

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MODIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA DA COMPOSIÇÃO TRIGLICERÍDICA DO ÓLEO DE
PIQUI (*Caryocar brasiliense camb*)

NARA LÚCIA FACIOLI

Engenheira de Alimentos

Prof.^a Dr.^a LIRENY A.G. GONÇALVES

Orientadora

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP para obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Alimentos.

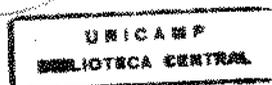
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por NARA LÚCIA FACIOLI e aprovada pela Comissão Julgadora em 11.12.96 em Campinas, 11 de dezembro de 1996.

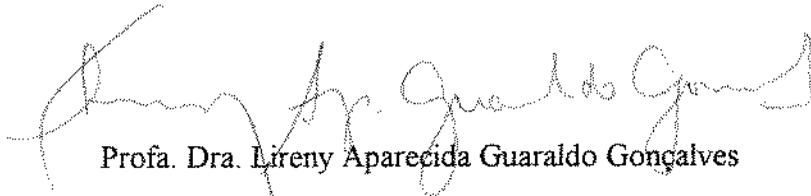
Campinas - 1996

Profa.Dra.LIRENY AP.G.GONÇALVES
Presidente da Banca

I



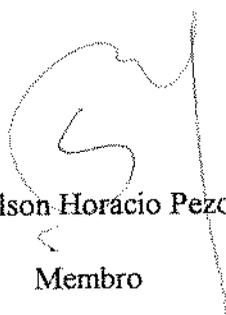
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Orientadora



Prof. Dr. Daniel Barrera - Arellano
Membro



Prof. Dr. Nelson Horácio Pezoa Garcia
Membro

Prof. Dra. Heloisa Mascia Cecchi
Suplente

Campinas, 11 de dezembro de 1996

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Lourdes, pelo constante incentivo.

À minha orientadora, Profa. Lireny A. G. Gonçalves, pelo apoio, amizade e incentivo na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera - Arellano, pela oportunidade de trabalhar com biotecnologia.

A todo o pessoal do laboratório, que direta ou indiretamente contribuíram e compartilharam todos os momentos no decorrer do meu curso de mestrado.

À CNPq pelo auxílio financeiro.

À EMBRAPA de Planaltina - Go, que dispôs de funcionários para coleta dos frutos de Piqui no cerrado e que colocou à disposição o laboratório para a extração do óleo.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	I
SUMMARY	III
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Produção e Consumo de Piqui	3
2.1.1. Produção	3
2.1.2. Consumo	3
2.2. Composição do Piqui	4
2.3. Vantagens do uso das Enzimas nos Processos Industriais	6
2.4. Mecanismo de Interesterificação Catalisada por Lipase	7
2.5. Especificações da Enzima Acilhidrolase EC 3.1.1.3	9
2.6. Especificidade Posicional da Lipozyme	10
2.7. Especificidade da Lipozyme quanto ao Substrato	11
2.8. Atividade da Lipozyme em função da Umidade da reação	15

2.9. Atividade e Produtividade da Lipozyme em função da temperatura de reação	18
2.10. Efeito da Concentração de Enzima na reação de Interesterificação	20
2.11. Efeito da Concentração do Solvente na reação de Interesterificação	22
2.12. Efeito da razão da concentração dos substratos na reação de Interesterificação	24
2.13. Produção de Gorduras Especiais	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Materiais	39
3.1.1. Matérias-primas	39
3.1.2. Reagentes	39
3.1.3. Instrumental	39
3.2. Métodos	40
3.2.1. Extração dos Lipídios	40
3.2.2. Caracterização e Composição do Óleo bruto de Piqui	41
3.2.3. Composição da Manteiga de Cacau	43
3.2.4. Determinação de Umidade e Acondicionamento da Enzima	43

3.3.	Procedimento Experimental	44
3.3.1.	Critério de Seleção	44
3.3.2.	Critérios de Avaliação	45
3.3.3.	Monitoramento das Reações de Interesterificação	45
3.3.4.	Procedimento nos Ensaios	46
3.3.5.	Purificação de Triglicerídeos em escala laboratorial	47
3.3.6.	Estudo das Condições de Reação na Interesterificação do Óleo de Piqui	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1.	Caracterização das Matérias-Primas	49
4.1.1.	Características do Óleo de Piqui	49
4.1.2.	Características da Lipozyme	50
4.1.3.	Características do Ácido Esteárico	50
4.2.	Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Piqui e da Manteiga de Cacau.	51
4.3.	Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui e da Manteiga de Cacau	55
4.4.	Estudo das Condições de Reação na Interesterificação do Óleo de Piqui	60

4.4.1. Efeito do teor de Umidade da Enzima	60
4.4.2. Efeito da Concentração de Lipozyme	65
4.4.3. Efeito da razão de Concentração dos Substratos.	68
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Composição e Teor de Óleo nas frações do Piqui	4
Tabela 2: Composição de Ácidos Graxos do Óleo de Piqui e da Manteiga de Cacau .	5
Tabela 3: Composição dos triglicerídeos principais da manteiga de cacau de diferentes origens.	26
Tabela 4: Triglicerídeos formados na reação de interesterificação de POMF com ácido esteárico	29
Tabela 5: Características físico-químicas do óleo de piqui	50
Tabela 6: Composição de ácidos graxos no ácido esteárico	51
Tabela 7: Composição em ácidos graxos do óleo de piqui, manteiga de cacau e fração média do óleo de palma (POMF)	52
Tabela 8: Composição triglicéridica do óleo de piqui, manteiga de cacau e fração média do óleo de palma (POMF)	56
Tabela 9: Efeito da umidade da Lipozyme sobre a composição em ácidos graxos dos triglicerídeos interesterificados do óleo de piqui	61

Tabela 10: Efeito da umidade da Lipozyme sobre a composição triglicéridica principal do óleo de piqui interesterificado	63
Tabela 11: Efeito da concentração de Lipozyme sobre o tempo de reação na formação de triglicérides	67
Tabela 12: Efeito da razão de concentração dos substratos sobre o tempo de reação na formação de triglicérides	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Exemplos de Acidólise e Transesterificação ou Interesterificação usando lipase <i>sn</i> 1,3 específica.	7
Figura 2 - Mecanismo de Interesterificação catalisada por Lipase.	8
Figura 3 - CLAE de triglicerídeo interesterificado por lipases com especificidades diferentes.	11
Figura 4 - Taxas de interesterificação do óleo de ucuhuba com vários ésteres metílicos.	12
Figura 5 - Taxas de interesterificação do óleo de ucuhuba com vários substratos.	13
Figura 6 - Composição dos produtos da interesterificação do óleo de ucuhuba com trioleoilglicerol, óleo de girassol e óleo de milho.	14
Figura 7 - Influência do conteúdo de água na atividade da Lipozyme.	16
Figura 8 - Efeitos da atividade de água da Lipozyme na formação de subprodutos e no tempo de reação.	17
Figura 9 - Atividade da Lipozyme em função da temperatura.	18
Figura 10 - Influência da temperatura no tempo de reação e na formação de subprodutos.	20
Figura 11 - Efeito da concentração de Lipozyme no tempo de reação e na formação de subprodutos.	21
Figura 12 - Efeito da concentração de solvente na taxa de interesterificação	23

Figura 13 - Efeito da concentração de solvente na formação de triglicerídeos saturados.	24
Figura 14 - CLAE da manteiga de cacau e do produto interesterificado.	32
Figura 15 - Curvas de derretimento da gordura do kokum interesterificado e da manteiga de cacau.	34
Figura 16 - CLAE dos triglicerídeos do equivalente da manteiga de cacau, da oleína de palma e da manteiga de cacau.	36
Figura 17 - DSC dos equivalentes da manteiga de cacau e da manteiga de cacau.	37
Figura 18 - Cromatograma de ácidos graxos (CG) do óleo de piqui obtido artesanalmente e da manteiga de cacau.	54
Figura 19 - Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) do óleo de piqui obtido artesanalmente.	58
Figura 20 - Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) da manteiga de cacau da variedade <i>Forasteiro</i> .	59
Figura 21 - Relação do tempo de reação em função da concentração de Lipozyme.	66
Figura 22 - Relação do tempo de reação em função da razão em peso dos substratos.	71
Figura 23 - Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) do óleo de piqui interesterificado.	73

Resumo das Abreviaturas utilizadas no texto

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
AEI	Ácido Esteárico Incorporado
ArOAr	1,3-diaraquidaoil-2-monooleína
CBE	Equivalente da Manteiga de Cacau
CBS	Substituto da Manteiga de Cacau
CBX	Extensor da Manteiga de Cacau
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
LLL	trilaureoil-glicerol
LLM	1,2-dilaureoil-3-monomiristoil
LMM	2,3-dimiristoil-1-monolaureoil
POMF	Fração Intermediária do Óleo de Palma
POP	1,3 - dipalmitoil - 2 - monooleína
POS	1(3) - palmitoil - 3(1) - estearoil - 2 - monooleína
SFC	Teor de Sólidos da Gordura
SOAr	1(3)-estearoil-3(1)-araquidaoil-2-monooleína
SOS	1,3 - diestearoil - 2 - monooleína
SUS	Triglicerídeo Monoinsaturado

RESUMO

Os sistemas enzimáticos têm apresentado bons resultados sobre os processos químicos convencionais nas transformações de óleos e gorduras, onde são necessários normalmente um grande número de reações.

Pela sua composição triglicéridica, o óleo de Piqui (*Caryocar brasiliense* camb) foi escolhido como matéria-prima para modificações enzimáticas visando a obtenção de produto, com composição triglicéridica semelhante à da manteiga de cacau brasileira, através da reação de interesterificação enzimática na presença de ácido esteárico. A incorporação do ácido deve ser na posição *sn*-1,3 que se efetiva com a utilização de uma enzima triacilhidrolase *sn* 1,3-3,1 específica, do fungo *Mucor miehei* (Lipozyme TM, Novo Industri, Copenhagen, Dinamarca).

Em sistema aberto, na reação por batelada, com agitação termostatizada a 70°C, foram testadas várias razões em peso dos substratos e variações na umidade e quantidade de enzima utilizada, com o objetivo de se obter um produto com composição triglicéridica principal semelhante à da manteiga de cacau, com 44% de incorporação de ácido esteárico.

A incorporação de ácido esteárico foi determinada baseando-se na quantificação dos triglicérides principais presentes na Manteiga de Cacau (POS, SOS e POP).

Os triglicérides, após a reação de interesterificação, foram separados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), recuperados em sílica, dissolvidos em acetona e injetados em cromatógrafo à líquido para quantificação.

O monitoramento da reação foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema de fase reversa.

Baseado nos resultados conclui-se que: a razão em peso de ácido esteárico / óleo piqui de 0,33, 10% de Lipozyme com sua umidade original (2,36%) e temperatura de 70°C, são as condições ideais para a interesterificação do óleo de piqui, com um tempo de reação de 240 minutos.

A proposta se mostrou viável em escala laboratorial, em reação com tempo de 4 horas. Há necessidade de se purificar o triglicerídio obtido do ácido esteárico não reagido e dos sub-produtos indesejáveis como: mono e diglicerídeos e triglicerídeos saturados.

SUMMARY

Enzymatic systems have been shown good results over conventional chemical processes for fats and oils modifications, where a great number of reactions are needed.

Piqui (*Caryocar brasiliense* camb) was selected for this work based on the triglyceride composition of the piqui fruit's oil. The oil of the Piqui fruit was then transformed into a raw-material to produce cocoa-butter-like fat through an enzymatic reaction. This transformation was possible through an enzymatic interesterification reaction in the presence of stearic acid. The acid was incorporated in the *sn* 1,3 position and catalyzed by *sn* 1,3-3,1 specific triacylglycerol acyltransferase enzyme from *Mucor miehei* fungi (Lipozyme TM, Novo Industri, Copenhagen, Denmark).

In open system, a series of batch tests were performed at 70°C, with agitation. The weight ratio of the substrate, the concentration and the moisture of the enzyme were varied in these tests in order to obtain a cocoa butter-like fat with 44% of an acid stearic incorporation.

The incorporation of stearic acid was determined based on the quantification of the principal triglycerides (POP,POS e SOS) founded on the cocoa butter.

After the interesterification reaction, the triglycerides were isolated by Thin Layer Chromatography (TLC). This was achieved by first recovering the layer in silica, then dissolving it in acetone and finally quantifying the triglycerides by High Performance Liquid Chromatography in a reverse phased system (HPLC), this was used to monitorated the reactions.

Based on the results, it was found that a weight ratio of 0,33 : 1 (stearic acid : piqui fruit oil), 10% of enzyme at 70°C are the ideals conditions to obtain a cocoa-butter-like fat.

Finally, it was observed that the proposed process was feasible with a reaction time of 240 minutes under laboratory scale and conditions. In addition, it is necessary to purify the triglycerides obtained from non-reacted stearic acid and undesirable by-products such as mono- and di-glycerides and saturated triglycerides.

1. INTRODUÇÃO

Biotechnology é a aplicação de organismos simples ou multicelulares e de seus sistemas enzimáticos derivados ou associados na obtenção de produtos desejados. Estes sistemas têm sido empregados nas reações de hidrólise de triacilgliceróis, formação de ésteres cerosos, acilação de glicerol, interesterificação de triacilgliceróis e na formação de esteróis. Os sistemas enzimáticos têm apresentado muitas vantagens sobre os processos químicos convencionais nas transformações de óleos e gorduras, onde são necessários normalmente grande número de reações (RATTRAY, 1984).

As propriedades físicas de uma gordura dependem do tipo de ácido graxo e da sua posição na molécula do glicerol (STEVENSON, *et alii*, 1979).

A manteiga de cacau é uma importante matéria-prima utilizada nas indústrias de chocolate e de produtos de confeitaria, apresentando alto valor comercial. Contém teores substanciais de 2-oleoil-glicerídeos de ácido palmítico e esteárico, que lhe conferem características únicas e valiosas de cristalização e de derretimento, essenciais na fabricação de determinados produtos, com ponto de fusão próximo à temperatura do corpo humano. Entretanto, seu alto custo inviabiliza sua utilização em muitos produtos alimentícios e faz com que seja substituída por outras gorduras de preços inferiores. Estearinas dos óleos de coco e do caroço da palma (palmiste), têm pontos de fusão semelhantes à da manteiga de cacau, mas quando misturados à mesma, formam misturas eutéicas com características indesejáveis (POSORSKE *et alii*, 1988).

