesterificação.....	26
3.1.4.3.1. Interesterificação química.....	26
3.1.4.3.2. Interesterificação enzimática.....	27
3.1.5. Lipases.....	29
3.1.6 Regioespecificidade e Metabolismo.....	30
3.1.7 Técnicas analíticas aplicadas a gorduras interesterificadas.....	31
3.1.7.1 Cromatografia em fase gasosa.....	31
3.1.7.2 Cromatografia líquida de alta resolução alta temperatura (HT-HRGC) e cromatografia líquida de exclusão por tamanho (HPSEC)...	31
3.1.7.3 Distribuição regioespecifica dos ácidos graxos.....	32
3.1.7.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	32

3.1.7.5 Comportamento térmico - Calorimetria Diferencial de Varredura....	34
3.1.7.6 Microscopia sob luz polarizada.....	36
3.1.7.7 Difração de raios-X.....	36
Referências.....	38
4. ARTIGOS.....	38
4.1. COMPARAÇÃO ENTRE INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E QUÍMICA DE ÓLEO DE GIRASSOL ALTO OLEICO E ÓLEO DE SOJA TOTALMENTE HIDROGENADA	38
Resumo.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos.....	42
2.1 Material.....	42
2.2 Métodos.....	42
2.2.1. Preparação da mistura.....	42
2.2.2. Condicionamento da enzima.....	42
2.2.3. Interesterificação enzimática.....	43
2.2.4. Interesterificação química.....	43
2.2.5 Composição em ácidos graxos.....	44
2.2.6. Composição em triacilgliceróis.....	44
2.2.7. Rendimento de interesterificação.....	45
2.2.8. Classes de lipídios.....	45
2.2.9. Conteúdo de gordura sólida e ponto de fusão.....	45
2.2.10. Análise térmica.....	46
2.2.11. Distribuição regioespecífica.....	46
2.2.12. Análise estatística.....	47

3. Resultados e discussão.....	47
3.1. Composição em ácidos graxos.....	47
3.2. Composição em triacilgliceróis.....	48
3.3. Classes de lipídios.....	49
3.4. Conteúdo de gordura sólida e ponto de fusão.....	51
3.5. Análise térmica.....	53
3.6. Distribuição regioespecifica.....	54
4. Conclusão.....	56
Referências.....	56
4.2. INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE GIRASSOL ALTO OLÉICO E ÓLEO DE SOJA TOTALMENTE HIDROGENADO: PROPRIEDADES FÍSICO - QUÍMICA.....	62
Resumo.....	63
1. Introdução.....	64
2. Material e métodos.....	65
2.1. Material.....	65
2.2. Métodos.....	66
2.2.1. Preparação das misturas e condicionamento da enzima.....	66
2.2.2. Interesterificação enzimática.....	66
2.2.3. Interesterificação química.....	67
2.2.4. Caracterização dos triacilgliceróis.....	67
2.2.4.1. Composição em triacilgliceróis.....	67
2.2.4.2. Distribuição regioespecifica.....	68
2.2.4.3. Conteúdo de gordura sólida.....	68
2.2.4.4. Análise térmica.....	69

2.2.4.5. Cinética de cristalização.....	69
2.2.4.6. Microscopia sob luz polarizada.....	70
2.2.4.7. Difração de Raios-X.....	70
3. Resultados e discussão.....	71
3.1. Composição em triacilgliceróis.....	71
3.2. Distribuição regioespecífica.....	72
3.3. Conteúdo de gordura sólida.....	73
3.4. Análise térmica.....	74
3.5. Cinética de cristalização.....	75
3.6. Microestrutura.....	77
3.7. Difração de Raios-X.....	79
4. Conclusão.....	81
Referências.....	81
4.3. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEOS DE GIRASSOL ALTO OLÉICO E TOTALMENTE HIDROGENADO.....	86
Resumo.....	87
1. Introdução.....	88
2. Material e métodos.....	90
2.1. Material.....	90
2.2. Métodos.....	90
2.2.1. Preparação de misturas e acondicionamento da enzima.....	90
2.2.2. Interesterificação enzimática.....	91
2.2.3. Interesterificação química.....	91
2.2.4. Composição em ácidos graxos.....	92

2.2.5. Análise do perfil de triacilgliceróis.....	92
2.2.6. Classes de lipídios.....	93
2.2.7. Distribuição regioespecifica.....	93
2.2.8. Conteúdo de gordura sólida.....	93
2.2.9. Comportamento térmico.....	94
2.2.10. Microscopia sob luz polarizada.....	94
2.2.11. Difração de raios-X.....	95
2.2.12. Análise estatística.....	95
3. Resultados e discussão.....	95
3.1. Composição de ácidos graxos.....	95
3.2. Composição em triacilgliceróis.....	96
3.3. Classes de lipídios.....	98
3.4. Distribuição regioespecífica.....	99
3.5. Conteúdo de gordura sólida.....	100
3.6. Perfil de cristalização.....	102
3.7. Microestrutura.....	104
3.8. Polimorfismo.....	106
Referências.....	109
4.4. GORDURAS ESPECIAIS CONTENDO ÁCIDO BEHÊNICO OBTIDAS POR INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE <i>CRAMBE ABYSSINICA</i> TOTALMENTE HIDROGENADO.....	115
Resumo.....	116
1. Introdução.....	117
2. Material e métodos.....	119
2.1. Material.....	119

2.2. Métodos.....	119
2.2.1. Preparação das misturas e condicionamento da enzima.....	119
2.2.2. Interesterificação enzimática.....	120
2.2.3. Interesterificação química.....	120
2.2.4. Composição em ácidos graxos.....	121
2.2.5. Composição em triacilgliceróis.....	121
2.2.6. Distribuição regioespecifica.....	122
2.2.7. Conteúdo de gordura sólida.....	123
2.2.8 Análise térmica.....	123
2.2.9. Microscopia sob luz polarizada.....	123
2.2.10. Difração de raios-X.....	124
3. Resultados e discussão.....	124
3.1. Composição em ácidos graxos.....	125
3.2. Composição em triacilgliceróis.....	126
3.3. Distribuição regioespecifica dos ácidos graxos.....	128
3.4. Conteúdo de gordura sólida.....	130
3.5. Propriedades térmicas.....	131
3.6. Microestrutura.....	132
3.7. Polimorfismo.....	134
4. Conclusão.....	135
Referências.....	136
5. DISCUSSÃO.....	140
6. CONCLUSÃO GERAL.....	142
7. REFERÊNCIAS.....	143
8. ANEXOS.....	153

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são modificados quimicamente pela hidrogenação e interesterificação, ou fisicamente pelo fracionamento (BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 2009). A reação de interesterificação é o processo mais importante para modificação físico-química de óleos e gorduras (NOOR LIDA, 2002).

Os lipídios estruturados (LE) são definidos como triacilgliceróis (TAG) modificados quimicamente ou enzimaticamente, visando alterar a composição dos ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol (CHRISTOPHE, 1998). A estrutura molecular dos TAG influencia o seu destino metabólico no organismo, bem como as suas características físicas (pontos de fusão, conteúdo de gordura sólida, polimorfismo, etc). Portanto, ao desenvolver um LE com estrutura química definida, é possível modificar propriedades nutricionais, apresentando ácidos graxos saturados ou insaturados de fácil absorção e digestão (IWASAKI ; YAMANE, 2002; OSBORN; AKOH, 2002).

Os LE sintetizados por métodos enzimáticos, que utilizam uma lipase específica *sn*-1,3 apresentam a vantagem de seletividade, regioespecificidade dos ácidos graxos, facilidade de recuperação do produto, controle sobre o processo e menor desperdício (AKOH,1997; WILLIS; LENCKI; MARANGONI, 1998). As reações catalisadas por lipase envolvem uma combinação de hidrólise e esterificação / interesterificação (OSÓRIO; FONSECA; DIAS, 2006). Uma vez que a reação ocorre sob a ligação éster, não há formação de isômeros *trans* (LI et al., 2010). Na presença de excesso de água, a hidrólise é predominante, resultando em um acúmulo de glicerol, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. No entanto, a água é essencial para manter a reação enzimática, porque mantém a integridade da enzima. Na primeira etapa da reação é necessário alcançar um equilíbrio entre a hidrólise e a esterificação. A água deve ser removida do meio reacional, a fim de minimizar a hidrólise e aumentar a esterificação, aumentando a taxa de conversão (OSBORN; AKOH, 2002).

No esforço para produzir reações reproduzíveis tecnologicamente e viáveis economicamente, a utilização de enzimas na forma imobilizada aumentou substancialmente a estabilidade e proporcionou ampla gama de aplicações importantes para o desenvolvimento de bioconversão (HILAL; NIGMATULLIN; ALPATOVA, 2004). A imobilização também está associada a maior produtividade,

automação de processos e operações contínuas, controle preciso sobre as reações, a facilidade de separação de produtos obtidos a estabilização da atividade enzimática, bem como a recuperação e reutilização de enzimas (SHIN; AKOH; LEE, 2009). Atualmente, vários estudos relatam a preparação de diferentes LE, a partir de uma variedade de óleos / gorduras com ácidos graxos específicos (LEE; AKOH; LEE, 2008; FAUZI; RASHID; OMAR, 2013; ADHIKARI; HU, 2012; BEBARTA et al., 2013).

A proposta deste estudo foi desenvolver lipídios estruturados por interesterificação enzimática, devido a sua seletividade, com a finalidade de fornecer efeitos metabólicos específicos para fins nutricionais e ou para melhorar as características físico-químicas dos lipídios.

O Capítulo 3 abrange uma revisão bibliográfica sobre lipídios e nutrição, interesterificação química e enzimática, lipases, regioespecificidade, metabolismo e as técnicas analíticas utilizadas na avaliação das propriedades físico-químicas de óleos e gorduras. Parte da literatura citada neste capítulo encontra-se nos capítulos abaixo na forma de artigos científicos.

O Capítulo 4 compara a interesterificação enzimática e química de misturas binárias de óleo de girassol alto oléico e óleo de soja totalmente hidrogenado. A duração da reação foi de 9 horas com monitoramento das propriedades físico-químicas a cada 3 horas, utilizando as técnicas analíticas da composição de triacilgliceróis, classe lipídicas, conteúdo de gordura sólida (CGS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e migração acil.

O Capítulo 5 avalia estes lipídios estruturados (do capítulo 4) quanto às propriedades de comportamento térmico, microestrutura, cinética de cristalização e polimorfismo em 3 horas de reação.

O Capítulo 6 demonstra os resultados obtidos pela interesterificação enzimática dos óleos de girassol alto oléico e totalmente hidrogenado em 3 horas de reação. Foram avaliados a composição de triacilgliceróis, o conteúdo de gordura sólida (CGS), comportamento térmico (DSC), distribuição regioespecífica dos ácidos graxos, microestrutura e polimorfismo.

O Capítulo 7 estuda gorduras especiais contendo ácido behênico obtido por óleos de girassol alto oléico e crambe totalmente hidrogenado via

interesterificação enzimática. Foram monitoradas as composições em ácidos graxos e triacilgliceróis, os conteúdos de gordura sólida (CGS), análise térmica (DSC), distribuição regioespecífica dos ácidos graxos, microestrutura e polimorfismo.

Em todos os estudos foi processada a interesterificações química com o objetivo de comparação.

Este estudo servirá como suporte de informação para a indústria alimentícia e pesquisas científicas em reações de interesterificação enzimática, envolvendo tempo de reação, reogiespecificidade dos ácidos graxos e metabolismo em lipídios estruturados.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo geral sintetizar e avaliar o comportamento físico-químico de lipídios estruturados obtidos por interesterificação enzimática (lipase *sn*-1,3 específica) de misturas binárias em diferentes proporções de óleo de girassol alto oléico e óleos totalmente hidrogenados de soja (*Glycine max* L.), girassol alto oléico (*Helianthus annuus*) e crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), com o propósito de obter LE com maior concentração de triacilgliceróis 1,3 disaturados e 2 mono-insaturado (SUS) para aplicação na indústria alimentícia.

2.1. Objetivos específicos

- 1- Escolha das proporções lipídicas de cada grupo.
- 2- Interesterificação química das misturas lipídicas para estudo comparativo por catálise enzimática.
- 3- Determinação das condições de reação de interesterificação enzimática para obtenção dos lipídios estruturados.
- 4- Avaliação das misturas lipídicas e dos lipídios estruturados obtidos por reação de interesterificação química e enzimática quanto à composição de ácidos graxos e triacilgliceróis, comportamentos de fusão e cristalização por calorimetria de varredura diferencial (DSC), conteúdo de gordura sólida por RMN, isoterma de cristalização a 25°C, composição de acilgliceróis parciais, distribuição regioespecífica

dos ácidos graxos na molécula de glicerol, morfologia e polimorfismo (difração raio-X).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Lipídios

3.1.1. Lipídios e nutrição

Os avanços nas pesquisas em relação à saúde e à nutrição têm influenciado a forma de alimentação. Desse modo, os consumidores estão procurando cada vez mais produtos que influenciam na nutrição e reduzem o risco de doenças.

Os lipídios apresentam funções essenciais para o organismo humano, como fonte de energia, constituintes das membranas celulares e precursores de hormônios ou análogos que atuam como efeitos fisiológicos. A atividade funcional dos lipídios atua no crescimento e desenvolvimento humano, especialmente nas etapas de gestação, lactação e infância, assim como na prevenção e tratamento de algumas patologias crônicas de base inflamatória, doenças cardiovasculares, câncer, etc (GUNSTONE, 1997).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para modificar a composição original dos óleos e gorduras tais como hidrogenação parcial, interesterificação e fracionamento. As propriedades nutricionais destes lipídios podem ser melhoradas com uma composição balanceada dos ácidos graxos, retenção da maioria das vitaminas e formação mínima de ácidos graxos *trans*. Atualmente, existe uma tendência para a produção de gorduras de baixo nível de isômeros *trans* ou livres de *trans* pelo processo de interesterificação, onde as propriedades físicas dos óleos são alteradas por rearranjo da distribuição de ácidos graxos na molécula de glicerol sem alterar a composição química. O aumento do interesse pela reação de interesterificação enzimática comparada à interesterificação química pode ser explicado, por fatores tais como o uso de biocatalisador, reação em temperatura baixa, seletividade específica, causar menor perda e menor formação de subprodutos (GIBON, 2011).

3.1.2. Propriedades físico-químicas das gorduras

Os lipídios são nutrientes essenciais à dieta humana: são fontes concentradas de energia (9 kcal/g); os ácidos graxos essenciais são precursores das prostaglandinas, hormônios necessários à regulação de várias funções vitais, que são veículos de transporte para as vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e necessários para o desenvolvimento e crescimento do corpo humano.

As gorduras desempenham ainda um papel importante nas propriedades funcionais e sensoriais nos produtos alimentícios (KRITCHEVSKY, 2002). Melhoram sensorialmente os alimentos que consumimos, na textura, no sabor, na palatabilidade e contribuem para a sensação de saciedade. Mais de 95% dos óleos e gorduras são constituídos por triacilgliceróis. Os triacilgliceróis são ésteres formados por uma molécula de glicerol e três ácidos graxos. São insolúveis em água e à temperatura ambiente (25°C), podem existir no estado líquido (óleos) ou no estado sólido (gorduras). O tipo e a localização dos ácidos graxos na molécula de glicerol definem as características físicas e químicas das gorduras, o destino metabólico e os benefícios para a saúde (OSBORN; AKOH, 2002). Podemos classificar os ácidos graxos de acordo com o tamanho da cadeia carbônica em pequeno (C2:0 a C6:0), médio (C8:0 a C12:0) e longo (>C12:0). Os ácidos graxos de cadeia longa são absorvidos e metabolizados mais lentamente que os ácidos graxos de cadeia curta e média. Não podem ser absorvidos ou transportados pelo sangue. São empacotados em micelas, que entram nas células intestinais e depois expelidos para sistema linfático e são coletados na circulação sistêmica (RAMÍREZ *et al.*, 2001; HUNTER, 2005).

O ponto de fusão da gordura está relacionado com o tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos, número de insaturações e suas posições na cadeia (SCRIMGEOUR, 2005).

O óleo de girassol alto oléico é considerado um óleo saudável, pois contém mais de 85% de ácidos graxos insaturados, principalmente oléico (C18:1) e baixo conteúdo de saturados, inferior a 9%. O triacilglicerol predominante é a trioleína (OOO). Apresenta uma excelente estabilidade oxidativa e com aplicação para fritura industrial, massas de biscoitos e *blend* de gorduras (MARTÍNEZ-FORCE *et al.*, 2009; ALBERIO *et al.*, 2016).

O óleo de soja é um produto abundante no Brasil, de alta qualidade nutricional, grande funcionalidade e baixo custo. Apresenta na sua composição química, alto conteúdo de ácidos graxos oléico (C18:0) 23% e linoléico (C18:2) 55%. Vários pesquisadores têm estudado as reações de interesterificação química e enzimática, contendo óleo de soja totalmente hidrogenado (RIBEIRO et al., 2009; PACHECO et al., 2013).

O crambe (*Crambe abyssinica Hochst*) é uma planta da família *Brassicaceae* cuja principal matéria prima é o óleo extraído de suas sementes, com ampla utilização em diferentes segmentos de indústrias. No Brasil seu cultivo é recente nos estados de Mato Grosso e Goiás, sendo que o interesse pela oleaginosa ocorreu por se tratar de uma planta de ciclo curto (LALAS et al., 2012; LARA, 2013). A produção de biodiesel no Brasil tem recorrido a diversas fontes vegetais, entre elas a do crambe, visando reduzir a rotação de cultura no inverno e por se tratar de uma oleaginosa com tolerância à seca. Na Fundação MS, de Maracaju, MS, pesquisadores atingiram a produção de 1000-1500 kg/ha (FUNDAÇÃO MS, 2014). Sua semente é composta de 35-60% de óleo e 20-40% de proteína. Entre os ácidos graxos componentes do óleo destacam-se: erúcico (C22:1), 56,2%, oléico (C18:1), 17,2%, linoléico (C18:2) 8,7%, linolênico (C18:3), 5,2% e eicosenóico (C20:1), 3,4% (LALAS et al., 2012; GUEDES, et al., 2014).

3.1.3. Polimorfismo e cristalização

Os óleos e gorduras vegetais e animais possuem várias espécies moleculares com diferentes propriedades químicas e físicas. Propriedades específicas de cristalização de gorduras e lipídios podem ser manifestadas de um lado pelo polimorfismo, e de outro pelas interações moleculares. Propriedades físicas de TAG e dos ácidos graxos (AG) tais como taxa de cristalização, tamanho de cristal e sua rede, morfologia do cristal e cristalinidade, estão diretamente influenciados pelo polimorfismo, o qual é influenciado pela própria estrutura molecular e por vários fatores externos tais como temperatura, pressão, solvente, impurezas, taxa de cristalização, etc. (SATO, 2001).

O polimorfismo é a habilidade de uma molécula de TAG ter mais do que uma forma cristalina, dependendo do arranjo do núcleo do cristal. Cada forma polimórfica tem distâncias paralelas distintas entre os grupos acil do TAG, as quais

são usadas para distinguir a forma polimórfica baseada em difração de raios-X. Em geral, TAG com três ácidos graxos saturados apresentam empacotamento duplo de cadeias, enquanto que o empacotamento triplo de cadeia (Figura 1a) é obtido em TAG com ácidos graxos de tamanhos diferentes de cadeia e com insaturações (METIN; HARTEL, 2005). Os TAG cristalizam-se em diferentes formas designadas por: α , β' e β , que correspondem às três principais disposições transversais das cadeias de ácidos graxos (Figura 1b).

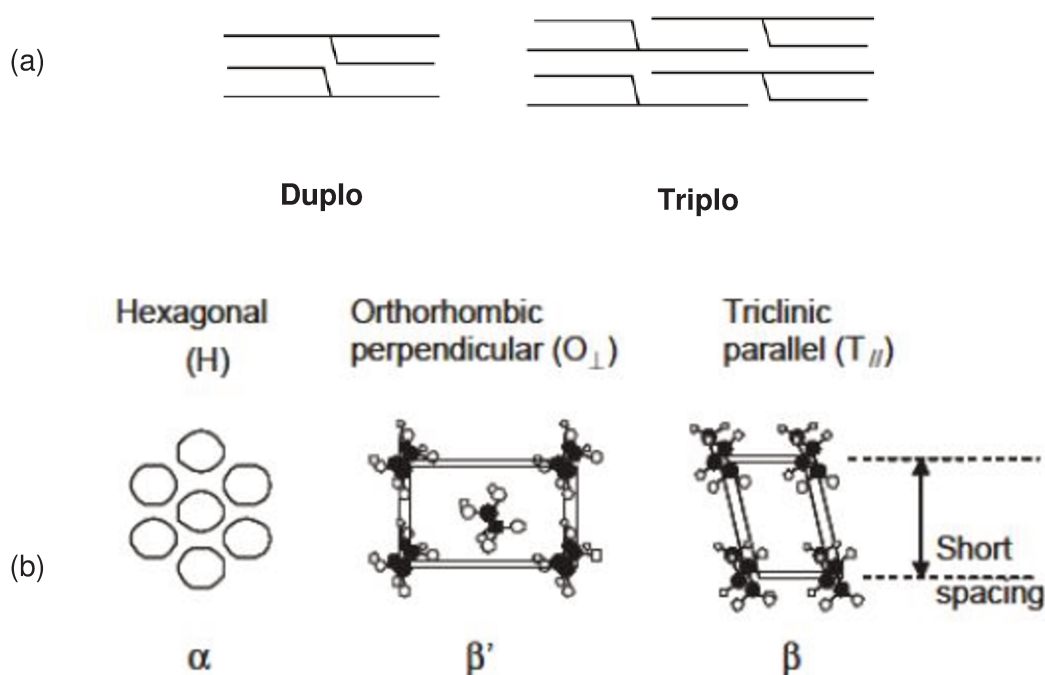


Figura 1. Tipos de empacotamento de cadeias (a) e estruturas das subcélulas das três formas mais comuns de polimorfismos em triacilgliceróis (b) (SATO, 2001).

A forma polimórfica α (cristais do sistema hexagonal) apresenta cristais mais frágeis, com menor densidade, com tamanho de 5 μm e menor ponto de fusão. É formada na fase inicial do processo de cristalização da gordura devido ao resfriamento rápido. Os cristais α , devido à sua instabilidade, são transformados em segundos ou minutos na forma β ou β' (MARANGONI, 2005).

A forma β' (cristais do sistema ortorrômbico) é constituída por uma rede com uma grande área superficial, capaz de imobilizar uma grande quantidade de óleo e de fase aquosa. Os cristais são relativamente pequenos (máx. 1 μm), finos, suaves e conferem ao produto uma superfície brilhante (GUNSTONE, 1998). Os

“shortenings” e as margarinas possuem uma textura suave e cremosa, devido à presença de cristais β' , que promovem plasticidade.

A forma β (cristais do sistema triclínico) é uma das mais estáveis para a maioria dos TAG puros e apresenta o ponto de fusão mais elevado. Apesar dos cristais β serem inicialmente pequenos, crescem em aglomerados na forma de agulhas (25 a 50 μm), sendo mais difícil de incorporar líquido e produzem a característica textura granulosa (GUNSTONE, 1998).

Os tipos de cristais que podem ser encontrados em gorduras são: Esferulitos A, cristais com núcleo compacto, cercado de agulhas longas e finas distribuídas radialmente; Esferulitos B, pequenos núcleos cercados de cristais orientados aleatoriamente; Cachos, grupos de cristais pequenos aproximadamente esféricos, arranjados aleatoriamente; Feixes, cristais distribuídos paralelamente, formando estruturas semelhantes a uma rede; Aglomerados, agregados de cristais esferulitos e cachos (BERGER; JEWELL; POLLITT, 1979).

3.1.4. Modificações em óleos e gorduras

A indústria alimentícia para suprir as necessidades do mercado utiliza métodos de modificação de óleos e gorduras para obtenção de produtos com características físicas e nutricionais específicas. Estas técnicas oferecem à indústria uma maior flexibilidade de escolha nas matérias primas e vantagens na produção de produtos de qualidade constante a preços razoáveis. Os principais processos de modificação são: fracionamento, hidrogenação e interesterificação.

3.1.4.1 Fracionamento

O fracionamento permite a separação de grupos de TAG, mas não muda a distribuição posicional dos ácidos graxos (WILLIS; LENCKI; MARANGONI, 1998). Esta técnica consiste na separação de óleos e gorduras em dois ou mais componentes, dependendo da sua solubilidade (em líquidos, óleos ou solventes) e ponto de fusão, por resfriamento controlado. As frações menos solúveis e com ponto de fusão mais elevado são denominadas estearinas e as frações mais solúveis, e com ponto de fusão mais baixo são denominadas oleínas. Esta técnica remove os

componentes minoritários, enriquece o óleo em um TAG desejável, separa a gordura em duas ou mais frações, que permitem uma aplicação mais ampla e de maior valor comercial, sendo igualmente uma alternativa à hidrogenação, que será discutida no próximo item.

O método mais utilizado para fracionamento é a seco, que consiste numa cristalização lenta e controlada do TAG por resfriamento a partir de temperatura superior ao ponto de fusão do principal TAG a ser separado, na ausência de solvente. O objetivo é separar os TAG pelo seu comportamento de cristalização (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005). A separação das fases líquida e sólida é efetuada por centrifugação ou filtração. Existe também o fracionamento na presença de solvente, que é um processo mais dispendioso, com utilização limitada e o processo na presença de um agente detergente, que já não é muito utilizado, pelas perdas e necessidade de purificação.

3.1.4.2 Hidrogenação

A hidrogenação de gorduras e óleos comestíveis envolve a adição de hidrogênio, na presença de um catalisador, nas duplas ligações carbono-carbono presentes nas cadeias dos ácidos graxos. É um processo que gera consistência em gorduras e óleos, convertendo TAG insaturados de baixo ponto de fusão em TAG sólidos, aumentando o ponto de fusão. O propósito do processo de hidrogenação é duplo: (1) para converter óleos líquidos em gorduras semi-sólidas ou plásticas para aplicações alimentares específicas, e (2) melhorar a estabilidade térmica e oxidativa do óleo ou gordura. Durante a hidrogenação de óleos e gorduras, três efeitos importantes ocorrem simultaneamente: (1) a saturação das ligações duplas com hidrogênio, (2) isomerização *cis-trans* das duplas ligações, gerando altos teores de isômeros *trans* e (3) a migração de ligações duplas para novas posições na cadeia de carbono do ácido graxo (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005). Uma solução tecnológica importante em aplicação atual na indústria mundial para alimentos para evitar o uso da hidrogenação e a consequente geração de isômeros *trans*, que ocorre conjuntamente, é a mistura de óleos líquidos com gorduras totalmente hidrogenadas para formar produtos de plasticidade desejável, principalmente após processos de interesterificação, que melhoram performance e miscibilidade entre

suas frações líquidas e sólidas, uma vez que o óleo, após hidrogenação total, elimina quase totalmente as ligações duplas dos AG.

3.1.4.3 Interesterificação

A reação de interesterificação é um processo de modificação das propriedades físicas e funcionais de misturas de TAG em gorduras e óleos. Os ácidos graxos permanecem inalterados, mas são redistribuídos nas ligações éster, criando novas estruturas, sem a formação de isômeros *trans* durante o processo (MARANGONI, 2002).

A interesterificação de óleos e gorduras pode ser utilizada para: modificar o comportamento de fusão, proporcionando consistência adequada a temperaturas ambiente e de refrigeração; modificar o comportamento cristalino, facilitando os processos de produção; diminuir a recristalização durante a vida útil do produto (ROZENAAL, 1992).

A interesterificação, por sua vez, compreende três tipos de reações: (1) Acidólise: entre uma gordura e ácidos graxos livres. (2) Alcoólise: entre uma gordura e um álcool. (3) Transesterificação: entre triacilgliceróis e ésteres.

Existem dois tipos de interesterificação, que se diferenciam pelo tipo de catalisador utilizado: a química e a enzimática.

3.1.4.3.1 Interesterificação química

A reação de interesterificação química consiste em três etapas: ativação do catalisador, quebra das ligações éster e troca de posição dos ácidos graxos. Esta troca de ácidos graxos entre as posições do glicerol não ocorre diretamente, mas através de uma série de reações de alcoólise que envolve acilgliceróis parciais (MARANGONI; ROSSEAU, 2002). O catalisador normalmente utilizado é alcalino, sendo o metóxido de sódio mais utilizado em processos industriais.

O processo de interesterificação química possui a vantagem de ser um processo de fácil aumento de escala e de menor custo, contudo a reação distribui os ácidos graxos de maneira aleatória nos triacilgliceróis, podendo conferir novas propriedades físicas ao produto, onde altera o comportamento de fusão e cristalização, o conteúdo de gordura sólida, a textura e o comportamento polimórfico

(DIAN et al., 2007). Vários estudos avaliam estes efeitos nas características físico-químicas de óleos e gorduras submetidos a este processo (CHIU; GIOIELLI; GRIMALDI, 2008; RIBEIRO, et al., 2009; MASUCHI, et al., 2014; IMRAN; NADEEM, 2015)

3.1.4.3.2 Interesterificação enzimática

Sistemas de interesterificação enzimática são compostos de uma fase contínua imiscível em água, que contém o substrato lipídico, e uma fase aquosa, contendo a lipase. As lipases são enzimas derivadas, predominantemente, de bactérias, fungos e leveduras.

Este processo tem a vantagem de permitir controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases *sn*-1,3, obtendo lipídios estruturados distintos do processo químico (WILLIS; MARANGONI, 1999).

A Figura 2 mostra o mecanismo da reação de interesterificação enzimática para produção de TAG com ácidos graxos de cadeias média e longa, utilizando uma lipase com seletividade *sn*-1,3 (IWASAKI ; YAMANE, 2002).

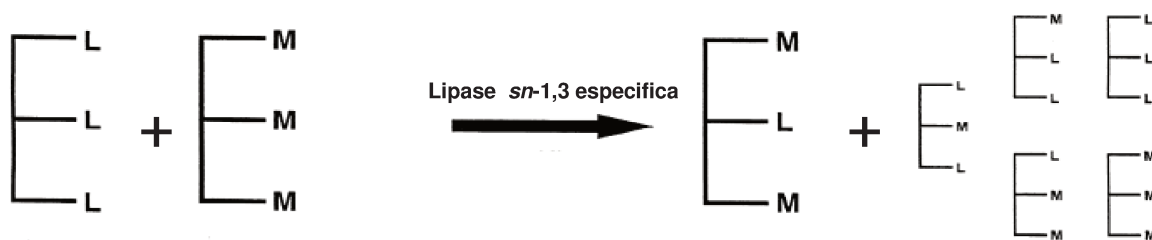


Figura 2. Mecanismo de interesterificação enzimática utilizando uma lipase com seletividade *sn*-1,3 (IWASAKI ; YAMANE, 2002).

A reação pode ocorrer em reator por batelada aplicado em processos de pequena escala e em reator contínuo, que permite a produção em escala comercial, diminuindo os custos e maior controle de processo (SOARES, 2013).

Existem vários fatores que influenciam a velocidade da reação enzimática: concentração da enzima, temperatura, pH, atividade da água, pressão e

a presença de compostos inibidores da atividade enzimática. Ex. produtos de oxidação lipídica e ácidos graxos livres (CHAMPE; HARVEY, 1996; XU, 2000).

A migração acil é um sério problema na interesterificação, pois prejudica o efeito de seletividade *sn*-1,3 da lipase. A razão para esta migração é a existência de acilgliceróis parciais, especialmente diacilgliceróis (DAG), que são produtos intermediários de reação, necessários e inevitáveis. A Figura 3 mostra mecanismo de reação preferencial da lipase *sn*-1,3 específica, obtendo 1,2 e 2,3-DAG, deixando intacta o posição *sn*-2 (LOPES, et al. 2016). O ácido graxo da posição *sn*-2 dos 1,2 e 2,3-DAGs, pode migrar espontaneamente produzindo 1,3-DAG, sendo mais estável. Subsequentemente, uma nova migração do ácido graxo pode regenerar 1,2 e 2,3-DAGs, que irá produzir TAG com inserções aleatórias de ácidos graxos saturados (AGS) na posição *sn*-2 após uma reesterificação nas posições *sn*-1 ou *sn*-3 (XU, 1998).

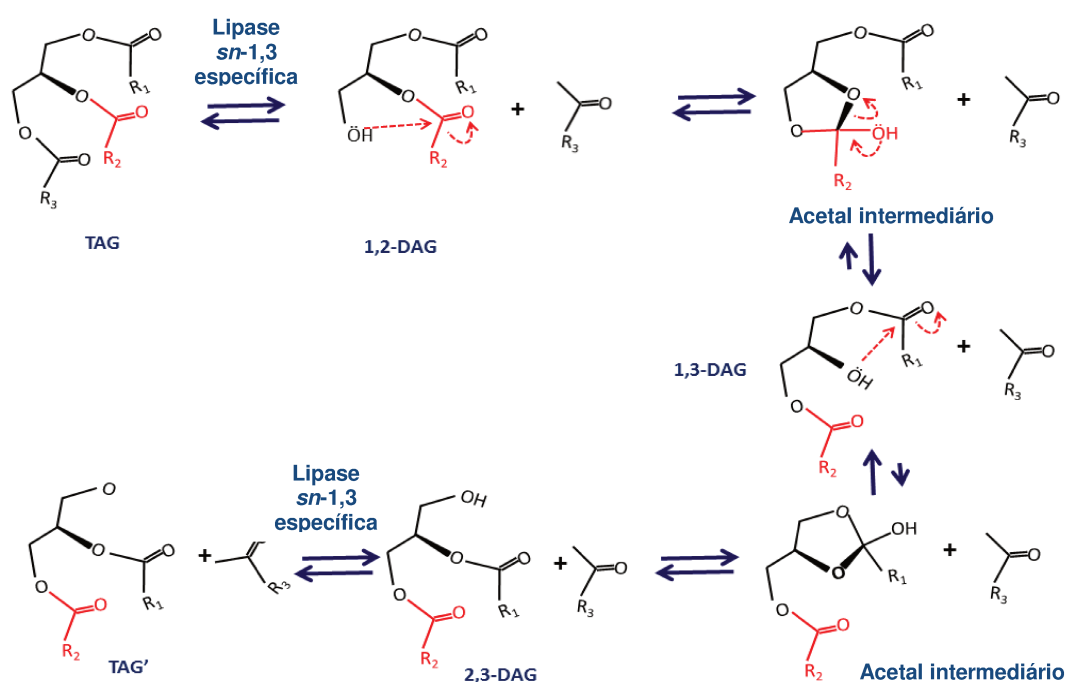


Figura 3. Mecanismo de reação espontânea de migração acil em interesterificação enzimática (LOPES, et al. 2016).

A interesterificação enzimática com lipases imobilizadas tem recebido atenção considerável nos últimos anos e muitos pesquisadores tem investigado esta reação para modificação de diversos lipídios (AHMADI; WRIGHT; MARANGONI,

2008; JEYARANI; REDDY, 2010; SILVA et al., 2011, SILVA et al., 2013; RUAN et al., 2014; KIM; AKOH, 2015; IFEDUBA, MARTINI; AKOH, 2016).

3.1.5. Lipases

As lipases catalisam reações de hidrólise de TAGs em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol em sistemas livres de solventes, apenas água e substrato, ou na presença de solventes orgânicos. Além da reação de transesterificação, as lipases podem catalisar as reações de acidólise e alcóólise sob condições controladas de umidade (LEE; AKOH, 1998).

Uma característica comum em algumas lipases microbianas, nas enzimas derivadas de *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosa* (TL) é a especificidade *sn*-1,3. Isto significa que nas reações com os TAGs, as mudanças dos ácidos graxos ocorrerão nas posições *sn*-1 e 3 na molécula de glicerol. Outra lipase que possui especificidade *sn*-1,3 é a Lipozyme TL IM[®], produzida por uma estirpe geneticamente modificada do *Aspergillus oryzae* e imobilizada em um silicato via adsorção iônica (Figura 4). A estabilização de enzimas por imobilização pode ser alcançada, quando uma ligação covalente intensa multiponto é produzida entre a enzima e o suporte. Dessa forma, a rigidez global da estrutura da enzima aumenta e torna-se mais estável contra qualquer reagente de inativação (LAFUENTE, 2010).

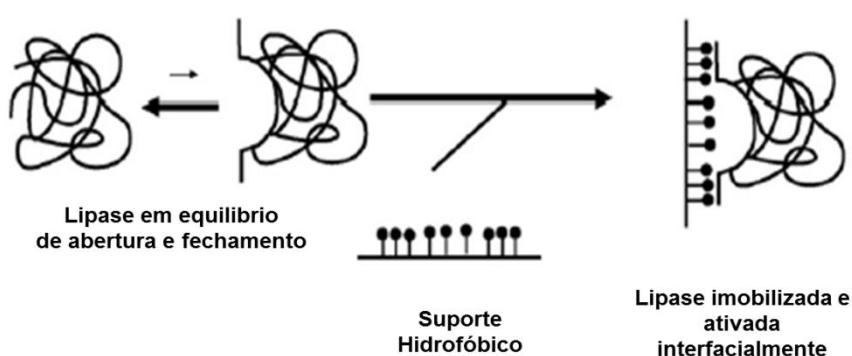


Figura 4. Imobilização de lipases por ativação interfacial em suportes hidrofóbicos (LAFUENTE, 2010).

Nas lípases têm a massa molecular de 20 a 75 quilodaltons (kDa), atividade em pH na faixa de 4 a 9 e temperatura entre a ambiente até 75°C, variando

sua termoestabilidade consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as de melhor estabilidade térmica (CASTRO; ANDERSON, 1995).

A utilização de enzimas imobilizadas confere maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso do tempo das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas (SHARMA; CHISTY; BANERJEE, 2001; RODRIGUES, 2013).

3.1.6. Regioespecificidade e Metabolismo

A estrutura dos TAG tornou-se cada vez mais importante, uma vez que a regioespecificidade influencia o metabolismo lipídico e biodisponibilidade dos ácidos graxos (LIEN *et al.*, 1997). A posição dos ácidos graxos na molécula de TAG (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) determina as propriedades físicas da gordura, o que afeta a sua absorção, o metabolismo e a distribuição nos tecidos, podendo ter implicações no risco de doença coronariana. Os óleos vegetais caracterizam-se por apresentarem predominantemente ácidos graxos insaturados na posição *sn*-2 dos TAG.

A estrutura dos TAG nos óleos e nas gorduras pode ser manipulada pelo processo de interesterificação, uma vez que pode ser usado para alterar as características físicas desses produtos, sem gerar ácidos graxos *trans*.

As gorduras interesterificadas ricas em ácidos graxos de cadeia longa são comercialmente importantes, mas com poucos estudos investigando os efeitos na saúde (LEFEVRE; KRIS-ETHERTON; ZHAO, 2004). Embora estudos em animais e crianças forneçam boas evidências para sugerir que gorduras vegetais interesterificadas com uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2 são bem absorvidos, isto não é suportado por estudos em humanos adultos (BERRY, 2009). Além do comprimento de cadeia e grau de saturação dos ácidos graxos, reconhece-se agora que a composição posicional no TAG pode ser um determinante importante na digestibilidade e no metabolismo. Isto porque a lipase pancreática e lipoproteína lipase hidrolisam preferencialmente os ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos TAG, deixando o ácido graxo na posição *sn*-2, tal como um 2-monoacilglicerol (MAG) (YANG; KUKSIS, 1991).

É importante investigar a migração acil na posição *sn*-2 com relação ao tempo das reações de interesterificação enzimática, bem como as suas

propriedades físicas, pois períodos muito longos de reação podem ocasionar a perda da regioespecificada na síntese dos lipídios estruturados.