Vários estudos têm sido realizados no sentido de se modificar gorduras com o objetivo de se obter equivalentes da manteiga de cacau: por cristalização fracionada em solvente (BALIGA & SHITOLE, 1981), interesterificação química (BHATTACHARYYA & BANERJEE, 1987) ou hidrogenação (GHOSH *et alii*, 1993), mas com sucessos limitados. A hidrogenação catalítica produz isômeros de ácidos graxos devido à geometria (*trans*) e isomerização posicional das duplas ligações, enquanto que a interesterificação química produz triglicerídeos de forma randômica, o que afeta a qualidade dos equivalentes da manteiga de cacau. O fracionamento em solventes é um processo enfadonho que envolve uma série de cristalizações da gordura com o objetivo de se obter uma mistura simples de triglicerídeos com uma estrutura desejável (SRIDHAR *et alii*, 1991).

Com a biotecnologia, vários processos enzimáticos têm sido estudados com a finalidade de se obter equivalentes da manteiga de cacau a partir de óleos e gorduras de baixo valor comercial. Recentemente, o uso de lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) como catalisadores de reações de interesterificação têm recebido considerável atenção, pois os resultados obtidos demonstram boa eficiência do processo.

Dados da composição em ácidos graxos do óleo da polpa e da amêndoa do Piqui (*Caryocar brasiliense* camb) mostram que são constituídos na sua maior parte por ácido oléico e ácido palmítico, enquanto que a manteiga de cacau apresenta altos teores dos ácidos, oléico, palmítico e esteárico.

O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos de vários parâmetros na reação de interesterificação do óleo da polpa de piqui com ácido esteárico, utilizando-se como catalisador uma lipase *sn* 1,3 específica e estimar as condições ideais de reação visando uma composição triglicéridica similar à da manteiga de cacau.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção e Consumo de Piqui (Brasil MIC-STI, 1985)

2.1.1. Produção

O piqui é uma planta arbórea da família *CARYOCARACEA*, gênero *Caryocar* L., englobando cerca de 20 espécies, a maioria de porte alto e compondo a vegetação da floresta amazônica, inclusive estendendo seu habitat natural aos países limítrofes, principalmente Peru, Suriname e Guianas. No Brasil, o piqui distribui-se desde a sua área de maior ocorrência no Pará e no Amazonas, aos estados do Nordeste e ainda aos estados do Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e norte do Paraná. É uma planta típica de cerrado e das caatingas.

Por ser uma planta não explorada economicamente, não se têm dados oficiais de produção, mas estima-se uma produção de 1.000 a 2.000 frutos por planta, sendo de 80g o peso médio de cada fruto e de 65g o peso médio dos caroços (ovários).

Com base nas estimativas feitas, o rendimento de óleo, por hectare de área cultivada, que comporte até 100 pés, irá variar de 1 a 2 toneladas anuais.

2.1.2. Consumo

Além da utilização do piquizeiro como fonte de combustível (lenha e carvão), e na marcenaria, a casca, como também as folhas, por conterem altos teores de taninos, constituem-se em matérias-primas na fabricação de tintas.

Entretanto, os caroços amarelos, encontrados no interior do fruto maduro, constituem o produto mais significativo da planta, sobretudo por representar um dos poucos recursos alimentares da população subnutrida moradora das áreas de ocorrência do piqui.

O consumo doméstico do piqui inclui a fabricação de licor, a elaboração de pratos típicos com o fruto cozido (arroz e frango com piqui, etc.). O óleo extraído da amêndoa e da polpa são consumidos como os outros óleos (soja, milho, etc.) e como unguento, usado em fricções costais e torácicas e lhe atribuem efeitos curativos para doenças respiratórias. Mas a importância básica do consumo de piqui está no suprimento nutricional, pelo menos 4 meses ao ano, de vitamina A e de lipídios (calorias), aos moradores carentes dessas regiões.

2.2. Composição do Piqui

Os resultados das análises em diversos lotes de frutas, mostradas na Tabela 1, indicam que o caroço amarelo representa aproximadamente 80% do peso da fruta, sendo a polpa do caroço a fonte principal de triglicerídeos, participando sozinha com mais de 75% do rendimento total do óleo.

Tabela 1: Composição e teor de óleo nas frações do piqui - Base Seca

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO (%)	TEOR DE ÓLEO (%)
Casca	42,0 - 58,0	2,0
Polpa	16,0 - 30,0	62,0
Endocarpo	15,0 - 16,0	15,8
Amêndoa	5,0 - 7,0	54,0

Brasil MIC-STI, 1985

Dados da composição de ácidos graxos do óleo da polpa e da amêndoa do Piqui (*Caryocar brasiliense* Camb), mostram que são constituídos na sua maior parte por ácido oléico e ácido palmítico (BRASIL MIC-STI, 1985), enquanto que a manteiga de cacau (*Theobroma cacao*) apresenta altos teores de ácido oléico, esteárico e palmítico (PADLEY *et alii*, 1986), como se observa na Tabela 2.

Tabela 2: Composição de Ácidos Graxos do Óleo de Piqui e da Manteiga de Cacau (%p/p).

ÁCIDO GRAXO	ÓLEO DE PIQUI (POLPA) 1	ÓLEO DE PIQUI (AMÊNDOA) 1	MANTEIGA DE CACAU 2
Palmítico	34,4	32,0	26,0
Palmitoléico	2,1	1,3	0,3
Estearico	1,8	2,1	34,4
Oléico	57,4	56,3	34,8
Linoléico	2,8	7,2	3,0
Linolênico	1,0	0,3	0,2
Saturados	36,2	34,1	60,4
Insaturados	63,3	65,1	38,3

1 - Brasil MIC-STI, 1985

2 - Padley *et alii*, 1995

Como a manteiga de cacau apresenta como maiores componentes na sua composição triacilglicerídica o 1(3)-palmitoil-2-oleoil-3(1)-estearoil-glicerol (**POS, SOP**) com 46%, o 1,3-diestearoil-2-oleoil-glicerol (**SOS**) com 33% e o 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-glicerol (**POP**) com 16% (PADLEY *et alii*, 1986), a interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico, catalisada por uma lipase sn-1,3 específica, poderá gerar um produto final com composição triglicerídica e propriedades físicas adequadas para a produção de equivalentes da manteiga de cacau.

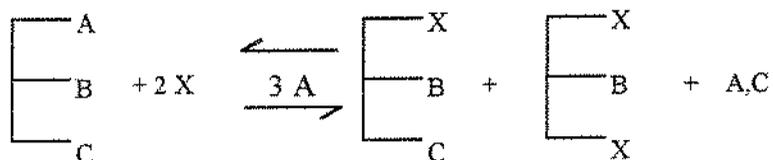
2.3. Vantagens do uso das Enzimas nos Processos Industriais (POSORSKE, 1984):

Pode-se relacionar as seguintes vantagens do uso de enzimas:

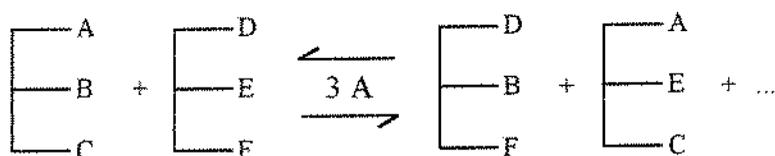
- Especificidade da enzima, o que permite controlar a produção dos produtos desejados.
- Condições brandas de processamento, o que diminui os custos em termos energéticos e de investimentos de equipamentos.
- Redução nos custos de tratamento de resíduos, pois as enzimas são biodegradáveis.

Utilizando uma lipase *sn* 1,3 específica, como a do fungo *Mucor miehei* (acilhidrolase EC 3.1.1.3), um ácido graxo específico pode ser incorporado nas posições extremas do triglicerídeo, sem alterar o ácido graxo da posição central, por um processo conhecido como acidólise ou rearranjar randomicamente os ácidos graxos das posições extremas, sem alterar o da posição central, pelo processo de transesterificação (HANSEN & EIGTVED, 1986). A Figura 1 exemplifica os dois tipos de reações:

- ACIDÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS



- TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS



onde:

A = enzima; X = ácido graxo

Figura 1 - Exemplos de Acidólise e Transesterificação ou Interesterificação usando lipase *sn* 1,3 específica.

Fonte: Hansen & Eigtved, 1986.

2.4. Mecanismo de Interesterificação Catalisada por Lipase

O mecanismo de reação ocorre via acil-enzima (SEMERIVA *et alii*, 1974), como mostra a Figura 2. Se o diglicerídeo desacilar o complexo acil-enzima contendo o grupo acil a ser incorporado no triglicerídeo para formar o produto, uma reação produtiva ocorre. Mas se uma molécula de água atacar o complexo acil-enzima, ocorrerá uma reação de hidrólise. Operando com teores muito baixos de umidade, evita-se a hidrólise.

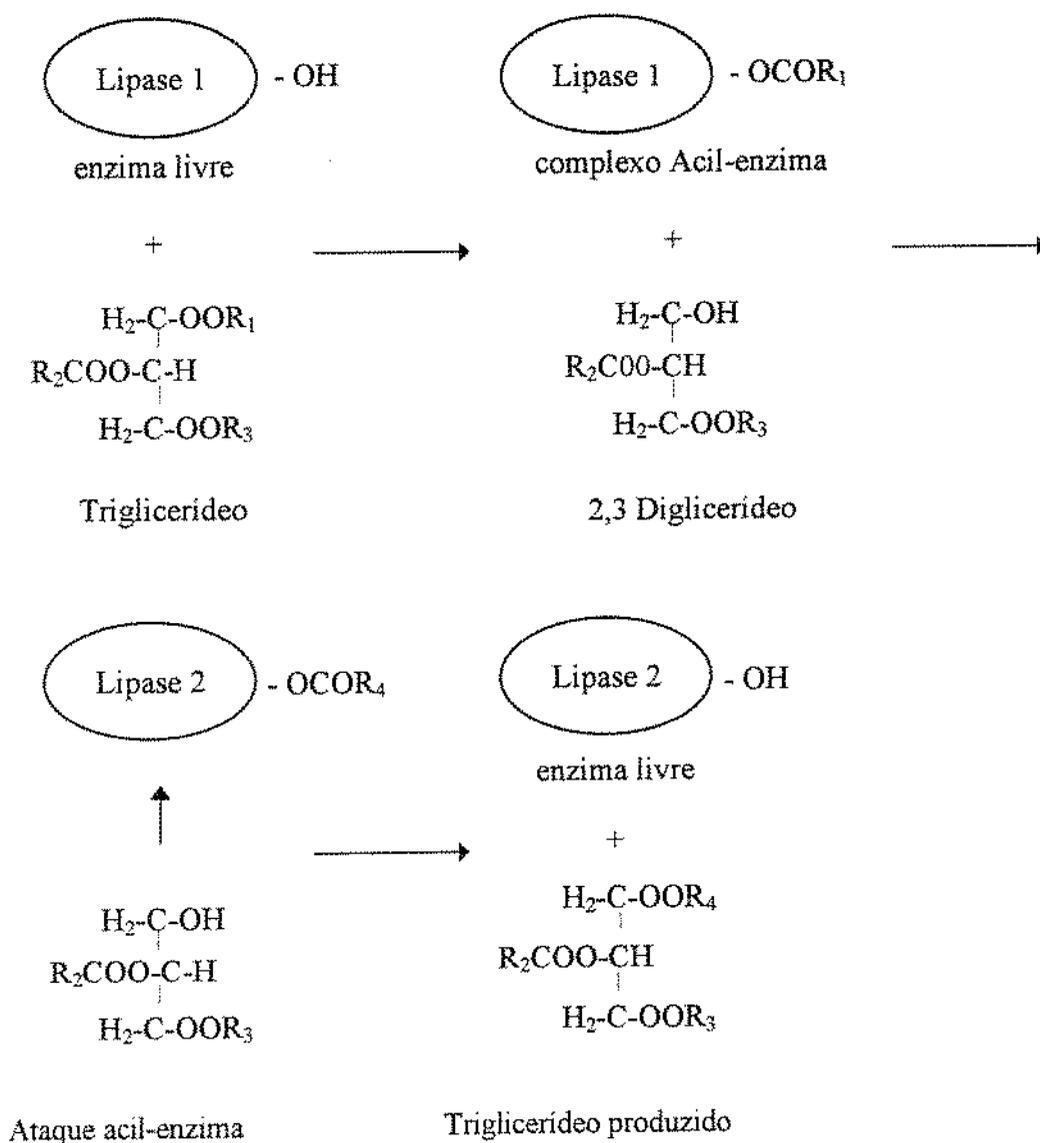


Figura 2 - Mecanismo de Interesterificação catalisada por Lipase.

Fonte: Semeriva et alii, 1974.

2.5. Especificações da Enzima Acilhidrolase EC 3.1-1.3 (LIPOZYME TM, 1985)

Lipozyme é um produto granular, com tamanho de partícula de 0,3 a 0,6 mm, adequado para uso em reatores contínuos de leito empacotado ou em reatores por batelada.

A enzima geralmente se apresenta imobilizada em uma resina macroporosa de troca aniônica. A imobilização da lipase se faz necessária devido a:

- Estabilização da enzima.
- Requerimento de baixas concentrações de água nas reações.
- Reutilização da enzima, com separação da mesma do meio de reação por filtração ou centrifugação.

A estabilidade térmica da Lipozyme imobilizada está entre 60 e 80°C. Sua atividade de interesterificação depende do conteúdo de água, sendo máxima a 10% de umidade, dependendo dos substratos e das condições de reação. A enzima retém a máxima atividade por 3 meses se estocada a 5°C, conforme fabricante.

A atividade de interesterificação da lipase imobilizada é medida em BIU (Batch Interesterification Unit)/g e 1 BIU corresponde a 1 micromol de ácido palmítico incorporado na trioleína por minuto, sob condições padrões (40°C e 1 atm).

A segurança da utilização da Lipozyme na interesterificação de óleos e gorduras comestíveis foi testada segundo um programa de segurança compreendendo os seguintes pontos (EIGTVED *et alii*, 1986):

- Segurança do tipo (grupo) do fungo *Mucor miehei*, onde se testou a patogenicidade do microorganismo.
- Estudo toxicológico da lipase, onde foram efetuados testes de alimentação em ratos e cachorros.

- Avaliação da estabilidade físico-química da lipase imobilizada com o objetivo de detectar alguma fuga de compostos aromáticos da resina para o meio de reação e/ou de enzima.

2.6. Especificidade Posicional da Lipozyme

Para se obter produtos específicos é necessária a escolha correta das matérias-primas e da enzima. A especificidade das enzimas pode ser posicional, quanto ao tamanho de cadeia dos substratos, quanto ao grau de insaturação e também quanto ao tipo de substrato.

A Lipase do fungo *Mucor miehei* possui a especificidade posicional *sn* 1,3 (3,1) como sua principal característica. A Figura 3 mostra as vantagens da utilização de enzimas com diferentes especificidades na obtenção de produtos específicos. As reações de interesterificação de ácido palmítico e trioleína utilizando-se as lipases da *Cândida cylindracea* em um caso, e no outro a lipase do *Mucor miehei* demonstram claramente a diferença de especificidade posicional das enzimas. Os triglicerídeos foram analisados por CLAE em fase reversa. Os resultados obtidos após 3 horas de reação revelam a não especificidade da lipase da *Cândida cylindracea* pois a trioleína foi interesterificada nas suas 3 posições, formando três compostos diferentes (**POO, POP, PPP**). Mas a lipase do *Mucor miehei* mostrou-se extremamente específica quanto à posição do ácido graxo interesterificado nas posições 1 e 3, formando somente dois compostos diferentes (**POO, POP**) (POSORSKE, 1984).

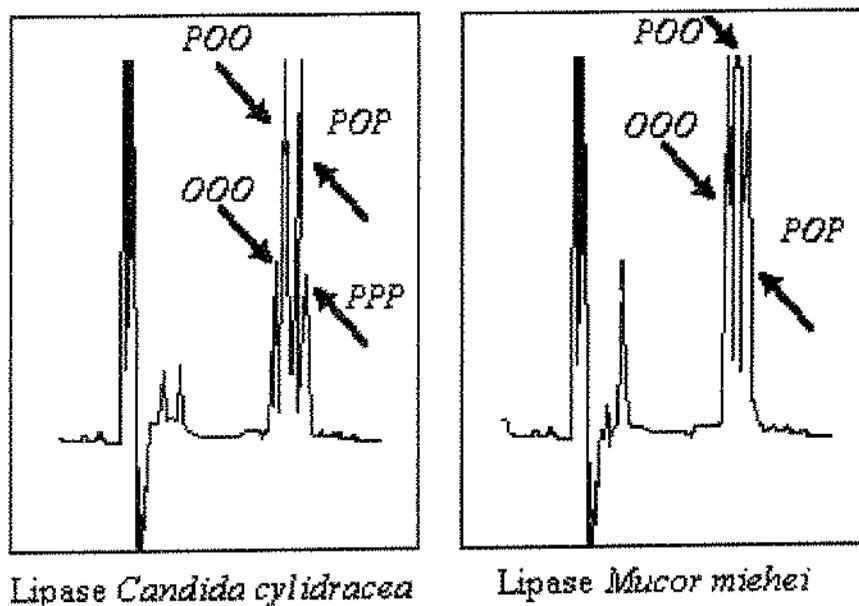


Figura 3 - CLAE de triglicerídeo interesterificado por lipases com especificidades diferentes.

ác. C16:0/trioleína = 1:1 (p/p), 31% de lipase e 3h de incubação a 40°C.

Fonte: Posorske, 1984.

SCHUCH & MUKHERJEE (1987) confirmaram a especificidade posicional da lipase do *Mucor miehei* em vários experimentos quando estudavam a especificidade dessa enzima quanto ao substrato, citados no item 2.7. A especificidade posicional foi determinada isolando os triacilgliceróis da mistura por CCD. A distribuição posicional dos grupos acil foi determinada por hidrólise com lipase pancreática (CHRISTIE, 1982) e CCD com sílica gel H impregnada com ácido bórico (THOMAS *et alii*, 1965) em conjunto com cromatografia gasosa para identificação dos ácidos graxos.

2.7. Especificidade da Lipozyme quanto ao Substrato

A interesterificação de lipídeos usando-se uma lipase triacilglicerol *sn* 1,3 específica (Lipozyme), foi estudada por SCHUCH & MUKHERJEE (1987), onde triacilgliceróis da ucuhuba (*Virola surinamensis*), que apresentam 90% de ácido láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) na sua composição, foram interesterificados com: ésteres metílicos de ácidos graxos saturados [tridecanoato

(C13:0), pentadecanoato (C15:0), heptadecanoato (C17:0), nonadecanoato (C19:0) e araquidato (C20:0)], ácido heptadecanóico, triacilgliceróis contendo C18 nas posições acil (óleo de girassol, de milho e trioleína), álcool de cadeia longa (octadecil) e com glicerol. Os substratos foram utilizados em quantidades equimolares, dissolvidos em hexana saturada com água. As reações foram catalisadas pela Lipozyme (10% em peso sobre os substratos) e temperatura de 45°C.

A taxa de interesterificação dos ésteres metílicos decresceu com o aumento do comprimento da cadeia (Figura 4) e as reações com com vários substratos apresentaram as seguintes taxas de interesterificação, em ordem decrescente: álcool de cadeia longa > ácido graxo > triacilglicerol > éster metílico > glicerol (Figura 5).

Conclui-se que a Lipozyme é seletiva quanto ao tipo de substrato e quanto ao tamanho de cadeia do mesmo.

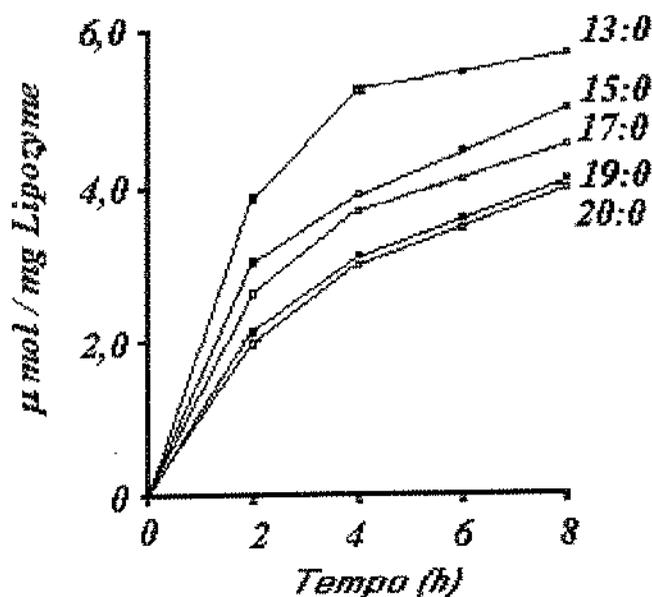


Figura 4 - Taxas de interesterificação do óleo de ucuhuba com vários ésteres metílicos.

óleo ucuhuba/éster metílico = 1:1 (mol/mol), 10% de Lipozyme e T=45°C.

Fonte: Schuch & Mukherjee, 1987.

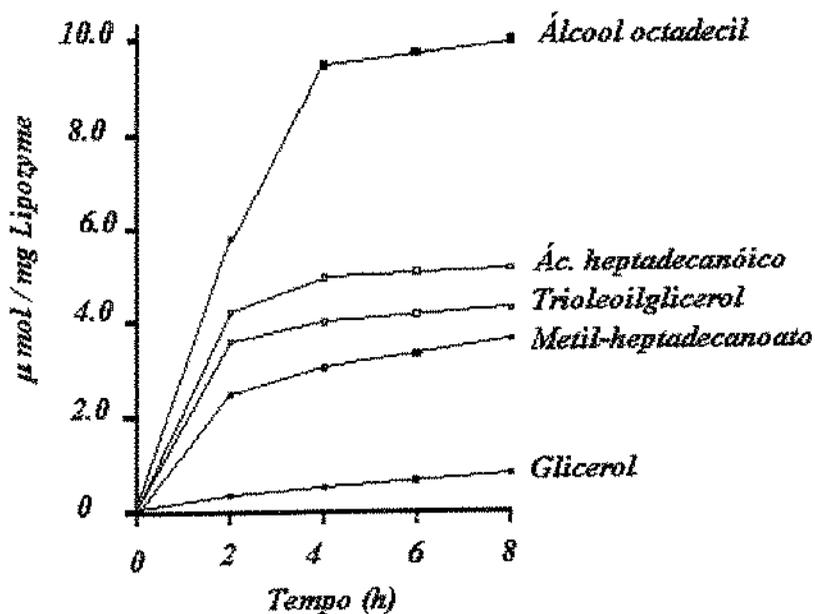


Figura 5 - Taxas de interesterificação do óleo de ucuhuba com vários substratos.

óleo ucuhuba/substrato = 1:1 (mol/mol), 10% Lipozyme e T=45°C.

Fonte: Schuch & Mukherjee, 1987.

A Figura 6 ilustra a composição dos produtos das interesterificações do óleo da ucuhuba com óleo de milho, óleo de girassol e trioleína, catalisadas pela Lipozyme a 45°C, com relação ao tempo de reação. São expressos os teores de triglicerídeos iniciais e os formados (%) após 2 e 4 h de reação, com relação aos seus números de carbono. As alterações observadas são marcadas pelo decréscimo do teor de triglicerídeos com números de carbono 38, 40 e 42 (correspondente aos triglicerídeos do óleo de ucuhuba) e aqueles com número de carbono 54 (correspondente ao trioleoilglicerol) e 52 e 54 (correspondente aos triglicerídeos dos óleos de girassol e milho). Simultaneamente é observado um acréscimo no teor de triacilgliceróis com números de carbono de 44 a 50. A reação com trioleoilglicerol mostra a formação de triglicerídeos com número de carbono 52, que não estavam presentes no início da reação.

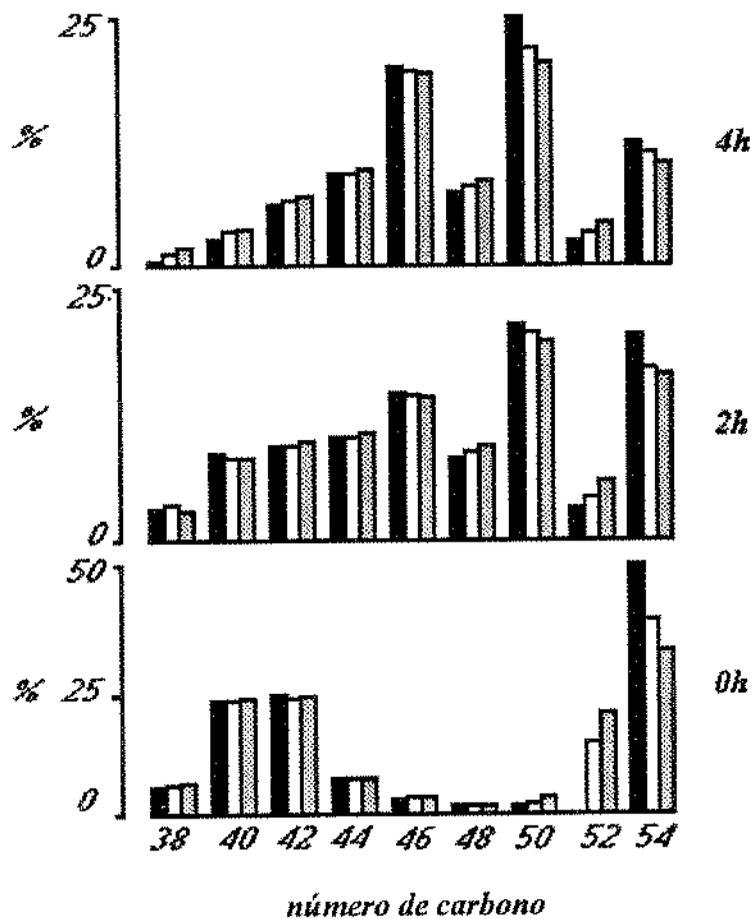


Figura 6 - Composição dos produtos da interesterificação do óleo de ucuhuba com trioleoilglicerol  óleo de girassol  e óleo de milho .

óleo ucuhuba/substrato = 1:1 (mol/mol), 10% Lipozyme e T=45°C.

Fonte: Schuch & Mukherjee, 1987.

Portanto, ficou demonstrado o grande potencial das reações de interesterificação catalisadas por lipases nas preparações de uma infinidade de acilgliceróis e ésteres de ácidos graxos que são usados como aditivos em alimentos e na agroquímica.

Também se torna possível a produção de triacilgliceróis com estrutura de ácidos graxos que não ocorrem na natureza, como por exemplo, triacilgliceróis contendo alto nível de ácido linoléico nas posições *sn* 1,3 e quase que exclusivamente ácidos graxos de cadeia média na posição *sn* 2, através da interesterificação de óleo de milho e girassol (ricos em ácido linoléico) catalisada por lipase *sn* 1,3

específica. Tais produtos têm interesse como produtos dietéticos, pois as lipases pancreáticas da maioria dos mamíferos hidrolisam rapidamente as posições *sn* 1,3, liberando o ácido linoléico que é utilizado como ácido graxo essencial pelo organismo.

2.8. Atividade da Lipozyme em função da Umidade da reação

A maior parte das enzimas atuam em sistemas aquosos onde ambos, enzima e substrato são solúveis. No caso da lipase, o substrato é insolúvel em água, e a enzima atua na interface óleo/água, que é essencial para a sua atividade. Para a Lipozyme, a interface é obtida por imobilização da água necessária junto com a enzima.

A questão da quantidade de água em meio de reações bio-orgânicas é necessária para manter a conformação tridimensional da enzima.