3.1.7. Técnicas analíticas aplicadas a gorduras interesterificadas

3.1.7.1. Cromatografia em fase gasosa (CG)

A análise de ácidos graxos via cromatografia gasosa (CG) é um meio rápido para determinar os tipos e proporções de ácidos graxos contidos em óleos e gorduras. As características físicas de uma gordura ou óleo são dependentes do grau de insaturação, do comprimento da cadeia de carbono, das formas isoméricas de ácidos graxos e da configuração molecular (O'BRIEN, 2004). Primeiramente, os óleos ou gorduras são convertidos a ésteres metílicos para serem volatilizados facilmente, quando injetados nas colunas cromatográficas. Um método muito utilizado no Brasil é a esterificação segundo Hartman & Lago (1973). Os óleos de soja e mostarda podem ser utilizados como padrões externos. Os ésteres metílicos passam por uma coluna, aquecida por meio de um gás de arraste, hélio ou nitrogênio. Uma vez que cada tipo de molécula tem uma taxa de progressão diferente, os vários componentes da mistura são separados conforme eluem ao longo da coluna, chegando ao fim dela em momentos diferentes (tempos de retenção). Um detector é empregado para monitorar o fluxo de saída da coluna. A linha de retenção é indicada no eixo horizontal do gráfico e é um índice qualitativo da substância, e a área sob a curva é em cada caso, uma medida quantitativa do componente (GONÇALVES, 2009).

3.1.7.2. Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (HT-HRGC) e cromatografia líquida de exclusão por tamanho (HPSEC)

As propriedades químicas, físicas e biológicas de gorduras e óleos não dependem apenas do tipo e quantidade de ácidos graxos, mas também sobre as posições destes ácidos graxos na molécula de glicerina. A cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (HT-HRGC) proporciona métodos rápidos para a determinação de quantidades relativas de glicerídeos de alta massa molecular presentes numa gordura (PEREIRA et al., 1996). A grande versatilidade da técnica é

baseada intrinsecamente no grande poder de resolução e extrema inércia química das colunas capilares, além da facilidade de utilização de vários sistemas de detecção e poder contar com sistemas de transferência de amostra (injeção na coluna a frio) (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000).

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanhos (*High-Performance Size-Exclusion Chromatography* - HPSEC), também conhecida como permeação em gel, tem permitido uma separação simples e rápida de compostos com baixa massa molar e com pequenas diferenças entre as massas molares dos compostos analisados. O solvente utilizado, em geral é o THF (tetrahidrofurano). O HPSEC separa componentes por massa molecular, sendo que os compostos mais pesados aparecem em um tempo menor no cromatograma. Separa ésteres por diferença de massa molar dos compostos, como triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ésteres e ácidos graxos livres (MÁRQUEZ-RUIZ, et al., 1996; MARMESAT et al., 2007).

3.1.7.3. Distribuição regioespecífica dos ácidos graxos

A distribuição regioespecífica dos ácidos graxos no TAG influencia na qualidade nutricional de óleos e gorduras. A espectroscopia de RMN ^{13}C provou ser uma análise importante para a determinação da estrutura do TAG (VLAHOV, 1998; VLAHOV, 2010). Os cálculos de composição e distribuição de ácidos graxos entre as posições *sn*-1,3 e *sn*-2 no TAG podem ser facilmente realizadas. Os carbonos da carbonila ressonam de acordo com a cadeia insaturada e posições no glicerol, na faixa de frequências 172-174 ppm (SACCHI, et al., 1992).

3.1.7.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As estimativas dos teores de sólido e líquido em uma gordura, em diferentes temperaturas, têm importância para o desempenho do produto a temperaturas definidas. Estes teores podem ser determinados por DSC e procedimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em que se obtém o conteúdo de gordura sólida (CGS).

Quando um pulso de radiofrequência é aplicado a uma amostra, tal como gordura, induz-se um sinal de magnetização. A amplitude inicial deste sinal é

proporcional ao número de prótons presentes na amostra. Quando mais de um componente que contém próton (ex. gordura líquida e sólida) está presente, o decaimento de sinal que corresponde a cada componente é diferente. Há um decaimento inicial na intensidade do sinal de magnetização que é característico do componente sólido. A magnetização remanescente apresenta um decaimento mais lento, oriundo do componente líquido. Os tempos de decaimentos distintos representam os componentes sólido e líquido da amostra. Tomando-se dois sinais de decaimento em dois tempos, obtém-se o percentual de gordura sólida ou líquida (CAMPOS, 2005).

A curva de cristalização é obtida através da análise do conteúdo de gordura sólida (CGS), em função do tempo, para uma temperatura de análise previamente fixada. Através desta curva, é possível utilizar a equação de Avrami, por regressão não linear. Seus parâmetros descrevem a cinética de cristalização do produto. O modelo de Avrami (1939), adaptado para gorduras, está descrito pela equação 1:

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

Onde: CGS (t) é o conteúdo de gordura sólida (%) em função do tempo, CGS (∞) é o conteúdo de gordura sólida quando o tempo tende ao infinito, k é a constante de Avrami, que representa a velocidade de cristalização constante, n é o expoente de Avrami que indica o mecanismo de crescimento do cristal.

O expoente de Avrami é uma função combinada entre o tempo dependente de nucleação e o número de dimensões em que o crescimento ocorre. A nucleação pode ser instantânea, com núcleos que aparecem todos de uma vez, ou esporádica, com números de núcleos que aumentam com o tempo (CAMPOS, 2005). Possíveis valores para o expoente de Avrami para diferentes tipos de nucleação são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores do expoente de Avrami (n) para diferentes tipos de nucleação e crescimento

Expoente de Avrami (n)	Tipo de crescimento de cristal e nucleação
1 + 0 = 1	Crescimento em forma de agulha a partir de núcleos instantâneos
1 + 1 = 2	Crescimento em forma de agulha a partir de núcleos esporádicos
2 + 0 = 2	Crescimento em forma de disco a partir de núcleos instantâneos
2 + 1 = 3	Crescimento em forma de disco a partir de núcleos esporádicos
3 + 0 = 3	Crescimento esferulítico a partir de núcleos instantâneos
3 + 1 = 4	Crescimento esferulítico a partir de núcleos esporádicos

Fonte: Campos (2005).

3.1.7.5. Comportamento térmico - Calorimetria Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimetry - DSC*)

Calorimetria de varredura diferencial (DSC) é uma técnica de análise utilizada para monitorar alterações no comportamento térmico dos materiais em função da temperatura. Os fenômenos térmicos são observados pela variação de entalpia (BILIADERIS, 1983).

Esta técnica fornece medidas diretas sobre a energia envolvida nos processos de fusão e cristalização. Quando uma gordura é aquecida, esta pode exibir múltiplas fases de fusão, sendo que cada etapa de recristalização representa a transição de uma forma polimórfica menos estável para uma mais estável. A temperatura de transição de pico pode ser um importante indicador da forma polimórfica de um cristal, pois a forma cristalina mais estável possui ponto de fusão maior (ZEITOUN, 1993).

A Figura 5 descreve um resultado do termograma com transição de fase de cristalização e fusão. A liberação de energia durante o processo de cristalização é um evento exotérmico, sendo demonstrado no termograma como um pico exotérmico. Por outro lado, na fusão, a energia é absorvida, sendo então, um processo endotérmico, resultando em uma redução na taxa de energia no sistema, demonstrado no termograma como um pico endotérmico (CAMPOS, 2005).

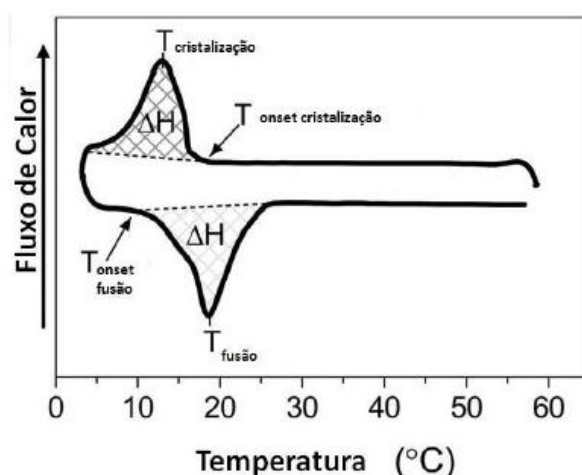


Figura 5. Eventos térmicos obtidos por DSC: Curvas de cristalização e fusão. (CAMPOS, 2005).

Os parâmetros típicos utilizados para descrever o comportamento térmico de uma amostra incluem:

- Temperatura de pico de cristalização (T_{pc}) e fusão (T_{pf}) – temperatura esta em que a maioria das espécies lipídicas se cristaliza ou se funde, sendo influenciada pela taxa de resfriamento ou fusão utilizada nas determinações;
- Temperatura *onset* de cristalização (T_{oc}) – é a temperatura em que são formados os primeiros cristais;
- Temperatura *onset* de fusão (T_{of}) – é a temperatura em que a amostra começa a fundir;
- Entalpia de cristalização (ΔH_c) e fusão (ΔH_f) - referem-se a entalpia da transição de fase;
- Temperatura final de cristalização (T_{fc}) e fusão (T_{ff}) – é a temperatura do final do fenômeno térmico.

Segundo Campos (2005), ao analisar amostras puras, o pico é muito estreito, indicando que todas as espécies cristalizarão em uma faixa estreita de temperatura. Este comportamento ocorre de forma diferente para sistemas complexos, tais como óleo comestível, onde há formação de cristais mistos, resultando em um pico mais largo, decorrente dos diferentes tipos de lipídios, propiciando em temperaturas de cristalização e fusão distintas.

3.1.7.6. Microscopia sob luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é o método mais conhecido para visualizar a microestrutura da rede cristalina de gorduras. Esta técnica fornece imagens nítidas da rede cristalina e o preparo das amostras é relativamente simples.

A Microscopia Sob Luz Polarizada distingue as fases sólida e líquida da gordura, que refletem a luz sob diferentes formas. A fase líquida da rede cristalina é isotrópica e apresenta as mesmas propriedades ópticas em todas as direções, apresentando-se escura sob a luz polarizada. A fase anisotrópica é a sólida e mostra uma orientação molecular definida e propriedades ópticas que variam com a orientação da luz incidente, sendo brilhante sob a luz polarizada. Este comportamento anisotrópico é conhecido como birrefringência (CAMPOS, 2005).

A análise qualitativa pode ser realizada a partir da avaliação visual das diferenças entre as imagens obtidas, classificando os cristais de acordo com a morfologia e o tamanho. Para análise quantitativa são usados parâmetros numéricos, entre eles o número total de cristais, o diâmetro médio dos cristais e a área cristalizada, que corresponde à razão entre a soma das áreas dos cristais e a área total da imagem (CAMPOS, 2005; GAMBOA; GIOIELLI, 2006).

3.1.7.7. Difração de raios-X

Difração de raios-X é utilizada para identificar polimorfismo em cristais, através da determinação das dimensões da unidade cristalina e sub-células, auxiliando no planejamento da aplicação da gordura. O princípio deste método consiste na excitação de um ânodo feito de um mineral, como cobre para a emissão de raios-X que são difratados pela estrutura cristalina em um determinado ângulo formado pelos planos dos átomos nesta estrutura. O ângulo depende da estrutura cristalina da amostra e o conjunto de picos que aparecem em uma função difratograma de raios-X como uma impressão digital analisada dos materiais, isto é, cada estrutura cristalina exibe um arranjo único dos picos do difratograma (GIOIELLI; SIMÕES; RODRIGUES, 2003).

A leitura de um difratômetro é feita por meio de um gráfico que fornece o registro das contagens por segundo (proporcional à intensidade difratada) *versus* a difração do ângulo 2θ (feixe transmitido). Devido às diferentes configurações

geométricas, os polimorfos difratam em diferentes ângulos, *short spacings* (SS) ou *long spacings* (LS). Os padrões de difração correspondentes aos *short spacings* (SS) das subcélulas identificam formas polimórficas em ordem crescente de estabilidade α , β' , e β . O LS e o SS são observados em ângulos de 1° a 15° e de 16° a 25° respectivamente, no sistema 2θ , em relação à posição do detector de raios-X e à sua direção de incidência (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002). A partir dos picos característicos pode-se identificar a forma polimórfica (TIMMS, 1984): forma α : um pico (ou SS) em 4.15 Å; forma β' : dois picos em 3.8 e 4.2 Å; forma β : um pico intenso em 4.6 Å que pode ser acompanhado de vários outros picos menores.

4. ARTIGOS

4.1. Comparação entre Interesterificação Enzimática e Química de Óleo de Girassol Alto Oléico e Óleo de Soja Totalmente Hidrogenado

Marilene D. M. Morselli Ribeiro, Chiu Chih Ming, Isabela M. Silvestre, Renato
Grimaldi, Lireny Ap. G. Gonçalves

Comparação entre Interesterificação Enzimática e Química de Óleo de Girassol Alto Oléico e Óleo de Soja Totalmente Hidrogenado

RESUMO

Lipídios estruturados (LE) foram preparados por interesterificação enzimática (IE) e química (IQ) do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) na proporção em massa de 50:50 (m/m). A IE foi catalisada pela lipase imobilizada Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*) isenta de solventes orgânicos, na dosagem de 7% a 70°C por 9 h e coletadas amostras para análise a 3h, 6h e 9h de reação. A mistura original e os produtos obtidos das reações química e enzimática foram avaliados quanto à composição em ácidos graxos (AG), triacilgliceróica, teor de gordura sólida (CGS), ponto de fusão, análise térmica (DSC) e distribuição regioespecífica dos ácidos graxos. A IE e IQ proporcionaram considerável rearranjo das classes de triacilgliceróis (TAG), apresentaram menor teor de TAG triessaturados e triinsaturados e aumentaram os TAG monoinsaturados e diinsaturados em relação à mistura original. Os LE obtidos por IE reduziram CGS com um derretimento linear, bem como mostraram ampla faixa de fusão por DSC, diminuindo o ponto de fusão. O monitoramento da reação demonstrou que houve menor migração acil na IE com 3 h de reação, sendo que no tempo máximo de reação, os resultados foram similares entre as técnicas. Os LE obtidos por meio da IE podem ter amplas aplicações em gorduras especiais para produtos de confeitaria e padaria, bem como de uso geral para margarina e gorduras.

Palavras-chave: Óleo de girassol alto oléico; Lipídios estruturados; Interesterificação; Lipases; Migração acil.

Símbolos: MI, mistura; IQ, interesterificação química; DAG, diacilgliceróis; DSC, calorimetria exploratória diferencial; IE, interesterificação enzimática; AG, ácido graxo; AGL, ácidos graxos livres; OSTH, óleo de soja totalmente hidrogenado; OGAO, óleo de girassol alto oléico; MAG, monoacilgliceróis; RMN, ressonância magnética nuclear; AGS, ácidos graxos saturados; AGI, ácidos graxos insaturados; CGS, conteúdo de gordura sólida; LE, lipídios estruturados; S₃, triessaturados; S₂U, dissaturados-monoinsaturados; U₂S, diinsaturados-monossaturados; U₃, triinsaturado; TAG, triacilgliceróis;

1. Introdução

Lipídios estruturados (LE) são triacilgliceróis modificados, obtidos por meio de interesterificação química ou enzimática, com a finalidade de alterar a composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol, que por sua vez, influenciam no polimorfismo e microestrutura da gordura [1]. A estrutura molecular dos TAG influencia o seu destino metabólico no organismo, bem como as suas características físicas (pontos de fusão e perfil de sólidos). Portanto, ao desenvolver um LE com estrutura química definida, é possível controlar o comportamento dos TAG, melhorando o efeito nutricional [2]. A reação de interesterificação é uma excelente alternativa para produção de gorduras com características funcionais e propriedades físicas desejadas para fabricação de alimentos [3-4].

O OGAO apresenta alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados (C18:1), com excelente estabilidade à oxidação e baixo teor de ácidos graxos saturados com aplicação ideal para fritura industrial, massas de biscoitos e misturas de gorduras [5]. O OTH é utilizado como “esqueleto” para produção de gorduras interesterificadas, sendo livre de ácidos graxos trans, rico em ácido esteárico (C18:0), com a adicional vantagem de fácil fornecimento e custo relativamente baixo do processo de hidrogenação total [6]. Apesar do alto teor de ácido graxo saturado (C18:0), não apresenta nenhum efeito adverso sobre o risco de doença cardiovascular [7].

A IQ é geralmente um processo aleatório e produz randomização posicional dos grupos acil nos TAG. A interesterificação catalisada por lipase é uma das alternativas tecnológicas de substituição do processo convencional de hidrogenação para reduzir ou eliminar os ácidos graxos *trans* em gorduras industriais.

Os LE sintetizados por métodos enzimáticos, que utilizam uma lipase específica 1,3 apresentam vantagem em relação à catalise química, tais como seletividade, regioespecificidade dos ácidos graxos, facilidade de recuperação do produto, reação em condições mais brandas, diminuição do dano térmico aos lipídios obtidos e controle sobre o processo [8-12]. Esta seletividade depende do tipo de enzima utilizada, forma de imobilização e as condições de reação. Um estudo mostrou que a IE de misturas de óleo de semente de camélia, estearina de palma e

óleo de coco, utilizando Lipozyme TL IM pode ser uma alternativa para produzir gorduras plásticas com aplicação comercial em formulações de margarinas [13]. Pande e Akoh [14] estudaram a obtenção de lipídios estruturados livres de ácidos graxos *trans* por IE para produção em margarinas, entre o óleo de soja com alto teor de ácido esteárico e estearina de palma. Yazdi & Alemzadeh [15] pesquisaram misturas de óleos de palma e girassol em reação IE, utilizando uma lipase imobilizada 1,3-específica. A condição ideal foi obtida a 64°C, dosagem de 8.9% de enzima e o tempo 3h de reação. Pesquisadores estudaram em um planejamento fatorial fracionário, os efeitos de determinados parâmetros reacionais (concentração de enzima, teor de umidade, tempo de reação, razão substrato, temperatura, e nível de agitação) durante a IE entre os óleos de soja e soja totalmente hidrogenada, utilizando dois tipos de enzimas imobilizadas (Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) [16]. OGAO foi modificado por acidólise enzimática com uma mistura de ácidos graxos para obter um LE equivalente de manteiga de cacau [17].

As reações catalisadas por lipase ocorrem em duas etapas, a hidrólise e a esterificação / interesterificação, e os diacilgliceróis (DAG) produzidos na primeira etapa são os reagentes na segunda etapa. A quantidade de DAG afeta o rendimento da reação e causa a migração acil ou a formação de subprodutos, e, como consequência, diminui o rendimento e pureza dos LE [18-19]. Recomenda-se controlar a quantidade de água para manter a integridade da enzima e aumentar a taxa de conversão da esterificação, diminuindo a hidrólise [3].

No presente estudo foram avaliadas as propriedades físico-químicas dos LE obtidos a partir da interesterificação enzimática catalisada por lipase específica *sn*-1,3 de mistura binária do óleo de girassol alto oléico e óleo de soja totalmente hidrogenado na proporção de 50:50. A duração da reação foi de 9 horas com monitoramento das propriedades físico-químicas, composição de TAG, classe lipídicas, conteúdo de gordura sólida (CGS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e migração acil a cada 3 horas. A IQ foi realizada como controle. Os LE obtidos com diferentes propriedades funcionais específicas e tempo controlado de reação podem apresentar uma melhor resposta na aplicação em uma ampla variedade de alimentos, como produtos de confeitaria, estabilizadores de estruturas cristalinas, aditivos em margarinas, entre outras finalidades.

2. Material e métodos

2.1. Material

Óleo de girassol alto oléico (OGAO) foi fornecido, após etapa de desodorização, pronto para consumo pela empresa Dow AgroSciences – distribuído pela Empresa Quantiq Ltda (São Paulo, Brasil) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) foi fornecido pronto para uso industrial pela Empresa Triângulo Alimentos S.A. (Itápolis, São Paulo, Brasil). A enzima imobilizada Lipozyme TL IM (lipase *Thermomyces lanuginosus*, *sn*-1,3 específica, atividade específica de 329 IUN / g: IUN = unidade de interesterificação) foi doada pela Empresa Novozymes do Brasil Ltda (Araucária – Brasil) e o catalisador químico metóxido de sódio em pó anidro a 99% adquirido de Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, USA.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação da mistura (MI)

Foram preparadas duas amostras de 100g da mistura de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) fundido na proporção de 50:50 (p/p). A mistura foi mantida a 80°C durante 30 min sob agitação magnética para destruir a memória cristalina. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.2. Condicionamento da enzima

Em escala laboratorial, primeiramente foi realizado o condicionamento da lipase *sn*-1,3 específica (Lipozyme TL IM) para remoção de ar e umidade. A Lipozyme TL IM apresenta um teor de água de 5% (p/p), sendo indicado pelo fabricante (Novozymes) reduzir esta umidade antes de realizar os experimentos para diminuir o teor de ácidos graxos livres (AGL) e mono e diacilgliceróis (MAG e DAG) por hidrólise da gordura. Foram adicionadas 100 g da mistura binária (item 2.2.1) em um balão de fundo redondo de 250 mL e, em seguida, aqueceu-se a referida amostra em um banho de óleo mineral a 70°C. Quando a mistura atingiu a

temperatura de 70°C foi adicionado 7% (p/p) de enzima e iniciada a agitação magnética a 300 rpm sob atmosfera de nitrogênio, durante 30 min. Foi observada a eliminação do ar, até que não existissem mais bolhas saindo pelos grânulos. A agitação foi desligada, esperando a decantação da enzima e a mistura do óleo foi retirada com uma pipeta pela parte superior. A enzima condicionada foi utilizada imediatamente no item 2.2.3.

2.2.3. Interesterificação enzimática (IE)

100g da mistura binária produzida no item 2.2.1. foi adicionada no balão de fundo chato contendo 7% (m/m) da enzima condicionada (2.2.2.) e aquecida em um banho de óleo mineral a 70°C com agitação magnética de 300 rpm sob atmosfera de nitrogênio. O período total de reação foi de 9h e coletadas amostras de 30g em tubos com tampa a cada 3h para análises, mantendo a agitação. Foi passado nitrogênio puro na mistura, fechou-se o tubo de vidro submetendo-o durante 10 min, a um banho de água a 95°C para inativação da enzima. Foi determinado o teor de AGL pelo método AOCS Ca 5a-40 [20] e calculado como ácido oleico (% em peso). Para a remoção dos AGL, a amostra foi filtrada dentro de um funil de separação de parede dupla com banho de água aquecida para evitar a solidificação da mistura. Foram adicionadas 5 gotas de solução de fenoltaleína e em seguida uma solução de NaOH 0,2M, quantidade pré-determinada na análise de ácidos graxos livres. A mistura interesterificada foi lavada com água quente (50-60°C), até desaparecer a coloração rósea, e em seguida, foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro para remoção da umidade e partículas de biocatalisador. Os produtos foram secos sob vácuo a 110°C durante 30 min. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.4. Interesterificação química (IQ)

As reações de interesterificação química foram realizadas para as mesmas proporções de OGAO e do OTH da catálise enzimática. Em escala laboratorial, 100g de cada mistura, sob agitação magnética, foi interesterificada na presença de 0,4% (m/m) de metóxido de sódio à temperatura de 100°C. O tempo de

reação foi de 20 min, sob vácuo, de acordo com a otimização realizada por Grimaldi, Gonçalves e Ando [21]. Para interromper a reação foram adicionados 3 mL de solução de ácido cítrico 5% (5g/100mL). As amostras interesterificadas foram lavadas com água destilada (80°C). Para reter a umidade dos produtos foi adicionado sulfato de sódio anidro no papel de filtro e, em seguida, os mesmos foram filtrados sob vácuo e secos a 110°C por 30 min. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.5 Composição em ácidos graxos (AG)

Método AOCS Ce 1f-96 [20]. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados de acordo com o método de Hartman e Lago [22]. As condições de operação do cromatógrafo foram: Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, coluna capilar DB-23 Agilent (50% cianopropil-metilpolisiloxano), dimensões: 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm. Condições de análise: temperatura do forno: 110°C- 215°C (5°C/min), 215°C – 24min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: hélio; razão split 1:50; volume injetado: 1,0 µL. A composição qualitativa foi determinada por comparação do tempo de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.6. Composição em triacilgliceróis (TAG)

A composição triacilglicerólica foi obtida segundo método AOCS Ce 5-86 [20], em cromatógrafo fase gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System). Coluna capilar DB-17HT (Agilent Catalog 122-1811 - 50%-fenilmetilpolisiloxano), 15m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno, 0,15 µm de filme. Condições de análise: injeção split, razão de 1:100; temperatura da coluna: 250°C, programada até 350°C à razão de 5°C/min; gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 360°C; temperatura do detector: 375°C; volume injetado: 1,0 µL; concentração da amostra: 10 mg/mL de tetrahidrofurano. A identificação dos grupos de TAG foi realizada mediante comparação dos tempos de retenção segundo os procedimentos de Antoniosi Filho, Mendes e Lanças [23]. As

análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.7. *Rendimento de interesterificação (RI, %)*

O rendimento de interesterificação (RI) foi definido de acordo com a Eq. (1) [24]:

$$RI(\%) = \frac{\Sigma(TAG_I)_t - \Sigma(TAG_I)_0}{\Sigma(TAG_D)_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: TAG_I= concentração (g/100g) dos triacilgliceróis cuja concentração aumentou durante a reação; TAG_D= concentração (g/100g) dos triacilgliceróis cuja concentration diminuiu durante a reação. Os índices “t” and (0) representam a concentração de TAG em um tempo qualquer de reação e na mistura inicial, respectivamente.

2.2.8. *Classes de lipídios*

A determinação da classe de lipídios (TAG, DAG, MAG e AGL) foi realizada por cromatografia de alta performance em um instrumento Perkin Elmer series 250 (Waltham, MA, USA), equipado com um Sicon Analytic detector de índice de refração (Hitachi High Tecnologias América, Schaumburg, IL, EUA), e duas colunas (500 Å , 300 x 7,8 mm e 100 Å ,300 x 7,8 mm) (Jordi Gel DVB, Apple Valley, MN, EUA). Condições de análises: as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em tetrahydrofurano; fase móvel: tetrahydrofurano (grau HPLC); fluxo: 1 mL/min; volume injetado: 20.0 µL [28]. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.9. *Conteúdo de gordura sólida (CGS) e ponto de fusão (PF)*

CGS foi determinado utilizando espectrometria de ressonância nuclear magnética com equipamento Bruker Minispec pc 120 (Silberstreifen, Rheinstetten, Alemanha) e com auxílio de banhos secos de alta precisão (0 – 70°C) Tcon 2000 (Duratech, Carmel, IN, EUA). O método utilizado foi AOCS Cd 16b-93 [20]: método

direto, com leitura das amostras em série, nas temperaturas de 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C, com temperagem para gorduras não estabilizadas. As análises foram realizadas em triplicata e cada resultado foi expresso como a média das três determinações.

O ponto de fusão foi calculado pela temperatura correspondente ao CGS obtido pela curva de RMN [26-28]. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.10. Análise térmica

Perfis de fusão das amostras foram determinados em calorímetro diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimeters* – DSC) modelo Q2000 (TA Instruments) conforme o método AOCS Cj 1-94 [20]. As condições de análise foram: 8-12 mg das amostras foram pesadas em recipientes de alumínio (40µL) e seladas. A calibração foi realizada com índio (PF=156,5°C, ΔH_f =28,45J/g). As amostras foram aquecidas a 80°C a 10°C/ min e mantidas durante 10 min. As amostras foram, em seguida, resfriadas para -60°C a 10°C/ min e mantidas durante 30 min e finalmente aqueceu-se a 80°C a 5°C / min. Os termogramas obtidos foram normalizados com base na massa das amostras. Através do *software* do equipamento, foram determinadas: temperatura onset de fusão (Tof), temperatura de pico de fusão (Tpf), entalpias de fusão (ΔH_f) e temperaturas finais de fusão (Tff). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.11. Distribuição regioespecifica

Aproximadamente 150 mg das amostras foram liquefeitas por aquecimento com ar quente e, imediatamente, dissolvidas em clorofórmio deuterado (500 µL, $CDCl_3$) e desoxigenado por fluxo de nitrogênio com tetrametilsilano (1%,TMS) como referência de deslocamento químico. As misturas foram mantidas em ultrassom a 60°C até obtenção de soluções homogêneas e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Espectros quantitativos de RMN ^{13}C foram adquiridos sem giro a 30°C utilizando o sistema de automação ICON NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) com um espectrometro Bruker Avance-III (500 MHz) operando a 125.69 MHz para o ^{13}C , equipado com uma sonda Broadband Observe (BBO) de 5-mm. Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: ^{13}C pulso

de excitação 90 ° para 10 μ s, varredura de largura de 238 ppm, tempo de repetição de 25 s (tempo de aquisição 10 s + atraso de relaxamento de 15 s), número de exames 128 e ganho do receptor ajustado automaticamente. O tempo experimental foi de 55 min. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível diferenciar ácidos graxos insaturados (AGI) (170,88 ppm) e ácidos graxos saturados (AGS) (170,91 ppm) esterificados na posição *sn*-2 do TAG, e AGI (171,29 ppm) e AGS (171,32 ppm) esterificados nas posições *sn*-1,3 do TAG. O assinalamento dos AGI e AGS foi realizado com base no efeito indutivo da dupla ligação sobre o grupo carbonila [29]. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.12. Análise estatística

Os dados obtidos pelas análises de classes de lipídios e ponto de fusão foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com o sistema de software STATISTICA versão 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Testes de Tukey foram aplicados para comparações estatísticas dos meios, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição em ácidos graxos

As composições em AG das matérias primas e mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50) são apresentadas na Tabela 1. O principal AG do OGAO foi o ácido oléico (87,4%) e o valor total de AGI foi de 93,1%. Valores semelhantes para esta matéria prima foram encontrados nos estudos de Segura *et al.* [30].

Tabela 1

Composição em ácidos graxos (%) das matérias primas e mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50).

Ácidos Graxos	OGAO	OSTH	OGAO/OSTH (50:50)
C14:0 (mirístico)	ND	0,1	ND
C16:0 (palmítico)	3,7	11,5	8,0
C18:0 (esteárico)	3,2	86,6	45,3
C18:1 (oléico)	87,4	0,1	43,5
C18:2 (linoleico)	5,8	0,2	3,0
C20:0 (araquídico)	ND	0,8	ND
C22:0 (behênico)	ND	0,5	0,2
C24:0 (lignocérico)	ND	0,2	ND
Σ Saturados	6,9	99,7	53,5
Σ Insaturados	93,1	0,3	46,5

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

No OSTH, o AG predominante foi o ácido esteárico (86,6%), seguido pelo ácido palmítico (11,5%), ambos ácidos graxos de cadeia longas e saturadas, que compõem 99,7% de sua estrutura. Li *et al.* em seu estudo para OSTH encontraram 82,6% de ácido esteárico e 13,5% de ácido palmítico [31]. A interesterificação é um processo catalítico que não altera a composição dos ácidos graxos das matérias primas iniciais, envolve somente o rearranjo dos grupos acil nos TAG formados [32].

3.2. Composição em Triacilgliceróis

Cada gordura apresenta uma relação direta entre a composição dos TAG e as propriedades físicas exibidas [33]. A Tabela 2 apresenta os resultados para a composição em TAG das misturas e as amostras após as reações de IQ e IE na proporção 50:50. Para o OGAO os TAG predominantes são OOO (80,4%), seguidos por POO/OPO (11,2%), OOL/OLO (5,8%) e OLL (2,1%), enquanto que para OSTH o TAG majoritário foi StStSt (65,1%), seguidos por PStSt/StPSt (30,9%) e PPSt/PSStP (4,0%). No caso da mistura, os TAG em maior concentração foram OOO (40,4%) e StStSt (32,5%), seguidos por PStSt/StPSt (15,5%). Observou-se que após as reações de interesterificação química e enzimática houve uma mudança significativa nas composições de TAG quando comparadas à mistura. Novos TAG foram

formados como StStO/StOSt, StOO/StOSt, PStO/POSt e PPO/POP. Foi observado um aumento substancial nos StOO/OSO e StStO/StOSt, enquanto que OOO e StStSt apresentaram uma redução significativa. Na IE houve um aumento do conteúdo de StStO/StOSt de 21,6 a 31,2% e StOO/OSTO de 20,0 a 24,9% ao longo das 9h de reação.

Tabela 2

Composição em triacilgliceróis (%) e por número de carbono (NC) das matérias primas, mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50), após interesterificações química (IQ) e enzimática (IE) com 3, 6, e 9 horas de reação.

TAG NC	TAG	OGAO	OSTH	OGAO/OSTH (50:50)				
				MI	IQ	IE 3H	IE 6H	IE 9H
50	PPSt/PStP	ND	4,0	2,0	1,6	1,0	1,0	1,5
	PPO/POP	0,5	ND	ND	0,3	0,9	1,0	1,0
52	PStSt/StPSt	ND	30,9	15,5	7,2	5,2	4,9	6,7
	PStO/POSt/ StPO	ND	ND	ND	5,4	9,5	9,4	9,0
	POO/OPO	11,2	ND	5,6	4,5	4,3	3,9	3,6
54	StStSt	ND	65,1	32,5	10,9	18,2	19,6	12,8
	StStO/StOSt	ND	ND	ND	31,5	21,6	27,0	31,2
	StOO/OSTO	ND	ND	ND	27,4	24,9	20,6	20,0
	OOO	80,4	ND	40,4	9,2	10,6	9,0	10,5
	OOL/OLO	5,8	ND	2,9	2,0	2,8	2,6	2,4
	OLL/LOL	2,1	ND	1,1	ND	1,0	1,0	1,3

P: ácido palmítico; St: ácido esteárico; O: ácido oléico; L: ácido linoléico; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

Ahmadi *et al.* [34] estudaram as IQ e IE em diferentes proporções do OGAO e óleo de canola totalmente hidrogenado. Os resultados encontrados mostram que os conteúdos de StStSt e OOO diminuíram e os conteúdos de StStO/StOSt e StOO/OSTO aumentaram significativamente em relação às misturas. Uma forma mais fácil de interpretar a composição de TAG da Tabela 2 foi demonstrá-la pelos quatro tipos de TAG obtidos (Tabela 3): S₃ (trissaturado), S₂I (dissaturados-monoin saturados), I₂S (diinsaturados-monosaturados) e I₃ (triinsaturados).

Tabela 3

Triacilgliceróis trissaturados (S_3), dissaturados-monoin saturados (S_2I), di-insaturados-monossaturados (I_2S) e tri-insaturados (I_3) (g/100g) da mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50), após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) com 3, 6, e 9 horas de reação.

TAG	OGAO	OSTH	MI	IQ	IE 3H	IE 6H	IE 9H
S_3	ND	100,0	50,0	19,7	24,4	25,5	21,0
S_2I	0,5	ND	ND	37,2	32,0	37,4	41,2
I_2S	11,2	ND	8,5	31,9	29,2	24,5	23,6
I_3	88,3	ND	41,5	11,2	14,4	12,6	14,2

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado; ND: não detectado.

A IQ e IE diminuiu a quantidade de S_3 e I_3 , aumentando a quantidade de S_2I e I_2S . Na catálise enzimática o conteúdo de S_3 foi maior ao da catálise química. Houve um aumento gradativo do S_2I e uma diminuição do I_2S durante o período de reação de IE. Para avaliar o desempenho catalítico da enzima imobilizada na troca dos ácidos graxos entre as moléculas de TAG, o rendimento da interesterificação (RI%) foi calculado de acordo com Eq. (1) (pág. 45). O rendimento de interesterificação (RI) variou de 56,9% a 3h de reação, 58,0% a 6h e 61,2% a 9h.

3.3. Classes de lipídios

Durante a reação de interesterificação houve formação de acilgliceróis parciais tais como DAG e MAG. A produção de acilgliceróis parciais, devido a migração acil é afetada pela temperatura, tempo, quantidade de enzima, razão de substrato e conteúdo de água [8]. Na reação de IE os valores de DAG (8,3 -13,5%) foram maiores ($p \leq 0,05$) que na reação IQ (5,1%), aumentando com o tempo de reação (Tabela 4). Lee *et al.* [35] sintetizaram por IE uma fração rica em tripalmitina da estearina de palma com oleato de etila e obtiveram resultados de 9.1% de DAG e 1,6% de MAG. De acordo com Domingues *et al.* [36], o catalisador de metóxido de sódio utilizado industrialmente nas quantidades entre 0,1 e 0,4% pode produzir valores maiores que 9% destes lípidos minoritários. Masuchi *et al.* [37] e Guedes *et al.* [38] avaliaram a interesterificação química de diferentes materiais lipídicos com 0,4% de metóxido de sódio e os resultados dos níveis de DAG foram de 4,8 - 9,6%

Tabela 4

Composição de acilgliceróis (%), triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG) e ácidos graxos livres (AGL) da mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50) , após a interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) com 3, 6, e 9 horas de reação.

	TAG	DAG	MAG + AGL
50:50 MI	99,6 $\pm$ 0,1 ^a	0,00	0,4 $\pm$ 0,1 ^a
50:50 IQ	93,8 $\pm$ 0,1 ^b	5,1 $\pm$ 0,3 ^a	1,1 $\pm$ 0,2 ^b
50:50 IE3H	91,3 $\pm$ 0,9 ^{bc}	8,3 $\pm$ 1,0 ^b	0,4 $\pm$ 0,1 ^a
50:50 IE6H	90,5 $\pm$ 0,4 ^c	9,2 $\pm$ 0,1 ^b	0,3 $\pm$ 0,0 ^a
50:50 IE9H	81,7 $\pm$ 0,6 ^d	13,5 $\pm$ 0,4 ^c	4,8 $\pm$ 0,1 ^c

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado. Letras iguais na mesma coluna indicam que não existem diferenças significativas entre as médias avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Pesquisadores revisaram várias publicações sobre a cristalização de gorduras e a influencia de componentes minoritários e aditivos [39]. Foi descrito que a quantidade de DAG, MAG e AGL nas gorduras pode variar e influenciar na sua cristalização. O efeito dos compostos minoritários da nucleação ao crescimento do cristal e o comportamento na fase polimórfica depende da similaridade entre a gordura e dos próprios componentes minoritários.

3.4. Conteúdo de gordura sólida e ponto de fusão

O CGS da mistura original e dos produtos interesterificados é apresentado na Fig.1. O aumento da plasticidade nas gorduras dos produtos interesterificados, deve-se ao alto teor de S_2I e I_2S [40]. Houve fusão completa da mistura, das gorduras interesterificadas via catalise química e enzimática na faixa de 60°C a 65°C e o conteúdo de gordura sólida a 25°C foi acima de 25,0%. A interesterificação resultou numa diminuição acentuada do CGS a partir de 30°C em relação à mistura. A 35°C, o CGS da mistura foi de 42,0%. Após a reação, os valores correspondentes foram de 31,7% para química e 26,1%, 25,6% e 24,8% para enzimática nos tempos de 3, 6 e 9 h, respectivamente. Este efeito está associado com uma redução nos S_3 e um aumento simultâneo nas porcentagens de S_2I e I_2S (Tabela 3), que refletem nas curvas de sólidos [41]. Comparando o CGS da gordura interesterificada enzimática a 3, 6 e 9 h houve uma diminuição de 48,4% para 45,7% a 25°C e a fusão completa a 60°C. Estas gorduras interesterificadas são

apropriadas para serem utilizadas em produtos que necessitem de estrutura ou são produtos de partida indicados como base para gorduras industriais.