A água ligada à lipase é mais importante do que a água livre, pois assegura a estabilidade e a atividade da enzima. Substratos e solventes secos podem remover esta água ligada, fazendo com que a atividade enzimática diminua (YAMANE, 1988 b).

O complexo acil-enzima pode ser rapidamente hidrolizado pela água, pois é uma molécula pequena e com grande mobilidade, favorecendo, dessa forma, a reação de hidrólise, com conseqüente aumento nas quantidade de ácidos graxos livres e diglicerídeos (LILLY & DUNNIL, 1987). Mas a questão central é determinar a concentração ótima de água no meio da reação de interesterificação. Esta depende de vários fatores, incluindo:

- tipo de lipase
- suporte de imobilização da enzima
- presença de outros compostos no suporte
- método de preparação do catalisador
- tipo e pureza dos substratos
- tipo dos solventes

O conteúdo de água determinará a concentração de equilíbrio dos ácidos graxos livres, mono, di e triglicerídeos (POSORSKE *et alii*, 1988).

A influência do conteúdo de umidade sobre a atividade BIU da Lipozyme está ilustrada na Figura 7, onde se verifica que a umidade ótima da enzima é cerca de 10% na reação de interesterificação de ácido palmítico e trioleína. Teores de 10% de enzima, em peso sobre os substratos e temperatura de 70°C são relatados (EIGTVED *et alii*, 1986).

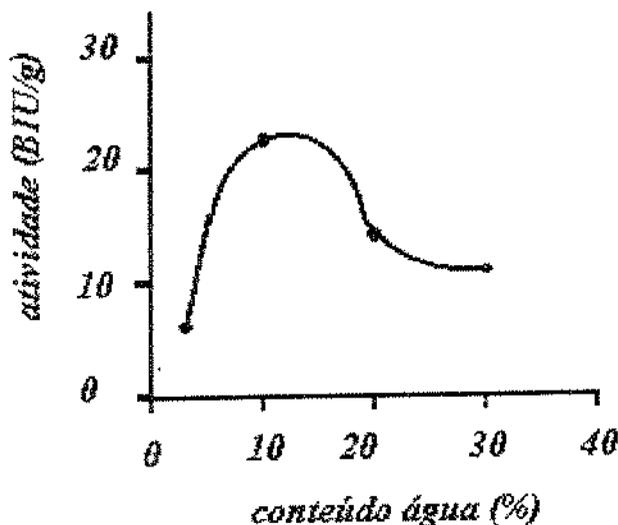


Figura 7 - Influência do conteúdo de água na atividade da Lipozyme.

ác.C16:0/trioleína = 1:1 (mol/mol), 10% Lipozyme a 25°C/12h.

Fonte: Eigtved *et alii*, 1986.

As reações de interesterificação por batelada entre o ácido oléico (10 g) e o glicerol (1,1 g), catalisadas pela Lipozyme IM-20 (0,5 g), em meio sem solvente, a 70°C, foram relatadas posteriormente por ERGAN *et alii*, 1990, que registraram umidades tão baixas como 0,01% do meio de reação, bem como vários métodos de remoção da água formada durante o processo de interesterificação ou de síntese de ésteres, incluindo:

- vácuo
- bombeamento de ar seco através do meio de reação
- adição de peneiras moleculares
- evaporação espontânea utilizando-se recipientes abertos e altas temperaturas.

BLOOMER *et alii* (1992), estudaram o efeito da umidade da Lipozyme IM-20 em função do tempo de reação de interesterificação entre etil-estearato e óleo de girassol e os níveis de ácidos graxos livres e diglicerídeos formados. A figura 8 mostra os resultados obtidos, onde se conclui que a reação realizada com a enzima seca foi mais rápida e resultou em menor formação de ácidos graxos livres e diglicerídeos, comparando-se com as reações realizadas com a Lipozyme com umidade equilibrada.

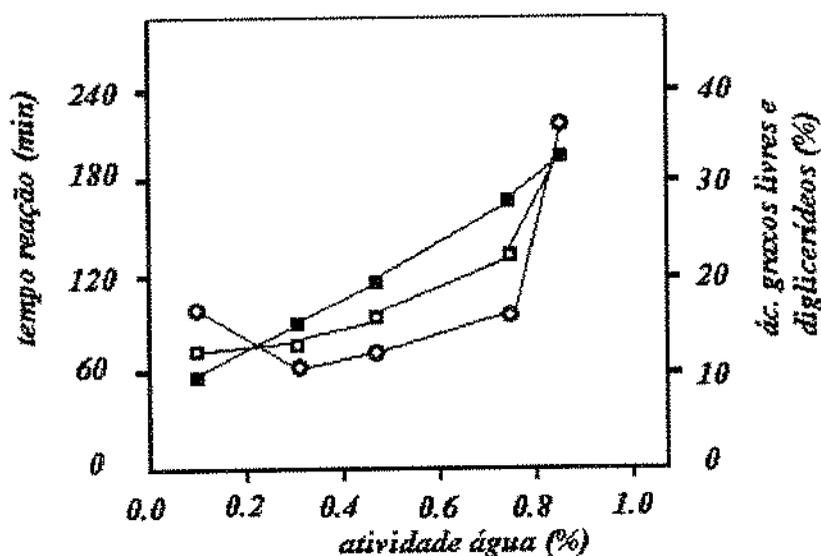


Figura 8 - Efeitos da atividade de água da Lipozyme na formação de subprodutos e no tempo de reação.

etil-estearato/óleo girassol = 2:1 (p/p), 10% Lipozyme e T=50°C.

Símbolos: ○ - tempo de reação
 □ - ácido graxos livres
 ■ - diglicerídeos

Fonte: Bloomer *et alii*, 1992

2.9. Atividade e Produtividade da Lipozyme em função da temperatura de reação

A atividade de uma lipase imobilizada, em um tipo específico de reação, é também função da temperatura, sendo uma variável importante.

A velocidade da reação de interesterificação aumenta com o aumento da temperatura, até um ponto onde começa ocorrer a inativação da enzima e sua atividade de interesterificação diminui. Portanto, a produtividade da Lipozyme depende de ambos, da atividade e da taxa de desativação da mesma. A influência da temperatura sobre a atividade BIU da Lipozyme está ilustrada na Figura 9, onde se verifica que a temperatura ótima de atuação da Lipozyme se encontra ao redor de 70°C (EIGTVED *et alii*, 1986). Na reação de interesterificação do ácido palmítico e trioleína foram usadas as seguintes condições: 10% de enzima, em peso sobre os substratos, com umidade de 10% sobre o peso da enzima.

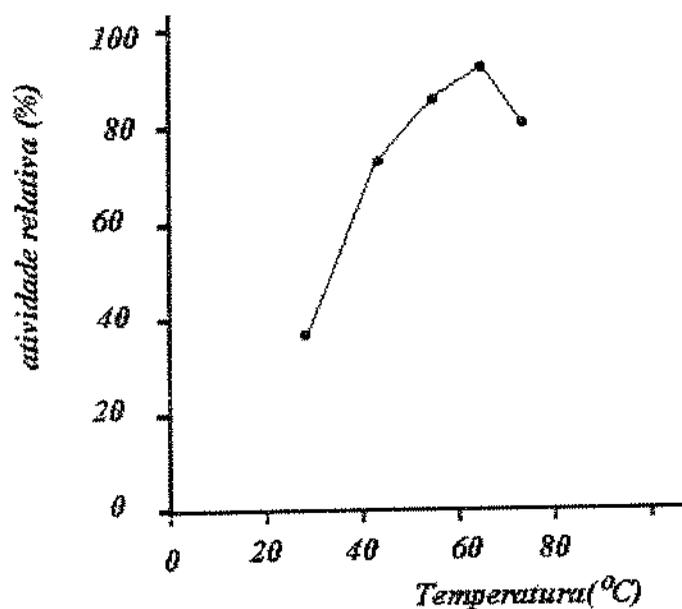


Figura 9 - Atividade da Lipozyme em função da temperatura.

ác. C16:0/trioleína = 1:1 (mol/mol), 10% Lipozyme com 10% umidade e T=70°C.

Fonte: Eigtved *et alii*, 1986.

ERGAN *et alii* (1990) observaram uma queda acentuada no tempo de reação necessário para alcançar o equilíbrio com o aumento da temperatura. Glicerol e ácido oléico, em quantidades estequiométricas foram utilizados como substratos, em meio sem solvente e na presença de 10% de Lipozyme. A síntese dos glicerídeos foi estudada a várias temperaturas (34, 50, 60, 70 e 80°C) em tubos abertos. Ficou claro que o aumento da temperatura facilita a remoção da água por evaporação favorecendo a reação de síntese de triglicerídeos. Em temperaturas de 60, 70 e 80°C o tempo necessário para se obter 86% de trioleína foi reduzido a menos de 48 horas, o que não ocorreu a 34°C, temperatura esta insuficiente para a evaporação de água gerada no meio da reação.

BLOOMER *et alii* (1992) confirmaram a redução no tempo de reação com o aumento da temperatura, mas também observaram um aumento no teor de ácidos graxos livres e diglicerídeos formados entre 30 e 70°C, como mostra a Figura 10. Na reação de interesterificação foram utilizados como substratos o etil-estearato e o óleo de girassol e a Lipozyme como catalisador.

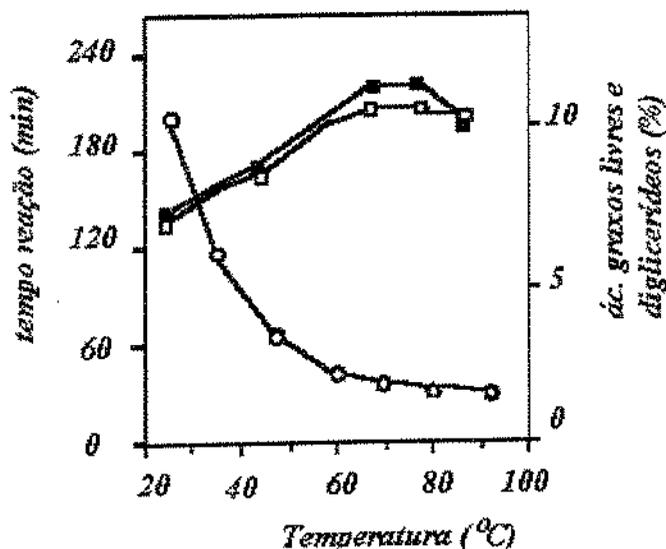


Figura 10 - Influência da temperatura no tempo de reação e na formação de subprodutos.

etil-estearato/óleo girassol = 2:1 (p/p), 10% Lipozyme com 7% de umidade.

Símbolos: ○ - tempo de reação

□ - ácidos graxos livres

■ - diglicerídeos

Fonte: Bloomer *et alii*, 1992.

2.10. Efeito da Concentração de Enzima na reação de Interesterificação

As reações de interesterificação de ácido palmítico e trioleína (2:1 em peso), a 70°C, usando a Lipozyme imobilizada com $A_w = 0,12 - 0,16$, em várias concentrações, foram estudadas por BLOOMER *et alii* (1991), concluindo que a quantidade de enzima consistiu do parâmetro mais importante para se evitar a formação de tripalmitato e reduzir a formação de diglicerídeos. A velocidade da reação aumentou com o aumento do teor de enzima. Utilizando-se níveis de 50%, a velocidade de reação é maior e finaliza-se antes da produção do tripalmitato, com formação de baixos teores de diglicerídeos.

Observações semelhantes foram feitas pelos mesmos autores em 1992, na reação de interesterificação entre etil-estearato e óleo de girassol a 50°C, como mostra a Figura 11. Neste trabalho concluiu-se que o teor ótimo de enzima é de 10% em peso sobre os substratos. O aumento do custo do processo não seria compensado com a utilização de 15% de enzima, pois se teria uma redução de apenas 15 minutos no tempo de reação.

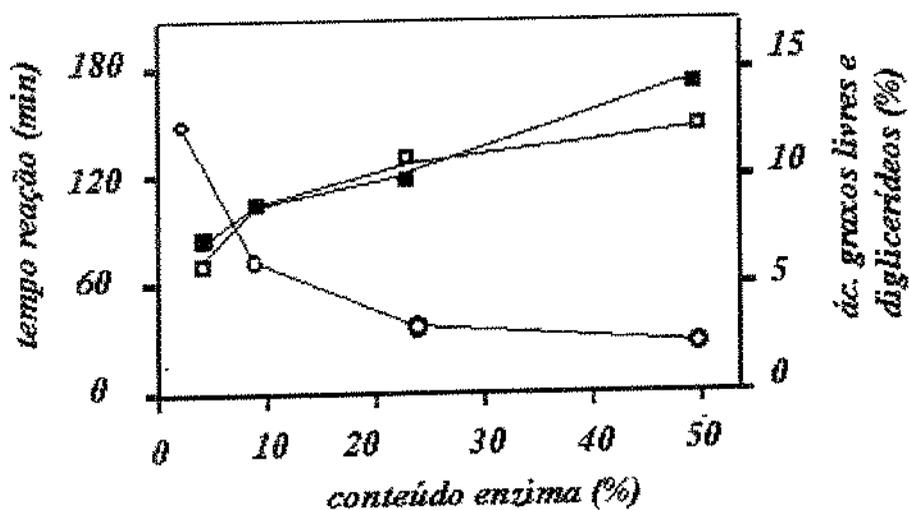


Figura 11 - Efeito da concentração de Lipozyme no tempo de reação e na formação de subprodutos.

Símbolos: ○ - tempo de reação

□ - ácidos graxos livres

■ - diglicerídeos

etil-estearato/óleo girassol = 2:1 (p/p), T=50°C e enzima com 7% de umidade.

Fonte: Bloomer *et alii*, 1992.

2.11. Efeito da Concentração do Solvente na reação de Interesterificação

O uso de um solvente acrescenta custo e complica o processo, exigindo um sistema mais caro pois este deve ser fechado. Entretanto, apresenta a vantagem da reação de interesterificação poder ser realizada a temperaturas mais baixas, pois diminui a viscosidade dos substratos e viabiliza as reações contínuas onde os substratos são bombeados através de um leito fixo de enzima imobilizada.

O uso de sistemas sem solvente na interesterificação foi sugerido por HANSEN & EIGTVED (1986), que encontraram taxas de reação satisfatórias. Mas a temperatura foi aumentada para 60°C para diminuir a viscosidade da mistura de reação a níveis aceitáveis e solubilidade dos substratos.

ISON *et alii* (1988) estudaram o efeito do solvente (éter de petróleo) em reações de interesterificação por batelada e por processo contínuo, utilizando óleo de oliva e ácido láurico ou octanóico ou decanóico como substratos. A lipase usada foi a do *Mucor miehei*. Os autores concluíram que a quantidade de solvente usada não teve efeito sobre a reação de interesterificação por batelada apesar do aumento da viscosidade do meio quando não se utilizou solvente. Deste trabalho conclui-se que a viscosidade do meio não interfere na reação de interesterificação por batelada. Já no processo contínuo, houve um decréscimo na velocidade de reação com o aumento da concentração dos substratos, ou seja, reduzindo-se a quantidade de solvente do meio. Os melhores resultados foram obtidos usando-se baixos teores de solvente. Concluiu-se que para esse tipo de processo a viscosidade do meio é muito importante devido à necessidade de bombeamento.

BLOOMER *et alii* (1990) verificaram a influência da concentração de solventes na velocidade da reação de interesterificação, por processo contínuo, visando como substratos a fração média do óleo de palma e etil-estearato sendo a Lipozyme usada como catalisador. A Figura 12 mostra que a 40°C obteve-se a maior taxa de interesterificação utilizando-se níveis de solvente (n-heptano) entre 1-1,5 g/g de substrato. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos a 60°C. A esta temperatura os substratos são fluídos e a taxa de interesterificação é maior do que a 40°C. Observa-se igualmente a formação de glicerídeos trisaturados em menores teores quando se usa sistema sem solventes (Figura 13).

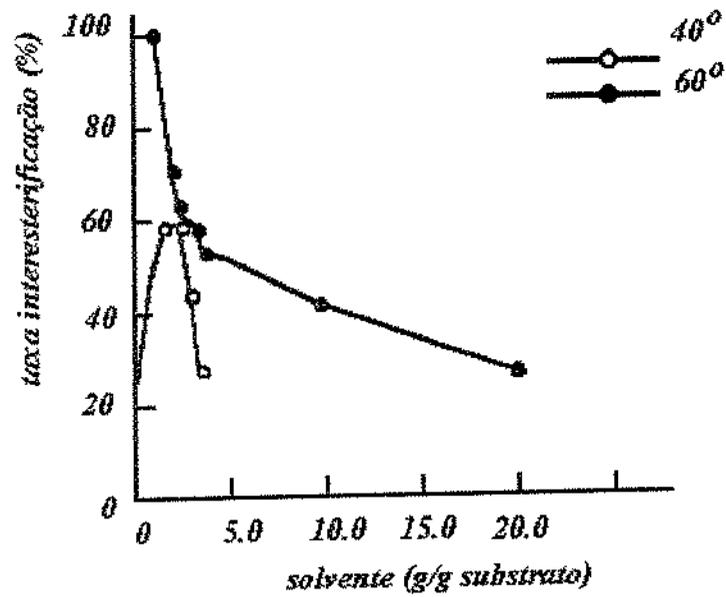


Figura 12 - Efeito da concentração de solvente na taxa de interesterificação.

etil-estearato / POMF = 2:1 (p/p), T = 40 e 60°C, 10% Lipozyme, t=75 minutos e solvente n-heptano saturado com água.

Fonte: Bloomer *et alii*, 1990.

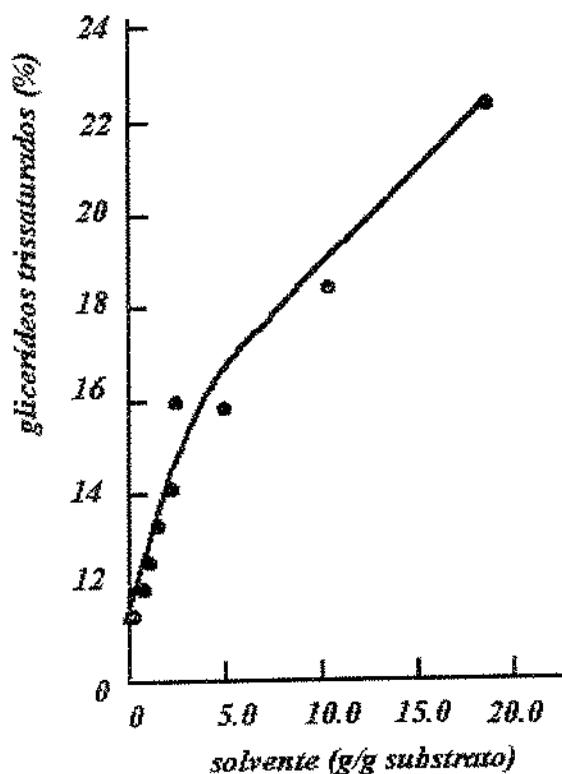


Figura 13 - Efeito da concentração de solvente na formação de triglicerídeos saturados.

- as mesmas condições de reação da Figura 12.

Fonte: Bloomer *et alii*, 1990.

2.12. Efeito da razão da concentração dos substratos na reação de interesterificação

Na síntese de triglicerídeos a partir de ácido oléico e glicerol, a máxima formação de trioleína, no equilíbrio da reação, catalisada pela Lipozyme (10% em peso sobre os substratos), a 60°C, ocorre com quantidades estequiométricas dos substratos. Os teores de mono e diglicerídeos aumentam significativamente com a adição de glicerol (ERGAN *et alii*, 1990).

O efeito da variação da razão ácido palmítico/trioleína foi estudado por BLOOMER *et alii*, 1991 para obtenção de equivalentes de manteiga de cacau. Estes autores concluíram que longos tempos de reações, catalisada pela Lipozyme (10% em peso sobre os substratos a 60°C) são

necessários quando se utilizam razões molares baixas de ácido/triglicerídeo. Acima da razão molar 3,45 o conteúdo de diglicerídeos é constante. Assim sendo, o ácido palmítico foi considerado um excelente acil-doador na reação de interesterificação, pois o tempo de reação diminuiu com o aumento do seu teor em relação ao triglicerídeo.

Os mesmos autores, em 1992, verificaram o efeito da razão molar dos substratos (etil-estearato/óleo de girassol) na reação de interesterificação catalisada pela Lipozyme. O tempo de reação diminuiu e a formação de diglicerídeos aumentou com o aumento da razão molar dos substratos. Entre as razões molares de 0,4 a 0,66 não se conseguiu chegar ao final da reação após 6 horas.

2.13. Produção de Gorduras Especiais

A produção mundial de manteiga de cacau está em torno de 800.000 toneladas por ano, e devido ao seu alto preço, os substitutos e equivalentes dessa matéria-prima tão importante nas indústrias de achocolatados e de produtos de confeitaria, vêm sendo estudados e utilizados com o objetivo de redução nos custos dos produtos finais. O mercado potencial para tais produtos equivalentes é cerca de 10% da produção da manteiga de cacau (RATLEDGE, 1987).

A manteiga de cacau é uma gordura natural que constitui aproximadamente 50 - 55% dos 'nibs' secos do cacau. Apesar das suas propriedades únicas de sabor e derretimento na elaboração de alguns produtos, a manteiga de cacau apresenta, além do seu alto custo, algumas limitações de uso, que são superadas com a utilização de gorduras especiais, em misturas com a mesma ou em sua total substituição (SOON, 1991), que são:

- Efeitos indesejáveis nas suas propriedades físicas causadas por variações de temperatura. Talvez, devido a esse fato, a manteiga de cacau de diferentes origens geográficas tem diferentes graus de dureza e diferentes pontos de fusão. Para se obter uma padronização adequada de consistência, é necessário que se proceda a uma mistura de vários tipos de manteiga de cacau (SHUKLA *et alii*, 1985).

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de manteiga de cacau de diferentes procedências com suas respectivas composições triglicéridicas.

Tabela 3: Composição dos triglicerídeos principais da manteiga de cacau de diferentes origens.

MANTEIGA CACAU	TEOR % (p/p)		
	POP	POS	SOS
Malásia	15,1	40,3	29,4
Nigéria	16,1	40,1	26,8
Brasil	14,4	34,5	22,6
Amostra A ¹	15,0	36,0	24,1
Amostra B ¹	18,2	39,5	24,5

1- não descritos no artigo.

Fonte: Shukla *et alii*, 1985

● Sendo a manteiga de cacau uma gordura vegetal, todas as substâncias lipossolúveis indesejáveis como: ácidos graxos livres, pesticidas, substâncias que alteram seu sabor, ácido láctico, ácido acético e outros, farão parte da sua composição, alterando seu sabor e contaminando o produto final.

● A manteiga de cacau é uma gordura de natureza polimórfica, com diferentes características físicas. Devido a isso, na produção de chocolates é necessário que se proceda a uma têmpera cuidadosa, mas demorada, a fim de que se obtenha uma cristalização da gordura na sua forma mais estável (β).

● A manteiga de cacau tem uma tolerância limitada à gordura láctea. Chocolates com alto teor de leite na sua formulação somente podem ser produzidos com gorduras especiais.

● As gorduras especiais podem ser produzidas para serem duras, de média consistência ou macias, dependendo do tipo do produto final a que se destina. Já a manteiga de cacau tem aplicações limitadas para corte e extrusão, por exemplo, devido à sua consistência.

A tecnologia de produção de gorduras especiais vem há muito tempo sendo desenvolvida e mantida em segredo. O maior desenvolvimento dessa tecnologia se restringe principalmente à fabricação dos substitutos láuricos da manteiga de cacau.

As gorduras especiais podem ser divididas em três classes, a seguir (SOON, 1991):

● CBS (SUBSTITUTOS DA MANTEIGA DE CACAU)

São gorduras especiais Láuricas, ricas em C36 (LLL), C38 (LLM) e C40 (LMM), obtidas por fracionamento ou enriquecimento de outras gorduras, como a de palma. Podem ser utilizadas até 100% em substituição à manteiga de cacau, mas não admitem misturas com a mesma. O limite máximo de mistura, sem alterar as propriedades reológicas da manteiga de cacau no chocolate, é de no máximo 4%.

● CBE (EQUIVALENTES DA MANTEIGA DE CACAU)

São gorduras especiais Não-Láuricas, compostas por isômeros *cis*, ricas em triglicerídeos monoinsaturados (SUS) e podem ser obtidas naturalmente na natureza (gorduras do Borneo Illipe e Kokum) e gorduras enriquecidas ou obtidas por fracionamento de outras gorduras, como por exemplo: gordura de Palma, Shea e Sal, que são ricas em POP, POS, SOS, SOAr e ArOAr. Podem ser utilizadas em misturas com a manteiga de cacau, sem limites de proporção e sem alterar suas propriedades físicas na fabricação de chocolate. São gorduras totalmente compatíveis com a manteiga de cacau.

● CBX (EXTENSORES DA MANTEIGA DE CACAU)

São gorduras especiais Não-Láuricas, compostas por isômeros *cis* e *trans*, derivadas do ácido eláidico (C18:1 *trans*), obtidas por hidrogenação e subsequente fracionamento. São parcialmente compatíveis, em misturas, com a manteiga de cacau (isômeros *cis*). A proporção é de 5 a 20% de utilização, sem afetar as propriedades reológicas da manteiga no chocolate.

As gorduras especiais ricas em triglicerídeos monoinsaturados podem ser incorporadas à manteiga de cacau com a finalidade de reduzir a exudação de gordura e aumentar sua consistência.

As gorduras especiais extensoras são aplicadas em misturas com a manteiga de cacau com a finalidade de modificar sua consistência, crocância, brilho e lhe conferir um grau de plasticidade.

A gordura CBS derivada da família do ácido láurico é um substituto total da manteiga de cacau. A Estearina do Óleo da Polpa da Palma fracionada é a matéria-prima geralmente utilizada na produção dessas gorduras especiais. Após o fracionamento, geralmente com acetona, ocorre a hidrogenação até um índice de iodo menor que 1,0. As Estearinas de Coco e de Babaçu fracionadas e posteriormente hidrogenadas, são outra fonte de CBS, mas com qualidades inferiores à CBS da estearina da palma, devido a esta última conter principalmente dois triglicerídeos, com números de carbono C36 e C38 e por outro lado, serem as estearinas do coco e do babaçu serem compostas por um leque maior de triglicerídeos, com números de carbono de C32 a C40. Essa é a razão pela qual a estearina do coco e do babaçu são muito macias, isto é, apresentam um baixo conteúdo de sólidos (SFC) e por conseguinte, não resistem às altas temperaturas dos meses de verão (SOON, 1991).

O abastecimento irregular de fontes de óleos de boa qualidade, ricos nos triglicerídeos POS e SOS, é um dos mais importantes fatores que geraram o desenvolvimento da Biotecnologia para modificar outras gorduras/óleos naturais e transformá-los em fontes desses triglicerídeos essenciais na produção de gorduras especiais (CBE). Nas reações de interesterificação de glicerídeos, realizadas com este objetivo, o final da reação não se dá ao alcançar o seu equilíbrio, mas sim quando se obtém uma composição triglicerídica desejada pré-estabelecida.

TANAKA *et alii* (1981) estudaram os efeitos da adição de tampão ao meio da reação de interesterificação de óleo de oliva (10 g) com ácido esteárico (10 g) catalisada pela lipase do *Rhizopus delimar* (40 g) e hexano como solvente, a 30°C e 3 dias de incubação sob agitação. Verificaram que com o decréscimo da quantidade do tampão e com a adição de hexano (20 g), a incorporação de ácido esteárico nos triglicerídeos do óleo de oliva foi mais eficiente.