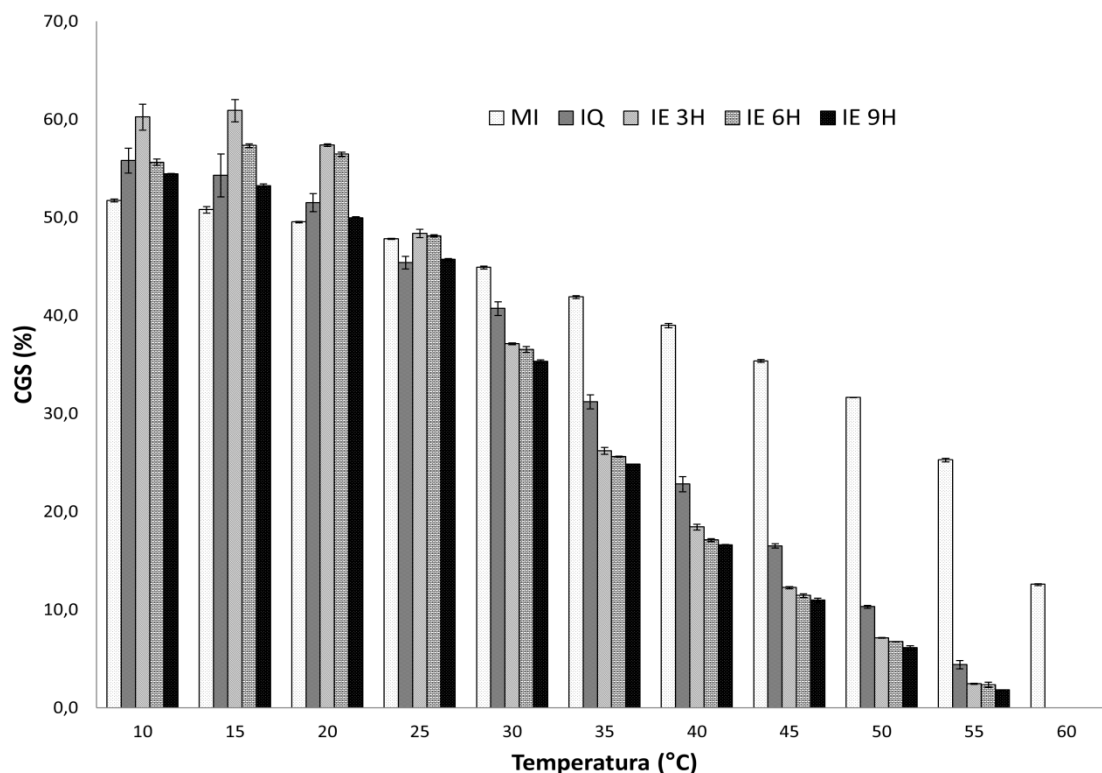


Fig.1. Conteúdo de gordura sólida (%) da mistura OGAO:OSTH (50:50) (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) com 3H, 6H e 9H de reação. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

Portanto, o ponto de fusão das gorduras interesterificadas (Tabela 5) muda em relação à sua mistura original (63,5°C), diminuindo após a reação. Nas gorduras obtidas por IE, a temperatura de fusão foi menor (53-52°C) ($p < 0,5$) com relação a catálise química (55°C) e não apresentou diferença significativa ($p > 0,5$) entre as temperaturas de fusão no período monitorado da reação enzimática. Assim, as características que interferem no ponto de fusão e, portanto, na propriedade física da gordura são o tamanho da cadeia do AG, insaturação e a distribuição específica dos AG em cada posição do TAG. Valores altos de ponto de fusão indicam que estas gorduras são de uso específico para gorduras ou *blends* que fornecem estrutura a um sistema de gorduras, sendo então considerada uma *hardstock*, ou *hardfat*.

Tabela 5

Ponto de fusão (°C) das amostras da mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) com 3, 6 e 9 horas de reação.

	MI	IQ	IE3H	IE6H	IE9H
Ponto de fusão (°C)	63,5± 0,5 ^a	55±0,5 ^b	53±0,5 ^c	53±0,5 ^c	52±0,5 ^c

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado. Mesmas letras para as mesmas colunas indicam que não existem diferenças significativas entre as médias avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5. Análise térmica

Existe uma relação direta entre a composição dos TAGs e o seu comportamento de fusão. As curvas de fusão da mistura e dos produtos interesterificados são mostradas na Fig. 2. A mistura apresentou 2 picos de fusão, o primeiro (A) relacionado aos TAG insaturados de menor ponto de fusão (-0,4°C) correspondente ao OGAO e o segundo (B) mais acentuado aos TAG saturados de maior ponto de fusão do OSTH (64°C). Após a interesterificação foi observada alteração nos eventos de fusão com formação de novos compostos (S₂U e U₂S) (Tabela 2). A IQ apresentou 3 picos de fusão, onde o pico C são TAG de maior ponto de fusão (56°C), seguidos do pico D de TAG de ponto de fusão intermediário com uma faixa extensa de fusão (34-52°C) e pico E de TAG de menor ponto de fusão (20°C). A IE apresentou somente 2 picos de fusão (D e E), demonstrando ser uma reação seletiva comparada a IQ. Durante o período de reação enzimática de 3h a 9h houve uma redução dos TAG de maior ponto de fusão, estreitando a faixa de fusão do pico D.

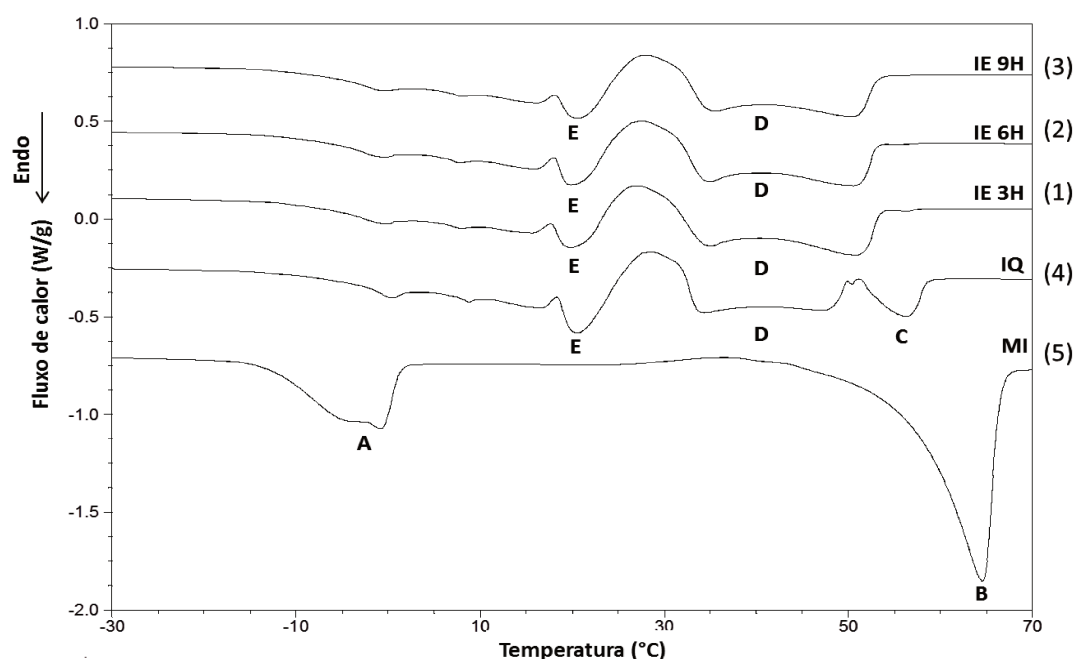


Fig.2. Evento térmico de fusão da mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50) (5), após interesterificação química (IQ) (4) e após enzimática (IE) com 3h (1), 6h (2), 9h (3) de reação. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

A reação de interesterificação enzimática de óleo de palma e frações com Lipozyme TL IM foram monitoradas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) por Danthine *et al.* [42]. Os resultados deste estudo descrevem como DSC pode ser utilizado para monitorar quantitativamente a interesterificação enzimática. Complementar ao método comum, utilizando dados do conteúdo de gordura sólida, a vantagem do DSC é apresentar maior sensibilidade na aquisição de dados e avaliando pequenas modificações na composição.

3.6. Distribuição regioespecífica

Os AGS e AGI estão distribuídos nos TAG e a distribuição regioespecífica confere efeitos nutricionais e funcionalidade à gordura. É comum entre óleos e gorduras vegetais naturais os AGS predominarem nas posições *sn*-1,3. A Fig. 3 apresenta a distribuição de AGS e AGI (%) nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 dos TAG na mistura e nos LE obtidos por IQ e IE, analisados por RMN ^{13}C . Na mistura as proporções de AGS e AGI são semelhantes (50%). Na IQ houve uma diminuição para 42,1% do AGI e um aumento para 57,9% do AGS na posição *sn*-2, quando

comparados aos resultados da mistura. Na IE os valores de AGI na posição *sn*-2 diminuem em relação ao tempo de reação, devido à migração acil. No período de 9h foi o menor teor de AGI de 41,5%, enquanto foi de 43,6% para 6h de reação. O maior valor de AGI foi de 47,4% para o tempo de 3h da reação enzimática. De acordo com o estudo de Lee *et al.* [35] o mínimo de migração acil foi obtido nas condições da reação de 50°C, 3h e na proporção 5,5 molar do substrato por interesterificação enzimática de estearina de palma e oleato de etila. Na produção de LE por acidólise catalisada por lipase em dióxido de carbono supercrítico também foi reportado, que longos tempos de reação causam aumento de migração acil [43].

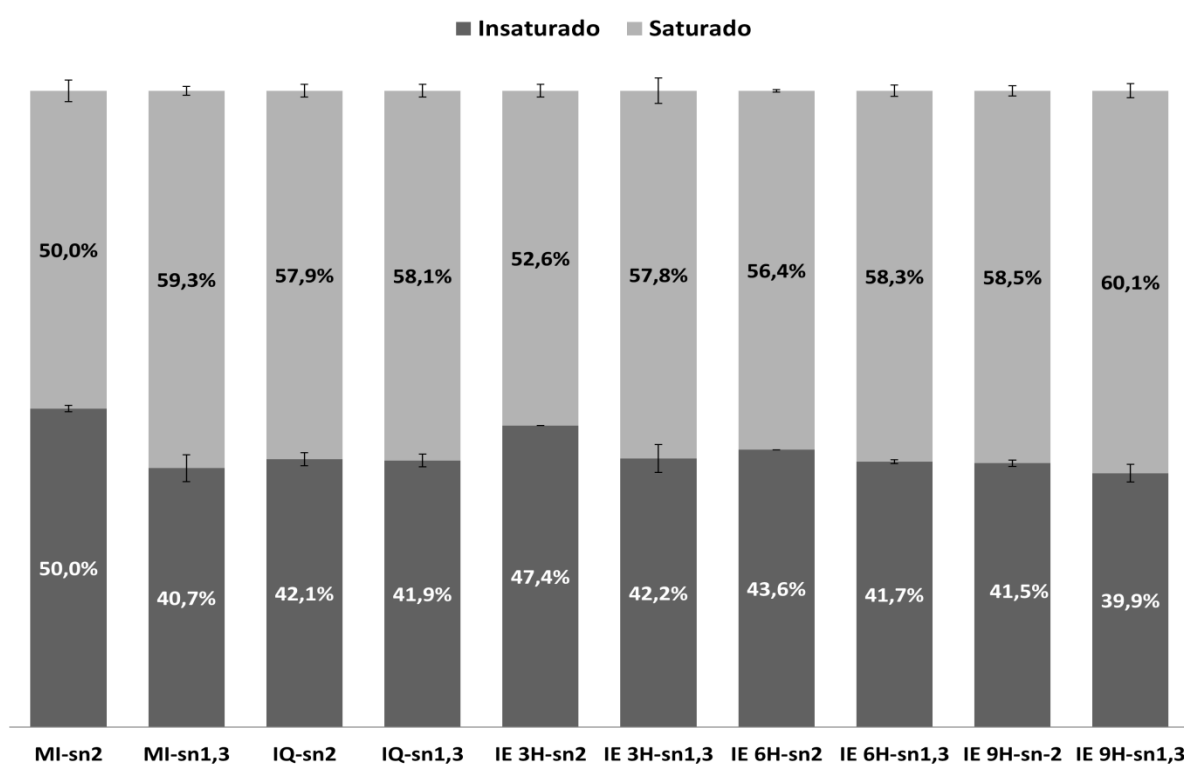


Fig. 3. Distribuição de ácidos graxos (%) nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 dos TAG na mistura (MI) OGAO:OSTH (50:50) após interesterificações química (IQ) e enzimática (IE) com 3h, 6h e 9h de reação. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

Uma predominância de AGS nos LE por IE na posição *sn*-1,3 foi observada, na faixa de 57,8% a 60,1%, enquanto os níveis de AGI foram de 39,9% a 42,2%. Também foi observado que um maior tempo de reação maior que 3 h, resulta na migração de AGI a partir da posição *sn*-2 para a posição *sn*-1,3.

IE dos óleos de girassol alto oléico e canola totalmente hidrogenado foram estudados após reação a 68°C, com 5% lipase imobilizada *sn*-1,3 por 24h de reação e comparados com IQ. Os autores observaram que os valores de *sn*-2 eram

iguais para ambas as reações e que possivelmente o longo tempo de reação resultou em uma taxa alta de migração acil, explicando a distribuição aleatória dos AG [34].

4. Conclusão

Ambos os processos de interesterificação química e enzimática promoveram alteração dos produtos obtidos em relação às misturas, como diminuição do ponto de fusão, reduziu o teor de sólidos em temperaturas elevadas, e alteração no comportamento térmico. O processo enzimático no tempo de reação de 3h apresentou como vantagem a seletividade na formação de novos TAG, menor migração acil em relação aos demais tempos, observado pelo monitoramento por RMN ^{13}C e menores níveis de acilgliceróis parciais. Os LE obtidos através da IE podem ter amplas aplicações em gorduras especiais para produtos de confeitaria e padaria, e como propósito geral para margarina e gorduras.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio das agências brasileiras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), os fornecedores das matérias primas DOW AgroScience, Quantiq Ltda., Triângulo Alimentos S.A. e Novozymes do Brasil Ltda.

6. Referências

- [1] Christophe, A. B., in: Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use. Ed. CHRISTOPHE, A.B., AOCS Press, 1998, 139-149.
- [2] Iwasaki, Y., Yamane, T., Enzymatic synthesis of structured lipids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2000, 10, 129-140.

- [3] Osborn, H. T., Akoh, C. C., Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Sci. Food Saf.* 2002, 3, 93-103.
- [4] Xu, X., Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 289–304.
- [5] Roman, O., Heyd, B., Broyart, B., Castillo, R. et al., Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *Food Sci. Technol.* 2013, 52, 49-59.
- [6] Otero, C., Hernandez, A. L., García, H. S., Martín, E.H. et al., Continuous enzymatic transesterification of sesame oil and a fully hydrogenated fat: Effects of reaction conditions on product characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 94, 877-887.
- [7] Hunter, J. E., Dietary levels of trans-fatty acids: Basis for health concerns and industry efforts to limit use. *Nutr. Res.* 2005, 25, 499–513.
- [8] Akoh, C. C., Making new structured fats by chemical reaction and enzymatic modification. *Lipid Technol.* 1997, 5, 61-66.
- [9] Yang, T., Freukilde, M. B., Xu X., Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2003, 80, 881–887.
- [10] Lopez-Hernandez, A., Garcia, H. S., Hill, C. G. Jr., Lipase catalyzed transesterification of medium-chain triacylglycerols and fully hydrogenated soybean oil. *Food Sci.* 2005, 70, 365–372.
- [11] 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. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 2006, 83, 739–745.

- [12] Wang, H., Wu, H., Ho, C., Weng, X., Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chem.* 2006, 97, 661–665.
- [13] Ruan, X., Zhu, X. M., Xiong, H., Wang, S. et al., Characterization of zero-trans margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. *Food Sci. Technol.* 2014, 49, 91–97.
- [14] Pande, G., Akoh, C.C., Enzymatic synthesis of trans-free structured margarine fat analogs with high stearate soybean oil and palm stearin and their characterization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013, 50, 232-239.
- [15] Yazdi, Z. K., Alemzadeh, I., Improvement of palm oil and sunflower oil blends by enzymatic interesterification. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2011, 46, 1093–1099.
- [16] Pacheco, C., Palla, C., Crapiste, G. H., Carrín, M. E., Optimization of reaction conditions in the enzymatic interesterification of soybean oil and fully hydrogenated soybean oil to produce plastic fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013, 90, 391–400.
- [17] Kadivar, S., Clercq, N., Walle, D., Dewettinck, K., Optimisation of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic sunflower oil. *J. Sci. Food Agr.* 2014, 94, 1325-1331.
- [18] Xu, X., Skands, A. R. H., Hoy, C. E., Mu, H., Balchen, et al., Production of specific- structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 1179-1186.
- [19] Xu, X.; Shands, A. R. H., Nissen, J., Hoy, C. E., Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: Preliminary study on incorporation and acyl migration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 301–308.
- [20] AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 6th Ed. American Oil Society. Champaign 2009.

- [21] Grimaldi, R., Gonçalves, L. A. G., Ando, M. Y., Otimização da reação de interesterificação química de óleo de palma. *Quim. Nova.* 2005, 28, 633-636.
- [22] Hartman, L., Lago, R., Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 1973, 22, 475–476.
- [23] Antoniosi Filho, N., Mendes, O. L., Lanças, F. M., Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, 1995, 40, 557-562.
- [24] Nunes, G. F. M., Paula, A. V., Castro, H. F., Santos, J. C. Compositional and textural properties of milkfat–soybean oil blends following enzymatic interesterification. *Food Chem.*, 2011, 125, 133–138.
- [25] Dobarganes, M. C., Velasco, J., Dieffenbacher, A., Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 1563–1575.
- [26] Goh, E. M., Ker, T. H., Relationship between slip melting point and pulsed NMR data of palm kernel oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68, 144–146.
- [27] Karabulut, I., Turan, S., Ergin, G., Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *Euro. Food Res. Technol.* 2004, 218, 224-229.
- [28] Ribeiro, A. P. B., Grimaldi, R., Gioielli, L. A., Gonçalves, L. A. G., Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: physico-chemical properties and food applications. *Food Res. Int.*, 2009, 42, 401–410.
- [29] Vlahov, G., Giuliani, A. A., Del, R. P., ¹³C NMR spectroscopy for determining the acylglycerol positional composition of lampante olive oils. Chemical shift assignments and their dependence on sample concentration. *Anal. Methods.* 2010, 2, 916–923.

- [30] Segura, N., Silva, R. C., Soares, F. S., Gioielli, L. A. et al., Valorization of beef tallow by lipase-catalyzed interesterification with high oleic sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001, *88*, 1945–1954.
- [31] Li, D., Adhikari, P., Shin, J. A., Lee, J.-H. et al., Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats. *Food Sci. Technol.* 2010, *43*, 458–464.
- [32] Rozendaal, A., Macrae, A.R. In: F. D. Gunstone, & F. B. Padley (Eds.), *Lipids Technologies and applications*. Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 223-264.
- [33] Rousseau, D., Marangoni, A. G., in: Akoh, C.C. & Min, D.B. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 2002, pp. 301–333.
- [34] Ahmadi, L., Wright, A. J., Marangoni, A. G., Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein rich blends: chemical composition, solid fat content and thermal properties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, *110*, 1014-1024.
- [35] Lee, J. H., Som, J. M., Akoh, C. C., Kim, M. R. et al., Optimized synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *New Biotechnol.* 2010, *27*, 38-45.
- [36] Domingues, M. A. F., Ribeiro, A. P. B., Kieckbusch, T. G., Gioielli, L. A. et al., Advances in lipids crystallization technology – Chapter 5. In: Mastai, Y. *Advanced topics in crystallization*. In Tech Open Access Publisher, 2015, p.105-132.
- [37] Masuchi, M.H., Gandra, K. M., Marangoni, A. L., Perenha, C. S. et al., Fats from chemically interesterified high-oleic sunflower oil and fully hydrogenated palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, *91*, 859-866.

- [38] Guedes, A. M. M., Ming, C. C., Ribeiro, A. P. B., Silva, R. C. et al., Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated *Crambe abyssinica* oil and Soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, *91*, 111–123.
- [39] Smith, K. W., Bhaggan, K., Talbot, G., van Malssen, K. F. Crystallization of fats: influence of minor components and additives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011, *88*, 1085–1101.
- [40] O'Brien, R. D. Fats and oils: formulating and processing for applications. CRC Press, New York, 2004.
- [41] Rousseau, D. R., Marangoni A. G., in: Marangoni AG, Narine S, *Physical Properties of Lipids*. CRC Press, New York, 2002a.
- [42] Danthine, S., Clercq, N., Dewettinck, K., Gibon, V., Monitoring batch lipase catalyzed interesterification of palm oil and fractions by differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2014, *115*, 2219–2229.
- [43] Kim I-H, Ko S-N, Lee S-M, Chung S-H. et al., Production of structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis in supercritical carbon dioxide: Effect on acyl migration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2004, *81*, 537-541.

**4.2. Interesterificação enzimática de óleo de girassol alto oléico e
óleo de soja totalmente hidrogenado:
propriedades físico-químicas**

Marilene D. M. Morselli Ribeiro, Chiu Chih Ming, Thiago I.B. Lopes
Renato Grimaldi, Anita J. Marsaioli, Lireny Ap. G. Gonçalves

Interesterificação enzimática de óleo de girassol alto oléico e óleo de soja totalmente hidrogenado: propriedades físico-químicas

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a interesterificação enzimática (IE) de misturas de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) nas proporções de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p), respectivamente. Foi utilizada a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) na dosagem de 7% a 70°C por 3h. As misturas originais e interesterificadas foram avaliadas quanto à composição triacilglicerólica, conteúdo de gordura sólida, comportamento térmico, distribuição regioespecífica, cinética de cristalização, microestrutura e polimorfismo. A interesterificação proporcionou diminuição na concentração dos triacilgliceróis (TAG) trissaturados e trinsaturados e aumento na proporção de mono e dissaturados. Os termogramas (eventos) de fusão apresentaram ampla faixa de fusão e houve diminuição no conteúdo de gordura sólida. O diâmetro médio dos cristais foi reduzido e alterada a morfologia dos lipídios estruturados (LE). A variação da constante de Avrami (k) e do expoente (n) mostrou que a interesterificação diminuiu a velocidade de cristalização e modificou o processo de cristalização. As análises de difração de raios-X revelam que as misturas interesterificadas apresentaram formas polimórficas β' e β . Os LE obtidos através da IE podem ter amplas aplicações em gorduras especiais para produtos de confeitaria e padaria, e como propósito geral para margarina e gorduras.

Palavras-chave: Interesterificação enzimática; óleo de girassol alto oléico; cristalização; distribuição regioespecífica; difração de raio-X.

1. Introdução

Os óleos e gorduras são muito importantes na dieta humana fornecendo energia, ácidos graxos essenciais, vitaminas, antioxidantes, etc. Nas últimas décadas há uma preocupação em diminuir problemas de saúde como obesidade, diabetes, ataques cardíacos e outras doenças, consequentemente, uma maior consciência para consumir produtos com menor teor de calorias (Lee, *et al.*, 2015).

Alterações na estrutura do lipídio na composição dos ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol é uma realidade na indústria alimentícia, por meio da reação de interesterificação química ou enzimática. A síntese via catálise enzimática, utilizando lipase específica *sn*-1,3 imobilizada, apresenta vantagem no controle do processo, seletividade e regioespecificidade (Garima, Sabir, Baeshen & Akoh, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013). A modificação de gorduras e óleos utilizando lipases tem sido relatada por vários pesquisadores, bem como a influência desta síntese nas características reológicas dos lipídios obtidos (Ahmadi, Wright & Marangoni, 2008; Adhikari *et al.*, 2012; Shin, Akoh & Lee, 2009; Zhao *et al.*, 2013).

O tamanho, a forma do cristal e a densidade podem alterar as propriedades físicas da gordura obtida. O crescimento de cristais, a nucleação primária, e a nucleação secundária nos sistemas de gordura são influenciados por muitos fatores, incluindo a difusão, a compatibilidade molecular, estrutura dos TAG, composição dos núcleos e propriedades de superfície, o número de núcleos e as condições de processamento, como temperatura e / ou cisalhamento (Rye, Litwinenko & Marangoni, 2005).

O OGAO apresenta uma grande estabilidade oxidativa (baixo teor de ácido linoleico e linolênico) e excelentes características sensoriais, com grande aplicação em frituras (Gupta, 2014). Nos últimos anos houve um aumento considerável no consumo deste óleo, devido à busca de uma alimentação mais saudável.

O Osth apresenta alto teor de ácido esteárico (aprox. 85%), livre de ácidos graxos trans, grande disponibilidade no mercado e preços competitivos. Pacheco *et al.* (2013) estudaram os efeitos de determinados parâmetros de reação (tempo, temperatura, agitação etc.) da IE de óleo de soja e óleo de soja totalmente hidrogenado. As variáveis mais importantes para a obtenção de gorduras semi-

sólidas com mínimo de geração de subproduto foram: concentração de enzima, tempo e proporção de substratos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da IE sobre comportamento térmico e propriedades de cristalização das misturas binárias de OGAO:OSTH, com a finalidade de compreender a estrutura da gordura e sua funcionalidade. A interesterificação química foi realizada como controle, determinando-se composição em TAG, teor de sólidos, cinética de cristalização, comportamento térmico (DSC), regioespecificidade, microscopia de luz polarizada e difração de RX para todas as sínteses. A pesquisa apresentada está dentro do conceito de desenvolvimento de processos sustentáveis, baixo consumo de energia, migração acil e produtos finais específicos, para aplicação na indústria alimentícia em *shortenings*, produtos de confeitaria, como substitutos de manteiga de cacau, estabilizadores de estruturas cristalinas, aditivos em margarinas, entre outras finalidades.

2. Material e métodos

2.1. Material

Óleo de girassol alto oléico desodorizado e pronto para consumo (OGAO) foi fornecido pela empresa Dow AgroSciences – distribuído pela Empresa Quantiq Ltda (São Paulo, Brasil) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) foi fornecido pronto para uso industrial pela Empresa Triangulo Alimentos S.A. (Itapólis, São Paulo, Brasil). A enzima imobilizada Lipozyme TL IM (lipase *Thermomyces lanuginosus*, *sn*-1,3 específico, atividade específica de 329 IUN / g: IUN = unidade de interesterificação) foi doada pela Empresa Novozymes do Brasil Ltda (Araucária – Brasil) e o catalisador químico utilizado foi metóxido de sódio em pó anidro a 99% foi adquirido de Sigma-Aldrich- St. Louis, MO, USA.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das misturas (MI) e condicionamento da enzima

Foram preparadas duas amostras de 100g da mistura de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) fundido para cada proporção de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p). As misturas foram mantidas a 80°C durante 30 min sob agitação magnética para destruir a memória cristalina. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C. Em escala laboratorial, primeiramente foi realizado o condicionamento da lipase específica *sn*-1,3 (Lipozyme TL IM) para remoção de ar e umidade. A Lipozyme TM IM apresenta um teor de água de 5% (p/p), sendo indicado pelo fabricante (Novozymes) reduzir esta umidade antes de realizar os experimentos para diminuir a formação de ácidos graxos livres (AGL), mono (MAG) e diacilgliceróis (DAG) formados pela hidrólise da gordura. Foi adicionada 100 g da mistura binária para cada proporção de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p) em um balão de fundo redondo de 250 mL e, em seguida, as amostras foram aquecidas em um banho de óleo mineral a 70°C. Quando a mistura atingiu a temperatura de 70°C foram adicionados 7% (p/p) de enzima e iniciada a agitação magnética a 300 rpm sob atmosfera de nitrogênio, durante 30 min. Foi observada a eliminação do ar, até que não existissem mais bolhas saindo pelos grânulos. A agitação foi desligada, esperando a decantação da enzima e a mistura do óleo foi retirada com uma pipeta pela parte superior. A enzima condicionada foi utilizada imediatamente na seção 2.2.2.

2.2.2. Interesterificação enzimática (IE)

100g da mistura binária acondicionada (2.2.1.), para cada proporção de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p), foi adicionada no balão de fundo chato contendo 7% da enzima condicionada e aquecida em um banho de óleo mineral a 70-75°C com agitação magnética de 300 rpm sob atmosfera de nitrogênio. Foram realizados testes preliminares, quanto à temperatura e tempo de reação 3, 6 e 9h, avaliando comportamento térmico (DSC) e migração acil. Foi definida a temperatura a 70°C e 3h de reação para o estudo e coletadas amostras de 30g em tubos com tampa para

análises, mantendo a agitação. Foi injetado nitrogênio puro na mistura, fechou-se o tubo submetendo-o, durante 10 min, a um banho de água a 95°C para inativação da enzima. O teor de AGL foi determinado como ácido oleico (% em peso) pelo método AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 2009). Para a remoção de AGL, a amostra foi filtrada dentro de um funil de separação de parede dupla com banho de água aquecida para evitar a solidificação da mistura. Foram adicionadas 5 gotas de solução de fenolftaleína e em seguida uma solução de NaOH 0,2M, quantidade pré-determinada na análise de ácidos graxos livres. A mistura interesterificada foi lavada com água quente (50-60°C), até desaparecer a coloração rósea e, em seguida, foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro para remoção da umidade e partículas de biocatalisador. Os produtos foram secos sob vácuo a 110°C durante 30 min. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.3. Interesterificação química (IQ)

As reações de IQ foram realizadas para as mesmas proporções de OGAO e do OTH da catálise enzimática. Em escala laboratorial, 100g de cada mistura, sob agitação magnética, foi interesterificada na presença de 0,4% (m/m) de metóxido de sódio à temperatura de 100°C. O tempo de reação foi de 20 min, sob vácuo, de acordo com a otimização realizada por Grimaldi, Gonçalves & Ando (2005). Para interromper a reação foi adicionada uma solução de ácido cítrico 5%. As amostras interesterificadas foram lavadas com água destilada (80°C). Para remover a umidade dos produtos foi adicionado sulfato de sódio anidro no papel de filtro e, em seguida, os mesmos foram filtrados e secos sob vácuo a 110°C por 30 min. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.4 Caracterização dos triacilgliceróis

2.2.4.1. Composição em triacilgliceróis (TAG). A composição triacilglicerólica foi obtida segundo método AOCS Ce 5-86 (AOCS, 2009), em cromatógrafo fase gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System). Coluna capilar DB-17HT Agilent Catalog 122-1811 (50%-fenilmetilpolisiloxano), 15m de comprimento, 0,25mm de diâmetro

interno, 0,15 μm de filme. Condições de análise: injeção split, razão de 1:100; temperatura da coluna: 250°C, programada até 350°C à razão de 5°C/min; gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 360°C; temperatura do detector: 375°C; volume injetado: 1,0 μL ; concentração da amostra: 10 mg/mL de tetrahidrofurano. A identificação dos grupos de TAG foi realizada mediante comparação dos tempos de retenção segundo os procedimentos de Antoniosi Filho, Mendes & Lanças (1995).

2.2.4.2. Distribuição regioespecífica. Aproximadamente 150 mg das amostras foram liquefeitas por aquecimento com ar quente e, imediatamente, dissolvidas em clorofórmio deuterado (500 μL , CDCl_3) e desoxigenado por fluxo de nitrogênio, contendo 1,0% de trimetilsilano (TMS) como referência de deslocamento químico. As misturas foram mantidas em ultrassom a 60 °C até obtenção de soluções homogêneas e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Espectros quantitativos de RMN ^{13}C foram adquiridos sem giro a 30°C utilizando o sistema de automação ICON NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) com um espectrometro Bruker Avance-III (500 MHz) operando a 125.69 MHz para o ^{13}C , equipado com uma sonda Broadband Observe (BBO) de 5-mm. Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: ^{13}C pulso de excitação 90° para 10 μs , varredura de largura de 238 ppm, tempo de repetição de 25 s (tempo de aquisição 10 s + atraso de relaxamento de 15 s), número de exames 128 e ganho do receptor ajustado automaticamente. O tempo experimental foi de 55 minutos. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível diferenciar ácidos graxos insaturados (AGI) (170,88 ppm) e ácidos graxos saturados (AGS) (170,91 ppm) esterificados na posição *sn*-2 do TAG, e AGI (171,29 ppm) e AGS (171,32 ppm) esterificados nas posições *sn*-1,3 do TAG. O assinalamento dos AGI e AGS foi realizado com base no efeito indutivo da dupla ligação sobre o grupo carbonila, método descrito por Vlahov, Giuliani & Del (2010). Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.4.3. Conteúdo de gordura sólida (CGS). Conteúdo de gordura sólida foi determinado utilizando espectrometria de ressonância nuclear magnética com equipamento Bruker Minispec pc 120 (Silberstreifen, Rheinstetten, Alemanha) e com auxílio de banhos secos de alta precisão (0 – 70°C) Tcon 2000 (Duratech, Carmel,

IN, EUA). O método AOCS Cd 16b-93 (AOCS, 2009) foi seguido, sendo este método direto com leitura das amostras em série, nas temperaturas de 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C, com temperagem para gorduras não estabilizadas. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.4.4. Análise térmica. Perfis de fusão das amostras foram determinados em calorímetro diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimeter* – DSC) modelo Q2000 (TA Instruments) conforme o método AOCS Cj 1-94 (AOCS, 2009), sendo as condições de análise: 8-12 mg das amostras foram pesadas em recipientes de alumínio com capacidade volumétrica de 40µL e seladas. A calibração foi realizada com índio (PF=156,5°C, ΔH_f =28,45J/g). As amostras foram aquecidas a 80°C a 10°C/ min e mantidas durante 10 min. As amostras foram, em seguida, resfriadas para -60°C a 10°C/ min e mantidas durante 30 min e finalmente aqueceu-se a 80°C a 5°C / min. Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliação dos resultados: temperatura onset de fusão (Tof), temperatura de pico de fusão (Tpf), entalpias de fusão (ΔH_f) e temperaturas finais de fusão (Tff). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.4.5. Cinética de cristalização. As amostras de matérias-primas e de misturas interesterificadas foram fundidas em forno de microondas e, em seguida, mantidas em banho seco de alta precisão (TCON 2000 - Duratech, EUA) a 70°C durante 1h para completa destruição de seu histórico cristalino. O aumento do conteúdo de gordura sólida, em função do tempo de cristalização, foi monitorado por Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) BRUKER pc20 Minispec, com compartimento de leitura estabilizado a 25°C. A aquisição de dados foi automática, com medidas tomadas a cada min, durante 100 min. A caracterização da cinética de cristalização foi realizada segundo o período de indução (τ_{SFC}) e teor máximo de sólidos ($CGS_{m\acute{a}x}$). A equação de Avrami (Equação 1) foi empregada para o estudo da cristalização, sendo linearizada e aplicada aos resultados obtidos para determinação dos valores de k e n (Campos, 2005). As análises foram realizadas em duplicata.

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

Onde: CGS(t): conteúdo de gordura sólida (%) em função do tempo; CGS(∞) : limite do conteúdo de gordura sólida no tempo tendendo ao infinito; k: constante de Avrami (min^{-n}), considera tanto a nucleação quanto a taxa de crescimento dos cristais; n : expoente de Avrami que indica o mecanismo de crescimento dos cristais.

2.2.4.6. Microscopia sob luz polarizada. Para a morfologia e estudo das dimensões cristalinas as amostras foram fundidas à temperatura de 70°C em forno de microondas. Com o auxílio de um tubo capilar, uma gota de amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida em temperatura controlada (70°C), que foi, em seguida, coberta com uma lamínula. As lâminas foram preparadas em duplicata e mantidas durante 24h em duas estufas na temperatura de 25°C. A morfologia dos cristais foi avaliada com o uso de microscópio sob luz polarizada (Olympus BX 51) acoplado a câmara de vídeo digital (Media Cybernetics). As lâminas foram colocadas sobre o suporte da placa de aquecimento, mantida à mesma temperatura de cristalização. As imagens foram capturadas pelo aplicativo Image Pro-Plus (Media Cybernetics), utilizando luz polarizada e com ampliação de 40x. Para cada lâmina foram focalizados três campos visuais. O diâmetro médio dos cristais foi selecionado como parâmetro de avaliação para a análise quantitativa das imagens e calculado usando o programa Image Pro-Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA).

2.2.4.7. Difração de Raios-X. As amostras foram completamente fundidas e cristalizadas a 25°C, em BOD durante 24h. As medidas foram realizadas no difratômetro Philips (PW 1710), utilizando a geometria Bragg-Bretano ($\Theta:2\Theta$) com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, tensão de 40 KV e corrente de 30 mA). As medidas foram realizadas com passos de 0,03° em 2Θ e tempo de aquisição de 2 s e scans de 14.5 to 27.5° (escala 2Θ). A identificação das formas polimórficas foi realizada a partir dos *short spacings* característicos dos cristais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição em Triacilgliceróis

Os resultados da composição em triacilgliceróis das misturas e das amostras após as reações de interesterificação química e enzimática nas proporções OGAO:OSTH de: 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 são apresentados na Figura 1. A interesterificação, tanto química quanto enzimática, produziu em todas as misturas uma redução nos triacilgliceróis I_3 (triinsaturados) e S_3 (trissaturados), bem como um aumento nos S_2I (dissaturados-monoinsaturados), I_2S (di-insaturados-monossaturados). Em todas as proporções foram observadas tanto pela IE quanto IQ surgimento de proporções maiores de S_2I (31-39%) e de I_2S (14,3 – 31,7%). O processo de interesterificação é importante para a diminuição S_3 (trissaturados) no desenvolvimento de novas gorduras com aplicação na indústria alimentícia, pois altera as propriedades físico-químicas, comportamento de fusão e cristalização, CGS, textura e comportamento polimórfico.

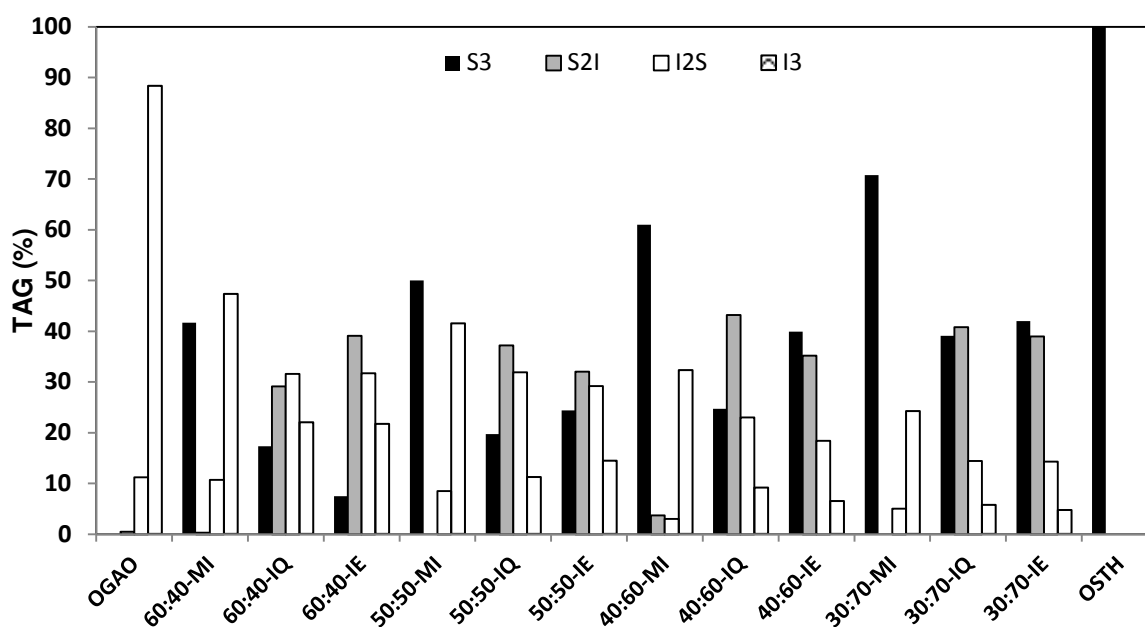


Figura 1. Composição TAG (%) antes e após a interesterificação química e enzimática das misturas do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH).

Li *et al.* (2010) processaram OGAO e OSTH em diferentes proporções via catálise enzimática comparando dois tipos de reatores, em batelada e contínuo. Os

resultados obtidos foram similares, tendo uma redução dos TAG trissaturados (S_3) e triinsaturados (I_3) e um aumento dos TAG dissaturados-monoin saturados (S_2I) e diinsaturados-monossaturados (I_2S), com relação à mistura e após a interesterificação.

3.2. Distribuição regioespecífica

Na Tabela 1 é apresentada a distribuição em ácidos graxos nas posições *sn*-1,3 e *sn*-2 dos TAGs das misturas antes e após interesterificação. Houve uma diminuição de AGI na posição *sn*-2 em relação a misturas. Os menores valores encontrados foram na IQ (reação randômica). A IE apresentou maiores valores de AGI na posição *sn*-2 (reação específica). Na posição *sn*-1,3 a maior quantidade determinada foram dos AGS, que é padrão típico dos óleos vegetais. Na IE houve pouca migração acil nas posições *sn*-1,3 dos AGS.

Tabela 1: Distribuição dos ácidos graxos (%) nas posições *sn*-1,3 e *sn*-2 dos TAG nas misturas antes e após interesterificação.

OGAO:OSTH(p/p%)	Posições <i>sn</i> -1,3		Posição <i>sn</i> -2	
	Saturado	Insaturado	Saturado	Insaturado
60:40				
MI	51,4	48,6	43,6	56,4
IQ	48,8	51,2	47,8	52,2
IE	51,8	48,2	46,4	53,6
50:50				
MI	59,3	40,7	50,0	50,0
IQ	58,1	41,9	57,9	42,1
IE	57,8	42,2	52,6	47,4
40:60				
MI	60,8	39,2	56,7	43,3
IQ	66,9	33,1	66,6	33,4
IE	64,7	35,3	62,9	37,1
30:70				
MI	75,5	24,5	71,8	28,2
IQ	76,8	23,2	77,7	22,3
IE	74,1	25,9	72,0	28,0

MI: mistura; IQ: interesterificação química; IE: interesterificação enzimática após 3h de reação; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

A migração acil a partir da posição *sn*-2 para *sn*-1,3 ou vice-versa, pode ocorrer de forma semelhante durante todas as fases de reação devido à formação contínua de DAG (Xu *et al.*, 1998). Há muitos fatores que podem contribuir para a migração acil, tal como o teor de água da lipase e o meio de reação, a natureza química do material de suporte, o tempo de reação, temperatura e o tipo de reator utilizado (Pande & Akoh, 2013). No estudo de IQ e IE de misturas de OGAO e óleo de canola totalmente hidrogenado, Ahmadi, Wright & Marangoni (2008) observaram que possivelmente, um longo período de reação resultou numa elevada taxa de migração acila, explicando a distribuição aleatória dos ácidos graxos na IE.

3.3. Conteúdo de gordura sólida

O CGS afeta propriedades físicas, tais como espalhabilidade, consistência e estabilidade que, por sua vez, afetam as características sensoriais (O'Brien, 2004). Os conteúdos líquidos / sólidos em várias temperaturas fornecem boas indicações do comportamento da gordura, auxiliando no ajuste de formulações e desenvolvimento de novos produtos (Lumor, Kim & Akoh, 2008). Os perfis de CGS das misturas MI, IQ e IE são mostrados na Figura 2.

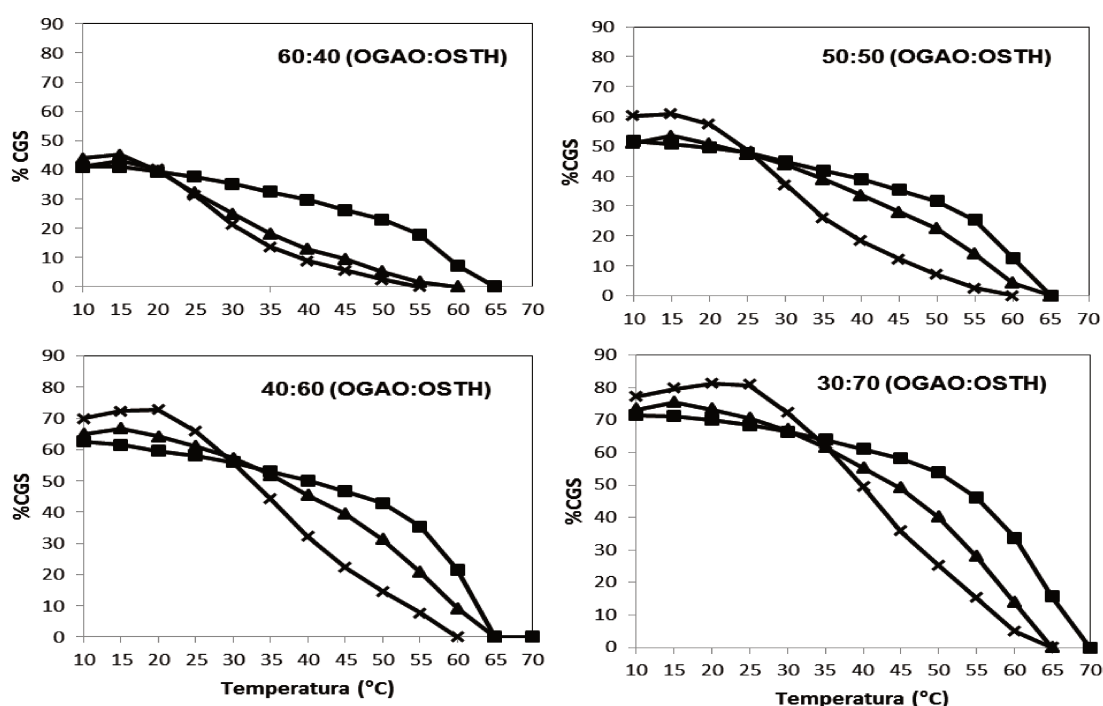


Figura 2. Conteúdo de gordura sólida (%) antes (MI-■) e após a interesterificação química (IQ-▲) e enzimática (IE-x) das misturas do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH).

Os CGS das MI, IQ e IE são significativamente diferentes entre si. A IE apresentou um perfil CGS inferior em temperaturas acima de 35°C em todas as misturas em relação a IQ, devido aos novos TAGs obtidos S₂I e I₂S (Marangoni & Rousseau, 1995). Foi observado, que a plasticidade da mistura IE 50:50 é maior do que na IQ e MI, os valores de CGS a 10°C e 40°C foram de 60,2% e 18,4%, respectivamente. Para todas as proporções a 10°C, nas amostras de IQ e IE mostraram um valor maior de CGS em comparação com as MI. A fusão foi completa na faixa de 55-65°C das amostras IQ e IE. Estas gorduras interesterificadas são apropriadas para serem utilizadas em produtos que necessitem de estrutura, indicados em misturas com óleos como base para gorduras industriais. Em estudos anteriores, vários autores reportaram a diminuição do CGS após a interesterificação (Farmani, Safari & Hamed, 2006; Soares *et al*, 2013; Kowalski *et al*, 2004; Jeyarani & Reddy, 2010).

3.4. Análise térmica

Há uma relação direta entre a composição dos TAG e as propriedades físicas de uma gordura (Rousseau & Marangoni, 2002). Os tipos de AG e a distribuição na molécula de glicerol irão definir o comportamento de fusão, conduzindo a diferentes formas polimórficas e intersolubilidade. Na Figura 3 são apresentados os perfis de fusão das MI, IQ e IE das misturas de OGAO e OSTH, determinados por DSC. Foram identificados dois picos nos perfis de fusão das misturas físicas (MI) nas diferentes proporções estudadas a temperaturas de -4,7 a -6,8°C ($\Delta H = 16,5$ a $44,2$ J/g) como pico (a) e 63,3 a 66,2°C ($\Delta H = 74,3$ a $112,7$ J/g) como pico (b), correspondendo ao OGAO e OSTH, respectivamente. Observa-se que após as IQ e IE houve uma alteração o perfil de fusão com diminuição destes dois picos, formando outros novos tipos de TAG como S₂I e I₂S. Estes novos picos são mais largos, que os picos das misturas originais, devido aos vários tipos de TAG formados após IQ e IE.

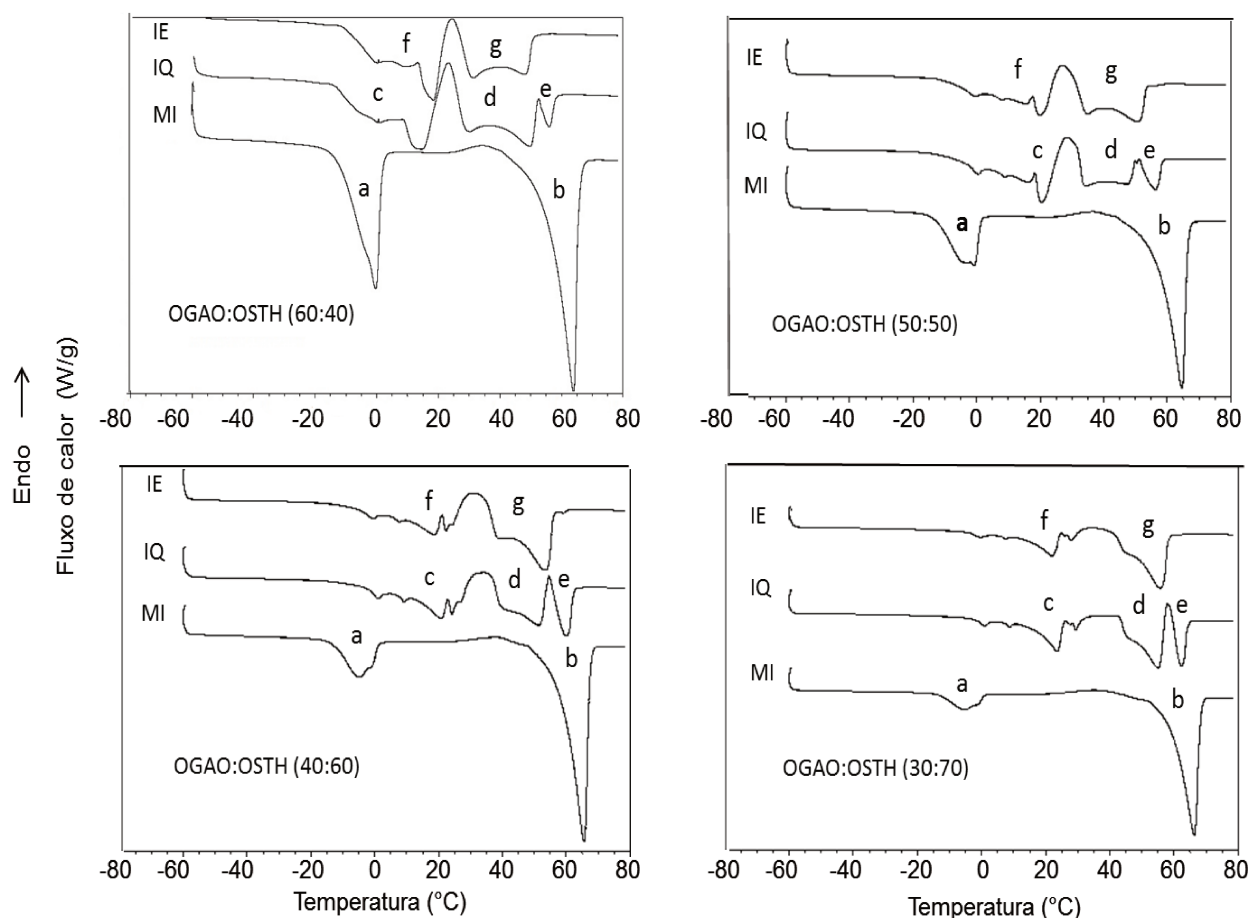


Figure 3. Eventos de fusão antes (MI) e após a intersterificação química (IQ) e enzimática (IE) das misturas do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH).

Na IQ houve formação de três picos na faixa de -5°C a 63°C e na IE de dois picos de 18°C a 55°C nas diferentes proporções estudadas. A IE é mais específica resultando em uma faixa mais estreita de fusão do que na IQ, devido ao tipo de reação randômica. A faixa de ponto de fusão final para todas as proporção da IE variou de $51,1$ a $59,4^{\circ}\text{C}$ e para IQ de $58,4$ a $67,1^{\circ}\text{C}$. As misturas com maior proporção de OSTH apresentaram maior ponto de fusão final. Este tipo de comportamento também foi observado por Lee, Akoh & Lee (2008) nas gorduras obtidas por IE produzidas com uma mistura de OSTH, óleo de canola e estearina de palma em diferentes proporções para gorduras de confeitaria.

3.5. Cinética de cristalização

A cinética de cristalização é um indicativo do mecanismo de nucleação e crescimento do cristal e está relacionada com as propriedades reológicas e de

plasticidade das gorduras (García *et al.*, 2015). Na Tabela 2 são mostrados os resultados do período de indução (τ_{CGS}), conteúdo de gordura sólida máximo (CGS_{max}) e os parâmetros de Avrami das misturas antes e após interesterificação, a partir das isotermas de cristalização a 25°C. A interesterificação modifica o mecanismo de cristalização das misturas originais. Em todas as misturas estudadas após a IQ e IE, os CGS_{max} diminuíram, em função dos novos TAG e redução dos TAG trissaturados, conforme demonstrado na Figura 1.

Tabela 2. Tempo de indução (τ_{SFC}), conteúdo de gordura sólida máximo (SFC_{max}), constante de Avrami (k), expoente de Avrami (n) e coeficientes de correlação (R^2) para as misturas antes e após a interesterificação, obtidos das isotermas de cristalização a 25°C.

OGAO:OSTH(w/w%)		τ_{SFC} (min)	SFC_{max} (%)	k (min^{-1})	n	R^2
60:40	MI	5	33,3	$8,99 \times 10^{-4}$	3,6	0,9933
	IQ	6	23,4	$2,00 \times 10^{-2}$	1,5	0,9788
	IE	6	19,9	$1,35 \times 10^{-2}$	1,4	0,9913
50:50	MI	3	43,1	$1,07 \times 10^{-2}$	2,6	0,9935
	IQ	3	39,8	$6,96 \times 10^{-2}$	2,7	0,9945
	IE	4	30,7	$4,18 \times 10^{-2}$	1,2	0,9758
40:60	MI	3	54,9	$1,31 \times 10^{-2}$	2,4	0,9965
	IQ	3	50,9	$8,92 \times 10^{-3}$	2,6	0,9954
	IE	4	38,8	$6,99 \times 10^{-2}$	1,1	0,9443
30:70	MI	2	66,8	$1,74 \times 10^{-2}$	2,4	0,9977
	IQ	3	62,6	$1,72 \times 10^{-2}$	2,2	0,9930
	IE	3	65,6	$1,21 \times 10^{-1}$	0,8	0,9554

MI: mistura; IQ: interesterificação química; IE: interesterificação enzimática; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado.

A cristalização começa com a formação dos núcleos, seguido do crescimento, provavelmente, controlada pela dinâmica molecular e cinética dos núcleos, na qual, através das interações de Van der Waals formam estruturas maiores ou *clusters* com vários cristais entrelaçados até resultar na rede cristalina da gordura (Bouzidi & Narine, 2010). A nucleação está diretamente associada ao tempo de indução. A cinética de cristalização dos LE obtidos por IE mostrou um aumento nos períodos de indução (3-6 min), sendo o maior resultado para a proporção 60:40,

devido a menor concentração de Osth e uma diminuição nos CGS_{max} (20-62%) em comparação com as MI.

O modelo de Avrami (Avrami, 1939, 1940 e 1941) fornece informações sobre a natureza do processo de cristalização. O expoente n descreve o tipo de mecanismo de nucleação e crescimento do cristal em função do tempo e a constante k representa as taxas de nucleação e crescimento, que dependem principalmente da temperatura. Os valores do parâmetro k aumentaram em todas as proporções da IE com relação às misturas. Este aumento é diretamente proporcional ao aumento do Osth (*hardstock*) na mistura, devido o aumento de TAG triessaturados. A triestearina tem uma velocidade de nucleação e crescimento muito rápida em comparação aos outros TAG na mistura (Ahmadi, Wright & Marangoni, 2008). Os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,94 em todos os tratamentos, demonstrando que a equação está adequada aos dados obtidos. Embora o resultado do expoente n deva ser um inteiro, valores fracionários são geralmente obtidos, mesmo nos casos em que o modelo se ajusta muito bem aos dados muito bem. Os desvios de valores inteiros para n podem ser explicados como o desenvolvimento simultâneo de dois ou mais tipos de cristais, ou cristais semelhantes a partir de diferentes tipos de núcleos (Marangoni, 2005a).

O índice de Avrami diminuiu de $n = 3 - 4$ para $n=1$ em função do aumento do Osth nas MI e IE em todas as proporções (Tabela 2). O valor de n na amostra MI, por exemplo, 60:40 foi de 3,6, que indica formação de cristais esferulíticos a partir de núcleos esporádicos. Nas amostras de IE os valores de n variaram de 1.4 – 0.8, que caracteriza a formação de cristais em agulha a partir de núcleos instantâneos. Nas amostras de IQ os valores de n variaram de 2.7 – 1.5, que correspondem a cristais de disco a agulha a partir de núcleos esporádicos.

3.6. Microestrutura

A microscopia sob luz polarizada auxilia na visualização dos diferentes tipos de cristais e alterações morfológicas no crescimento do cristal e transformações nas formas polimórficas, principalmente no que diz respeito às gorduras interesterificadas. A microscopia sob luz polarizada (MPL) distingue as fases sólida e líquida da gordura, que refletem a luz sob diferentes formas (Campos, 2005). A temperatura e a taxa de resfriamento durante a cristalização da gordura

interferem na estrutura cristalina e morfologia. Na Figura 4 são apresentadas as estruturas cristalinas das amostras MI, IQ e IE em todas as proporções das misturas de OGAO:OSTH, por resfriamento rápido a 25°C/24h, com aumento de 40x. As imagens das estruturas dos cristais nas misturas 60:40 (1) 50:50 (4), 40:60 (7) e 30:70 (10) mostram formas de esferulitos. Na IQ na maioria das proporções, as imagens são de cristais na forma de esferulitos e na IE as proporções 60:40 (3), 50:50 (6), 40:60 (9) apresentaram cristais na forma de agulhas e proporção 30:70 (12) na forma de esferulitos.

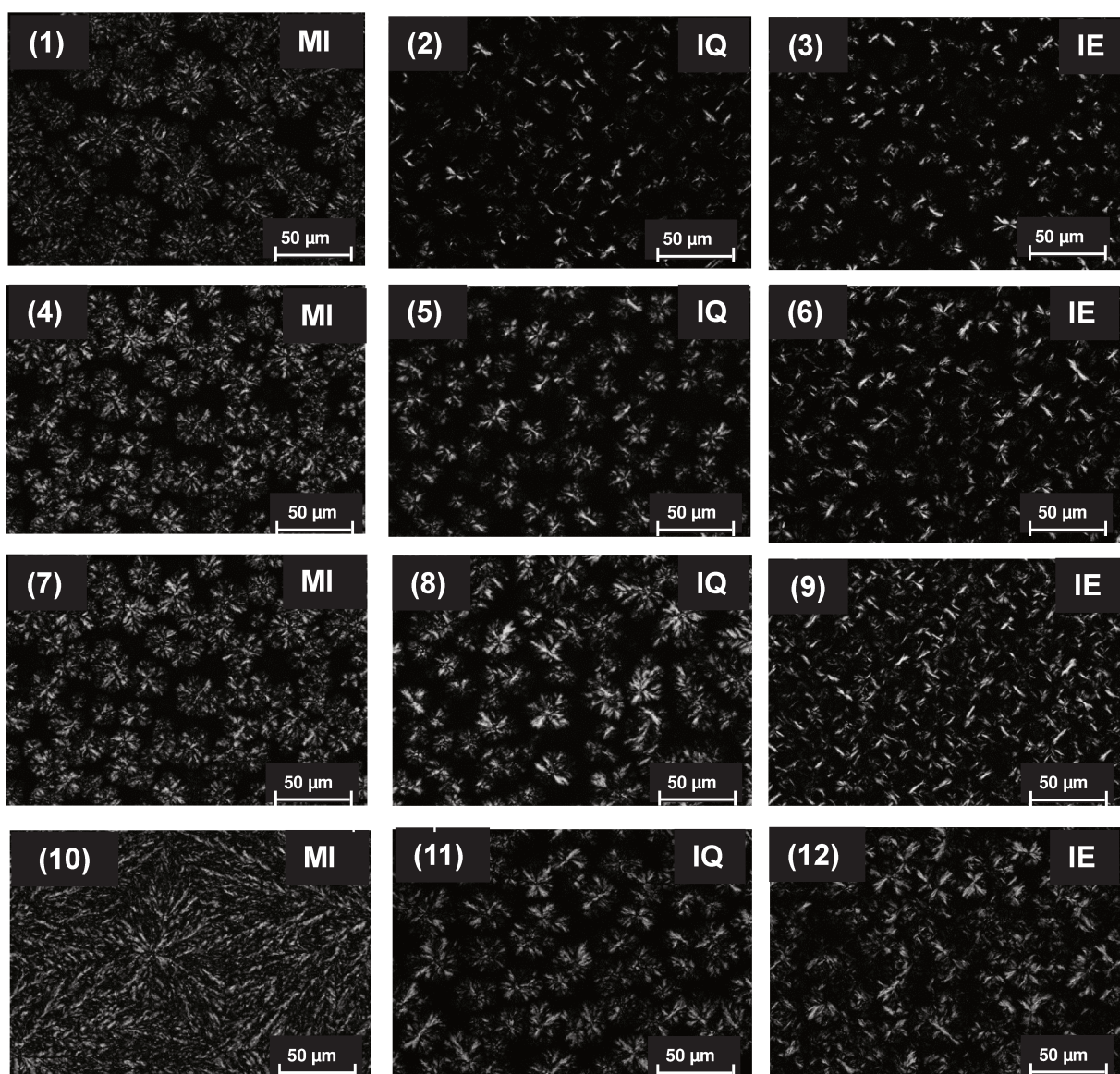


Figure 4. Imagens de cristalização antes (MI) e após a interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) das misturas do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH). Proporções 60:40 (1-3), 50:50 (4 -6), 40:60 (7-9) and 30:70 (10-12).

Na Tabela 3 são apresentados os valores de diâmetros médios e máximos das misturas de OGAO:OSTH (MI, IQ e IE). O processo de IE diminuiu o tamanho do $D_{\text{máx}}$ do cristal e, simultaneamente com aumento da concentração de OSTH nas misturas houve aumento do tamanho $D_{\text{máx}}$ do cristal para ambos os processos de IQ e IE. Este evento pode ser atribuído à maior quantidade de triesterina na mistura e sua rápida cristalização.

Tabela 3. Diametros médio e máximo dos cristais (μm) das misturas antes e após interesterificação, obtidos pela isoterma de cristalização estática a 25°C.

OGAO:OSTH(p/p%)	MI		IQ		IE	
	$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{max}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{max}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{médio}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{max}} (\mu\text{m})$
60:40	16,7	52,4	18,2	46,5	18,9	41,6
50:50	18,3	59,4	20,0	65,7	19,5	56,7
40:60	20,2	74,0	22,0	75,0	20,0	56,9
30:70	21,2	82,5	21,2	73,2	22,6	81,6

MI: mistura; IQ: interesterificação química; IE: interesterificação enzimática; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH= óleo de soja totalmente hidrogenado.

Ahmadi, Wright & Marangoni (2008) estudaram misturas de óleo de girassol alto oleico e óleo de canola totalmente hidrogenado por interesterificação via química e enzimática, obtendo resultados semelhantes, com diminuição nos tamanhos dos cristais, após ambos processos. Ribeiro *et al.* (2009) pesquisaram misturas de óleo de canola e óleo de algodão totalmente hidrogenado por IQ e obtiveram resultados semelhantes com diminuição do tamanho do cristal.

3.7. Difração de Raios-X.

Moléculas de triacilgliceróis têm a capacidade de empacotar em diferentes conformações geométricas durante a cristalização. Vários polimorfos apresentam diferentes estruturas cristalinas com idêntica composição química, mas com propriedades físicas diferentes. Existem três tipos de polimorfos fundamentais nas gorduras, denominados α (hexagonal), β' (ortorrômbico) e β (triclínico), sendo que a estabilidade e ponto de fusão são crescentes nesta sequência (Sato, 2001). A difração de raios-X é usada na identificação do polimorfismo cristalino a partir de

dimensões das células unitárias formadoras de cristais e distâncias e ângulos calculados. A Figura 5 mostra os padrões de difração de raios-X obtidos a 25°C para as MI e após a IQ e IE das misturas OGAO:OSTH a 60:40 e 30:70 obtidas a 25°C.

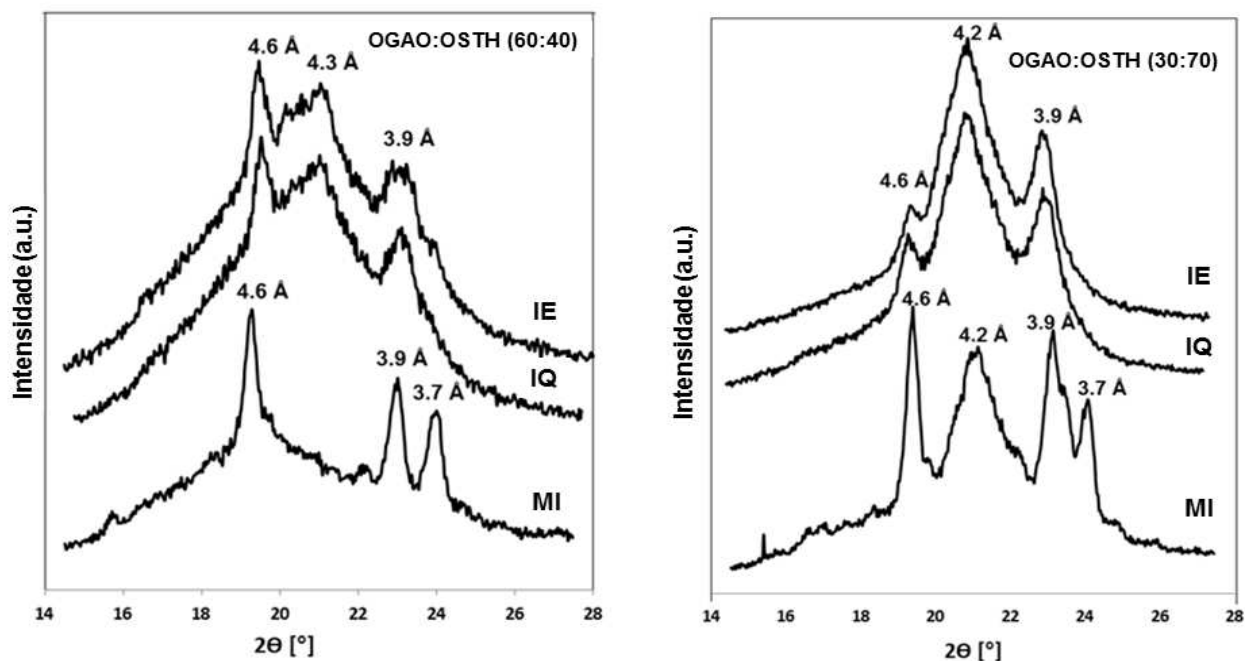


Figure 5. Difractogramas antes (MI) e após a interesterificação química (IQ) e enzimática (EI) das misturas do óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) nas proporções de 60:40 e 30:70 a 25°C/24h.

A mistura 60:40 (MI) apresentou predominância do polimorfo β . As misturas 60:40 IQ e IE apresentaram forma polimórfica β em maior intensidade, contudo a forma β' em menor proporção. A mistura 30:70 (MI) apresentou os polimorfos β e β' com picos de alta e média intensidade, respectivamente. Após a interesterificação, em (IQ) e (IE) houve uma inversão, o pico de maior intensidade foi o do polimorfo β' e polimorfo β apresentou um pico de menor intensidade (Tabela 4).

Tabela 4. Formas polimórficas das misturas antes e após interesterificação, obtidas a 25°C.

OGAO:OSTH (p/p%)	MI	IQ	IE
60:40	β	$\beta >> \beta'$	$\beta >> \beta'$
30:70	$\beta > \beta'$	$\beta' >>> \beta$	$\beta' >>> \beta$

MI: mistura; IQ: interesterificação química; IE: interesterificação enzimática; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OSTH: óleo de soja totalmente hidrogenado; ">" um pouco mais, ">>" muito mais e ">>>" significativamente mais.

Narine & Humphrey (2004) obtiveram resultados semelhantes em misturas de óleos interesterificados, apresentando os dois tipos de polimorfos β e β' . Zhao *et al.* (2013) produziram gordura plástica por interesterificação enzimática dos óleos de Osth, perilla e *Cinnamomum camphora* seed. Observaram que a forma polimórfica β foi reduzida durante a interesterificação e forma β' aumentou significativamente. Isto foi atribuído ao rearranjo dos ácidos graxos nos TAG após a reação de interesterificação, diminuindo a simetria molecular dos TAG.

4. Conclusão

Ambos os processos de interesterificação promoveram alteração nas propriedades físico-químicas em relação às misturas. O presente estudo permitiu a verificação da composição triacilglicerólica, perfil de sólidos, comportamento térmico, regioespecificidade, microestrutura e cinética de cristalização das misturas de OGAO:OSTH em diferentes proporções, com o objetivo de uso em produtos alimentícios com aplicações definidas. O processo enzimático apresentou vantagem sobre a IQ com relação à menor temperatura de reação e seletividade na formação de novos TAG. Esses produtos obtidos através da interesterificação enzimática podem ter amplas aplicações em gorduras especiais para produtos de confeitaria e padaria.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, agências CNPq e FAPESP, e os fornecedores de matérias-primas.

Referências

Adhikari, P., Shin, J., Lee, J. H., Kim, H. R., Kim, I.H. & Lee, K. T. (2012). Crystallization, physicochemical properties and oxidative stability of the interesterified hard fat from rice bran oil, fully hydrogenated soybean oil, and coconut oil through lipase-catalyzed reaction. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2474–2487.

- Ahmadi, L., Wright, A. J. & Marangoni, A. G. (2008). Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/ triolein-rich blends: microstructure and polymorphism. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 1025–1034.
- Antoniosi Filho, N., Mendes, O.L. & Lanças, F.M. (1995). Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, 40, 557-562.
- AOCS (2009). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. (5th ed.), Champaign, Illinois, USA: American Oil Chemist's Society.
- Avrami, M. (1939). Kinetics of Phase Change. I. General theory. *Journal of Chemical Physics*, 7, 1103–1112.
- Avrami, M. (1940). Kinetics of Phase Change. II. Transformation-time relations for random distribution of nuclei. *Journal of Chemical Physics*, 8, 212–224.
- Avrami, M. (1941). Granulation, Phase Change and Microstructure. Kinetics of Phase Change. III. *Journal of Chemical Physics*, 9, 177–184.
- Bouzidi, L. & Narine, S.S. (2010). Evidence of critical cooling rates in the nonisothermal crystallization of triacylglycerols: A case for the existence and selection of growth modes of a lipid crystal network. *Langmuir*, 26, 4311–4319.
- Campos, R. (2005). Experimental Methodology. In A. G. Marangoni (Ed), *Fat Crystal Networks*. (pp. 267-349). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Farmani, J., Safari, M. & Hamed, M. (2006). Application of palm olein in the production of zero-*trans* Iranian vanaspati through enzymatic interesterification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 636–643.
- García, L. B., Patel, A., Dewettinck, K., Rousseau, D., Sato, K. & Ueno, S. (2015). Lipid crystallization kinetics - Roles of external factors influencing functionality of end products. *Current Opinion in Food Science*, 4, 32-38.

- Garima, P., Sabir, J. S. M., Baeshen, N. A. & Akoh, C. C. (2013). Enzymatic synthesis of extra virgin olive oil based infant formula fat analogues containing ARA and DHA: One-stage and two-stage syntheses. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 10590–10598.
- Grimaldi, R., Gonçalves, L. A. G. & Ando, M. Y. (2005). Otimização da reação de interesterificação química de óleo de palma. *Química Nova*, 28, 633-636.
- Gupta, M. K. (2014). Sunflower oil: History, applications and trends. *Lipid Technology*, 26, 260 – 263.
- Jeyarani, T. & Reddy, S.Y. (2010). Effect of enzymatic interesterification on physicochemical properties of mahua oil and kokum fat blend. *Food Chemistry*, 123, 249–253.
- Kowalski, B., Tarnowska, K., Gruczynska, E. & Bekas, W. (2004). Chemical and enzymatic interesterification of beef tallow and rapeseed oil blend with low content of tallow. *Journal Oleo Science*, 53, 479-488.
- Lee, J.H.; Akoh, C.C. & Lee, K.T. (2008). Physical properties of trans-free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 85, 1–11.
- Lee, Y. Y., Tang, T. K., Phuah, E. T., Karim, N. A. A., Alwi, S. M. M. & Lai, Oi-M. (2015). Palm-based medium-and-long-chain triacylglycerol (P-MLCT): production via enzymatic interesterification and optimization using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Science Technology*, 52, 685–696.
- Li, D., Adhikari, P., Shin, J. A., Lee, J.-H., Kim, Y.-J, Zhu, X, -M, Hu, J.-N., Jin, J., Akoh, C.C. & Lee, K. -T (2010). Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats. *LWT- Food Science Technology*, 43, 458–464.
- Lumor, S.E., Kim, B. H. & Akoh, C.C. (2008). Optimization of solid fat content and crystal properties of a *trans*-free structured lipid by blending with palm midfraction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 9294–9298.

- Marangoni, A. G. (2005a). Crystallization Kinetics. In A. G. Marangoni (Ed). *Fat crystal networks*, (pp. 21-82). New York: Marcel Dekker.
- Marangoni, A.G. & Rousseau, D. (1995). Engineering Triacylglycerols: the role of Interesterification. *Trends in Food Science Technology*, 6, 329-335.
- Narine, S. S. & Humphrey, K. L. A. (2004). Comparison of lipid shortening functionality as a function of molecular ensemble and shear: Microstructure, polymorphism, solid fat content and texture. *Food Research International*, 37, 28–38.
- O'Brien, R. D. (2004). Fats and oils formulation. In *Fats and oils: formulating and processing for applications* (pp. 267-269). 2nd ed.; New York: CRC Press.
- Pacheco, C., Palla, C., Crapiste, G. H. & Carrín, M. E. (2013). Optimization of reaction conditions in the enzymatic interesterification of soybean oil and fully hydrogenated soybean oil to produce plastic fats. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 90, 391–400.
- Pande, G. & Akoh, C. C. (2013). Enzymatic synthesis of trans-free structured margarine fat analogs with high stearate soybean oil and palm stearin and their characterization. *LWT- Food Science Technology*, 50, 232–239.
- Ribeiro, A. P. B., Basso, R. C., Grimaldi, R., Gioielli, L. A., Santos, A. O., Cardoso, L. P. & Gonçalves, L. A. G. (2009). Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International*, 42, 1153–1162.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Murcia, A. B., Torres, R. & Fernandez-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42, 6290-6307.
- Rousseau, D.R. & Marangoni, A.G. (2002). The effects of interesterification on the physical properties of fats. In Marangoni AG & Narine, S. (Eds), *Physical Properties of Lipids*; New York: CRC Press.

- Rye, G. G., Litwinenko, J. W. & Marangoni, A. G. (2005). Fat crystal networks. In F. Shahidi (Ed), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (pp. 121-160). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Sato, K. (2001). Crystallization behavior of fats and lipids – a review. *Chemical Engineering Science*, 56, 225-265.
- Shin, J. A., Akoh, C. C. & Lee, K. T. (2009). Production and physicochemical properties of functional-butterfat through enzymatic interesterification in a continuous reactor. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57, 888–900.
- Soares, F.A.S.M., Osório, N.M., Silva, R. C., Gioielli, L. A. & Dias, S.F. (2013). Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 413–428.
- Vlahov, G., Giuliani, A.A. & Del, R.P. (2010). ¹³C NMR spectroscopy for determining the acylglycerol positional composition of lampante olive oils. Chemical shift assignments and their dependence on sample concentration. *Analytical Methods*, 2, 916–923.
- Xu, X., Skands, A.R.H., Hoy, C.E., Mu, H., Balchen, S. & Adler-Nissen (1998). Production of specific- structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75, 1179-1186.
- Zhao, M. L., Tang, L., Zhu, X. M., Hu, J.N., Li, H. Y., Luo, L. P., Lei, L. & Deng, Z.Y. (2013). Enzymatic production of zero-trans plastic fat rich in α -linolenic acid and medium-chain fatty acids from highly hydrogenated soybean oil, cinnamomum camphora seed oil and perilla oil by Lipozyme TL IM. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 1189–1195.

4.3. Síntese enzimática de lipídios estruturados a partir de óleos de girassol alto oléico e totalmente hidrogenado.

Marilene D. M. Morselli Ribeiro, Chiu Chih Ming, Thiago I.B. Lopes, Renato Grimaldi,
Anita J. Marsaioli, Lireny Ap. G. Gonçalves

Síntese enzimática de lipídios estruturados a partir de óleos de girassol alto oléico e totalmente hidrogenado.

RESUMO

Lipídios estruturados (LE) foram sintetizados através de interesterificação enzimática (IE) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e totalmente hidrogenado (OGAOTH), em diferentes proporções de peso (60:40, 50:50, 40:60 e 30:70), com Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginose*), a uma dosagem de 7% durante 3 h a 70°C e agitação de 300 rpm. A interesterificação química (IQ) foi realizada como controle. O progresso da reação foi monitorado, segundo as mudanças na composição triacilglicérica, conteúdo de gordura sólida (CGS), comportamento térmico (DSC), distribuição regioespecífica, microestrutura e polimorfismo. A interesterificação promoveu um considerável rearranjo das espécies de triacilgliceróis, redução dos conteúdos dos triinsaturados (S_3) e triinsaturados (I_3) e aumento na dissaturados-monoin saturados (S_2U) e diinsaturados-monossaturados (I_2S) em todas as misturas. As misturas interesterificadas, no geral, mostraram redução do CGS e perfil de fusão mais linear, comparados com as misturas originais. Menor migração acil foi observada na IE em relação a IQ. Os LE mostraram características para aplicação como gorduras de padaria / confeitaria e aditivo na cristalização de lipídios na indústria de alimentos.

Palavras chave

Lipídios estruturados, migração acil, Lipozyme TL IM, óleo de girassol alto oléico, interesterificação enzimática, triacilgliceróis.