MACRAE (1983) estudou a composição triglicerídica do produto obtido por interesterificação da Fração Intermediária do Óleo de Palma - POMF (240 g) com ácido esteárico (120 g), a 40°C, por 16 horas, usando éter de petróleo (550 g) como solvente e a lipase do *Aspergillus niger* como catalisador da reação. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Triglicerídeos formados na reação de interesterificação de POMF com ácido esteárico

		% NOS TRIGLICERÍDEOS	
		POMF	PRODUTO INTERESTERIFICADO
ÁCIDOS GRAXOS	C14:0	0,70	0,70
	C16:0	57,0	37,0
	C18:0	6,0	28,9
	C18:1	31,8	30,2
	C18:2	3,60	3,50
	C20:0	0,20	0,20
TRIGLICERÍDEOS	SSS	5	13
	POP	58	19
	POS	13	32
	SOS	2	13
	SSO	7	2
	SLnS	9	7
	SOO	4	11
	OUTROS	2	3

Fonte: Macrae, 1983

Houve um aumento indesejável de 8% nos triglicerídeos saturados (SSS) e de 7% em SOO. O importante é observar que houve incorporação de ácido esteárico (C18:0), aumentando seu teor de 6,0 para 28,9%, com conseqüente redução do ácido palmítico (C16:0) de 57 para 37% e que o perfil triglicéridico da POMF foi modificado de forma a se obter maior teor dos triglicerídeos desejados, principais componentes da manteiga de cacau (POS, SOS) e conseqüente, mas desejável, redução no teor de POP.

Com a descoberta das lipases *sn* 1,3 específicas e partindo-se de gorduras vegetais baratas, com características apropriadas, vários métodos foram e continuam sendo desenvolvidos com a finalidade de se obter produtos equivalentes à manteiga de cacau (BLOOMER *et alii*, 1990, 1991, 1992; CHONG *et alii*, 1992).

BLOOMER *et alii* (1990) estudaram 12 preparações de lipases comerciais com o objetivo de verificar as performances como catalisadores nas reações de interesterificação da POMF com etil-estearato na formação de equivalentes da manteiga de cacau, sendo que cinco lipases se mostraram adequadas. A quantidade ótima de enzima na reação de interesterificação foi de 10% (em peso sobre os substratos). Observaram que a 60°C o aumento na quantidade do solvente no meio de reação faz com que aumente os níveis de triglicerídeos saturados, o que não é de interesse.

Ficou demonstrado que a escolha do suporte usado na imobilização das lipases e a forma do substrato (esterificado ou ácido graxo livre), afetaram significativamente a atividade catalítica das enzimas. A taxa de atividade de interesterificação foi determinada pelo percentual de incorporação de estearato nos triglicerídeos monoinsaturados do produto, definida pela fórmula:

$$\% \text{ Incorporação} = \frac{\% \text{POS} + 2 \times \% \text{SOS}}{2(\% \text{POP} + \% \text{POS} + \% \text{SOS})} \times 100$$

BLOOMER (1990) verificou o tempo necessário na formação de equivalente da manteiga de cacau estudando o tempo de incorporação de estearato nos triglicerídeos da POMF (1 parte, em peso) com etil-estearato (2 partes, em peso), usando a Lipozyme como catalisador e T=80°C. Chegou-se à conclusão que foram necessários aproximadamente 37 minutos de reação para se obter 57% de incorporação de estearato. Também foram estudadas variações nas condições de reação, com as seguintes conclusões:

- 75°C foi a temperatura onde ocorreu maior incorporação de estearato.

- Lipozyme é a lipase com maior capacidade catalítica, quando comparada com outras duas lipases e menos dependente do conteúdo de água no meio de reação. A capacidade de interesterificação da Lipozyme praticamente não foi alterada quando se utilizou a enzima com umidade tão baixa quanto 0,15%.

- Na razão em peso dos substratos (etil-estearato / POMF) de 1,4, obteve-se um tempo de reação de 72 minutos e formação de 14% de triglicerídeos saturados. Na razão de 2,0, o tempo de reação foi de 93 minutos e 11% de trissaturados foram formados.

- Outros substratos foram analisados: POMF, óleo de girassol e trioleína foram interesterificados com etil-estearato e trioleína também interesterificada com etil-palmitato. O tempo necessário para alcançar o final da reação variou muito pouco em todos os casos. A formação de triglicerídeos saturados teve pequenas diferenças.

- Foi observada redução significativa no tempo de reação em função do aumento do teor de Lipozyme utilizada, variando de 290 minutos com 5% de enzima até 40 minutos com 20% de enzima.

- Foi utilizada uma coluna empacotada com Lipozyme para estudar o tempo de reação necessário para esterificar POMF com etil-estearato (1 : 1, em peso), a 40°C e usando n-hexano como solvente. O fluxo de substratos adotado foi de 6 ml/h. O tempo de residência dos substratos na coluna foi estimado em 12 minutos. A incorporação de estearato não se alterou, aproximadamente 25%, por 5 dias. Portanto, não apresentando bons resultados.

CHANG *et alii* (1990) prepararam equivalentes da manteiga de cacau a partir de óleo de algodão completamente hidrogenado (fonte de ácido esteárico) e óleo de oliva (1:1 em peso), por interesterificação catalisada pela Lipozyme. O tempo ótimo de reação para produzir o maior componente da manteiga de cacau, 1(3)-palmitoil-3(1)-estearoil-2-monooleína (POS) foi de 4 horas. O produto interesterificado foi isolado da mistura de reação por duas etapas de filtração, a 4 e 25°C. O rendimento obtido foi de 19%, em peso, com relação aos óleos originais. O produto foi analisado por CLAE em fase reversa, que demonstrou o seu conteúdo em componentes triglicerídeos similares aos da manteiga de cacau, mas com um nível mais elevado em diglicerídeos (Figura 14).

O ponto de fusão do produto obtido determinado por DSC (Diferencial Scanning Calorimetry = Calorimetria Diferencial de Varredura) foi de 39°C, que pode ser comparado com o da manteiga de cacau (36°C). Este aumento no ponto de fusão pode ser explicado pelo maior teor em triglicerídeos SOS.

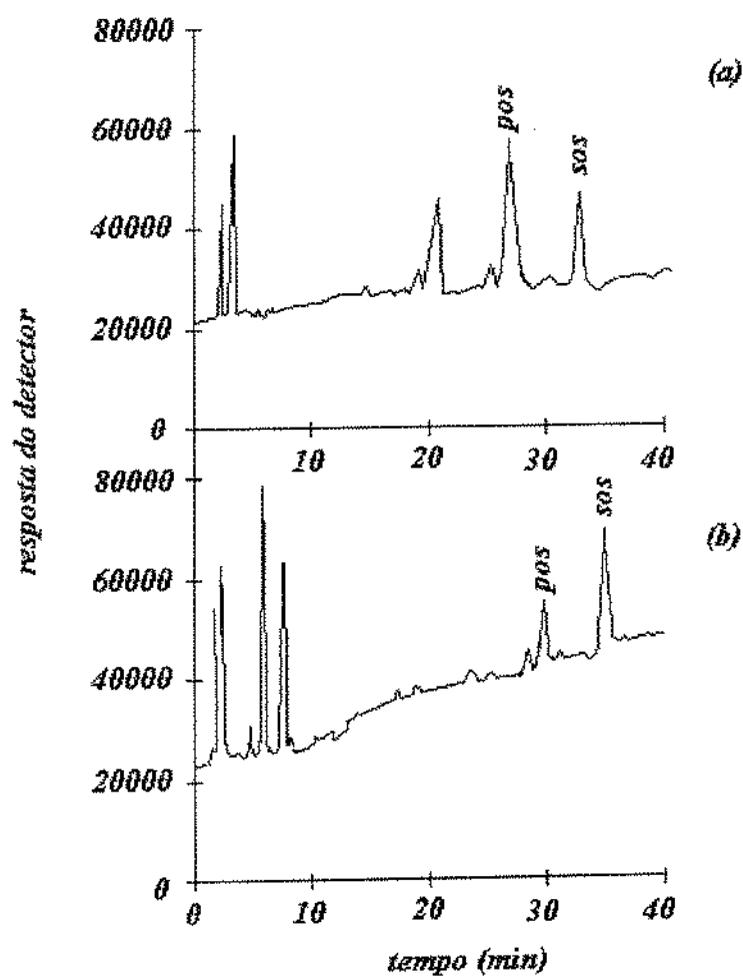


Figura 14 - CLAE da manteiga de cacau (a) e do produto interesterificado (b).

óleo algodão hidrogenado/óleo oliva = 1:1 (p/p), T=70°C e 10% Lipozyme.

(b) triglicerídeo interesterificado obtido por filtração a 4 e 25°C.

Fonte: Chang *et alii*, 1990

Devido à sua composição em ácidos graxos, gorduras semi-sólidas de plantas originárias da Índia (sal, kokum, mahua, dhupa e mango) foram utilizadas em reações de interesterificação com palmitato e/ou estearato, na proporção em peso 2:1 (palmitato/gordura), catalisadas pela Lipozyme, com o objetivo de se obter produtos semelhantes à manteiga de cacau. Exceto no caso da Kokum, além da adição de palmitato, seria necessária a incorporação de estearato nos outros tipos de gordura. Os triglicérides equivalentes da manteiga de cacau foram isolados por fracionamento em etanol a 4 e 25°C. A Figura 15 mostra a curva de derretimento do produto obtido da interesterificação da gordura do kokum e da manteiga de cacau. As outras gorduras não têm composição triglicéridica adequada para transformação em equivalentes da manteiga de cacau (SRIDHAR *et alii*, 1991).

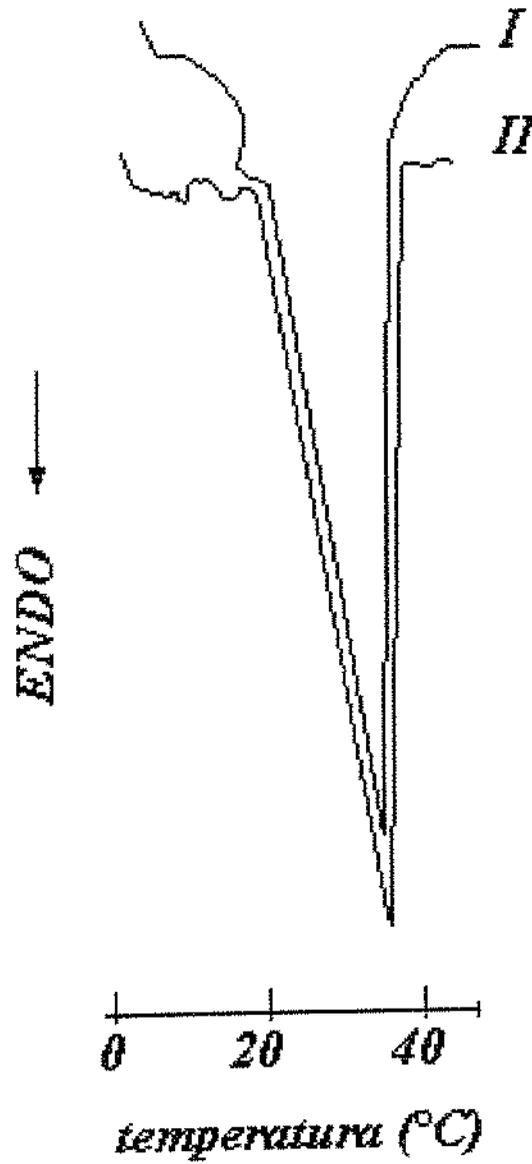


Figura 15 - Curvas de derretimento de I. gordura do kokum interesterificado e II. manteiga de cacau.

palmitato/gordura = 2:1 (p/p), T=60°C e 6% Lipozyme.

I = triglicerídeo interesterificado e fracionado com etanol a 4 e 25°C.

Fonte: Sridhar *et alii*, 1991

CHONG *et alii* (1992) desenvolveram procedimentos de fracionamento para purificação dos equivalentes da manteiga de cacau obtidos a partir da interesterificação da oleína de palma com ácido esteárico catalisada pela Lipozyme. A incorporação de estearoil na oleína de palma formou 39,3% de triglicerídeos desejáveis, equivalentes aos da manteiga de cacau (**POP, POS e SOS**).

Uma combinação de etapas de fracionamento envolvendo inicialmente a remoção dos ácidos graxos livres da mistura, por destilação por arraste de vapor sob vácuo, seguida por cristalização fracionada dos glicerídeos em hexano e/ou acetona, forneceram frações de gorduras cuja composição de triglicerídeos foi analisada por CLAE e o comportamento térmico analisado por DSC. A análise por CLAE mostra que a fração F2(A) pode ser comparada com a manteiga de cacau (Figura 16) e a análise por DSC (Figura 17) ilustra o comportamento térmico das frações F2(A), F2 (B) e F2(C), também equiparáveis à manteiga de cacau quanto ao derretimento. Estas frações foram obtidas por cristalização em hexano (1:10 p/v), hexano (1:5 p/v) e acetona (1:10 p/v).

Portanto, a oleína de palma se mostrou como uma fonte de triglicerídeos para serem transformados enzimaticamente em equivalentes da manteiga de cacau, e após três fracionamentos seletivos, obteve-se um rendimento de aproximadamente 25% de triglicerídeos desejados, sobre o peso do óleo original.