1. INTRODUÇÃO

As características físicas de óleos e gorduras são determinadas pela sua composição química, tais como os tipos de ácidos graxos (AG) e a sua distribuição na molécula de glicerol. A maioria dos óleos e gorduras possui aplicação limitada em suas formas originais. O óleo de girassol alto oléico (OGAO) apresenta maior estabilidade termo-oxidativa, devido aos níveis elevados de ácido oléico (próx. 88%). Estes tipos de óleos são altamente apropriados para alimentos (por exemplo, produtos fritos, padaria e margarinas, sobremesas congeladas).¹

Diferentes estratégias podem ser usadas para modificar a composição original dos óleos, tais como hidrogenação parcial, interesterificação e fracionamento. A interesterificação é um dos métodos mais importantes para modificar a composição dos triacilgliceróis (TAG), visando a produção de gorduras “*low trans*” ou “*trans-free*” com comportamento de cristalização adequado e textura desejável.²

Lípidos estruturados (LE) são desenvolvidos para obter óleos ou gorduras reestruturados com maior valor nutricional e metabólico pela adição de tamanhos diferentes de cadeias de ácido graxo na molécula de glicerol, bem como na sua posição na molécula, de acordo com a finalidade da aplicação.³

LE podem ser obtidos por síntese química e enzimática. Vários estudos mostram que a interesterificação por catálise enzimática é mais eficiente no que diz respeito à seletividade e controle de reação em relação a catálise química.^{4,5} Esta seletividade depende do tipo de enzima utilizada, como está imobilizada e as condições da reação. As reações enzimáticas são realizadas sob condições brandas, necessitam de menor energia, fácil recuperação dos produtos e produzem lipídios de melhor qualidade nutricional.⁶ Os óleos e gorduras de origem vegetal são preferencialmente ricos em ácidos graxos insaturados na posição central *sn*-2 dos triacilgliceróis (TAG), enquanto os ácidos graxos saturados estão principalmente, nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 nos TAG podem elevar as concentrações de LDL, mais do que o mesmo ácido graxo na posição *sn*-1 ou *sn*-3, porque o destino metabólico é diferente nestas posições.⁷ Pacheco *et al.*⁸ avaliaram a ocorrência do fenômeno da migração acila durante a interesterificação catalisada por lipase específica dos óleos de soja líquido e totalmente hidrogenado. Os autores observaram a migração de acil na posição *sn*-2, mesmo usando lipase

específica *sn*-1,3 e este efeito foi relacionado ao tipo e concentração de lipase, temperatura e adição de solvente. No entanto, este tipo de catalisador ainda é preferido em comparação aos catalisadores não específicos ou químicos, porque este reage em menor temperatura e menor tendência à oxidação, mantendo o valor nutricional do produto. Vários pesquisadores têm estudado sobre a síntese enzimática utilizando uma lipase *sn*-1,3 específica como o biocatalisador nas diferentes aplicações como: substitutos de gordura no leite humano, equivalentes à manteiga de cacau e gorduras plásticas “*low-trans*” ou “*trans-free*”.⁹⁻¹³

Lipozyme TL IM é uma lipase *sn*-1,3 específica imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* em sílica granulada via adsorção iônica. Esta imobilização da lipase num suporte pode alterar o comportamento de uma enzima em muitos processos, tais como hidrólise seletiva ou oxidações, misturas racêmicas de resoluções cinéticas ou síntese controlada cineticamente (pH e temperatura). Lipozyme TL IM é indicada na indústria de alimentos, por exemplo, na síntese enzimática de triacilgliceróis médio e de cadeia longa, substitutos de gordura de leite humano, gorduras plásticas “*low-trans*” ou “*trans-free*”, monoacilgliceróis e diacilgliceróis.^{14,15} Lee *et al.*¹⁶ otimizaram a reação de interesterificação enzimática das misturas de óleo de palmiste e óleo de palma com Lipozyme TL IM para obter triacilgliceróis de cadeias média e longa, utilizando planejamento experimental. A maior parte do estudo focou sobre as propriedades de fusão das diferentes proporções das misturas de lípidos para diversas aplicações nas indústrias alimentícias, tais como produtos de confeitaria, margarinas e gorduras que são benéficas para a saúde. Ifeduba *et al.*¹⁷ estudaram a interesterificação enzimática do óleo de girassol alto oléico e tripalmitina ou triestearina com Lipozyme TL IM para produzir gorduras plásticas de “*low-saturated*” e “*zero trans*”.

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas dos LE obtidos na interesterificação enzimática (IE) catalisada por uma lipase *sn*-1,3 específica, Lipozyme TL IM, de uma mistura binária de OGAO e OGAOTH em diferentes proporções em peso (60:40, 50:50, 40:70, 30:70) com 7% (p / p) de Lipozyme TL IM a 70°C durante 3 h. A interesterificação química (IQ) foi realizada como controle. As propriedades físico-químicas do LE foram analisadas tais como, composição em TAG, teor de gordura sólida (CGS), comportamento térmico (DSC), a migração de acil, microscopia sob luz polarizada e difração de raio-X. Estes LE foram desenvolvidos e avaliados visando obter uma ampla gama de aplicações em

alimentos, como gorduras de padaria / confeitaria e aditivo de cristalização de lipídios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1. Matérias primas. O óleo de girassol alto oléico (OGAO) refinado e desodorizado foi fornecido pela empresa Dow AgroSciences - distribuído pela empresa Quantiq Ltda (São Paulo, Brasil). O óleo girassol alto oléico totalmente hidrogenado (OGAOTH) para uso industrial, foi fornecido pela empresa Sina S.A. (Pirapozinho, São Paulo, Brasil). A enzima imobilizada Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* lipase *sn*-1,3 específica, atividade específica de 329 IUN / g: = IUN unidade interesterificação) foi doada pela empresa Novozymes do Brasil Ltda (Araucária - Brasil), e como catalisador químico foi utilizado metóxido de sódio em pó anidro (99%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação de misturas (MI) e condicionamento da enzima. Duas amostras de 100 g da mistura de OGAO e OGAOTH foram preparadas e derretidas nas seguintes proporções: 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p). As misturas foram mantidas a 80°C durante 30 minutos com um agitador magnético para destruir a memória cristalina, e, em seguida, armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C. Em escala de laboratório, a lipase *sn*-1,3 específica (Lipozyme TL IM) foi condicionada para remover o ar e a umidade. Lipozyme TL IM apresenta um teor de água de 5% (p/p). Assim, 100 g da mistura binária foram adicionadas em um balão de fundo redondo, e aquecido em banho de óleo mineral a 70°C. Quando a temperatura da mistura atingiu 70°C, 7% (p/p) da enzima foi adicionada e a mistura foi agitada a 300 rpm, utilizando um agitador magnético, sob atmosfera de nitrogênio durante 30 minutos. A eliminação do ar foi evidenciada pela ausência de

bolhas nos grânulos. A agitação foi desligada, a enzima foi decantada e a fase superior de óleo foi removida com uma pipeta. A enzima condicionada foi utilizada imediatamente na interesterificação enzimática.

2.2.2. Interesterificação enzimática (IE). 100 g de cada mistura produzida nas proporções de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p) foram adicionados a um balão de fundo redondo contendo 7% de enzima condicionada e aquecidas em um banho de óleo mineral a 70°C com agitação magnética a 300 rpm sob atmosfera de nitrogênio. Foram realizados testes preliminares, quanto à temperatura e tempo de reação 3, 6 e 9h, avaliando comportamento térmico (DSC) e migração acil. Foi definida a temperatura a 70°C e 3h de reação para o estudo e coletadas amostras de 30g em tubos com tampa para análises, mantendo a agitação. Foi injetado nitrogênio puro na mistura, fechou-se o tubo submetendo-o, durante 10 min, a um banho de água a 95°C para inativação da enzima. O conteúdo teor de ácido graxo livre (AGL) foi determinado em ácido oleico (% em peso) de acordo com método oficial da American Oil Chemists' Society No. Ca 5a-40 (2009).¹⁸ Para remover o AGL, a amostra foi filtrada em funil de separação de parede dupla com banho de água aquecida para evitar a solidificação da mistura. Foram adicionadas 5 gotas de solução de fenolftaleína e, em seguida, uma quantidade pré-determinada de NaOH 0,2M. A mistura interesterificada foi lavada com água quente (50-60°C) até o desaparecimento da coloração rósea, e em seguida, foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro para remoção da umidade e partículas de biocatalizador. Os produtos foram secos sob vácuo a 110°C durante 30 min. As amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.3. Interesterificação química (IQ). As reações de IQ foram realizadas para as mesmas proporções de OGAO e OGAOTH utilizadas na IE. Em escala laboratorial, 100 g de cada mistura sob agitação magnética foi interesterificada na presença de 0,4% (p/p) de metóxido de sódio a uma temperatura de 100°C. O tempo de reação foi de 20 min sob vácuo, de acordo com a otimização efetuada por Grimaldi, Gonçalves & Ando.¹⁹ A reação foi então interrompida pela adição de uma solução de ácido cítrico a 5% (5g/100mL) e as amostras interesterificadas foram lavadas com

água destilada (80°C). Para remover a umidade foi adicionado sulfato de sódio anidro no papel de filtro, por meio do qual as amostras foram filtradas sob vácuo e secas a 110°C durante 30 min. As amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.4. Composição em ácidos graxos (AG). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram preparados de acordo com o método de Hartman & Lago.²⁰ A composição de ácidos graxos foi determinado de acordo com o método oficial da American Oil Chemists' Society No. Ce 1f-96 (2009).¹⁸ As condições de operação do cromatógrafo foram : Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilent 6850 Series GC System, coluna capilar DB-23 Agilent (50% cianopropil-metilpolisiloxano), dimensões: 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm. Condições de análise: temperatura do forno: 110°C- 215°C (5°C/min), 215°C – 24min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: hélio; razão split 1:50; volume injetado: 1,0 µL. A composição qualitativa foi determinada por comparação do tempo de retenção dos picos com os respectivos padrões de AG. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.5. Análise do perfil de triacilgliceróis. A composição dos triacilgliceróis foi determinada de acordo com o método oficial da American Oil Chemists' Society No. Ce 5-86 (2009)¹⁸ por cromatografia gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System). Coluna capilar DB-17HT (Agilent Catalog 122-1811 - 50%-fenilmetilpolisiloxano), 15m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno, 0,15 µm de filme. Condições de análise: injeção split, razão de 1:100; temperatura da coluna: 250°C, programada até 350°C à razão de 5°C/min; gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 360°C; temperatura do detector: 375°C; volume injetado: 1,0 µL; concentração da amostra: 10 mg/mL de tetrahydrofurano. A identificação dos grupos de TAG foi realizada mediante comparação dos tempos de retenção segundo os procedimentos de Antoniosi Filho, Mendes & Lanças.²¹ As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.6. Classes de lipídios. A determinação da classe de lipídios (TAG, DAG e outros) foi realizada por cromatografia de alta performance em um instrumento Perkin Elmer series 250 (Waltham, MA, USA), equipado com um Sicon Analytic detector de índice de refração (Hitachi High Tecnologias América, Schaumburg, IL, EUA), e duas colunas (500 Å , 300 x 7,8 mm e 100 Å ,300 x 7,8 mm) (Jordi Gel DVB, Apple Valley, MN, EUA). Condições de análises: as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em tetrahydrofurano; fase móvel: tetrahydrofurano (grau HPLC); fluxo: 1 mL/min; volume injetado: 20,0 µL.²² As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.7. Distribuição regioespecífica. Aproximadamente 150 mg das amostras foram liquefeitas por aquecimento com ar quente e imediatamente dissolvidas em clorofórmio deuterado (500 µL, CDCl₃) e desoxigenado por fluxo de nitrogênio com tetrametilsilano (1%,TMS) como referência de deslocamento químico. As misturas foram mantidas em ultrassom a 60°C até obtenção de soluções homogêneas e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Espectros quantitativos de RMN ¹³C foram adquiridos sem giro a 30°C utilizando o sistema de automação ICON NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) com um espectrometro Bruker Avance-III (500 MHz) operando a 125.69 MHz para o ¹³C, equipado com uma sonda Broadband Observe (BBO) de 5-mm. Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: ¹³C pulso de excitação 90° para 10 µs, varredura de largura de 238 ppm, tempo de repetição de 25 s (tempo de aquisição 10 s + atraso de relaxamento de 15 s), número de exames 128 e ganho do receptor ajustado automaticamente. O tempo experimental foi de 55 min. No espectro de RMN ¹³C foi possível diferenciar ácidos graxos insaturados (AGI) (170,88 ppm) e ácidos graxos saturados (AGS) (170,91 ppm) esterificados na posição *sn*-2 do TAG, e AGI (171,29 ppm) e AGS (171,32 ppm) esterificados nas posições *sn*-1,3 do TAG. O assinalamento dos AGI e AGS foi realizado com base no efeito indutivo da dupla ligação sobre o grupo carbonila usando o método descrito por Vlahov *et al.*²³ Todas as amostras foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.8. Conteúdo de gordura sólida (CGS). O conteúdo de gordura sólida foi determinado por espectrometria de ressonância magnética nuclear com o equipamento Bruker Minispec PC 120 (Silberstreifen, Rheinstetten, Alemanha)

juntamente com Banhos secos de alta precisão Tcon 2000 (0 - 70°C) (Duratech, Carmel, IN, EUA). O conteúdo de gordura sólida foi determinado de acordo com método oficial da American Oil Chemists' Society No. Cd 16b-93 (2009)¹⁸, sendo este um método direto com leituras das amostras em série em temperaturas de 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C, com têmpera para gorduras não estabilizadas. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.9. Comportamento térmico. Perfis de cristalização das amostras foram determinados em calorímetro diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimeter* – DSC) modelo Q2000 (TA Instruments) conforme o método oficial da American Oil Chemists' Society No.Cj 1-94,¹⁸ pesando 8-12 mg de amostra em um recipiente de alumínio com capacidade volumétrica de 40µL e seladas. O instrumento foi calibrado com índio (PF=156,5°C, ΔH_f =28,45J/g). As amostras foram aquecidas a 80°C a 10°C/ min e mantidas durante 10 min. As amostras foram, em seguida, resfriadas para -60°C a 10°C/ min e mantidas durante 30 min e finalmente aqueceu-se a 80°C a 5°C / min. Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliação dos resultados: temperatura onset de cristalização (Toc), temperatura de pico de cristalização (Tpc), entalpias de cristalização (ΔH_c) e temperaturas finais de cristalização (Tfc). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.10. Microscopia sob luz polarizada. Para a morfologia e estudo das dimensões cristalinas, as amostras foram fundidas à temperatura de 70°C em forno de microondas. Com o auxílio de um tubo capilar, uma gota de amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida em temperatura controlada (70°C), que foi, em seguida coberta com uma lamínula. As lâminas foram preparadas em duplicata e mantidas durante 24 h em duas estufas na temperatura de 25°C. A morfologia dos cristais foi avaliada com o uso de microscópio de luz polarizada (Olympus BX 51) acoplado a câmara de vídeo digital (Media Cybernetics). As lâminas foram colocadas sobre o suporte da placa de aquecimento, mantidas à mesma temperatura de cristalização. As imagens foram capturadas pelo aplicativo Image Pro-Plus (Media Cybernetics), utilizando luz polarizada e com ampliação de 40 x. Para cada lâmina foram focalizados três campos visuais. O diâmetro médio dos cristais foi selecionado como parâmetro de avaliação para a análise quantitativa das

imagens e calculado usando o programa Image Pro-Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA).

2.2.11. Difração de Raios-X. As amostras foram completamente fundidas e cristalizadas a 25°C, em BOD durante 24h. A difração de raios-X foi determinada conforme o método oficial da American Oil Chemists' Society No. Cj 2-95 (2009).¹⁸ As medidas foram realizadas no difratômetro Philips (PW 1710), utilizando a geometria Bragg-Bretano ($\Theta:2\Theta$) com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, tensão de 40 KV e corrente de 30 mA). As medidas foram realizadas com passos de $0,03^\circ$ em 2Θ e tempo de aquisição de 2 s e scan de $14,5$ a $27,5^\circ$ (escala 2Θ). A identificação das formas polimórficas foi realizada a partir dos *short spacings*, que são característicos dos cristais.

2.2.12. Análise estatística. Os dados obtidos pelas análises de classes de lipídios foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com o sistema de software STATISTICA versão 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Testes de Tukey foram aplicados para comparações estatísticas dos meios, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição de ácidos graxos. Na Tabela 1 foram apresentadas as composições de AG das matérias-primas e das misturas físicas (MI) em diferentes proporções. O principal AG do OGAO foi ácido oléico (C18:1) com 87,4%, seguido por 5,8% de ácido linoléico (C18:2) e 3,7% de ácido palmítico (C16:0).¹

Tabela 1. Composição em ácidos graxos (%) das matérias primas originais, óleo de girassol alto oléico (OGAO), óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado (OGAOTH) e das misturas binárias (OGAO:OGTH).

Ácidos graxos (%)	Matérias primas (%)		OGAO:OGAOTH (% p/p)			
	OGAO	OGAOTH	60:40	50:50	40:60	30:70
C16:0 (P-palmitico)	3,7	3,7	3,7	3,7	3,6	3,8
C18:0 (St-esteárico)	3,2	96,3	40,4	49,7	58,7	68,2
C18:1 (O-oléico)	87,4	-	52,4	43,7	35,3	26,2
C18:2 (L-linoléico)	5,8	-	3,5	2,9	2,3	1,8
Σ Saturados	6,9	100,0	44,1	53,4	62,3	72,0
Σ Insaturados	93,1	-	55,9	46,6	41,2	28,0

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.

No OGAOTH, o principal AG foi o ácido esteárico (C18:0) com 96,3% seguido por 3,7% do ácido palmítico (C16:0). A composição das misturas apresentou somente quatro tipos de AG (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) e variou de 3,6 - 3,8% de ácido palmítico (C16:0), seguido por 40,4 - 68,2% de ácido esteárico (C18:0), 26,2 - 52,4% de ácido oléico (C18:1) e 1,8 - 3,5% de ácido linoléico (C18:2).

3.2. Composição em triacilgliceróis. As espécies de TAG do OGAO, OGAOTH, misturas e dos produtos interesterificados são apresentados na Tabela 2. As espécies predominantes de TAG no OGAO foram OOO (80,4%), seguidos por POO / OPO (11,8%), OOL / OLO (5,8%), OLL (2,1%) e PPO / POP (0,5%). As principais espécies TAG no OGAOTH foram StStSt (88,1%) e PStSt / StPSt (11,9%). As principais espécies TAG das misturas físicas foram StStSt (35,9 - 61,8%) e OOO (24,2 - 48,7%). A interesterificação produziu alteração significativa na composição de TAG das misturas. Houve acentuada diminuição dos OOO e StStSt, enquanto novas espécies TAG, como StStO / StOSt, StOO / OStO e PStO / POSt foram detectadas. As principais espécies TAG da IQ foram StStO / StOSt (20,0 - 38,0%) e StOO / OStO (14,4-30,0%), enquanto da IE foram StStO / StOSt (30,2 - 36,4%) e StOO / OStO (14,0 - 30,5%). Uma pequena quantidade de PStO / POSt (4,5 - 5,3%) foi observada também como uma nova espécie para ambas as reações de interesterificação (IQ e IE).

Tabela 2: Composição em TAG (%) do óleo de girassol alto oléico (OGAO), óleo de girassol alto oleico totalmente hidrogenado (OGAOTH), misturas (MI) e após a interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

Matérias primas				OGAO:OGAOTH (%p/p)											
				60:40			50:50			40:60			30:70		
NC	TAG	OGAO	OGAOTH	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE
50	PPO/POP	0,5	ND	0,2	ND	ND	0,3	ND	ND	0,2	ND	ND	0,1	ND	ND
52	PStSt/ StPSt	ND	11,9	4,8	1,8	2,0	6,1	2,7	2,9	7,2	4,2	4,2	8,1	5,6	5,7
	PStO/ POSt	ND	ND	ND	5,3	5,3	ND	5,1	5,2	ND	5,2	5,1	ND	4,5	4,7
	POO/OPO	11,2	ND	6,8	3,7	3,2	5,0	2,0	2,6	4,5	1,6	1,6	3,4	ND	ND
54	StStSt	ND	88,1	35,9	17,0	7,3	44,4	11,6	14,9	52,9	20,5	21,2	61,8	33,5	35,4
	StStO/ StOSt	ND	ND	ND	20,0	30,2	ND	32,2	31,6	ND	38,0	36,4	ND	36,3	34,5
	StOO/ OSO	ND	ND	ND	30,0	30,5	ND	29,8	26,6	ND	21,4	22,0	ND	14,4	14,0
	OOO	80,4	ND	48,7	15,7	15,1	40,5	11,2	10,9	32,1	6,6	7,0	24,2	4,2	4,3
	OOL/OLO	5,8	ND	2,4	4,2	4,1	2,8	3,8	3,6	2,3	2,5	2,5	1,8	1,5	1,4
	OLL	2,1	ND	1,2	2,3	2,3	0,9	1,6	1,7	0,8	ND	ND	0,6	ND	ND

NC: número de carbono; ND: não detectado; P: ácido palmítico; St: ácido esteárico; O: ácido oléico; L: ácido linoleico.

Chae *et al.*²⁴ observaram também este tipo de comportamento na IE de óleo de girassol alto oleico e óleo de soja totalmente hidrogenado com Lipozyme TL IM. Foram identificadas significativas diminuições dos 3 principais TAGs (OOO, StStSt, e PStSt). Entretanto, aumentos acentuados nas espécies TAGs recém-formados de POSt e StOSt, bem como, StOO também foram observados.

3.3. Classes de lipídios. Em processos de interesterificação ocorre a formação de glicérides parciais como diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), os quais estão relacionados com certos parâmetros de reação (tempo, temperatura, suporte de imobilização da enzima, proporção de substrato e teor de água).^{25,26} Os valores de TAG, DAG e MAG das misturas e os produtos das IQ e IE estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (AGL) das misturas (MI) e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

OGAO:OGAOTH (%p/p)		TAG	DAG	MAG/AGL
60:40	MI	99,4±0,1 ^a	0,0±0,0	0,6±0,0 ^a
	IQ	89,7±0,0 ^b	7,8±0,1 ^a	2,4±0,0 ^b
	IE	89,9±0,0 ^b	9,7±0,0 ^b	0,4±0,0 ^c
50:50	MI	99,3±0,0 ^a	0,0±0,0	0,7±0,0 ^a
	IQ	89,6±0,0 ^b	8,0±0,0 ^a	2,4±0,0 ^b
	IE	90,7±0,0 ^c	8,6±0,4 ^b	0,7±0,3 ^a
40:60	MI	99,3±0,0 ^a	0,0±0,0	0,7±0,0 ^a
	IQ	89,7±0,3 ^b	8,0±0,3 ^a	2,2±0,0 ^b
	IE	89,5±0,2 ^b	9,9±0,2 ^b	0,6±0,0 ^c
30:70	MI	99,3±0,0 ^a	0,0±0,0	0,7±0,0 ^a
	IQ	88,1±0,1 ^b	9,5±0,0 ^a	2,4±0,1 ^a
	IE	89,8±0,4 ^b	9,4±0,1 ^a	0,8±0,2 ^c

Mesmas letras para as mesmas colunas indicam que não existem diferenças significativas entre as médias avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$); OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.

Os valores DAG mais elevados foram observados na reação enzimática (8,6-9,9%) comparados à reação química (7,8-9,5%), que estão relacionados com a quantidade de água, temperatura, carga enzimática e

tempo de reação em processo por batelada. ²⁷ Ahmadi *et al.*⁴ estudaram as interesterificações química e enzimática das misturas dos óleos de girassol alto oléico e canola totalmente hidrogenado e também encontraram níveis mais altos da DAG na IE comparados a IQ.

3.4. Distribuição regioespecífica. A distribuição estereoespecífica dos ácidos graxos em óleos e gorduras produz efeito sobre as qualidades nutricionais e tecnológicas. A espectroscopia de RMN ¹³C provou ser uma análise para determinar as estruturas de TAG. A metodologia proporcionou bons resultados com a preparação mínima da amostra e em menor tempo experimental. Os cálculos das composições e distribuição dos ácidos graxos entre as posições *sn*-1,3 e *sn*-2 dos TAG podem ser facilmente realizados, utilizando a metodologia de alta resolução quantitativa de RMN ¹³C, baseada nos carbonos da carbonila das cadeias acil dos TAG.²⁸ Na Tabela 4 são apresentadas as porcentagens de ácidos graxos insaturados (AGI) e ácidos graxos saturados (AGS) presentes nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 do glicerol antes e depois das IE e IQ. Houve uma diminuição nos AGI na posição *sn*-2 nas misturas físicas (MI), a medida que aumentou-se a proporção de OGAOTH. A IQ é uma reação aleatória, mostrando um menor teor de AGI na posição *sn*-2 nos TAG do que na IE. As amostras da IQ apresentaram um teor de AGI entre 23,2 - 49,2%, enquanto as amostras da IE o teor foi de 27,0 a 53,2%. A IE apresentou migração acil comparada com misturas físicas (MI), mas em valor menor do que na IQ. O teor de AGS aumentou na posição *sn*-1,3 em todas as MI com o aumento na proporção de OGAOTH. A variação do AGS na IQ foi maior do que na IE, respectivamente, 53,6-77,7% e 51,0-74,8%.

Tabela 4. Distribuição dos ácidos graxos (%) nas posições *sn*-2, *sn*-1,3 dos TAG nas misturas (MI), após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

OGAO:OGAOTH (%p/p)		Posição <i>sn</i> -2 (%)		Posição <i>sn</i> -1,3 (%)	
		AGI	AGS	AGI	AGS
60:40	MI	55,7	44,3	47,0	53,0
	IQ	49,2	50,8	46,4	53,6
	IE	53,2	46,8	48,9	51,1
50:50	MI	52,0	48,0	43,6	56,4
	IQ	42,1	57,9	42,1	57,9
	IE	48,0	52,0	47,5	52,5
40:60	MI	38,5	61,5	32,9	67,1
	IQ	33,1	66,9	33,4	66,9
	IE	35,9	64,1	32,5	67,5
30:70	MI	32,3	67,7	27,5	72,5
	IQ	23,2	76,8	22,3	77,7
	IE	27,0	73,0	25,2	74,8

OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado; AGS: ácido graxo saturado; AGI: ácido graxo insaturado.

A migração acil é um processo termodinâmico e espontâneo durante a interesterificação enzimática por lipase específica, resultando na perda de seletividade.²⁵ Vários autores têm estudado a Lipozyme TL IM na IE, analisando a migração acil. Os resultados desses estudos mostraram que a especificidade da lipase pode ser influenciada pela migração acil.^{29,30}

3.5. Conteúdo de gordura sólida. A curva CGS versus temperatura é um parâmetro importante para analisar muitas características de gorduras, tais como aparência, espalhabilidade, exsudação de óleo e outras propriedades.³¹ A interesterificação resultou numa diminuição da CGS nas misturas em todas as proporções (Figura1). Este efeito está associado com uma redução nos TAG trissaturados (StStSt, PStSt / StPSt) e o surgimento de novas espécies de TAG como os dissaturados-monoin saturados (StStO / StOSt, PStO / POSt) e monossaturados-diinsaturados (StOO / OStO) em quantidades consideráveis. Após a interesterificação houve uma grande diminuição em todas as curvas das misturas de CGS a temperatura de 35°C.

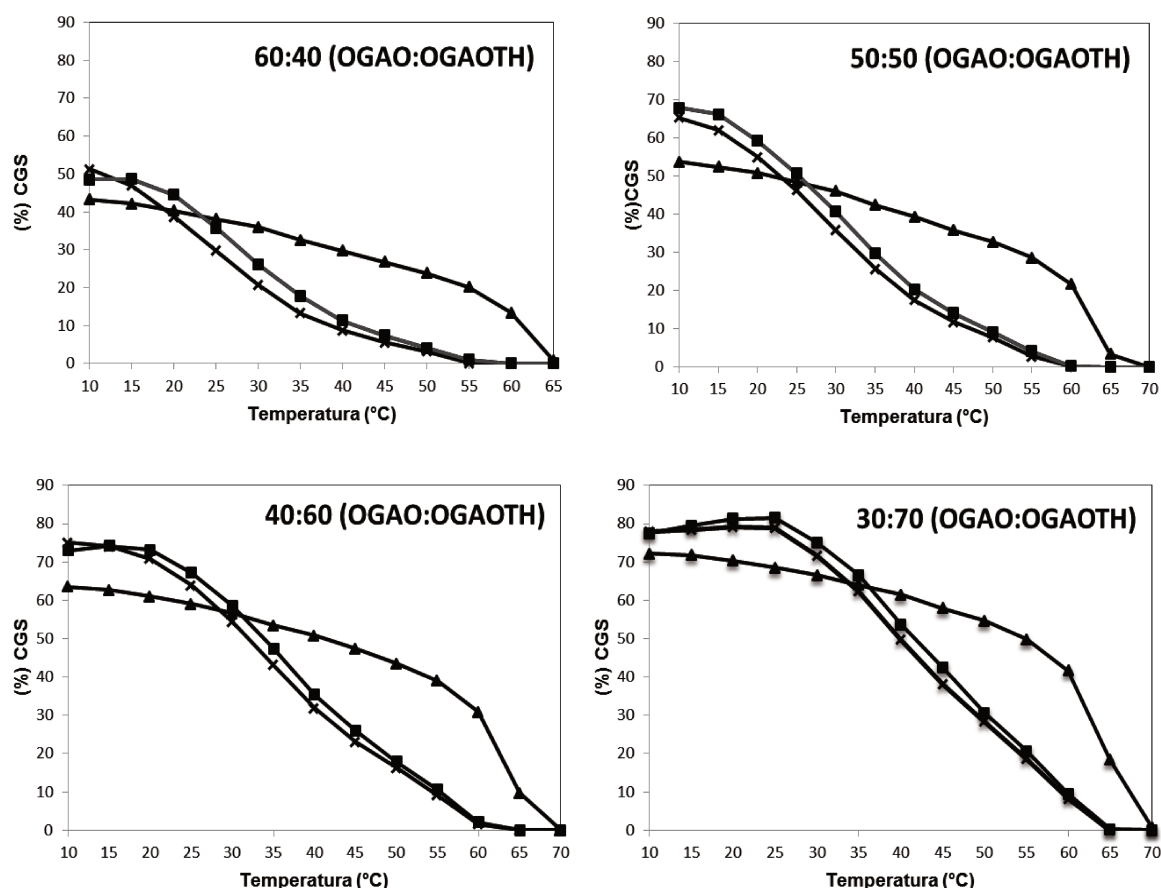


Fig. 1 Conteúdo de gordura sólida (%) da mistura (MI-▲) dos óleos de girassol alto oléico (OGAO) girassol alto oléico totalmente hidrogenado (OGAOTH) e após interesterificação química (IQ-x) e enzimática (IE-■).

Nas temperaturas acima deste intervalo, as curvas de CGS da IQ e IE são muito semelhantes, as quais diminuem linearmente até derreter completamente entre 60°C e 65°C. As misturas físicas em todas as proporções em peso mostraram valores de CGS de 38,0-68,6% a 25°C. Enquanto que os valores de CGS das gorduras obtidas por IQ foram de 29,8-78,9% e por EI foram 35,7-81,6% a 25°C. A 40°C, os valores de CGS das misturas foram reduzidos a 29,7-61,5%, enquanto os valores de CGS dos LE obtidos por IQ foram entre 8,8-49,7% e por EI foram entre 11,3-53,7%. Todos LE têm CGS maior que 10% a 20°C e 22°C, um resultado que proporciona resistência à exsudação.³² Todos LE mostraram CGS acima de 25% (Figura 1) à temperatura ambiente (25°C). Estes LE foram projetados para ter amplas aplicações em alimentos, como uma base gordura para “*shortenings*”, em

gorduras de padaria / confeitaria e como um aditivo de cristalização para lipídios.

3.6. Perfil de cristalização. O comportamento térmico das amostras de gorduras pode ser estudado utilizando calorimetria de varredura diferencial (DSC). Perfis térmicos de DSC podem ser utilizados para monitorizar a reação IE e explicar a mudança das propriedades físicas dos productos interesterificados.³³ Os perfis das curvas foram modificados por meio da reação, que reflete a alteração na composição dos TAG. A Fig. 2 mostra o perfil de cristalização do MI, IE e IQ das misturas de OGAO:OGAOTH. As misturas físicas (MI) mostraram um pico pronunciado, o que caracteriza a fração triinsaturada (SSS) do OGAOTH com alta temperatura de cristalização. As temperaturas de cristalização das misturas aumentaram em relação à quantidade de OGAOTH, portanto, acelerou o processo de cristalização. As temperaturas de cristalização iniciaram na faixa 44,5-49,1°C. O segundo pico apresentou menor intensidade na fração triinsaturada (OOO) do OGAO com menor temperatura de cristalização. Resultados semelhantes foram observados no estudo da IE a partir de OGAO e tripalmitina ou tristearina.¹⁷

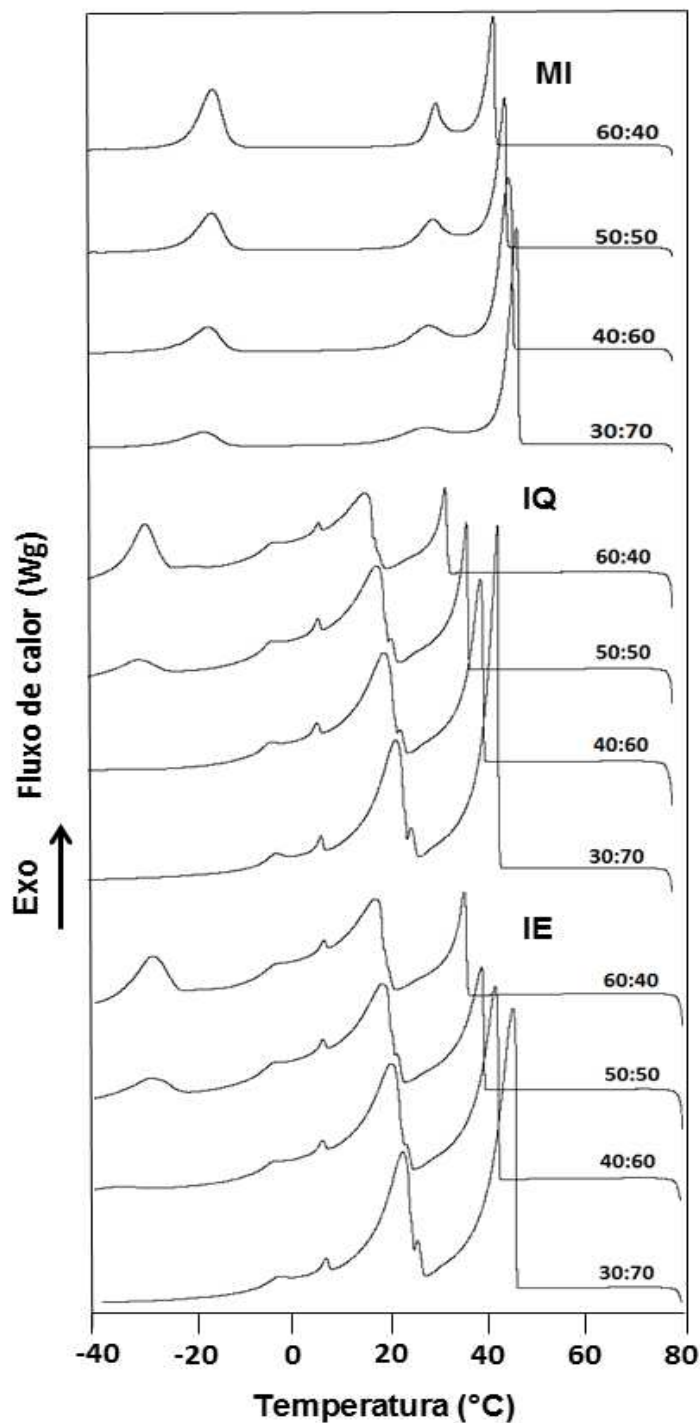


Fig. 2 Perfis de cristalização das misturas (MI) dos óleos de girassol alto oléico (OGAO) e girassol alto oléico totalmente hydrogenado (OGAOTH), após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

Após interesterificação (IE e IQ) o perfil de cristalização mudou, produzindo outros tipos de TAG intermediários. As misturas interesterificadas 60:40 e 50:50 (OGAO: OGAOTH) apresentaram três picos e nas misturas

40:60 e 30:70 dois picos com valores de temperaturas de cristalização próximos para IE e IQ. Os segundos picos tiveram uma faixa de início de cristalização nas temperaturas entre 16,5-22,9°C, característica de um aumento substancial no conteúdo de TAG de ponto de cristalização intermediária como monoinsaturados-dissaturados (StStO/StOSt) e diinsaturado-monossaturado (StOO/OStO). Este tipo de comportamento também foi observado por Ribeiro *et al.*³⁴ na interesterificação de misturas de óleo de soja e óleo de soja totalmente hidrogenado.

3.7. Microestrutura. Microscopia sob luz polarizada é a técnica mais utilizada para visualizar as redes microestruturais de gorduras, a fim de explicar as diferenças de textura e cristais destes materiais, e as mudanças morfológicas que ocorrem durante o crescimento desses cristais. Através desta técnica, também são observadas alterações nas formas polimórficas, resultantes da interesterificação de gorduras.³⁵ A Fig. 3 apresenta as estruturas cristalinas das misturas (OGAO:OGAOTH) antes e depois da interesterificação obtidas por cristalização a 25 °C / 24h e ampliação de 40x. Nas misturas físicas (MI) foram observadas a formação de esferulitos com maior tamanho nas misturas 40:60 e 30:70 (OGAO:OGAOTH), devido à maior proporção de triestearina (StStSt). A presença de esferulitos grandes ou esferulitos aglomerados proporciona à gordura uma textura granulada indesejável e é função principalmente da triestearina nas misturas.³⁶ Observou-se que o diâmetro do cristal diminui com o aumento do teor de OGAO na mistura. A IE e IQ alteraram a morfologia do cristal de todas as misturas. Depois de interesterificação foram observados cristal esferulitos menos densos com estrutura fortemente aglomerada nas misturas 40:60 e 30:70 (OGAO:OGAOTH) comparadas as misturas físicas. No entanto, as misturas 50:50 e 60:40 (OGAO: OGAOTH) após a interesterificação mostraram formação de cristais esferulitos mais densos com a estrutura fracamente aglomerada.