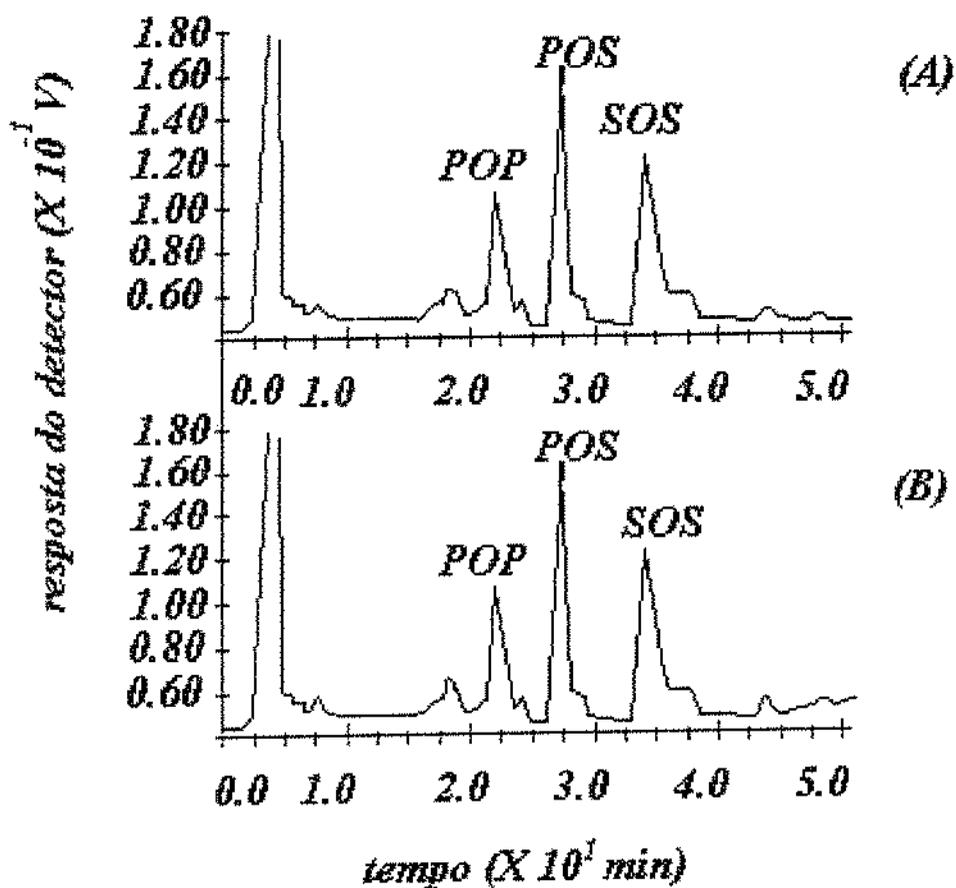


Figura 16 - CLAE dos triglicerídeos do equivalente da manteiga de cacau F2(A) da oleína de palma (A) e da manteiga de cacau - (B).

oleína de palma/ác. C18:0 = 2:1 (p/p) T=60°C, 10% Lipozyme, água (1% v/p do óleo) e t=20 h.

(A) triglicerídeo interesterificado obtido e fracionado com hexano (1:10 p/v).

(B) triglicerídeos da manteiga de cacau.

Fonte: Chong *et alii*, 1992.

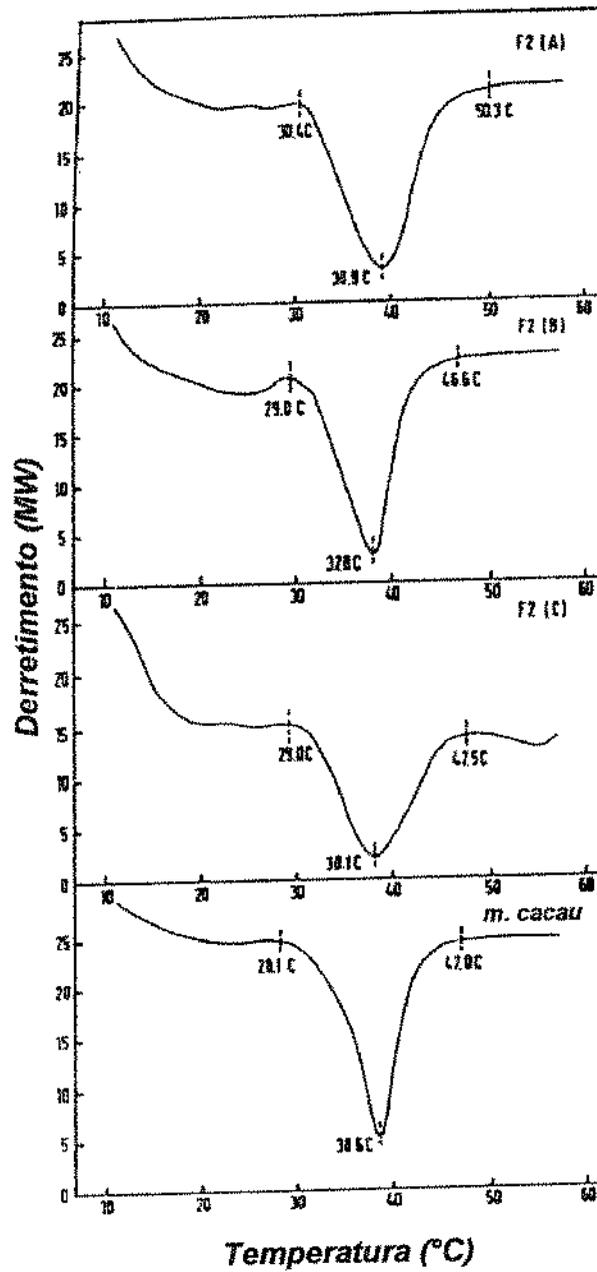


Figura 17 - DSC dos equivalentes da manteiga de cacau F2(A), F2(B) e F2(C) e da manteiga de cacau.

- as mesmas condições de reação da Figura 16.

fracionamentos com hexana e acetona.

Fonte: Chong *et alii*, 1992.

BLOOMER *et alii* (1992) estudaram em escala piloto (2.000 g de óleo inicial) as melhores condições da reação de interesterificação catalisada pela Lipozyme entre o óleo de girassol e o etil estearato para se obter a incorporação de estearato igual à obtida na fração média do óleo de palma, com a finalidade de produzir equivalente da manteiga de cacau. Não houve formação de triglicerídeos saturados nas reações. Os resultados obtidos foram:

- O tempo de reação diminui e o nível de ácidos graxos livre e diglicerídeos aumenta com a elevação da temperatura e com o aumento da concentração de etil-estearato.
- Aumentando-se a quantidade de enzima, reduz-se o tempo de reação mas observa-se o acréscimo nos teores de ácidos graxos livres e de diglicerídeos.
- A elevação do teor de umidade do meio de reação favorece a reação de hidrólise. A reação de interesterificação conduzida com a lipase seca é mais rápida e resulta em menor formação de ácidos graxos livres e diglicerídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias-primas

- Óleo da Polpa de Piqui: obtido do fruto da espécie *Caryocar brasiliense* camb, extraído artesanalmente com água em fervura a partir de frutos colhidos na região de Planaltina - Goiás.
- Ácido esteárico: grau bioquímico Riedel de Hâen (27403) com Ponto de Fusão = 67 - 68°C - Alemanha
- Enzima: imobilizada em resina aniônica macroporosa, uma lipase do fungo *Mucor miehei*, especificidade *sn* 1,3, comercializada pela Novo Industri A/S, sob o nome de Lipozyme TM, cedida pelo fabricante. Lote LUC 0004/10 de Janeiro de 1992 - Atividade 49 BIU/g - Copenhagen - Dinamarca. 1 BIU (*Bath Interesterification Unit*) / g = 1 μ mol de ácido palmítico incorporado na trioleína (40°C, 1 atm), por minuto.
- Manteiga de cacau: extraída a partir de frutos colhidos na região de Ubatuba-SP, da espécie *Theobroma cacao*, variedade *Forasteiro*, cedida pelo ITAL-Campinas-SP.

3.1.2. Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau P.A. e de diferentes procedências: Merck, Ecibra, Sigma, Fluka, Riedel de Hâen e Nu-Chek.

3.1.3. Instrumental

Além dos utensílios e vidraria normalmente utilizados em laboratório, os seguintes equipamentos foram utilizados para a realização do trabalho:

- Cromatógrafo gasoso, modelo Sigma 3B, Perkin-Elmer, com detector de Ionização de Chama (FID), acoplado a integrador Perkin-Elmer, modelo LCI-100.
- Cromatógrafo Líquido, modelo Series 10, Perkin-Elmer, com detector de Índice de Refração Sicon Analytic, acoplado a integrador Perkin-Elmer, modelo LCI-100.
- Cabine UV para leitura de placas fluorescentes dotada de lâmpada Fluotest, Hanau, Heraeus (254 a 365 nm).
- Banho termostaticado IKA Werk, modelo HBR-250, com agitação e acoplado a termômetro de contato (precisão 0,1°C).
- Estufa marca Memmert, modelo UL 40, com ventilação a ar.
- Evaporador rotativo Buchi.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração dos Lipídios

Os frutos maduros do piqui foram colhidos no cerrado de Planaltina - Goiás e logo após a colheita, submetidos ao seguinte processo de extração, na unidade da Embrapa do local.

- Descascamento - para a remoção dos ovários do fruto, geralmente em número de quatro nesta variedade.
- Despoldamento - manual, para a separação da polpa do caroço.
- Trituração da polpa - realizada em liquidificador, utilizando-se 100% de água em peso.
- Extração do óleo - empregou-se o método artesanal utilizado pelos usuários na região de coleta dos frutos. Submeteu-se a polpa a um cozimento intensivo com água e separou-se o óleo sobrenadante. Em seguida, secou-se o produto em recipiente metálico sobre uma chapa quente até que o mesmo perdesse a opacidade causada pela umidade. Finalmente, o

óleo obtido foi filtrado em papel de filtro. Os caroços obtidos após a separação da polpa foram descartados.

Para a obtenção de uma amostra homogênea de óleo de piqui, após a extração, procedeu-se à mistura dos óleos obtidos e o óleo final homogeneizado foi conservado em geladeira, após o acondicionamento em vários frascos de 20 mL, envoltos em papel alumínio.

A cada série de experimentos, um frasco era retirado da geladeira e deixado à temperatura ambiente por 2 horas, tempo suficiente para liquefação do produto. Tomou-se o cuidado de não utilizar o produto do mesmo frasco por mais de cinco vezes.

3.2.2. Caracterização e Composição do Óleo bruto de Piqui

Na caracterização da polpa e no estudo da composição do óleo de piqui, foram realizadas determinações utilizando-se os seguintes métodos analíticos:

A. Porcentagem de Lipídios

Foi determinada pelo método oficial AOCS Ac 3-44 (1993), com solvente hexano por 12 horas.

B. Teor de Umidade

Foi utilizado neste trabalho o método oficial AOCS Ca 2c-25 (1993)

C. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres

Foi determinado pelo método oficial AOCS Ca 5a-40 (1993). O resultado expresso em ácido oléico tomando-se como fator 282 para o cálculo.

D. Índice de Iodo (Wijs)

Foi utilizado o método oficial AOCS Cd 1b-87 (1993)

E. Índice de Saponificação

Foi determinado pelo método oficial AOCS Cd 3-25 (1993)

F. *Índice de Peróxido*

Utilizou-se o método oficial AOCS Cd 8-53 (1993)

G. *Composição em Ácidos Graxos*

Para esta determinação seguiu-se o método oficial AOCS Ce 1-62 (1993), por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos. As condições adotadas foram:

- Coluna de aço inoxidável com 1/8" de diâmetro externo e 4 m de comprimento, empacotada com 10% de Silar 10 C em Chromosorb W-HP (100-120 mesh).
- Fluxo de Nitrogênio (gás de arraste) de 25 mL/min.
- Temperatura do injetor = 225°C
- Temperatura da coluna = 175°C
- Temperatura do detector = 225°C

Os ésteres metílicos foram preparados segundo HARTMAN & LAGO (1973). Injetou-se no cromatógrafo de 1 a 3 µL de ésteres metílicos em hexano.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção dos componentes da amostra com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Standard *Nu-Chek*). A quantificação foi efetuada por normalização de áreas, obtendo-se a porcentagem de cada componente pela razão da área individual e área total dos picos, calculadas pelo Integrador.

H. *Composição Triglicéridica*

Foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema de fase reversa, com detector de índice de refração, empregando-se as seguintes condições (DEFFENSE, 1984):

- Coluna: Lichrosorb RP-18 (5 µm) - 25 cm, Merck.
- Fase móvel: acetona : acetonitrila (62:38, v:v).
- Fluxo: 1 mL/min.

Os solventes empregados nesta análise foram todos grau CLAE e sofreram processo de degaseificação através de ultra-som e filtração em membrana Alltech (nylon, 47 mm, 0,2 micron, 100/PK) antes do uso. As amostras de óleo foram dissolvidas em acetona e injetadas no cromatógrafo equipado com "loop" de 20 µL.

Para a identificação dos triglicerídeos foram utilizados padrões individuais e misturas padrão (Fluka e Sigma) para se obter os tempos de retenção. A ordem de eluição dos triglicerídeos foi determinada por comparação com cromatograma CLAE do óleo de palma (DEFENSE, 1984) e análises de misturas do óleo de piqui com padrões individuais.

Nas reações de interesterificação seguiu-se procedimento conforme descrito posteriormente no item 3.3.4.

3.2.3. Composição da Manteiga de Cacau

Foram realizadas duas determinações na amostra de manteiga de cacau, utilizando-se a metodologia citada anteriormente:

A. *Composição em ácidos graxos (CG), conforme item 3.2.2 G*

B. *Composição triglicéridica (CLAE), conforme item 3.2.2 H*

3.2.4. Determinação de Umidade e Acondicionamento da Enzima

A. *Teor de umidade*

Foi determinado pelo método oficial AOCS Ca 2c - 25 (1993)

B. *Acondicionamento*

A enzima utilizada foi acondicionada em embalagem de alumínio e conservada em geladeira. A cada dois dias, uma amostra de peso estimado ao uso era retirada da geladeira e transferida para dessecador contendo sílica, assim, se dispunha sempre de Lipozyme com sua umidade original. O produto residual não utilizado era descartado.

O acondicionamento da enzima a 10% de umidade foi efetuado seguindo-se metodologia oficial (ASTM E 104-85, 1985). Manteve-se 15 g de Lipozyme em dessecador por 48 horas, no mínimo, contendo no seu fundo solução de ácido sulfúrico PA e água, nas proporções de 64 e 35% respectivamente. A determinação da umidade da enzima foi verificada após acondicionamento.

A enzima acondicionada a 10% de umidade foi mantida em dessecador, hermeticamente fechado. A amostra de Lipozyme era renovada a cada semana e procedia-se o seu acondicionamento.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Critério de Seleção

Baseado na composição em ácidos graxos do óleo de piqui, citada em literatura, verificou-se que com a incorporação de ácido esteárico poderia ser viável a obtenção de produto lipídico modificado com composição semelhante à da manteiga de cacau.