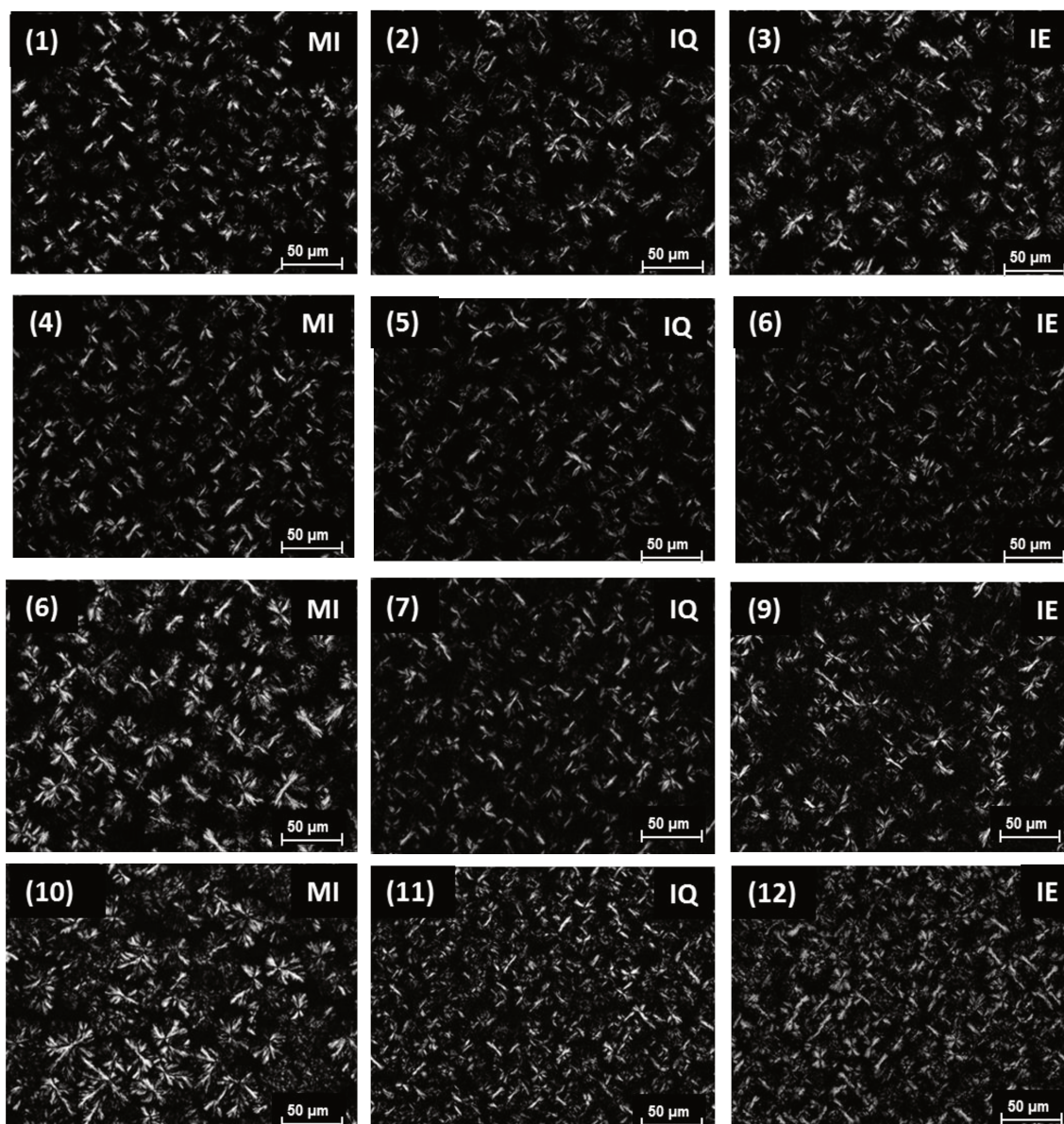


Fig. 3 Imagens de cristalização nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado (OGAOTH) e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) a 25°C/24h com aumento de 40x. Proporções: 60:40 (1-3), 50:50 (4 -6), 40:60 (7-9) e 30:70 (10-12).

Segundo os autores Ribeiro et al, a interesterificação de misturas de óleo de canola e óleo de semente de algodão totalmente hidrogenado provocou uma diminuição no tamanho do cristal.³⁷ As diferenças nas estruturas cristalinas podem ser significativamente influenciadas por interações entre as moléculas no estado cristalino e a quantidade de óleo líquido em torno dos cristais, fatores que promoveriam diferenças estruturais em muitos níveis diferentes da formação dos cristais e agregados até a formação de aglomerados.³⁸ Os processos de IE e IQ diminuíram os $D_{\max}$ dos cristais, mas,

simultaneamente, o aumento da concentração do OGAOTH nas misturas resultou em um aumento no $D_{\max}$ dos cristais para ambos os processos. A variação do diâmetro médio do cristal da IE e IQ foi de 18,5 μm a 22,7 μm . O diâmetro médio dos cristais da gordura deve ser inferior a 30 μm para evitar uma sensação arenosa na boca.³⁹

3.8. Polimorfismo. As formas polimórficas de gorduras são fases sólidas de mesma composição química, que mediante a fusão produz fases líquidas idênticas. A forma α é metaestável e, assim, transforma-se em formas mais estáveis. Duas formas cristalinas são chamadas "monotrópicas" quando uma é mais estável do que a outra, e a recristalização irá tomar lugar somente na direção da forma mais estável. As três formas polimórficas podem diretamente se formar a partir da massa fundida. Também é evidente a irreversibilidade da transformação do α para β para β' .⁴⁰ A difração de raios-X é utilizada para diferenciar entre os polimorfos de lipídicos. Os *short spacings* (SS) representam a distância entre planos adjacentes numa arranjo cristalino.⁴¹ A Tabela 5 mostra o padrão de difração de raios-X com *short spacing* e formas polimórficas a 25°C durante 24h das misturas físicas 50:50 e 30:70 (OGAO:OGAOTH) (MI) e gorduras interesterificadas (IE e IQ).

Tabela 5. Formas polimórficas a 25°C por 24h das misturas antes (MI) e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

OGAO:OGAOTH	<i>Short spacing</i> (Å)				Forma polimórfica
	4,6	4,2	3,9	3,8	
50:50 - MI	4,60 (fo)	4,28 (m)	3,93 (m)		$\beta > \beta'$
30:70 - MI	4,59 (m)	4,24 (m)	3,90 (m)		$\beta' + \beta$
50:50 - IQ	4,60 (fo)	4,27 (m)		3,89 (m)	$\beta > \beta'$
30:70 - IQ	4,59 (f)	4,28 (fo)		3,88 (m)	$\beta' > \beta$
50:50 - IE	4,60 (fo)	4,28 (f)	3,92 (m)		$\beta > \beta'$
30:70 - IE	4,59 (m)	4,25 (m)	3,90 (m)		$\beta' + \beta$

Intensidades: f: fraco; m: médio; fo: forte; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.

As misturas físicas exibiram uma mistura de formas β (intensidade forte ou média) e β' (intensidade média), enquanto que após a interesterificação na mistura 30:70 (IE e IQ) a intensidade de curto espaçamento representando a forma β pareceu diminuir, e mostrou forma β' de cristal mais dominante do que na mistura física. Na mistura 50:50 após a interesterificação (IE e IQ) continuou uma mistura das formas β (intensidade forte) e β' (média e fraca intensidade). De acordo com os resultados, o polimorfo β' está associado com o aumento do OGAOTH na mistura.

Difratogramas das misturas obtidos a 25°C durante 24h antes (MI) e após a interesterificação (IE e IQ) são mostradas na Fig. 4. Os cristais β' são pequenos e sua morfologia é apropriada às características de plasticidade, estabilizando ar em gorduras para produtos de padaria e confeitaria. A forma β compreende cristais grandes que dão dureza e que pode ser usado como um aditivo de cristalização para lipídios. Outros estudos anteriores relataram resultados semelhantes.^{13,42}

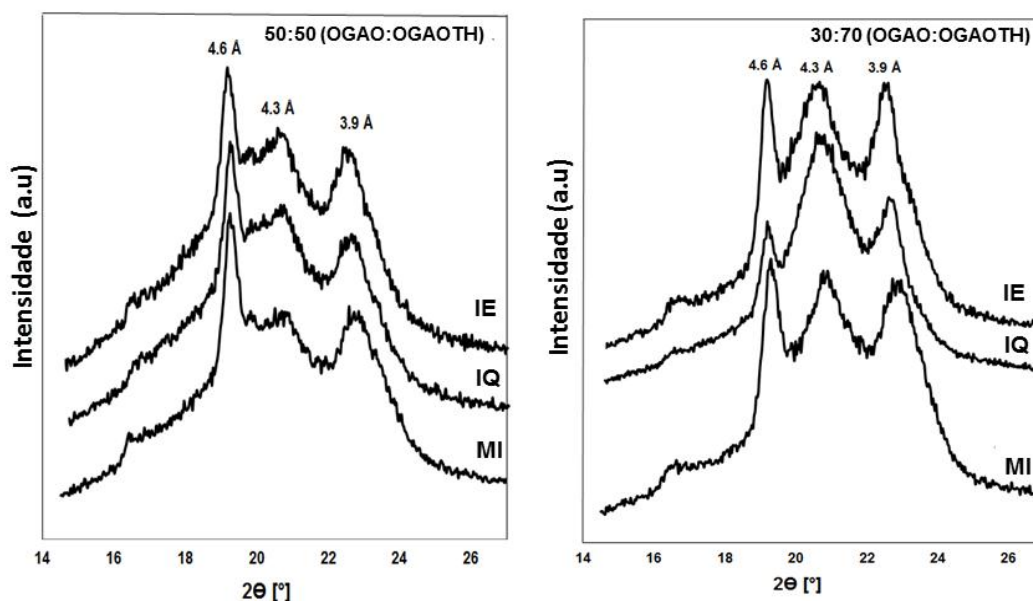


Fig. 4 Difratogramas das misturas obtidos a 25°C/24h antes (MI) e após a interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) dos óleos de girassol alto oléico (OGAO) e girassol alto oléico totalmente hidrogenado (OGAOTH) nas proporções de 50:50 e 30:70.

Concluindo, este estudo demonstrou que tanto a interesterificação enzimática como a química modificaram significativamente a composição dos triacilglicerois, e, conseqüentemente, o perfil de cristalização e conteúdo de

gordura sólida das misturas. O processo enzimático com 3h de tempo de reação mostrou a produção de novos TAG e menor migração de acil do que IQ, evidenciado por RMN ^{13}C . Os LE obtidos apresentaram características adequadas para aplicação como gorduras para padaria e como um aditivo de cristalização para lipídios.

INFORMAÇÃO DO AUTOR

Correspondência do autor

*Endereço e-mail: morselliribeiro@uol.com.br. Fax: 55-19-32891186 (M.D.M.M. Ribeiro).

Financiamento

Os autores agradecem o apoio financeiro do CAPES, CNPq e FAPESP.

Notas

Os autores declaram que não há interesse financeiro concorrente.

ABREVIÇÃO USADA

AG, ácido graxo; AGI, ácido graxo insaturado; AGL, ácido graxo livre; AGS, ácido graxo saturado; CGS, conteúdo de gordura sólida; DAG, diacilgliceróis; DSC, calorimetria de varredura diferencial; IE, interesterificação enzimática; IQ, interesterificação química; LE, lipídios estruturados; MAG, monoacilgliceróis; MI, mistura; OGAO, óleo de girassol alto oleico; OGAOTH, óleo de girassol totalmente hidrogenado; RMN, ressonância magnética nuclear; S₃, trissaturado; S₂I, dissaturado-monoin saturado; I₂S, diinsaturado-monossaturado; I₃, triinsaturado; TAG, triacilgliceróis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, agências CNPq e FAPESP e as empresas Dow AgroSciences – distribuidora Quantiq Ltda (São

Paulo, Brasil) pelo fornecimento do óleo de girassol alto oléico e a Sina S.A. pelo processo de hidrogenação do óleo.

REFERÊNCIAS

- (1) Alberio, C.; Izquierdo, N. G.; Galella, T.; Zuil, S.; Reid, R.; Zambelli, A.; Aguirrezábal, L. A. N. A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. *Europ. J. Agron.* **2016**, 73, 25–33.
- (2) Osborn, H. T.; Akoh, C. C. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2002**, 3, 93–103.
- (3) Iwasaki, Y; Yamane, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2000**, 10, 129-140.
- (4) Ahmadi, L.; Wright, A. J.; Marangoni, A. G. Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Chemical composition, solid fat content and thermal properties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, 110, 1014–1024.
- (5) Farfán, M.; Álvarez, A.; Garate, A.; Bouchon, P. Comparison of chemical and enzymatic interesterification of fully hydrogenated soybean oil and walnut oil to produce a fat base with adequate nutritional and physical characteristics. *Food Technol. Biotechnol.* **2015**, 53, 361-366.
- (6) Akoh, C. C. Making new structured fats by chemical reaction and enzymatic modification. *Lipid Technol.* **1997**, 5, 61–66.
- (7) Berry, S. E. E.Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* **2009**, 22, 3–17

- (8) Pacheco, C.; Crapiste, G. H.; Carrín, M. E. Study of acyl migration during enzymatic interesterification of liquid and fully hydrogenated soybean oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, 122, 117–124
- (9) Brys J.; Wirkowska, M.; Gorska, A.; Ostrowska-Ligeza, E.; Brys, A. Application of the calorimetric and spectroscopic methods in analytical evaluation of the human milk fat substitutes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, 118, 841–8.
- (10) Zou, X.Q.; Huang, J.H.; Jin, Q.Z.; Guo, Z.; Cheong, L.Z.; Xu, X.B.; Wang, X.G. Preparation of human milk fat substitutes from lard by lipase-catalyzed interesterification based on triacylglycerol profiles. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, 91, 1987–98.
- (11) Kim, S.; Kim, I.H.; Ako, C.C.; Kim, B.H. Enzymatic production of cocoa butter equivalents high in 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearin in continuous packed bed reactors. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, 91:747.
- (12) Ruan, X.; Zhu, X.M.; Xiong, H.; Wang, S.Q.; Bai, C.Q.; Zhao, Q. Characterisation of zero-*trans*margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, 49, 91–7.
- (13) Zhao, S. Q.; Hu, J. N.; Zhu, X. M.; Bai, C. Q.; Peng, H.L.; Xiong, H., Hu, J.W.; Zhao, Q. Characteristics and feasibility of trans-free plastic fats through Lipozyme TL IM-catalyzed interesterification of palm stearin and Akebia trifoliata variety Australis seed oil. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 3293–300.
- (14) Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 62, 197–212.

- (15) Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Fernandez-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6290—6307.
- (16) Lee, Y. Y.; Tang, T. K.; Phuah, E. T.; Karim, N. A. A.; Alwi, S. M. M.; Lai, O. M. Palm-based medium-and-long-chain triacylglycerol (P-MLCT): production via enzymatic interesterification and optimization using response surface methodology (RSM). *J. Food. Sci. Technol.* **2015**, 52, 685–696.
- (17) Ifeduba, E. A.; Martini, S.; Akoh, C. C. Enzymatic interesterification of high oleic sunflower oil and tripalmitin or tristearin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2016**, 93, 61–67.
- (18) [AOCS] American Oil Chemist's Society. *Official and recommended methods of the American Oil Chemist's Society*, 15th ed.; AOCS Press: Champaign, IL, **2009**.
- (19) Grimaldi, R.; Gonçalves, L. A. G.; Ando, M. Y. Otimização da reação de interesterificação química de óleo de palma. *Quím. Nova.* **2005**, 28, 633-636.
- (20) Hartman, L.; Lago, R.C.A. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* **1973**, 22, 475–494.
- (21) Antoniosi Filho, N.; Mendes, O. L.; Lanças, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, **1995**, 40, 557-562.
- (22) Dobarganes, M. C.; Velasco, J.; Dieffenbacher, A.; Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1563–1575.

- (23) Vlahov, G.; Giuliani, A. A; Del, R. P.. ^{13}C NMR spectroscopy for determining the acylglycerol positional composition of lampante olive oils. Chemical shift assignments and their dependence on sample concentration. *Anal. Methods*. **2010**, 2, 916–923.
- (24) Chae, M. H.; Park, H. K.; Kwon, K. I.; Kim, J. W.; Hong, S. I.; Kim, Y.; Kim, B. H.; Kim, I. H. Lipase-catalyzed interesterification in packed bed reactor using 2 different temperatures. *J. Food Sci.*, **2011**, 76, 555-559.
- (25) Xu, X.; Skands, A.R.H.; Hoy, C.E.; Mu, H.; Balchen, S.; Nissen, J. A. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration. *J. Am. Oil Chem. Soc* , **1998**, 9, 1179-1185.
- (26) Kadivar, S.; Clercq, N.; Van deWalle, D; Dewettinck, K. Optimisation of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic sunflower oil. *J. Sci .Food. Agric.*, **2014**, 94, 1325–1331.
- (27) Xua, X.; Mub, H.; Skandsa, A.R.H., Høyb, C.-E.; Adler-Nissena, J. Parameters affecting diacylglycerol formation during the Production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 175-171.
- (28) Vlahov, G. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy to check 1,3-random, 2-random pattern of fatty acid distribution in olive oil triacylglycerols. *Spectroscopy*, **2005**, 19, 109–117 109.
- (29) Teichert, S; Akoh, C.C. Characterization of stearidonic acid soybean oil enriched with palmitic acid produced by solvent-free enzymatic interesterification. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 9588–9595.
- (30) Zhao, S.Q.; Hu, J.N.; Zhu, X.M.; Bai, C.Q. et al. Characteristics and feasibility of trans-free plastic fats through lipozyme TL IM-Catalyzed interesterification of palm stearin and Akebia trifoliata variety Australis seed oil. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 3293–3300.

- (31) Lida, A. M. D. N.; Sundram, 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. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2002**, 79, 1138-1143.
- (32) Guedes, A.M.M.; Chiu Chih Ming, C.C.; Ribeiro, A.P.B.; Silva, R.C.; Gioielli, L.A.; Gonçalves, L.A.G. Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated *Crambe abyssinica* oil and soybean oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 2014, 91, 111–123.
- (33) Danthine, S; Clercq, N.D.; Dewettinck, K.; Gibon, V. Monitoring batch lipase catalyzed interesterification of palm oil and fractions by differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, 115, 2219–2229.
- (34) Ribeiro, A.P.B.; Grimaldi, R.; Gioielli, L.A.; Santos, A.O. et al. Thermal behavior, microstructure, polymorphism, and crystallization properties of zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil. *Food Biophysics*, **2009**, 4, 106-118.
- (35) Rousseau, D. R.; Marangoni, A. G. The Effects of interesterification on the physical properties of fats. In *Physical Properties of Lipids*. Marangoni, A. G; Narine, S., Eds; CRC Press, New York, USA, **2002**.
- (36) Narine, S.S.; Humphrey, K.L. A comparison of lipid shortening functionality as a function of molecular ensemble and shear: microstructure, polymorphism, solid fat content and texture. *Food Res. Int.*, **2004**, 37, 28–38.
- (37) Ribeiro, A.P.B.; Basso, R.C.; Grimaldi, R.; Gioielli, L;A. et al. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Res. Int.*, **2009**, 42, 1153–1162.

- (38) Shi, Y.; Liang, B.; Hartel, R.W. Crystal Morphology, Microstructure and textural properties of model lipid systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2005**, 82, 399-408.
- (39) Marangoni, A.G.; Narine, S.S. Identifying key structural indicators of mechanical strength in networks of fat crystals. *Food. Res. Int.*, **2002**, 35, 957-969.
- (40) Marangoni, A. G.; Wesdorp, L.H. Crystallography and polymorphism. In *Structure and Properties of Fat Crystal Networks*, 2nd ed; CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL, **2013**, pp 1-24.
- (41) Omar, Z.; Let, C.C.; Seng, C.C.; Rashid, N.A. Crystallization and rheological properties of hydrogenated palm oil and palm oil blends in relation to crystal network. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2005**, 107, 634-640.
- (42) Lee, J.H.; Akoh, C.C.; Lee, K.T. Physical properties of trans-free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2008**, 85, 1–11.

**4.4. Gorduras especiais contendo ácido behênico obtidas por
interesterificação enzimática do óleo de *Crambe abyssinica*
totalmente hidrogenado**

Marilene D. M. Morselli Ribeiro^{1*}, Chiu Chih Ming¹, Thiago I. B. Lopes², Renato
Grimaldi¹, Anita J. Marsaioli², Lireny A. G. Gonçalves¹

**Gorduras especiais contendo ácido behênico obtidas por
interesterificação enzimática do óleo de *Crambe abyssinica*
totalmente hidrogenado**

Resumo

Lipídios estruturados (LE) com baixas calorias ricos em ácidos behênico e oleico foram produzidos por interesterificação enzimática (IE) e química (IQ) de óleo de girassol rico em ácido oléico (OGAO) e óleo de *Crambe abyssinica* totalmente hidrogenado (OCTH) em proporções de 60:40 , 50:50, 40:60 e 30:70 (p/p), respectivamente. A lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) foi usada durante 3h a 70°C, a uma dosagem de 7% (p/p) livre de solventes orgânicos. A mistura inicial (MI) e os produtos da reação foram avaliados quanto as composições em ácido graxos (AG) e triacilgliceróis (TAG), os conteúdos de gordura sólida (CGS), análise térmica, distribuição regioespecífica dos AG, microestrutura e polimorfismo. A tendência da reação foi no sentido de uma redução nos teores TAG C₅₂, C₅₄, C₆₀, C₆₂ e C₆₄ e um aumento nos conteúdos TAG C₅₆, C₅₈ e C₆₆, portanto, o conteúdo de gordura sólida foi reduzido. Menor migração acil na posição *sn*-2 dos TAG foi obtida na IE, em comparação a IQ em todas as proporções das misturas. Os cristais em forma de agulha foram predominantes na IE, enquanto grandes esferulitos simétricos foram observados nas MI. Foi observada a redução no diâmetro médio do cristal em todas as misturas interesterificadas, além das modificações da morfologia dos cristais. A difração de raios-X mostrou uma predominância dos cristais na forma β' , tanto na IE e IQ. Os LE foram produzidos para aplicação na indústria de alimentos como gorduras de panificação / confeitaria nas proporções de 60:40 / 50:50 e como aditivo na cristalização de lipídios nas proporções de 40: 60 / 30:70.

Palavras-chave: lipídios estruturados; interesterificação enzimática; lipase; óleo de *Crambe abyssinica*; óleo de girassol alto oléico; regioespecificidade.

1. Introdução

Crambe abyssinica (Hochst) é uma planta rica em óleo que pertence à família das crucíferas. É nativa da região do Mediterrâneo, mas a espécie mostrou boa adaptação a outras condições climáticas (Souza *et al.* 2009). Esta espécie tem sido cultivada no Brasil, devido ao interesse industrial em extrair o óleo de semente (26-38%) e ao seu alto teor de proteína com grande potencial para cultivo na entressafra, na região Centro-Oeste, já que a referida crucífera apresenta características favoráveis a rotação de culturas com plantio direto após a colheita da soja (Panno *et al.* 2009). O óleo pode ser distinguido de outros pelo seu elevado teor de ácido erúcico (50-60%). Este ácido graxo (AG) contém 22 átomos de carbono e apenas uma ligação dupla, e tem usos industriais especiais (Laghetti *et al.* 1995). O óleo de crambe totalmente hidrogenado é um sólido branco que tem um potencial valor como componente de composições de ceras. O processo de hidrogenação converte o ácido erúcico (C22:1) em ácido behênico (C22:0). O ácido behênico pode ser usado como um elemento funcional de gorduras de baixas calorias e nas gorduras alimentares contendo este ácido graxo é esperado a redução, a deposição de gordura visceral (Kojima *et al.* 2010). Além disso, as gorduras contendo ácido behênico podem ser utilizadas como aditivos de cristalização em sistemas lipídicos (Mori 1989). O óleo de girassol alto oléico tem cerca de 89% de ácido oléico na sua composição em comparação com o óleo tradicional, que contém menos do que 50%. Este aumento da quantidade de ácido oleico fornece alta estabilidade termo-oxidativa (Labalette *et al.* 2012; Alberio *et al.* 2016) e esse óleo é extremamente valioso para alimentos (por exemplo para produtos fritos, padaria e margarinas).

A fim de corresponder a demanda dos alimentos industrializados para desenvolvimento de diferentes gorduras e óleos pode-se realizar a modificação de óleos vegetais para produzir novos produtos que melhorem a funcionalidade, a absorção, o metabolismo e a nutrição (Akoh 1995). Os óleos vegetais são geralmente ricos em ácidos graxos insaturados (AGI) na posição *sn*-2 dos TAG e ácidos graxos saturados (AGS) nas posições *sn*-1 e *sn*-3 (*sn*-1,3). Presume-se que os AGS na posição *sn*-2 podem afetar o metabolismo de lipídico hepático de maneira diferente do que os mesmos ácidos graxo nas

posições *sn*-1 ou *sn*-3 (Mu e Porsgaard 2005). A interesterificação enzimática dos óleos e as *hardfats* foram estudadas nas últimas décadas, utilizando enzimas específicas imobilizadas em processos de batelada e contínuos, relacionados com as condições da reação (temperatura, concentração de enzima, tempo, adição de solvente e velocidade de agitação), a fim de incorporar o AG desejado na estrutura dos TAG. O objetivo foi diminuir a migração do grupo acila na posição *sn*-2 e reduzir a produção de produtos intermediários, tais como diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) (Ifeduba *et al* 2016; Speranza *et al* 2015; Pande *et al* 2013). Essas gorduras podem ser aplicadas em produtos de panificação, margarina, gordura, e também como aditivos de cristalização (Zhao *et al.* 2014; Meng *et al.* 2013).

A utilização de aditivos em sistemas de gordura tem sido investigada por vários pesquisadores, como também a influência sobre as propriedades físicas das gorduras, reduzindo os custos e melhorando a qualidade do produto final (Basso *et al.* 2010; Smith *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2015). Polimorfismo e interações moleculares são propriedades específicas da cristalização de gorduras. Alta similaridade das características da cadeia de acila desses aditivos com as gorduras tais como, comprimento de cadeia e número de ligações duplas, permite a sua integração na matriz do cristal e / ou adesão para um local de crescimento do cristal (Sato 2001; Smith *et al.* 2011). Ribeiro *et al.* (2013a) investigaram cinco *hardfats* como modificadores de cristalização no processo de manteiga de cacau (MC). O melhor resultado foi encontrado com óleo de crumbe totalmente hidrogenado, com um efeito estabilizador sobre o polimorfismo da MC.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas dos LE obtidos a partir da interesterificação enzimática (IE) catalisada por Lipozyme TL IM, específica *sn*-1,3 em misturas binárias de OGAO e OCTH em diferentes proporções em peso (60:40, 50:50, 40:70, 30:70) utilizando 7% (p/p) de Lipozyme TL IM a 70°C durante 3h. A interesterificação química (IQ) foi realizada como controle. Foram analisadas as seguintes propriedades físico-químicas dos LE: composições em AG e TAG, conteúdo de gordura sólida (CGS), calorimetria exploratória diferencial (DSC), migração de acila, microscopia de luz polarizada e difração de raios-X. Estes LE foram projetados

para obter amplas aplicações em alimentos, como gorduras de padaria / confeitaria e aditivos de cristalização em sistemas lipídicos.

2. Material e métodos

2.1. Material

O óleo de girassol alto oléico desodorizado (OGAO) foi fornecido pela empresa Dow AgroSciences - distribuído pela empresa Quantiq Ltda (São Paulo, SP Brasil). O óleo crambe totalmente hidrogenado (OCTH), uso industrial, foi fornecido pela empresa Cargill Agrícola S / A (Itumbiara, GO, Brasil). A enzima imobilizada Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* lipase, específica *sn*-1,3, atividade específica de 329 IUN / g: IUN = unidade de interesterificação) foi doada pela empresa Novozymes do Brasil Ltda (Araucária - Brasil), e o catalisador químico, metóxido de sódio em pó anidro (99%) produzido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das misturas (MI) e condicionamento da enzima

Duas amostras de 100 g das misturas de OGAO e OCTH foram preparadas, derretidas em cada uma das seguintes proporções: 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (m/m). As misturas foram mantidas a 80°C durante 30 min com um agitador magnético para destruir a memória cristalina, e em seguida, armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C. Em escala de laboratório, a lipase específica *sn*-1,3 (Lipozyme TL IM) foi condicionada para remover o ar e a umidade. O Lipozyme TL IM apresentou um teor de umidade de 5% (p/p) e o fabricante (Novozymes) recomenda reduzir este conteúdo, antes de realizar a experiência com o objetivo de diminuir o teor de ácidos graxos livres (AGL) e mono (MAG) e diacilgliceróis (DAG) formados pela hidrólise da gordura. Uma alíquota de 100 g da mistura binária foi colocada em um balão de fundo redondo de 250 ml e, em seguida, aqueceu-se em banho de óleo mineral a 70°C. Quando a temperatura da mistura atingiu 70°C, 7% (m/m) da enzima foi adicionada e a mistura foi agitada

a 300 rpm, utilizando um agitador magnético, sob uma atmosfera de nitrogênio durante 30 minutos. A eliminação do ar foi evidenciada pela ausência de bolhas nos grânulos. A agitação foi desligada, a enzima decantada e a fase superior de óleo removida com uma pipeta. A enzima condicionada foi utilizada imediatamente no IE.

2.2.2. Interesterificação enzimática (IE)

100 g de cada mistura produzida nas proporções de 60:40, 50:50, 40:60 e 30:70 (m/m) foram adicionadas ao balão de fundo redondo de 250 ml, contendo 7% (m/m) de enzima condicionado aquecido num banho de óleo mineral a 70°C com agitação magnética a 300 rpm, sob atmosfera de nitrogênio. Foram realizados testes preliminares, quanto à temperatura e tempo de reação 3, 6 e 9h, avaliando comportamento térmico (DSC) e migração acil. Foi definida a temperatura a 70°C e 3h de reação para o estudo e coletadas amostras de 30g em tubos com tampa para análises, mantendo a agitação. Foi injetado nitrogênio puro na mistura, fechou-se o tubo submetendo-o, durante 10 min, a um banho de água a 95°C para inativação da enzima. O teor de ácidos graxos livres foi determinado como o ácido oléico (% em peso) de acordo com o método AOCS Ca 5a-40 (AOCS 2009). Para remover o AGL, a amostra foi tratada usando um funil de separação de paredes duplas com banho de água aquecida para evitar a solidificação da mistura. Cinco gotas de uma solução de fenolftaleína foram então adicionadas, seguidos por uma quantidade pré-determinada de NaOH 0,2M. A mistura interesterificada foi então lavada com água quente (50-60°C) até ao desaparecimento da cor rósea e em seguida, filtrada através em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro para remover as partículas de umidade e biocatalisador. Os produtos foram secos sob vácuo a 110°C durante 30 min, armazenados em frascos de vidro e estocados a temperatura de -5°C.

2.2.3. Interesterificação química (IQ)

As reações IQ foram realizadas com as mesmas proporções de OGAO e OCTH utilizadas na IE. Em escala de laboratório, 100 g de cada

mistura foram interesterificadas sob agitação magnética, na presença de 0,4% de metóxido de sódio a 99% (p/p) na temperatura de 100°C. O tempo de reação foi de 20 min sob vácuo, de acordo com a otimização efetuada por Grimaldi *et al.* (2005). A reação foi então interrompida pela adição de uma solução de ácido cítrico a 5% e as amostras interesterificadas foram lavadas com água destilada (80°C). Para remoção da umidade, as amostras foram filtradas em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, seguida por secagem sob vácuo a 110°C durante 30 min. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a temperatura de -5°C.

2.2.4. Composição em ácidos graxos (AG)

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) foram preparados conforme Hartman e Lago (1973) e separados utilizando o método AOCS Ce 1f-96. As condições de operação cromatográficas foram: Cromatógrafo de Gás capilar Agilent Série 6850 equipado com uma coluna DB-23 Agilent capilar (50% cianopropila-metilpolisiloxano), dimensões: 60 m; 0,25 mm de d.i. e filme de 0,25 µm. As condições de análise foram: temperatura do forno: 110°C - 215°C (5°C/min), 215°C - 24 min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: hélio; razão split 01:50; volume de injeção: 1,0 µL. A composição qualitativa foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos picos com relação aos picos dos respectivos AGs padrões. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.5. Composição em triacilgliceróis (TAG)

Um cromatógrafo gasoso Agilent 7890 equipado com detector FID e injetor split / splitless foi usado para separar os TAGs produzidos na reação. As amostras foram dissolvidas em heptano na concentração de 2 mg/mL e injetado numa coluna capilar DB-5-HT (15m x 250 µm x 0,1 µm). A temperatura do forno foi programada inicialmente a 360°C com aquecimento para 390°C a 5°C/min, permanecendo nesta temperatura por 14 min. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a 40 cm.s⁻¹ e nitrogênio como make-up a 40 cm.s⁻¹. As temperaturas

do injetor e do detector foram mantidas a 360°C e 380°C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1 µL para razão de split de 1:30. Os TAG trissaturados (S₃), triinsaturado (I₃), dissaturados-monoinsaturado (S₂I) e diinsaturados-monossaturados (I₂S) foram separados de acordo com o número de átomos de carbono dos ácidos graxos e identificados por comparação com os tempos de retenção de tribehenina padrão (99% pureza) e óleo de soja, o qual tem uma composição conhecida. As análises foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.6. Distribuição regioespecífica

Aproximadamente 150 mg das amostras foram liquefeitas por aquecimento com ar quente e, imediatamente, dissolvidas em clorofórmio deuterado (500 µL, CDCl₃) e desoxigenado por fluxo de nitrogênio com tetrametilsilano (1%, TMS) como referência de deslocamento químico. As misturas foram mantidas em ultrassom a 60°C até obtenção de soluções homogêneas e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Espectros quantitativos de RMN ¹³C foram adquiridos sem giro a 30°C utilizando o sistema de automação ICON NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) com um espectrometro Bruker Avance-III (500 MHz) operando a 125,70 MHz para o ¹³C, equipado com uma sonda Broadband Observe (BBO) de 5-mm. Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: ¹³C pulso de excitação 90° para 10 µs, varredura de largura de 238 ppm, tempo de repetição de 25 s (tempo de aquisição 10 s + atraso de relaxamento de 15 s), número de exames 128 e ganho do receptor ajustado automaticamente. O tempo experimental foi de 55 minutos. No espectro de RMN ¹³C foi possível diferenciar ácidos graxos insaturados (AGI) (170,88 ppm) e ácidos graxos saturados (AGS) (170,91 ppm) esterificados na posição *sn*-2 do TAG, e AGI (171,29 ppm) e AGS (171,32 ppm) esterificados nas posições *sn*-1,3 do TAG. O assinalamento dos AGI e AGS foi realizado com base no efeito indutivo da dupla ligação sobre o grupo carbonila usando o método descrito por Vlahov et al.²³ Todas as amostras foram realizadas em duplicata e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.7. Conteúdo de gordura sólida (CGS)

O conteúdo de gordura sólida foi determinado por espectrometria de ressonância magnética nuclear usando o PC120 Bruker Minispec (Silberstreifen, Rheinstetten, Alemanha) juntamente com banhos secos de alta precisão (0-70 ° C) Tcon 2000 (Duratech, Carmel, IN, EUA). O método AOCS Cd 16b-93 (AOCS 2009) foi seguido, sendo este um método com leituras diretas em série, nas temperaturas de 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C, com temperagem para gorduras não estabilizadas. As análises foram realizadas em duplicatas e cada resultado foi expresso como a média das duas determinações.

2.2.8. Análise térmica

Os perfis de cristalização das amostras foram determinados usando um calorímetro diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) modelo Q2000 (TA Instruments) de acordo com o método AOCS Cj 1-94 (AOCS 2009), pesando 8 - 12 mg de amostra em recipientes de alumínio com capacidade volumétrica de 40µL e selando-os. O instrumento foi calibrado com índio (ponto de fusão = 156,5°C, ΔH_f = 28,45 J/g). As amostras foram aquecidas a 80°C a 10°C / min, mantidas a esta temperatura durante 10 min, resfriando para -60°C a 10°C / min, mantida a esta temperatura durante 30 min, e, finalmente, aqueceu-se a 80°C a 5°C / min. Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliação dos resultados: temperatura onset de cristalização (Toc), temperatura de pico de cristalização (Tpc), entalpias de cristalização (ΔH_c) e temperaturas finais de cristalização (Tfc). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.9. Microscopia sob luz polarizada

Com o propósito de estudar a morfologia e as dimensões cristalinas, as amostras foram fundidas em um forno de microondas a 70°C. Com o auxílio de um tubo capilar, uma gota de amostra foi colocada numa lâmina de vidro pré-aquecida a uma temperatura controlada (70°C) e coberta com uma lamela.

As lâminas foram preparadas em duplicata e mantidas durante 24h numa incubadora a 25°C. A morfologia dos cristais foi avaliada, usando um microscópio de luz polarizada (Olympus BX 51) ligado a uma câmara de vídeo digital (Media Cybernetics). As lâminas foram então colocadas sobre o suporte de uma placa de aquecimento mantido à mesma temperatura de cristalização, e as imagens capturadas pelo programa Image Pro-Plus aplicativo (Media Cybernetics), usando luz polarizada e amplificação 40x. Três campos visuais foram focalizados em cada lâmina e o diâmetro médio dos cristais selecionado como o parâmetro de avaliação para a análise quantitativa das imagens calculadas, utilizando o programa de imagem Pro-Plus, versão 7.0 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA).

2.2.10. Difração de Raios-X

Os hábitos polimórficos das gorduras antes e após a interesterificação (IE e IQ) foram determinados por difração de raios-X, de acordo com o método AOCS Cj 2-95 (AOCS 2009). As amostras foram completamente derretidas e cristalizadas a 25°C em uma BOD durante 24h. As medições foram feitas num difractómetro Philips PW 1710 com o Bragg-Brentano ($\Theta:2\Theta$) geometria, e a radiação Cu-Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA). As medidas foram tomadas em 0,03° etapas em 2Θ com um tempo de aquisição de 2s e digitalização de 14,5-27,5 ° (escala 2Θ). As formas polimórficas foram identificadas a partir dos espaçamentos curtos, que são característicos dos cristais.

3. Resultados e discussão

No presente trabalho, o efeito de interesterificação enzimática (IE) sobre as propriedades físico-químicas das misturas em diferentes proporções de OGAO:OCTH foi avaliada, com o objetivo de compreender a estrutura da gordura e a sua funcionalidade.

3.1. Composição em ácidos graxos (AG)

As composições de ácidos graxos das matérias-primas e as misturas em diferentes proporções são apresentadas na Tabela 1. Os principais AGs no OCTH foram C22:0 (56,6%), C18:0 (32,0%), C20:0 (6,4%), C16:0 (2,8%) e C24:0 (2,1%). O AG predominante no OGAO foi C18:1 (87,4%), seguidos pelo C18:2 (5,8%), C16:0 (3,7%) e C18:0 (3,2%). Os teores mais elevados de AGs nas misturas foram C18:1 (25,6 – 52,4%) e C22:0 (22,6-40,9%).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos (%) das matérias primas, óleo de girassol alto oléico (OGAO), óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH) e das misturas binárias (OGAO:OCTH).

Ácidos graxos (%)	Matérias primas		OGAO:OCTH (% m/m)			
	OGAO	OCTH	60:40	50:50	40:60	30:70
C16:0 (P-palmitico)	3,7	2,8	3,3	3,4	3,2	2,9
C18:0 (St-esteárico)	3,2	32,0	14,5	17,0	20,0	22,9
C18:1 (O-oléico)	87,4	-	52,4	42,2	34,2	25,6
C18:2 (L-linoléico)	5,8	-	3,4	3,0	2,6	1,8
C20:0 (A-araquídico)	-	6,4	2,7	3,2	3,8	4,4
C22:0 (B-behênico)	-	56,6	22,6	30,0	34,9	40,9
C24:0 (Lg-lignocérico)	-	2,1	1,1	1,1	1,3	1,5
Σ Saturado	6,9	100,0	44,2	54,7	63,2	72,6
Σ Insaturado	93,1	-	55,8	45,3	36,8	27,4

O OCTH é rico em ácido behênico (C22:0) e outros estudos também mostraram altas concentrações de ácido behênico neste óleo (Ribeiro *et al.* 2013b; Guedes *et al.* 2014).

3.2. Composição em triacilgliceróis (TAG)

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para as composições de TAG das misturas, antes e depois IE e IQ. O TAG predominante no OGAO foi a trioleína (OOO, C₅₄), com 88,3%, seguido pelo POO / PSO (C₅₂), com 11,4%. No que diz respeito ao OCTH, o TAG na maior quantidade foi StBB (C₆₂), com 61,3%, seguido de SAB (C₆₀), com 15,6%.

Após a interesterificação foi observado um aumento nos TAG com número de carbonos C₅₈, com predominância de OOB/StOB/StStB quando comparado com as misturas, sendo maior após IE (32,0-37,5%). Houve também uma diminuição dos TAG com o número de carbono C₆₂ como StBB, sendo menor na IE (7,0-18,2%). Guedes *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes para a composição em TAG após a IQ. Além disso, a interesterificação resultou na formação de uma nova espécie de TAG (BBB, C₆₆) não detectados anteriormente nas misturas físicas. Tyne & Ledóchowska (2005) estudaram a interesterificação de óleo de oliva (como a fonte de ácido oleico) com óleo de colza com alto erúcico totalmente hidrogenado (como fonte de ácido behênico), e a acidólise de óleo de oliva com ácido behênico catalisada pela enzima Lipozyme RM IM. A interesterificação resultou na formação de novos TAG, principalmente como BOO, BOP e BOB.

Tabela 2: Composição em triacilgliceróis (%) quanto ao número de carbono das matérias primas e das misturas binárias do óleo de girassol alto oleico (OGAO) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH), antes (MI) e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

OGAO:OCTH (%m/m)														
Matérias primas			60:40			50:50			40:60			30:70		
NC	OGAO	OCTH	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE	MI	IQ	IE
50	0,5	ND	ND	0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
52	11,4	1,5	7,8	6,7	6,9	6,5	5,7	5,8	5,8	5,7	4,6	4,5	4,0	4,2
54	88,3	2,7	53,1	42,2	42,0	45,7	34,0	33,6	36,9	26,4	24,2	28,5	18,9	20,7
56	ND	8,1	3,3	8,0	8,0	4,1	8,8	8,8	4,8	6,2	9,2	5,7	9,9	9,5
58	ND	7,2	3,4	31,2	32,0	3,5	34,4	35,0	4,3	35,5	37,5	5,0	35,8	37,2
60	ND	15,6	6,2	3,7	3,5	7,7	4,8	4,8	9,4	7,0	6,3	10,8	7,6	7,1
62	ND	61,3	24,7	7,2	7,0	30,8	10,6	10,5	36,7	16,8	15,9	42,9	19,2	18,2
64	ND	3,6	1,5	0,6	0,6	1,6	0,9	0,9	2,2	1,6	1,3	2,4	2,1	1,6
66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	0,6	ND	0,8	1,0	ND	2,5	1,5

NC: número de carbono; ND: não detectado; NC: 50: PPSt; 52: POSt/POO; 54: SOO/OOO; 56: POB/StOA/OOA; 58: StStB/StOB/OOB; 60: StAB; 62: StBB/OBB; 64: ABB; 66: BBB

P: ácido palmítico; St: ácido esteárico; O: ácido oléico; L: ácido linoléico; A: ácido araquídico; B: ácido behênico; Lg: ácido lignocérico.

3.3. Distribuição regioespecífica dos ácidos graxos

A análise regioespecífica dos TAG por RMN ^{13}C mostrou a distribuição e conteúdo dos ácidos graxos insaturados (AGS) e dos ácidos graxos saturados (AGI) na molécula de glicerol. Esta análise pode fornecer informações importantes sobre como a estrutura estereoespecífica influencia o metabolismo lipídico e a biodisponibilidade do ácido graxo. A metodologia proporcionou bons resultados com a preparação mínima de amostra e um tempo experimental significativamente menor. A técnica é bem adequada para o estudo da interesterificação de óleos vegetais e gorduras (Guedes *et al.* 2014; Speranza *et al.* 2015). A Fig. 1 mostra as porcentagens dos AGI e dos AGS presentes na posição *sn*-2 do glicerol antes e depois IE e IQ. Houve uma diminuição em AGI na posição *sn*-2, das misturas à medida que se aumentou a proporção de OCHT. A migração de acila foi menor após IE do que após IQ, de modo que os resultados AGI na posição *sn*-2 na IE foram mais elevados (31,0-58,2%), em comparação com os resultados após IQ (25,5-56,2%). Os LE obtidos após IE na proporção 40:60 tiveram mais AGI na posição *sn*-2 do TAG

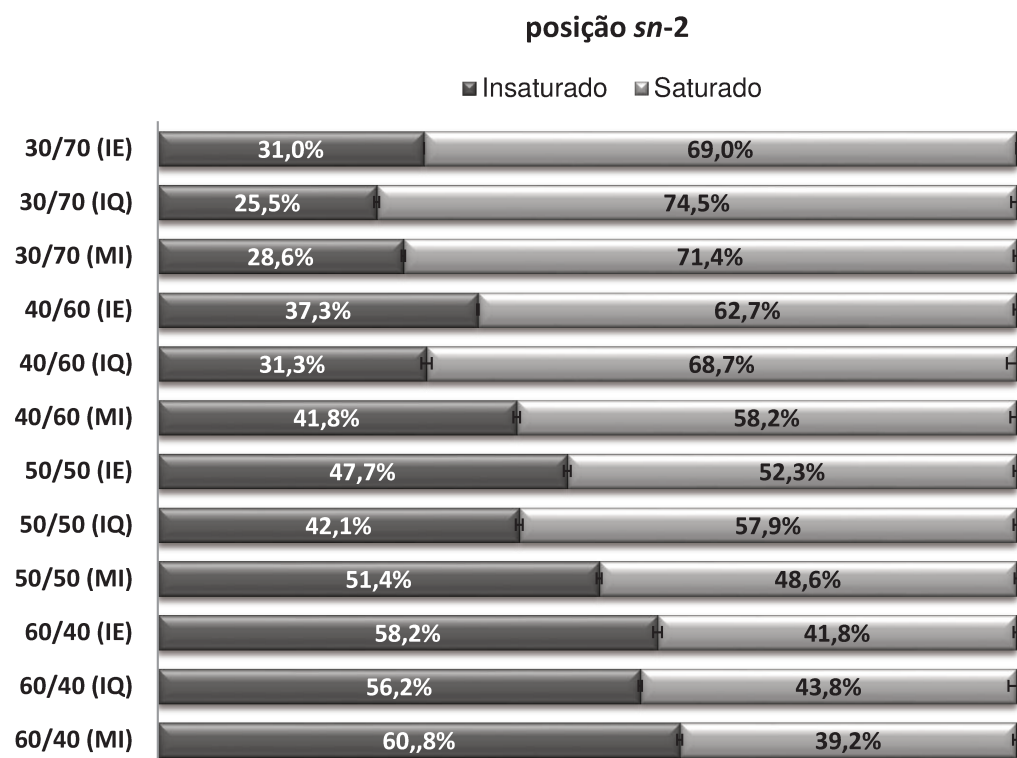


Fig. 1 Distribuição de ácidos graxos (%) na posição *sn*-2 dos triacilgliceróis nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oleico (OGAO) e óleo de cramba totalmente hidrogenado (OCHT) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

A Fig. 2 mostra os resultados para AGI e AGS presentes nas posições *sn*-1,3 do TAG, antes e depois IE e IQ. O teor de AGS aumentou nas posições *sn*-1,3 em todas as misturas com aumento na proporção de OCTH. Após IE a faixa para AGS foi de 47,3-71,4% e após IQ foi 45,9-74,1%. A maioria dos AGs determinados nas posições *sn*-1,3 foram saturados, que é o padrão típico para os óleos vegetais.

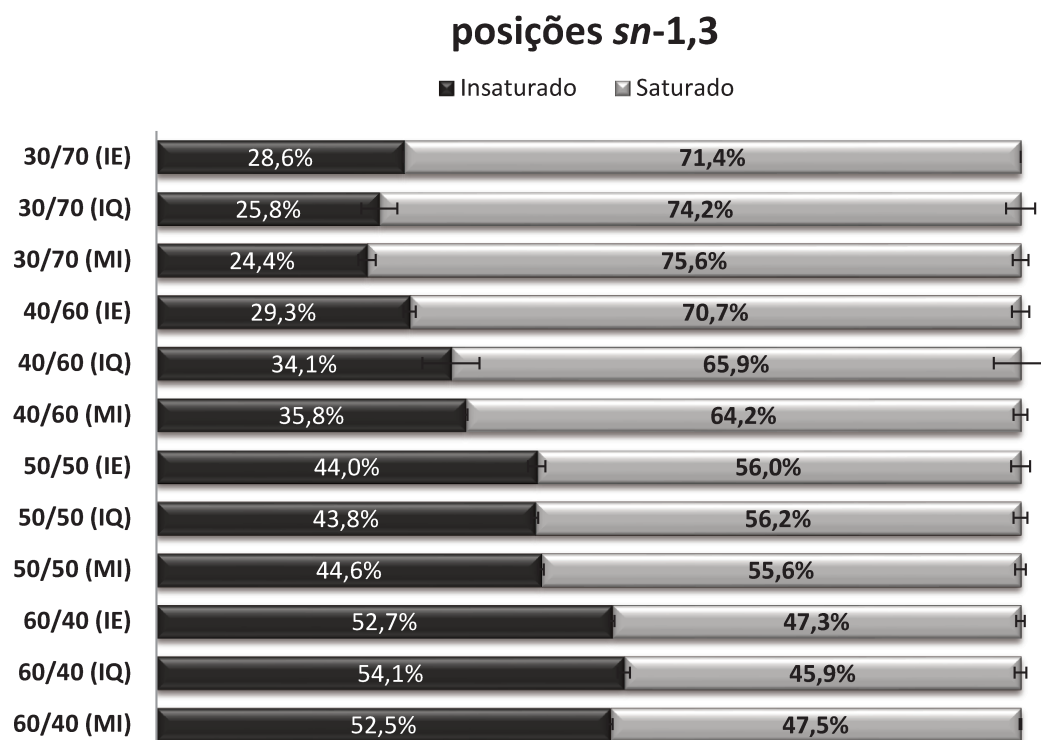


Fig. 2 Distribuição de ácidos graxos (%) na posição *sn*-1,3 dos triacilgliceróis nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oleico (OGAO) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

Pacheco *et al.* (2015) estudaram o fenômeno da migração acila durante a interesterificação catalisada por lipase de óleos de soja refinado e totalmente hidrogenado. Sua pesquisa mostrou que mesmo com a utilização de lipases específicas *sn*-1,3, a migração acila ocorreu na posição *sn*-2 da TAG. No entanto, este tipo de biocatalisadores ainda é preferido em comparação com as lipases não específicas ou catalisadores químicos, uma vez que eles mantêm o perfil de distribuição de AG nos TAG originais, em maior extensão.

3.4. Conteúdo de gordura sólida (CGS)

A Fig. 3 mostra os perfis de CGS para todas as misturas antes e após IE e IQ. As misturas 40:60 e 30:70 após IE e IQ, a 10°C apresentaram, no geral, maior CGS em comparação com as MI. No entanto, nas temperaturas mais elevadas (30-55°C) os valores foram inferiores de uma forma geral. Esta diminuição no CGS foi devido às reações de interesterificação, formando novos TAGs a partir das matérias primas iniciais. Os LE obtidos após IE e IQ foram completamente fundidos na faixa de 55-65°C. A 35°C, o CGS das misturas IE variou de 10,6-46,3%, enquanto que nas misturas de IQ variou de 23,6-58,0%. A plasticidade das misturas 60:40 e 50:50 após IE foi maior que a de IQ.

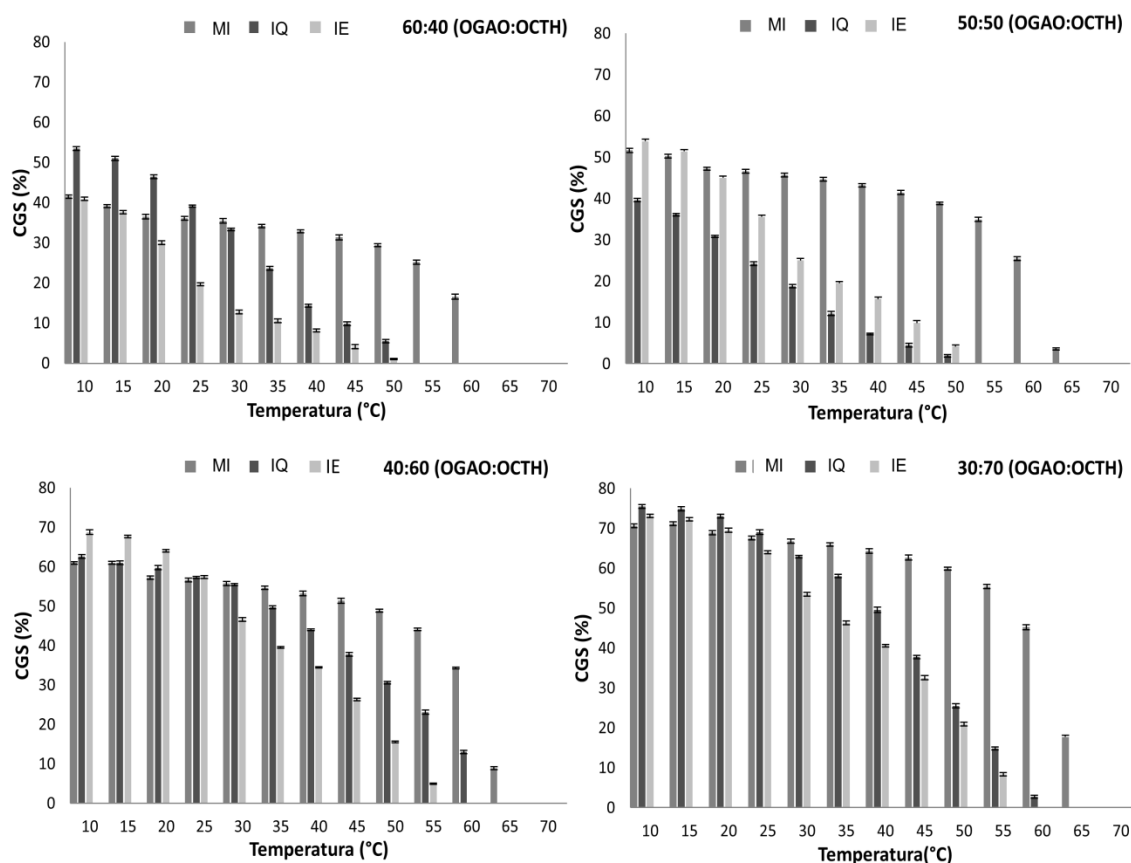


Fig. 3 Curva de sólidos (%) nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de crumbe totalmente hidrogenado (OCTH) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

A formação de novos TAG após a interesterificação com pontos de fusão intermediários apresentou (POB/StOA/OOA e StStB/StOB/OOB) um

declínio no CGS entre 25-45°C, mostrando perfis de fusão mais lineares. Vários estudos anteriores relataram uma diminuição no CGS com aumento da temperatura após a interesterificação enzimática de misturas, devido a diminuição de TAG trissaturados e aumento de TAG monoinsaturados e diinsaturados (Lee *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2014).

3.5. Propriedades térmicas

A Fig. 4 mostra os perfis de cristalização das misturas (MI) de OGAO:OCTH e após IE e IQ. O termograma do OCTH mostrou um pico de cristalização intensa em 56,6°C dos TAG saturados e o OGAO mostrou um pico estreito de cristalização em -36,2°C dos TAG insaturados.

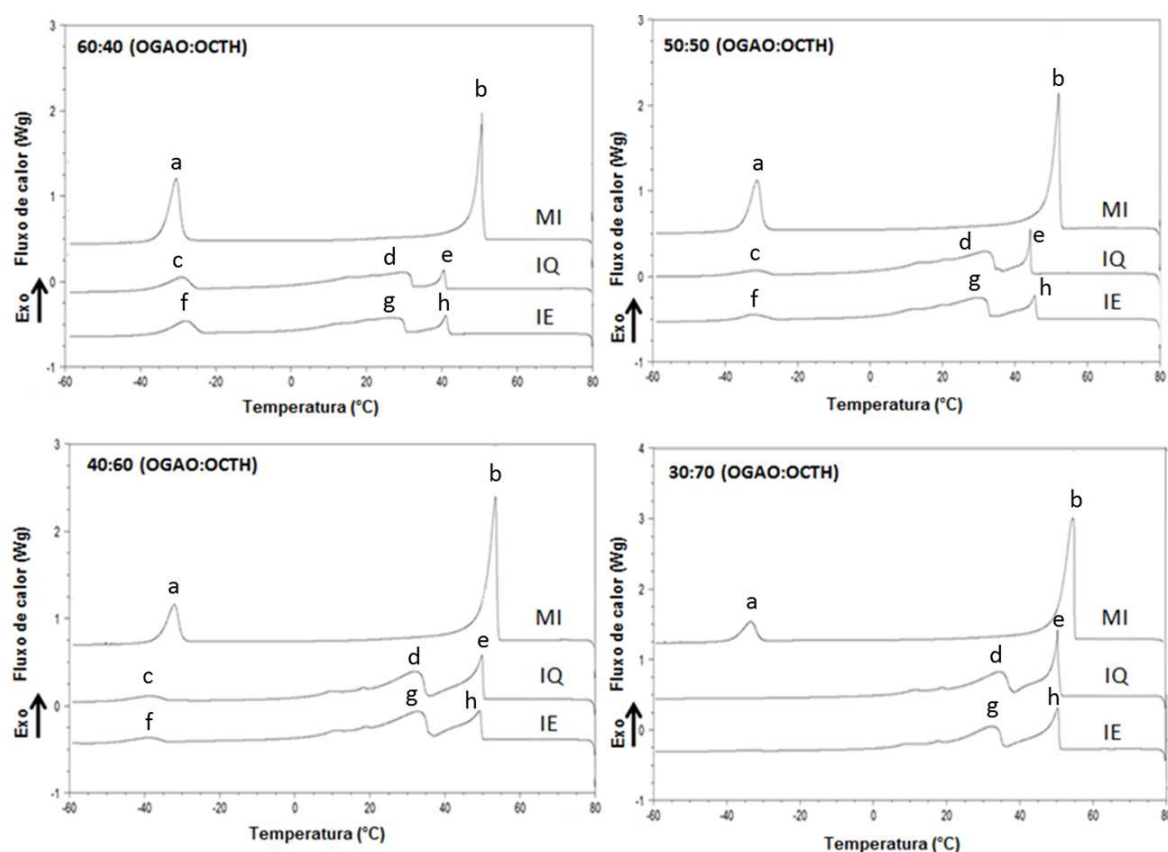


Fig. 4 Eventos de cristalização nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de crame totalmente hidrogenado (OCTH) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE).

As misturas físicas (MI) mostraram perfis de cristalização com dois picos nas faixas de -30,7 a -33,2°C (a) e de 50,4 a 54,8°C (b). Após a interesterificação (IE e IQ) os perfis de cristalização mudaram, em decorrência

a formação de TAG de ponto de fusão intermediários. Após a interesterificação, o segundo pico indicou um aumento da concentração de TAG dissaturados-monoin saturados e monossaturados-diinsaturados, o que afetou a intensidade do perfil de cristalização. Os picos foram mais largos em comparação com os componentes individuais (OGAO e OETH), e após a interesterificação (IE e IQ), as misturas (60:40; 50:50 e 40:60) mostraram três picos de cristalização. O primeiro pico foi de -29,5°C a -33,2°C (c,f), o segundo a partir de 29,1°C a 32,3°C (d,g) e o terceiro de 40,2°C a 50,6°C (e,h). A IE resultou em picos de cristalização menores do que IQ, com a diferença de 2-3°C (T_{pc}). Após o processo de interesterificação (IE e IQ), somente a mistura 30:70 (OGAO:OETH) mostrou dois picos de cristalização que foram a 32,3°C e 50,5°C (d,e) após IE e a 34,3°C e 50,6°C (g,h) , após o IQ. Este tipo de comportamento também foi observado por Guedes *et al.* (2014).

3.6. Microestrutura

Microscopia de luz polarizada é uma técnica utilizada para visualizar a rede microestrutural das gorduras. As propriedades reológicas macroscópicas das redes formadas por lipídios são essenciais para a consistência e a aceitabilidade dos produtos finais de gorduras plásticas (Narine & Marangoni 2005). A Fig. 5 mostra as estruturas cristalinas de todas as amostras em todas as proporções das misturas (MI) (OGAO:OETH), IQ e IE, formadas pelo resfriamento rápido a 25°C / 24h. A microestrutura mudou consideravelmente após a interesterificação. As misturas físicas (MI) apresentaram cristais como agulhas com núcleos compactos, agulhas longas e distribuídas radialmente. Após a IE e IQ, os cristais alteraram para o formato de agulhas menores e aglomeradas.

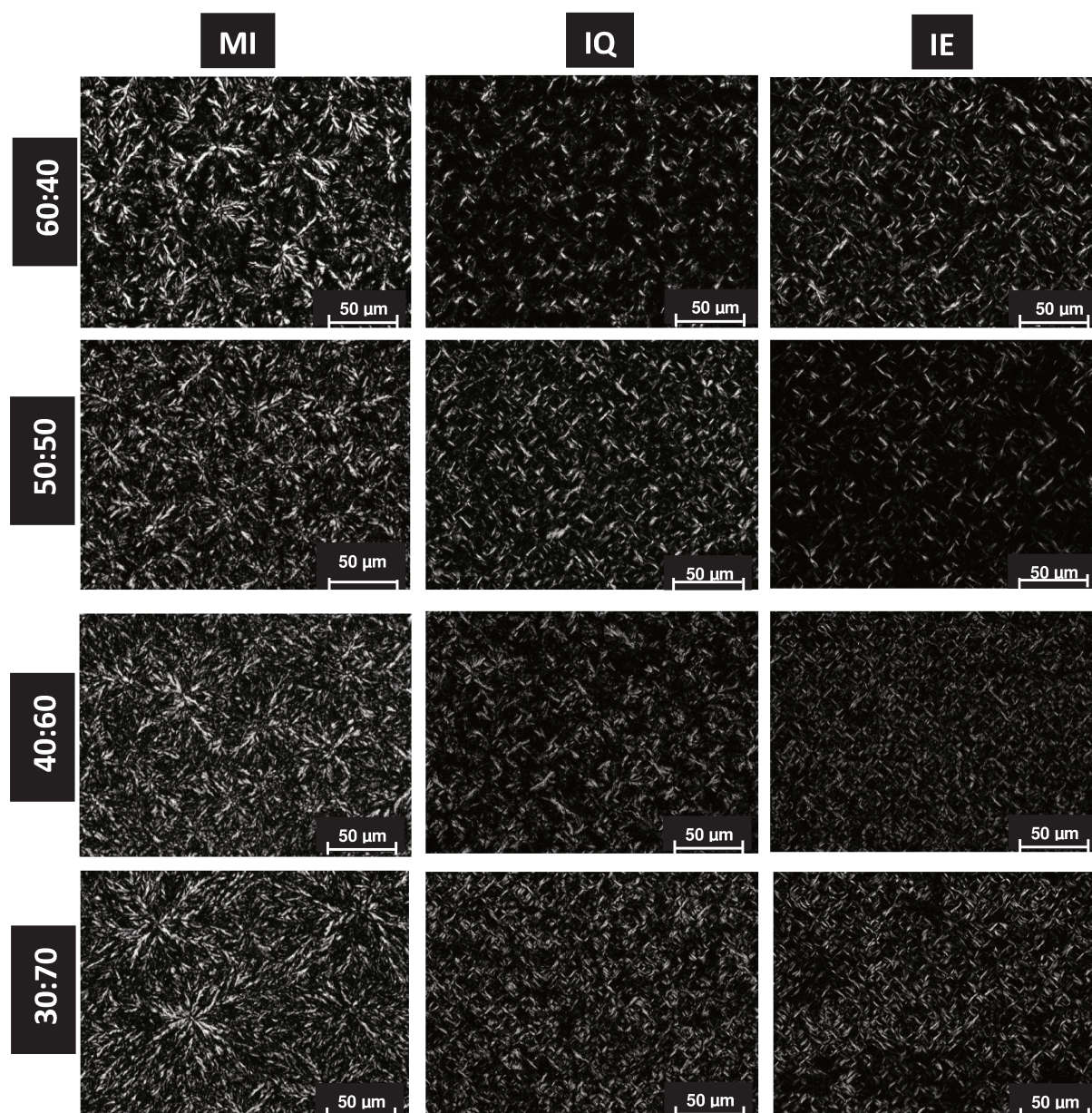


Fig. 5 Imagens de cristalização nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de crambe totalmente hydrogenado (OCTH) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) (60:40 e 30:70) a 25°C/24h com aumento de 40x.

Assim, os resultados sugerem que a quantidade de OCTH influencia na estrutura e na rede dos cristais das gorduras interesterificadas e que o teor crescente OCTH induziu a formação de cristais na forma de agulha longa com núcleos compactos. De acordo com Marangoni *et al.* (2002), o diâmetro médio dos cristais de gorduras em produtos alimentares deve ser inferior a 30 μm para evitar uma sensação de aspereza na boca. O diâmetro médio do cristal de todas as misturas OGAO:OCTH foi de 19,1 a 21,2 μm . Após IQ foi de 18,2 a 19,4 μm e após IE foi de 16,5 a 18,7 μm , assim IE promoveu uma diminuição do diâmetro médio de cristal comparada a MI.

3.7. Polimorfismo

Os tipos de polimorfos presentes numa gordura definitivamente afeta as propriedades macroscópicas do cristal e irão estabelecer o ponto de fusão da rede (Narine & Marangoni 1999). Os polimorfos apresentam composições químicas idênticas, mas diferentes estruturas cristalinas e diferentes propriedades físicas. Gorduras sólidas apresentam três polimorfos fundamentais, designados como α (hexagonal), β' (ortorrômbico) e β (triclínico). A estabilidade térmica destes polimorfos segue a ordem $\beta > \beta' > \alpha$, e β tem o mais alto ponto de fusão. A conversão de uma forma para outra ocorre geralmente na direção das formas mais estáveis (Timms 1984). A técnica de difração de raios-X é utilizada para identificar o polimorfismo em cristais, determinando espaçamento curto para sua caracterização. A Tabela 3 mostra o padrão de difração de raios-X com espaçamento curto e as formas polimórficas a 25°C durante 24h das misturas (MI) 60:40/30:70 (OGAO:FHCO) e das gorduras interesterificadas (IE e IQ). O OCTH foi cristalizado sob a forma α , mostrando espaçamento curto muito forte de 4,14 Å.

Tabela 3. Formas polimórficas e *short spacings* nas misturas (MI) de óleo de girassol alto oléico (OGAO) e óleo de crambe totalmente hidrogenado (OCTH) antes e após interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) (60:40 e 30:70) a 25°C por 24h.

Amostras		Short spacings (Å)					Forma polimórfica
		4.6	4.2	4.1	3.8	3.7	
OCTH				4,14 (fo)			α
MI		4,6 (>f)		4,13 (fo)		3,75 (f)	$\beta' >> \beta > \alpha$
60:40 (OGAO:OCTH)	IQ	4,6 (>f)	4,23(m)		3,81(f)		$\beta' > \beta$
	IE	4,6 (f)		4,15 (m)			$\beta' > \beta$
30:70	MI	4,6 (f)		4,17 (fo)		3,78 (fo)	$\beta' >>> \beta > \alpha$
(OGAO:OCTH)	IQ	4,6 (>f)		4,13 (fo)	3,83 (f)		$\beta' >> \beta > \alpha$
	IE	4,6 (f)		4,11 (fo)			$\beta' >> \beta > \alpha$

">" significa um pouco mais, ">>" muito mais e ">>>" mais; Intensidades: f: fraco; m: médio; fo: forte; OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.

Lopes *et al.* (2015) encontraram a mesma forma polimórfica (α) para OCTH. A mistura física de 30:70 (OGAO:FHCO) exibiu uma mistura das formas

β' (intensidade forte) e β (intensidade fraca), enquanto que após a interesterificação a forma β' aparentemente diminuiu. A intensidade do espaçamento curto 3,83Å diminuiu após IQ e desapareceu após a IE. A mistura física de 60:40 (OGAO:OCTH) apresentou uma mistura de formas β' (intensidade forte, mas menor do que o 30:70 MI) e β (intensidade muito fraca). Após a interesterificação a forma β' também diminuiu. A intensidade dos *Short spacings* em 4,23Å e 3,81Å diminuiu após IQ e a 3,81Å desapareceu depois da IE. As diferenças nos estados polimórficos encontradas após a interesterificação podem ser, devido à quantidade de OCTH, indicando que o aumento na quantidade OCTH é proporcional ao aumento da forma de cristal β' . Ahmadi *et al.* (2008) estudaram a IE e IQ das misturas de óleo de canola totalmente hidrogenado com óleo de girassol alto oléico e obtiveram uma predominância da forma cristais β' .

4. Conclusão

Ambos os processos de IQ e IE promoveram modificações nos produtos finais quando comparado com a mistura original, tal como, perfil CGS mais linear e comportamento térmico diferente. O processo enzimático aplicado para 3h de reação mostrou a vantagem da seletividade para a produção de novos TAGs, menor migração de acila, tal como evidenciado por RMN ^{13}C . Após a interesterificação houve uma diminuição no tamanho dos cristais e do polimorfo β' . Estes LE foram projetados para ter amplas aplicações em alimentos como gorduras de padaria / confeitaria e aditivos de cristalização para lipídios.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP, e os fornecedores das matérias-primas.

Referências

- Ahmadi L, Wright AJ, Marangoni AG (2008) Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Microstructure and polymorphism. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 110:1025–1034
- Akoh CC (1995) Structured Lipids. *Enzymatic Approach Inform* 6: 1055–1061
- Alberio C, Izquierdo NG, Galellac T (2016) A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. *Eur J Agron* 73:25–33
- AOCS: Official Methods and Recommended Practices of the AOCS (2009) 6th edition. American Oil Chemists' Society, Champaign
- Basso RC, Ribeiro APB, Masuchi MH, Gioielli LA et al (2010) Tripalmitin and monoacylglycerols as modifiers in the crystallisation of palm oil. *Food Chem.* 122: 1185–1192
- Grimaldi R, Gonçalves LAG, Ando MY (2005) Otimização da reação de interesterificação química de óleo de palma. *Quím. Nova* 28:633-636
- Guedes AMM, Ming CC, Ribeiro APB, Silva RC et al (2014) Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated crambe abyssinica oil and soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 91:111–123. doi 10.1007/s11746-013-2360-7
- Hartman L, Lago RCA (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22:475–494
- Ifeduba EA, Martini S, Akoh CC (2016) Enzymatic interesterification of high oleic sunflower oil and tripalmitin or tristearin. *J Am Oil Chem Soc* 93:61–67

- Kojima M, Tachibana N , Yamahira T , Seino S et al (2010) Structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. *Lipids Health Dis* 9:77
- Labalette F, Jouffret P, Merrien A (2012). Oleic Sunflower production: current situation and trends for the future. *Proceeding of 18th International SunflowerConference*
- Laghetti G, Piergiovanni AR, Perrino P (1995) Yield and oil quality in selected lines of *Crambe abyssinica* grow in Italy. *Ind. Crop. Prod.* 4:203–212
- Lee JH, Casimir C. Akoh CC, Lee KT (2008) Physical properties of trans-free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 85:1–11
- Lopes JD, Grosso CRF, Calligaris GA, Cardoso LP et al. (2015) Solid lipid microparticles of hardfats produced by spray cooling as promising crystallization modifiers in lipid systems. *Eur J Lipid Sci Technol* 117:1733–1744
- Marangoni AG, Narine SS (2002) Identifying key structural indicators of mechanical strength in networks of fat crystals. *Food Res Int* 35:957-969
- Meng Z, Geng WX, Li JW, Yang ZQ et al (2013) Enzymatically catalyzed synthesis of anti-blooming agent 1,3- dibehenoyl-2-oleoyl glycerol in a solvent-free System: Optimization by response surface methodology. *J. Agric Food Chem* 61:10798–10806
- Mori H (1989) BOB: A fat bloom inhibitor. *Manuf Conf* 69:63–66
- Mu H, Porsgaard T (2005) The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 44:430–448

- Narine SS and Marangoni AJ (1999) Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. *Food Res Int* 32:227-248
- Oliveira GM, Ribeiro APB, Santos AO , et al (2015) Hard fats as additives in palm oil and its relationships to crystallization process and polymorphism. *LWT - Food Science and Technology* 63:1163-1170.
- Pacheco C, Crapiste GH, Carrín ME (2015) Study of acyl migration during enzymatic interesterification of liquid and fully hydrogenated soybean oil. *J Mol Catal B: Enzym* 122:117–124
- Pande G, Sabir JSM, Baeshen NA, Akoh CC (2013) Enzymatic synthesis of extra virgin olive oil based infant formula fat analogues containing ARA and DHA: One-Stage and Two-Stage Syntheses. *J Agric Food Chem* 61:10590–10598
- Panno G, Prior M (2009) Avaliação de substratos para a germinação de crambe (*Crambe abyssinica*). *Rev Cultiv Saber* 2:151–7
- Ribeiro APB, Basso RC, Santos AO, Andrade GC et al (2013a) Hardfats as crystallization modifiers of cocoa butter. *Eur J Lipid Sci Technol* 11:1462–1473
- Ribeiro APB, Basso RC, Kieckbusch TG (2013b) Effect of the addition of hardfats on the physical properties of cocoa butter. *Eur J Lipid Sci Technol* 115:301–312
- Sato, K (2001) Crystallization behaviour of fats and lipids - a review. *Chem Eng Sci* 56 : 2255-2265
- Smith KW, Bhaggan K, Talbot ., van Malssen K F (2011) Crystallization of fats: Influence of minor components and additives. *J Am Oil Chem Soc* 88:1085–1101

- Souza ADV, Fávaro SP, Ítavo IC, Roscoe R (2009) Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. *Pesq Agropec Bras* 44:1328-1335
- Speranza P, Ribeiro APB, Macedo GAM (2015) Lipase catalyzed interesterification of Amazonian patauá oil and palm stearin for preparation of specific-structured oils. *J Food Sci Technol* 52:8268–8275. doi: 10.1007/s13197-015-1943-8
- Timms RE (1984) Phase behaviour of fats and their mixtures. *Prog Lipid Res* 23:1–38
- Tynek M and Ledóchowska E (2005) Structured triacylglycerols containing behenic acid: preparation and properties. *J Food Lipids* 12:77–89
- Vlahov G, Giuliani AA, Del RP (2010) ^{13}C NMR spectroscopy for determining the acylglycerol positional composition of lampante olive oils. Chemical shift assignments and their dependence on sample concentration. *Anal Method* 2:916–923
- Zhao SQ, Hu JN, Zhu XM et al (2014) Characteristics and feasibility of trans-free plastic fats through Lipozyme TL IM-catalyzed interesterification of palm stearin and Akebia trifoliata variety Australis seed oil. *J Agric Food Chem* 62:3293–3300

5. DISCUSSÃO

Foram avaliadas as propriedades físico-químicas das misturas e dos LE obtidos por interesterificação enzimática de 3 grupos, utilizando OGAO/OSTH, OGAO/OGAOTH e OGAO/OCTH em diferentes proporções (60:40, 50:50, 40:60 e 30:70).

O ácido graxo predominante do OGAO foi C18:1 com 87,4% e do OSTH foi o C18:0 com 86,6%, seguido pelo C16:0 com 11,5%. Para OGAOTH foi C18:0 com 96,3% e para OCTH foi C22:0 com 56,6%, seguido pelo C18:0 com 32,0%. O TAG predominante do OGAO foi OOO com 80,4%, do OSTH foi StStSt com 65,1%, do OGAOTH foi StStSt com 88,1% e do OCTH foi StBB/OBB com 61,3%.

Houve uma mudança no perfil dos TAG em todas as proporções dos grupos estudados após IQ e IE, devido a formação de novos TAG (S_2I e I_2S) e a diminuição dos S_3 e I_3 . Nos grupos OGAO/OSTH e OGAO/OGAOTH os novos TAG formados foram StStO/StOSt e StOO/StO. No grupo do OGAO/OCTH os novos TAG formados foram StStB/StOB/OOB/BBB.

Foram observados maiores teores de diacilgliceróis e monoacilgliceróis em amostras interesterificadas no processo enzimático (5,1-9,9%) comparado ao químico (4,8-9,5%) para todos os grupos e proporções estudadas. Esses valores podem estar relacionados com a quantidade de água, temperatura, carga enzimática e tempo de reação em processo por batelada.

Houve uma diminuição de AGI na posição *sn*-2 em relação a misturas. Os menores valores encontrados foram na IQ (reação randômica). A IE apresentou maiores valores de AGI na posição *sn*-2 (reação específica) na reação com tempo de 3h. Na IE os valores de AGI na posição *sn*-2 diminuem em relação ao tempo de reação, devido à migração acil, menor valor com 9h de reação. Na posição *sn*-1,3 a maior quantidade determinada foram dos AGS, que é padrão típico dos óleos vegetais.

O aumento da plasticidade nas gorduras dos produtos interesterificados, deve-se ao alto teor de S_2I e I_2S , associado à redução do S_3 refletindo nas curvas de sólidos. No grupo OGAO/OSTH a IE apresentou um perfil CGS inferior em temperaturas acima de 35°C em todas as misturas em

relação à IQ. No grupo OGAO/OGAOTH em todas as proporções os perfis de CGS da IQ e IE foram muito semelhantes, diminuindo linearmente até a fusão completa. No grupo OGAO/OCTH houve a formação de novos TAG após a interesterificação com pontos de fusão intermediários apresentou (POB/StOA/OOA e StStB/StOB/OOB) um declínio no CGS entre 25-45°C, mostrando perfis de fusão mais lineares. Todos os grupos após a IQ e IE em todas proporções mostraram CGS acima de 25% à temperatura ambiente (25°C) e fusão completa na 55-65°C.

No comportamento térmico os perfis de fusão e cristalização das misturas dos 3 grupos nas diferentes proporções estudadas apresentaram dois picos, relacionados aos TAG insaturados e saturados. Observa-se que após as IQ e IE houve uma alteração no perfil de fusão e cristalização com diminuição destes dois picos, formando outros novos tipos de TAG como S₂I e I₂S. Estes novos picos são mais largos, que os picos das misturas originais, devido aos vários tipos de TAG formados após IQ e IE. Os LEs com maior proporção de Osth, AGAOTH e OCTH apresentaram maior ponto de fusão final.

Nos grupos OGAO/OSTH e OGAO/OGAOTH apresentaram cristais na forma de esferulitos, que após IQ e IE diminuíram de tamanho (prox. 20µm), mas que ao mesmo tempo com o aumento do hardfat nas misturas houve um aumento no tamanho do cristal. No grupo OGAO/OCTH as misturas físicas (MI) apresentaram cristais como agulhas com núcleos compactos, agulhas longas e distribuídas radialmente. Após a IE e IQ, os cristais alteraram para o formato de agulhas menores (próx. 18µm) e aglomeradas.

Houve a estabilização do polimorfo β' como forma cristalina predominante após IQ e IE nos grupos OGAO/OSTH e OGAO/OGAOTH. No grupo OGAO/OCTH houve uma diminuição do polimorfo β' após IQ e IE, aumentando com a proporção de OCTH na mistura.

Enfim, a interesterificação enzimática e química são processos eficientes para a obtenção de lipídios estruturados, modificando as características iniciais dos lipídios com a finalidade de atender as diversas aplicações comerciais.

6. CONCLUSÃO GERAL

Em todas as misturas avaliadas de óleo de girassol alto oleico na presença de gorduras totalmente hidrogenadas de soja, girassol e crambe, tanto a interesterificação enzimática como a química promoveram a diminuição nos teores de triacilgliceróis triessaturados e triinsaturados e aumento dos triacilgliceróis monossaturados-diinsaturados e dissaturados-moninsaturados, resultando no decréscimo do ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida em função da temperatura e na velocidade de cristalização.

Houve diminuição do conteúdo de gordura sólida e a formação de perfis mais lineares após a interesterificação.

Os perfis de fusão e cristalização mudaram após IQ e IE em decorrência a formação de novos TAG de ponto de fusão intermediários.

A cinética de cristalização demonstrou alteração no período de indução e conteúdo de gordura sólida máximo das gorduras interesterificadas.

A IQ e IE acarretaram significativa diminuição nas dimensões dos cristais em todas as misturas.

O processo enzimático em todas as misturas com 3h de reação mostrou a vantagem de seletividade para produção de novos triacilgliceróis e menor migração acil na posição *sn*-2 do ácido graxo insaturado, quando comparado com 6h e 9h de reação, evidenciado pela análise de C¹³ RMN, sendo produtos com maior valor nutricional e metabólico.

A IQ e IE alterou o polimorfismo das misturas à base de OGAO/OSTH e OGAO/OGAOTH, com promoção significativa do polimorfo β' . Para a mistura à base OGAO/OCTH após IQ e IE houve redução do polimorfo β' .

Os resultados apresentados neste trabalho servirão como base de informação para as indústrias alimentícias, bem como para futuras pesquisas científicas que abordem a aplicação de gorduras interesterificadas via enzimática em alimentos com aplicações em produtos para confeitaria e aditivos de cristalização para lipídios.

7. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, P.; HU, P. Enzymatic and chemical interesterification of rice bran oil, sheaolein, and palm stearin and comparative study of their physicochemical properties. **Journal of Food Science**, v.77, p. 1284-1291, 2012.

AKOH, C. C. Making new structured fats by chemical reaction and enzymatic modification. **Lipid Technology**, v.5, p. 61–66, 1997.

AHMADI, L.; WRIGHT, A.; MARANGONI, A.G. Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Chemical composition, solid fat content and thermal properties. **European Journal Lipid Science Technology**, v.110, p. 1014–1024, 2008.

ALBERIO, C. et. al. A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. **European Journal of Agronomy**, v.73, p. 25–33, 2016.

AVRAMI, M. Kinetics of phase change. I. General theory. **Journal of Chemical Physics**, v. 7, p.1103-1112, 1939.

BEBARTA, B., et al. Medium chain and behenic acid incorporated structured lipids from sal, mango and kokum fats by lipase acidolysis. **Food Chemistry**, v.136, p. 889-894, 2013.

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

BERRY, S. E. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, p. 3–17, 2009.

BILIADERIS, C.G. Differential scanning calorimetry in food research – a review. **Food Chemistry**, v.10, p.239-265, 1983.

BLOCK, J. M; BARRERA-ARELLANO, D. Modificación de lípidios. In: **Temas selectos en Aceites y Grasas**, volume 1, capítulo IX, p. 265-276. Editora Blucher – SP, 2009.

CAMPOS, R. Experimental methodology. In: **Fat Crystal Networks**. Ed. MARANGONI, A.J. Marcel Dekker, New York, p.267-349, 2005.

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemical by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v 18, p. 544-554, 1995.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. Ed. Artmed, 2ª ed. Porto Alegre, 1996.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média. II- Pontos de amolecimento e fusão. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 238-243, 2008.

CHRISTOPHE, A.B. Metabolism and physiological effects of dietary fats in relation to their structure. In: Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use. Ed. CHRISTOPHE, A.B. **American Oil Chemists` Society Press**, p.139-149, 1998.

DIAN, N.L.H.M., SUNDRAM, K., IDRIS, N.A. Effect of chemical interesterification on triacilglicerol and solid fat contents of palm stearin, sunflower oil and palm kernel olein blends. **European Journal Lipid Science Technology**. V. 109, p. 147-156, 2007.

FAUZI, S. H. M.; RASHID, N. A.; OMAR, Z. Effects of chemical interesterification on the physicochemical, microstructural and thermal properties of palm stearin, palm kernel oil and soybean oil blends. **Food Chemistry**, v. 137, p. 8– 7, 2013.

FUNDAÇÃO MS. Crambe. Disponível em:<<http://www.fundacaoms.org.br/produto/crambe> > Acesso em: 01maio2014.

GAMBOA, O.W.D.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados a partir de gorduras de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**. São Paulo, v.29, p. 646-653, 2006.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Lipid shortenings: a review **Food Research International**, v. 35, n. 10, p. 1015-1048, 2002.

GIBON, V. Enzymatic interesterification of oils. **Lipid Technology**, v.23, p. 274-277, 2011

GIOIELLI, L.A.; SIMÕES, I.S.; RODRIGUES, J.N. Crystal morphology and interactions of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats. **Journal of Food Engineering**. v.57, p.347-355, 2003.

GONÇALVES, L. A. G. Análisis de lípidos: una visión práctica. In: BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. (eds.). **Temas selectos en aceites y grasas**. Procesamiento. Capítulo XII, ed. 1, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 1, p.365-399, 2009.

GUEDES, A. M. M., et al. Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated *Crambe abyssinica* oil and soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v.91, p.111–123, 2014.

GUNSTONE, F.D. Major Sources of Lipids. In: GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B.. **Lipid Technologies and applications**. New York: Marcel Dekker, INC. p. 19-50, 1997

GUNSTONE, F.D. Movements towards tailor-made fats. **Progress Lipid Research**, v.37, p.277- 305, 1998.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HILAL, N; NIGMATULLIN, R; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 238, n.1/2, p. 131-141, 2004.

HUNTER, J. E. Dietary levels of *trans*-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. **Nutrition Research**, v. 25, p. 499-513, 2005.

IFEDUBA, E.A.; MARTINI, S.; AKOH, C.C. Enzymatic interesterification of high oleic sunflower oil and tripalmitin or tristearin. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 61–67, 2016.

IMRAN, M.; NADEEM, M. Triacylglycerol composition, physicochemical characteristics and oxidative stability of interesterified canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Lipids in Health and Disease**, v.14, p.138-149, 2015.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.129-140, 2002.

JEYARANI, T.; REDDY, S.Y. Effect of enzymatic interesterification on physicochemical properties of mahua oil and kokum fat blend. **Food Chemistry**, v.123, p.249–253, 2010.

KIM, B.H.; AKOH, C.C. Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. 1713-1724, 2015.

KRITCHEVSKY, D. Fats and oils and human nutrition. In: **Food Lipids**. Akoh CC y Mi. D (Eds). Marcel Deker, Inc New York, p. 543-558, 2002.

LAFUENTE, R.F. Review -Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197–212, 2010.

LALAS, S., et al. Full characterisation of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 89, p.2253–2258, 2012.

LARA, A. C. C. **Seleção individual com teste de progênes em crambe (Crambe abyssinica Hochst)**. Tese (doutorado em agronomia) Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, São Paulo, 2013.

LEE, J. H.; AKOH, C. C.; LEE, K. T. Physical properties of trans free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 1–11, 2008.

LEE, K. T.; AKOH, C. C. Characterization of enzymatically syntetized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexanoic and caprylic acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, p. 495-499, 1998.

LEFEVRE, M., KRIS-ETHERTON, P.M., ZHAO, G. Dietary fatty acids, hemostasis, and cardiovascular disease risk. **Journal American Dietetic Association**, v. 104, p. 410–419, 2004.

LI, D., et al. Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats. **Food Science and Technology**, v.43, p. 458–464, 2010.

LIEN E.L., et al. The effect of triglyceride positional distribution on fatty acid absorption in rats. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 25, p.167–174, 1997.

LOPES, T.I.B. et al. Comparison of the regiospecific distribution from triacylglycerols after chemical and enzymatic interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated high oleic sunflower oil blend by carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Food Chemistry**, v. 212, p. 641–647, 2016.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. R. The Effects of interesterification on the physical properties of fats. Chap 13. In: MARANGONI, A. G; NARINE, S. (Eds) **Physical Properties of Lipids**. CRC Press, 2002.

MARANGONI, A. G. Crystallization kinetics. In: MARANGONI, A.G. (Ed) **Fat Crystal Networks**. New York: Marcel Dekker, p.21-82, 2005.

MARMESAT, S., VELASCO, J., MÁRQUEZ-RUIZ, G., DOBARGANES, M.C. A rapid method for determination of polar compounds in used frying fats and oils. **Grasas y Aceites**, v. 58, p. 179-184, 2007,

MARQUEZ-RUIZ, G. et al. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin an internal standard. **Journal Chromatograph**, v.749, p. 55–60, 1996.

MARTÍNEZ-FORCE, E.; RUIZ-LÓPEZ, N.; GARCÉS, R. Influence of specific fatty acids on the asymmetric distribution of saturated fatty acids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) triacylglycerols. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 1595–1599, 2009.

MASUCHI, M. H. et al. Fats from chemically interesterified high-oleic sunflower oil and fully hydrogenated palm. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 859–866, 2014.

METIN, S.; HARTEL, R.W. Crystallization of fats and oils. **Bailey's Industrial Oli and Fat Products**, v. 6, 6^a ed, p. 45-76, 2005.

NOOR LIDA, et al. 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.11, p. 1137-114, 2002.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: formulating and processing for applications**. New York: CRC, 2004.

OSBORN, H.T.; AKOH, C.C. Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p. 93-103, 2002.

OSÓRIO, N.M.; FONSECA, B, M. M.; DIAS, S. F. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. **European Journal Lipid Science Technology**, v.108, p.545–553, 2006.

PACHECO, C. et al., Optimization of reaction conditions in the enzymatic interesterification of soybean oil and fully hydrogenated soybean oil to produce plastic fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.90, p.391–400, 2013.

PEREIRA, A.S., SILVA, E.F., AQUINO NETO, F.R. Cromatografia gasosa de alta temperatura: A nova fronteira e sua aplicação na análise de compostos de alta massa molecular. **Química Nova**, v. 19, p. 600-604, 1996.

PEREIRA, A.S.; AQUINO NETO, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, p. 370-379, 2000.

RAMÍREZ, M.; AMATE, L.; GIL, A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. **Early Human Development 65 Suppl.**, p. 95-101, 2001.

RIBEIRO, A. P. B., et al., Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. **Food Research International**, v. 42, p. 401–410, 2009.

RODRIGUES, R.C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by Immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

ROZENAAL, A. Interesterification of oils and fats. **Inform**, v.3, n11, p. 1232-1237, 1992.

RUAN, X. et al., Characterisation of zero-trans margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p.91–97, 2014.

SACCHI, R., et al. Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high resolution ¹³C NMR of the carbonyl region, **Journal of Food Science**, v. 2, p.117–123, 1992.

SATO, K. Crystallization behaviour of fats and lipids * a review. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 2255-2265, 2001.

SCRIMGEOUR, C. Chemistry of fatty acids. In: SHAHIDI, F. (Ed) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6° Edition, v 1, Chap. 1, 2005.

SENANAYAKE, S.; SHAHIDI, F. Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. In: SHAHIDI, F (Ed) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6^o Edition, v. 3, chap. 17, 2005.

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

SHIN, J.A., AKOH, C.C.; LEE, K.T. Production and physicochemical properties of functional-butterfat through enzymatic interesterification in a continuous reactor. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 888-900, 2009.

SILVA, R. C., et al. Interesterification of lard and soybean oil blends catalyzed by immobilized lipase in a continuous packed bed reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1925-1933, 2011.

SILVA, R.C., et al. Microstructure and thermal profile of structured lipids produced by continuous enzymatic interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.90, p. 631-639, 2013.

SOARES, F.A., et al. Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 115, p. 413–428, 2013.

TIMMS, R. E. Phase Behavior of Fats and Their Mixtures, **Progress in Lipid Research**, v. 23, n.1, p.1-38, 1984.

VLAHOV, G. Regiospecific analysis of natural mixtures of triglycerides using quantitative ¹³C nuclear magnetic resonance of acyl chain carbonyl carbons. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.36, p. 359–362, 1998.

VLAHOV, G., GIULIANI, A.A., DEL RE, P. ^{13}C NMR spectroscopy for determining the acylglycerol positional composition of lampante olive oils. Chemical shift assignments and their dependence on sample concentration. **Analytical Methods**, v.2, p. 916–923, 2010.

WILLIS, W.M.; MARANGONI, A.G. Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 4, p.443-450, 1999.

WILLIS, W.M., LENCKI, R. W., MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p.1-36, 1998.

XU, X. et al. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 1179-1186, 1998.

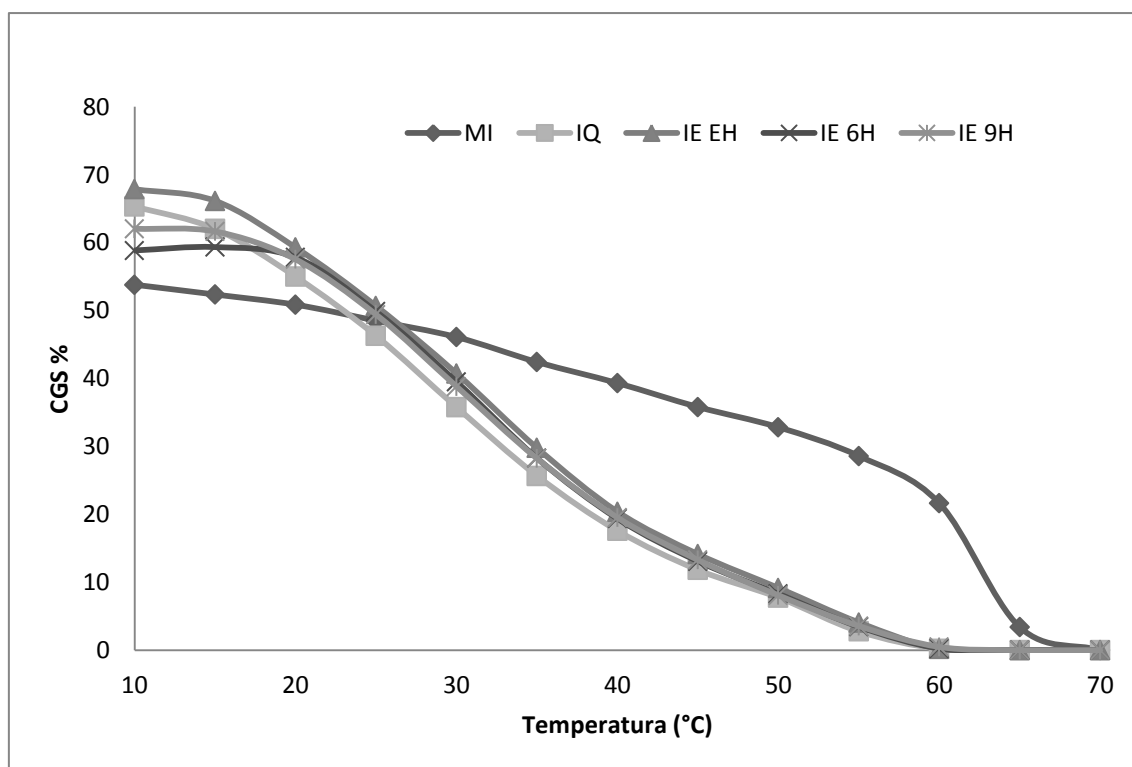
XU, X. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. **Inform**, v.11, p. 1121-1129, 2000.

YANG, L.Y.; KUKSIS, A. Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols. **Journal Lipid Research**, v.32, p. 1173–1186, 1991.

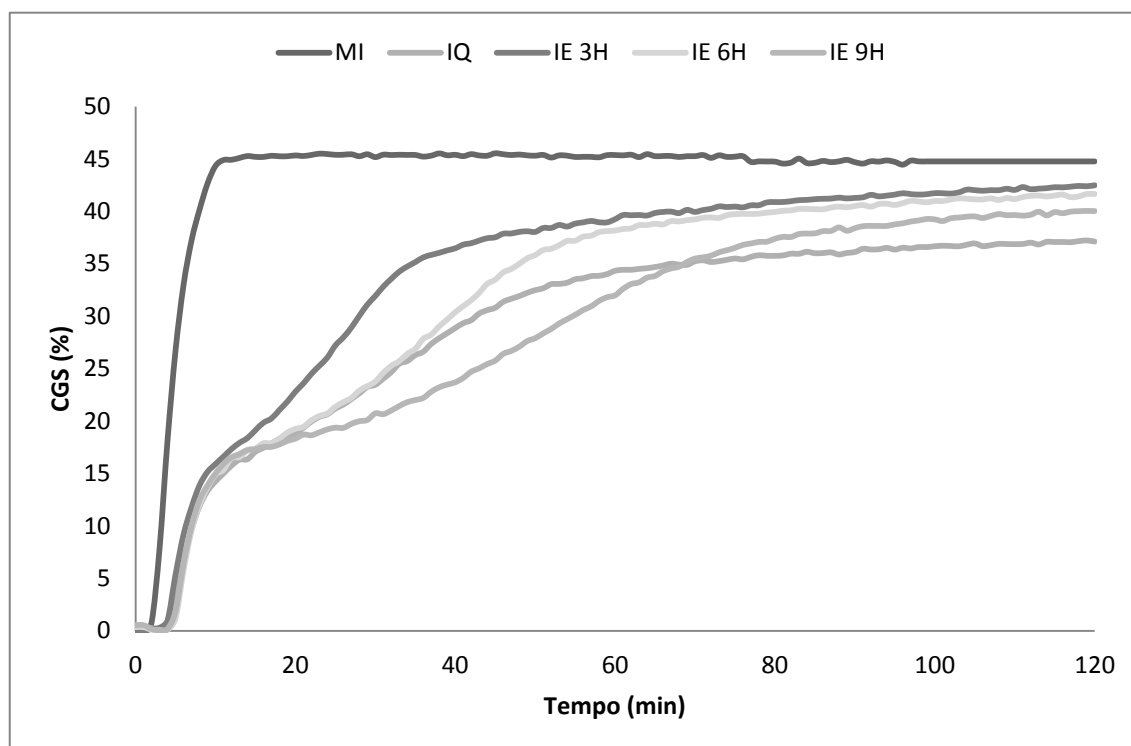
ZEITOUN, M.A.M. Physical properties of interesterified fat blends. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 5, p. 467-471, 1993.

8. ANEXOS

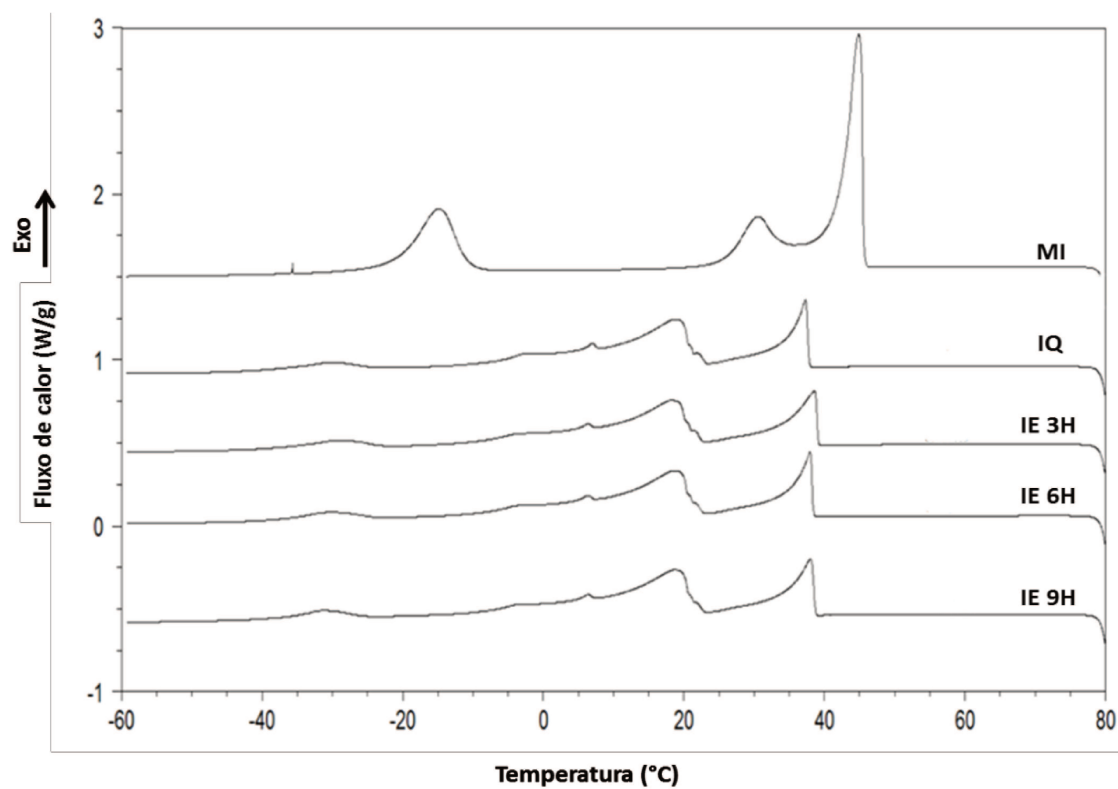
ANEXO 1 Curvas de conteúdo de gordura sólida versus temperatura da proporção 50:50 (OGAO:OGAOTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.



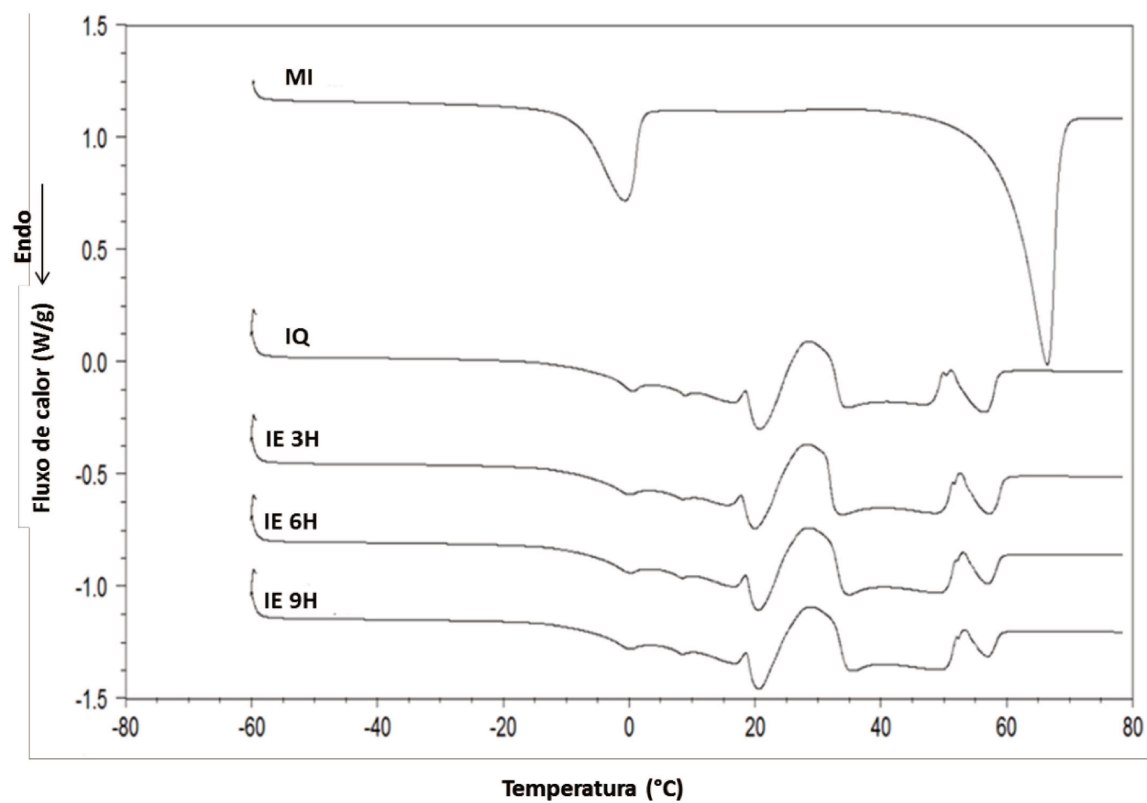
ANEXO 2 Cinética de cristalização a 25°C da proporção 50:50 (OGAO:OGAOTH), mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.



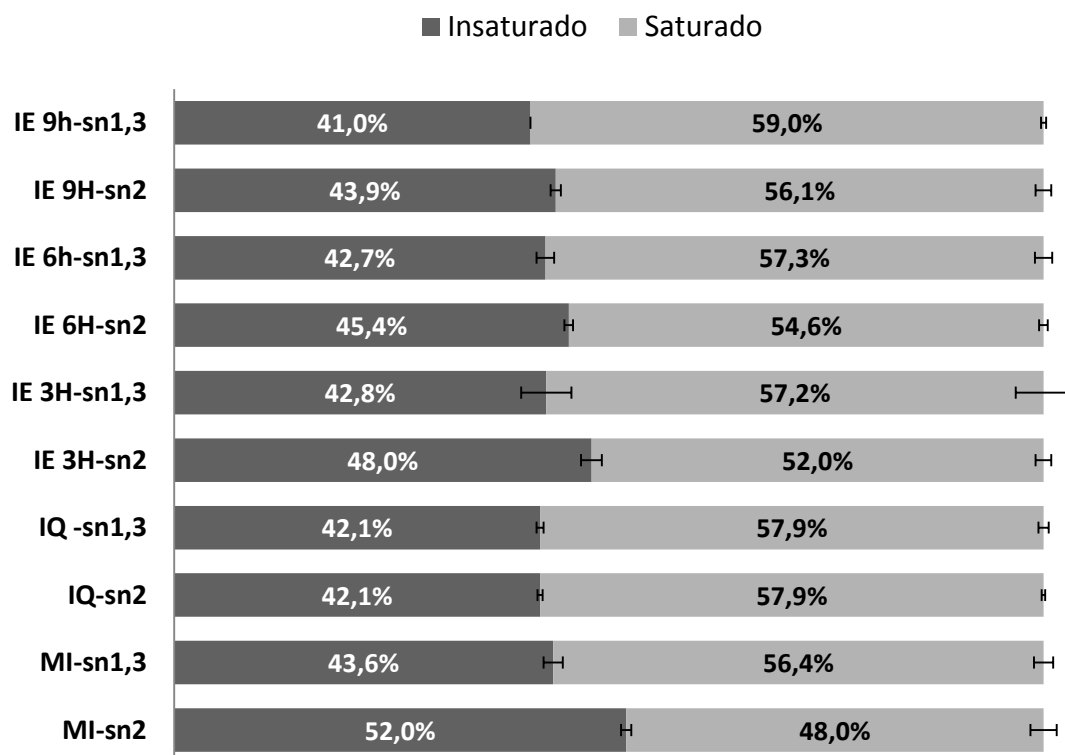
ANEXO 3 Eventos de cristalização da proporção 50:50 (OGAO:OGAOTH), mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.



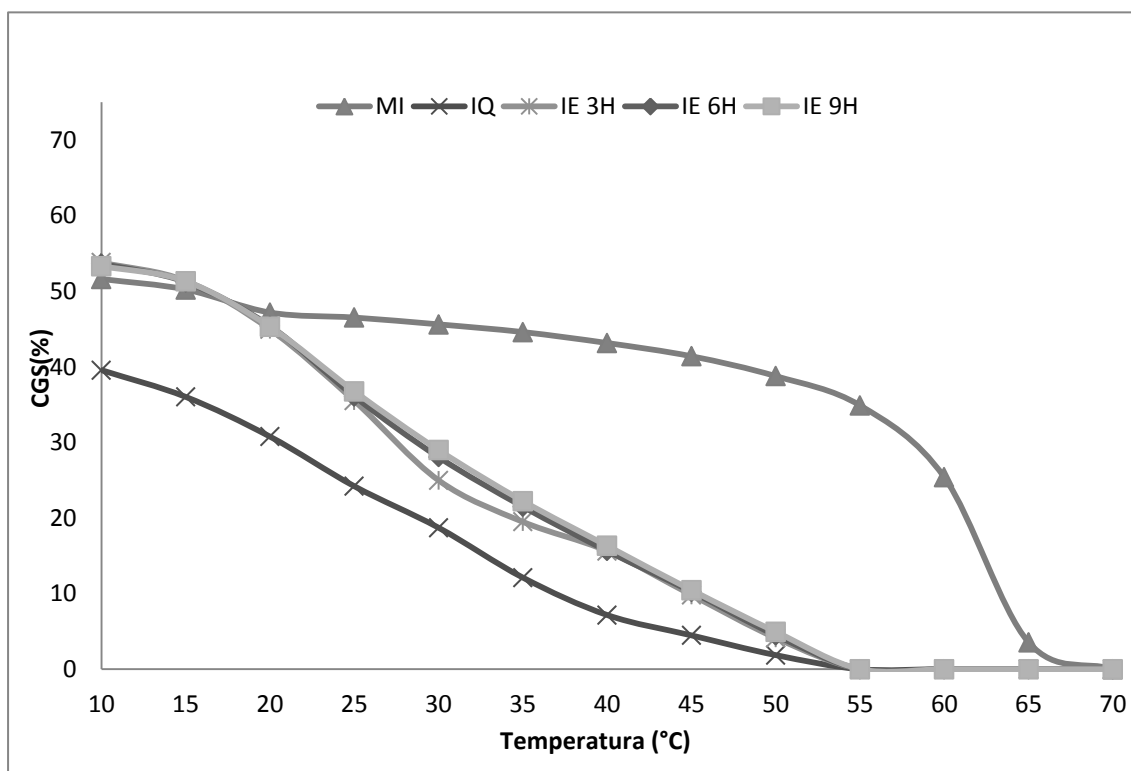
ANEXO 4 Eventos de fusão proporção 50:50 (OGAO:OGAOTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.



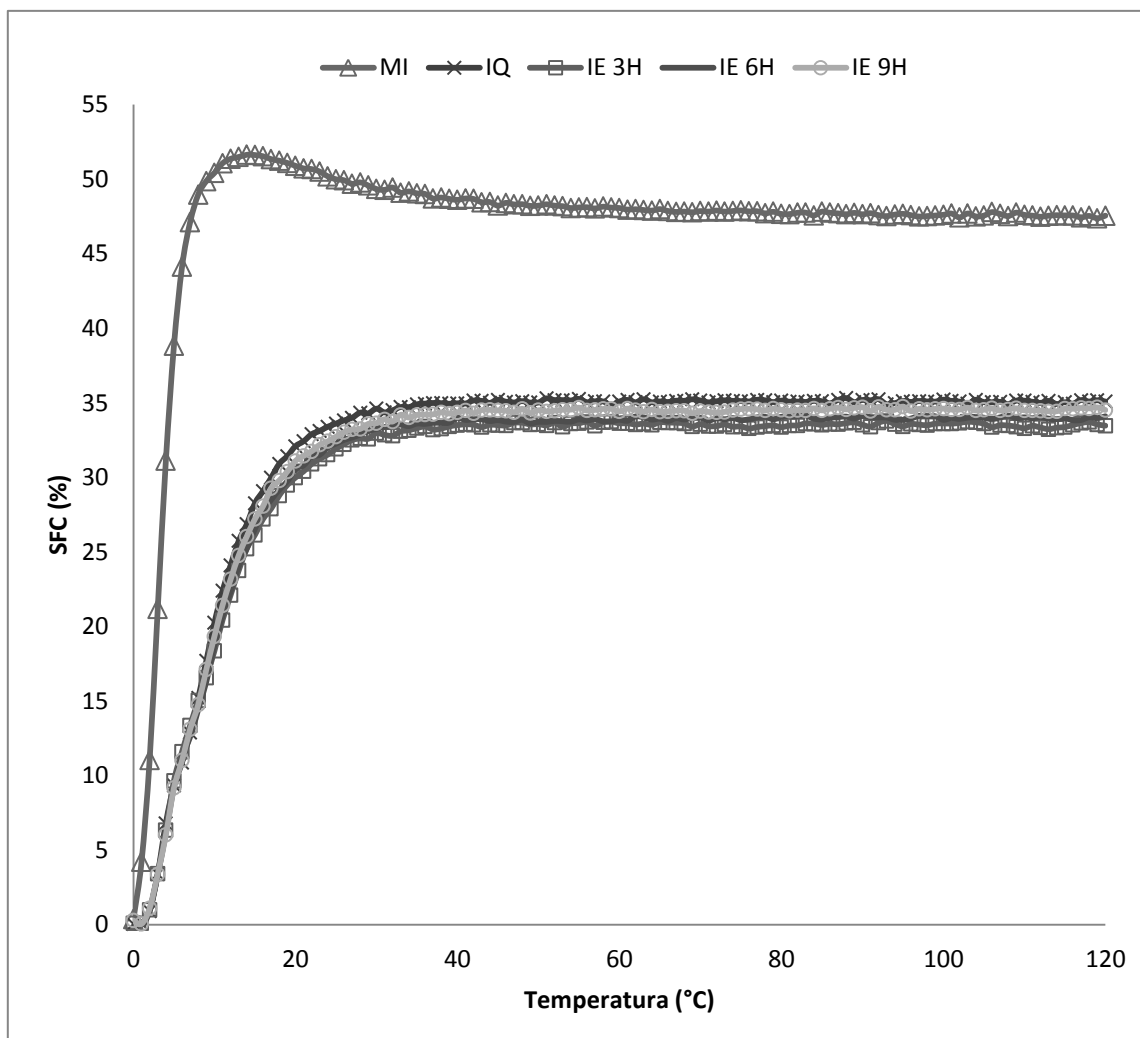
ANEXO 5 Distribuição de ácidos graxos (%) nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 dos TAG na proporção 50:50 (OGAO:OGAOTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OGAOTH: óleo de girassol alto oléico totalmente hidrogenado.



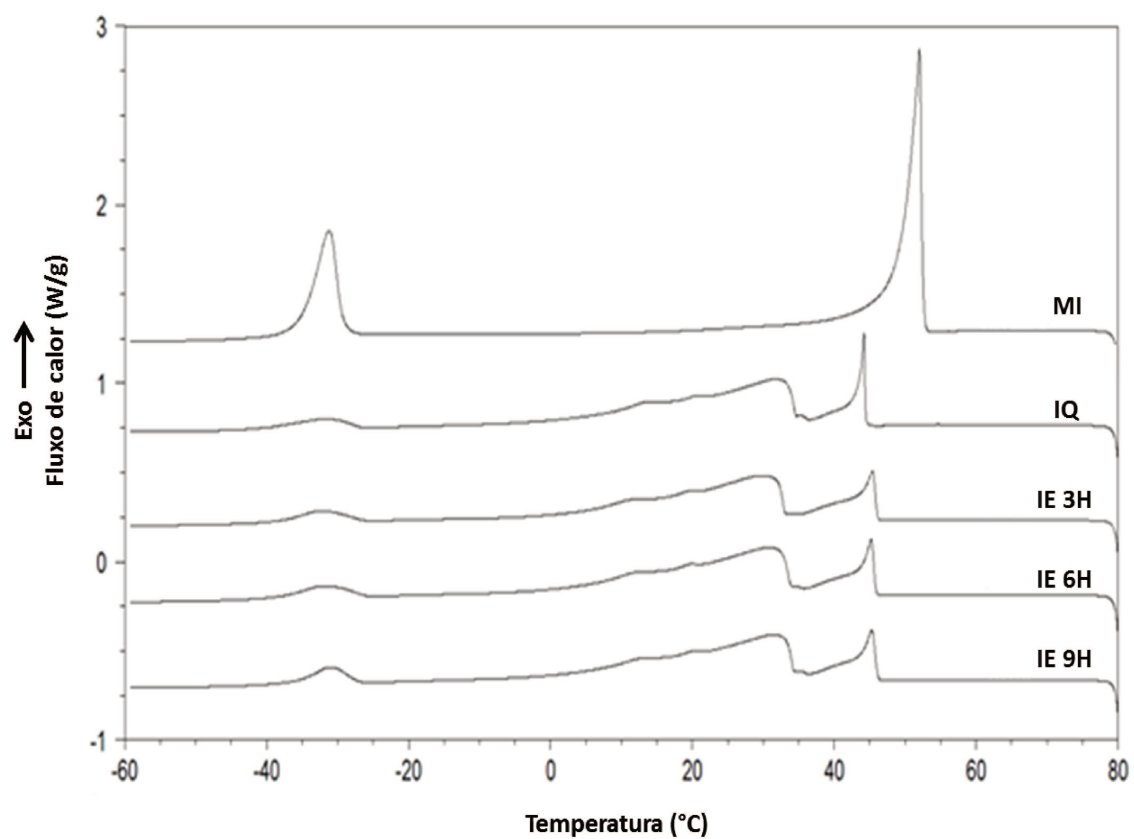
ANEXO 6 Curvas de conteúdo de gordura sólida da proporção 50:50 (OGAO:OCTH), mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.



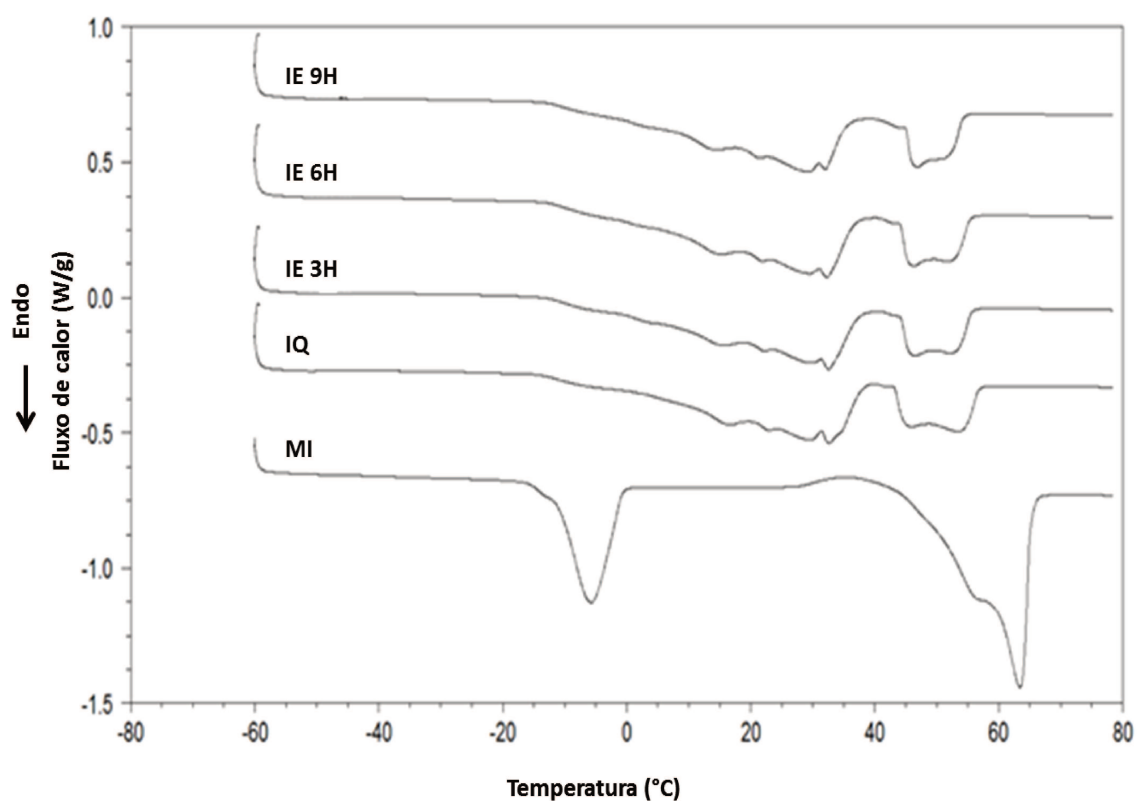
ANEXO 7 Cinética de cristalização a 25°C, proporção 50:50 (OGAO:OCTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.



ANEXO 8 Eventos de cristalização proporção 50:50 (OGAO:OCTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.



ANEXO 9 Eventos de fusão proporção 50:50 (OGAO:OCTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.



ANEXO 10 Distribuição de ácidos graxos (%) nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 dos TAG na proporção 50:50 (OGAO:OCTH) mistura (MI), interesterificação química (IQ) e enzimática (IE) de 3, 6 e 9 horas. OGAO: óleo de girassol alto oléico; OCTH: óleo de crambe totalmente hidrogenado.