Após a análise do perfil triglicéridico em CLAE do óleo de piqui, verificou-se que uma interesterificação enzimática com lipase *sn* 1,3 específica seria adequada para alterar seu perfil triglicéridico na presença de ácido esteárico, fornecendo teoricamente teores diferentes de POP, POS e SOS.

A Lipozyme foi adotada como catalisador das reações de interesterificação, por ser uma lipase já avaliada em trabalhos anteriores sobre obtenção de equivalentes da manteiga de cacau, já citados na revisão bibliográfica, por ter comprovada sua especificidade e eficiência e também por estar comercialmente disponível no mercado sob a forma imobilizada.

O ácido esteárico foi escolhido por apresentar uma maior taxa de interesterificação quando comparado com seu éster (SCHUCH *et al*, 1987), por apresentar menor custo e maior disponibilidade no mercado.

O trabalho aqui desenvolvido equivale ao estudo da viabilidade em escala laboratorial de obtenção de uma mistura triglicéridica não disponível na natureza, com composição semelhante à da

manteiga de cacau brasileira, obtida através de reação de interesterificação catalisada por lipase *sn* 1,3 específica, sem reutilização da mesma.

3.3.2. Critérios de Avaliação

Para se verificar preliminarmente a eficiência da Lipozyme na incorporação de ácido esteárico nos triglicerídeos do óleo de piqui empregou-se a técnica de cromatografia gasosa.

O monitoramento das reações de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico, catalisadas pela Lipozyme, foi realizado pela determinação da composição triglicéridica, pois esta tem influência direta nas propriedades físicas de um óleo/gordura. Como POP, POS e SOS são os principais triglicerídeos presentes na manteiga de cacau, o produto interesterificado foi avaliado baseando-se nos teores destes triglicerídeos presentes na sua composição.

Para determinar o ponto final de cada reação, adotou-se a incorporação de ácido esteárico (% AEI), como método para se quantificar o ácido esteárico total nos triglicerídeos do óleo de piqui interesterificado. O final da reação foi determinado ao se chegar na %AEI = 44, que é o valor encontrado para a manteiga de cacau utilizada como padrão. Pontos acima de 44% não foram estudados.

3.3.3. Monitoramento das Reações de Interesterificação

O ácido esteárico incorporado no óleo de piqui foi determinado através da quantificação dos triglicerídeos principais presentes na manteiga de cacau (POP, POS e SOS) e calculados pela seguinte equação (BLOOMER *et alii*, 1990):

$$\% \text{ AEI} = \frac{\% \text{ POS} + 2 \times \% \text{ SOS}}{2(\% \text{ POP} + \% \text{ POS} + \% \text{ SOS})} \times 100$$

Para o monitoramento das reações de interesterificação foram utilizadas as seguintes determinações:

- A. *Composição em ácidos graxos (CG)*, conforme item 3.2.2 G
- B. *Composição triglicéridica (CLAE)*, conforme item 3.2.2 H

3.3.4. Procedimento nos Ensaios

Os experimentos foram realizados em micro escala (menor que 1 grama) onde a enzima, o óleo de pequi e o ácido esteárico foram incubados, sob agitação magnética, em tubo de ensaio aberto e imerso em banho de glicerol termostaticado a 70°C. Ao final de cada reação, o tubo de ensaio foi retirado do banho, adicionados 5 mL de hexano ao meio de reação, para evitar a solidificação do produto à temperatura ambiente. Após separação da Lipozyme por decantação, o sobrenadante foi acondicionado em frasco ambar, com tampa e estocado no freezer.

Para cada parâmetro estudado (umidade e concentração da enzima e concentração de substratos), submeteu-se à avaliação um número limitado de tubos de ensaio que se enquadrasse dentro de uma faixa de tempo suficiente para que a incorporação de ácido esteárico necessária ocorresse. Dependendo do experimento, os tempos de reação utilizados variaram de 1 a 20 horas. Para cada parâmetro se verificou a melhor faixa de estudo otimizando-a após a obtenção de resultados preliminares em intervalos maiores de tempo.

Não se utilizou solvente no meio de reação, com a finalidade de redução na temperatura, pelos seguintes motivos (BLOOMER *et alii*, 1992):

- aumentar a velocidade de reação
- reduzir a formação de mono e diglicerídeos
- utilizar sistema aberto e por batelada, que é eficiente, de mais fácil operação e mais econômico.

O emprego de 70°C como temperatura de reação é justificado por três motivos:

- Ser uma temperatura ligeiramente superior ao Ponto de Fusão do ácido esteárico (67 - 68°C), garantindo a total solubilidade do mesmo no meio de reação.
- Estar dentro da faixa de temperatura ótima de atuação da Lipozyme (LIPOZYME TM, 1985).
- Não ser necessário a retirada da água formada durante a reação, pois a esta temperatura a evaporação ocorre naturalmente, minimizando, dessa forma, a reação de hidrólise (ERGAN *et alii*, 1990).

Não se justifica realizar experimentos em regiões de temperatura diferentes da indicada pelo fabricante da enzima pois, a temperatura ótima normalmente é obtida de estudos de equação de Michaelis - Menten e da relação de Arrhenius (GACESA *et al*, 1990). No caso das enzimas, a relação de Arrhenius se mantém somente em uma faixa restrita de temperatura.

A estabilidade térmica limitada das enzimas resulta na sua inativação a elevadas temperaturas. As condições de operação devem sempre contemplar o equilíbrio entre a conveniência de uma velocidade alta com a necessidade de uma estabilidade aceitável.

Neste caso especial, o fator realmente predominante é o fato do ácido esteárico apresentar-se sólido abaixo de 67°C, limitando portanto as condições de ensaio fora desta pequena faixa de trabalho (67 a 70°C).

Ensaio preliminares para definição do tipo de sistema a ser utilizado levaram a reações de interesterificação com tempos de 1 a 20 horas. A partir dos resultados obtidos em termos de composição em ácidos graxos, verificou-se que em sistema aberto o tempo de reação para se obter aproximadamente 25% de ácido esteárico incorporado nos triglicerídeos interesterificados do óleo de piqui foi inferior a 1 hora. A escolha das condições de reação está baseada na obtenção de gorduras especiais (CBE) a partir da POMF e etil-estearato, principalmente (SRIDHAR *et alii*, 1991; BLOOMER *et alii*, 1992 e CHONG *et alii*, 1992). Utilizou-se para este ensaio 10% de Lipozyme em peso sobre os substratos com sua umidade original, razão em peso ácido esteárico / óleo piqui de 2,0 e temperatura de 70°C.

Não foi utilizado vácuo no sistema porque a Lipozyme mostrou-se eficiente em reação aberta, com tempos reduzidos.

3.3.5. Purificação de Triglicerídeos em escala laboratorial

Os produtos de reação obtidos como citado no item 3.3.4 e armazenados em freezer, foram deixados à temperatura ambiente por duas horas antes do uso. Os triglicerídeos foram separados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), em placas preparativas de 0,5 mm preparadas manualmente no laboratório, com: hexano/éter etílico/ácido acético, na proporção 70:30:1 (v/v/v). Recorreu-se ao uso do solvente Toluol para dissolver as amostras, quando estas apresentavam-se insolúveis. Por ser o óleo de piqui rico em carotenóides, a quantidade de amostra aplicada em cada

placa foi estimada baseando-se na intensidade de coloração da amostra aplicada, aproximadamente 30 - 50 mg. Utilizou-se o Fluotest (254 e 365 nm) para localização dos triglicérides e posterior recuperação (SCHUCH *et al.*, 1987). A verificação da classe de triglicérides foi constatada por comparação de R_f de padrões de mono, di e triglicérides aplicados simultaneamente. As amostras, dissolvidas em acetona, foram centrifugadas para separação da sílica e o solvente parcialmente evaporado sob corrente de nitrogênio. Na fração resultante foi determinada sua composição triglicéridica (3.3.2 H) e em ácidos graxos (3.3.2 G). Utilizou-se duas placas preparativas para cada determinação.

3.3.6. Estudo das Condições de Reação na Interesterificação do Óleo de Piqui

A. Umidade da Lipozyme

Foram testadas duas umidades:

- original da Lipozyme
- 10% de umidade

B. Concentração de Lipozyme

Foram estudadas as seguintes concentrações de Lipozyme, em peso sobre os substratos:

6% ; 8% ; 10% ; 12% e 14% .

C. Razão de Concentração dos Substratos

Foram utilizadas as seguintes concentrações dos substratos (ácido esteárico / óleo de piqui):

RAZÃO MOLAR	RAZÃO EM PESO
1,0	0,33
2,4	0,80
3,6	1,20
4,8	1,60
6,0	2,00

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados reportados neste trabalho foram obtidos através de análise de amostras em duplicata, e portanto representam um valor médio das determinações.

4.1. Caracterização das Matérias-Primas

4.1.1. Características do Óleo de Piqui

Os testes iniciais foram realizados com óleo de piqui adquiridos no comércio, na região de Montes Claros - MG. Amostras enviadas de Fortaleza, obtidas artesanalmente também foram testadas. Na caracterização em ácidos graxos detectou-se que ambas estavam adulteradas com óleo de soja. Na impossibilidade de obtenção de amostra pura do óleo de piqui, recorreu-se à colheita dos frutos na região produtora, conforme item 3.2.1.

A polpa do piqui apresentou um teor de lipídios de 63,05% (B.S.), por extração com éter de petróleo, por 12 horas.

As características físico-químicas do óleo de piqui, extraído artesanalmente e utilizado nos experimentos, estão apresentadas na Tabela 5. Neste método de extração não foi determinado o rendimento em óleo.

Tabela 5: Características físico-químicas do óleo de piqui

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	VALORES
Umidade (%)	0,065
% AGL (expresso em ác. oléico)	0,27
Índice de Peróxido (meq/1.000g amostra)	1,38
Índice de Iodo (Wijs)	50
Índice de Saponificação (mg KOH/g amostra)	201

Os resultados obtidos estão de acordo com os citados em BRASIL MIC-STI (1985) e mostram boa qualidade do óleo extraído pelo baixo valor de ácidos graxos livres e bom estado oxidativo (Índice de Peróxido baixo).

4.1.2. Características da Lipozyme

Lipozyme TM, com umidade original de 2,36% .

4.1.3. Características do Ácido Esteárico

O produto de grau P.A. foi caracterizado por cromatografia gasosa, detectando-se mistura com outros ácidos graxos (Tabela 6).

Tabela 6: Composição de ácidos graxos no ácido esteárico

ÁCIDOS GRAXOS		TEOR % (p/p)
Palmitico	(C16:0)	5,3
Palmitoléico	(C16:1)	0,9
Esteárico	(C18:0)	90,6
Oléico	(C18:1)	0,6
Linoléico	(C18:2)	0,1
Araquídico	(C20:0)	2,4

Pelos dados acima, a pureza do ácido esteárico utilizado é de 90,6%.

Peso molecular = 283,3 g/mol.

Para efeito de cálculo da razão de concentração dos substratos recorreu-se ao valor 90,6 aqui obtido, que representa a pureza real do ácido.

4.2. Composição em ácidos graxos do óleo de piqui e da manteiga de cacau.

A composição em ácidos graxos e a sua distribuição triglicéridica caracterizam e definem a utilização de um óleo ou gordura para um determinado fim.

A importância de sua determinação no óleo de piqui e na manteiga de cacau, se deve principalmente para se determinar preliminarmente, se o óleo de piqui é adequado para ser utilizado como substrato com o objetivo de se obter uma composição semelhante à da manteiga de cacau e para

se definir o tipo de ácido graxo a ser incorporado. Os resultados estão apresentados na Tabela 7, juntamente com o peso molecular obtido e dados encontrados na literatura para a manteiga de cacau e fração média do óleo de palma, utilizado para modificação lipídica na obtenção de equivalente de manteiga de cacau (BLOOMER *et alii*, 1990, 1991 e 1992).

Tabela 7: Composição em ácidos graxos do óleo de piqui, manteiga de cacau e fração média do óleo de palma (POMF)

ÁCIDO GRAXO		TEOR % (p/p)			
		ÓLEO PIQUI	CACAU	CACAU ¹	POMF ¹
Palmitico	(C16:0)	40,2	27,0	26,0	54,0
Palmitoléico	(C16:1)	1,4	0,2	0,3	--
Estearico	(C18:0)	2,3	25,3	34,4	8,0
Oléico	(C18:1)	53,9	40,4	34,8	34,0
Linoléico	(C18:2)	1,5	5,9	3,0	2,0
Linolénico	(C18:3)	0,7	0,3	0,2	--
Araquídico	(C20:0)	0,2	0,9	1,0	0,7
PESO MOLECULAR					
	(g/mol)	853,0	881,8		

1 - Padley *et alii*, 1995

Observa-se que o óleo de piqui possui apenas 9,2% do total de ácido esteárico presente na manteiga de cacau, portanto a incorporação desse ácido se faz necessária para que o seu teor, no produto interesterificado, seja elevado a níveis próximos aos encontrados na manteiga de cacau (25,3%).

Como já citado na revisão bibliográfica, a POMF é a matéria-prima mais utilizada para modificações em equivalentes da manteiga de cacau e pode-se observar, na Tabela 7 que, assim como o óleo de piqui, a POMF contém na sua composição, baixo teor de ácido esteárico e alto teor de ácido palmítico.

Encontrou-se na literatura valores diferentes para a composição em ácidos graxos principais da manteiga de cacau (PADLEY *et al*, 1995), mas optou-se por utilizar uma variedade brasileira como padrão. Assim como o café e o óleo de palma, a manteiga de cacau também tem seu preço no mercado de acordo com sua origem, pois dependendo do país, a variedade cultivada pode gerar uma manteiga de cacau com propriedades físicas diferentes e ser considerada de qualidade inferior para a confecção de determinados produtos, como por exemplo os chocolates finos. Essas variações se devem à composição em ácidos graxos e à sua distribuição triglicéridica (STEVENSON *et alii*, 1979). Verifica-se perfeitamente pela composição em ácidos graxos que neste caso temos duas variedades de manteiga de cacau bem diferentes entre si.

A Figura 18 apresenta os cromatogramas de ácidos graxos do óleo de piqui (A) e da manteiga de cacau (B).

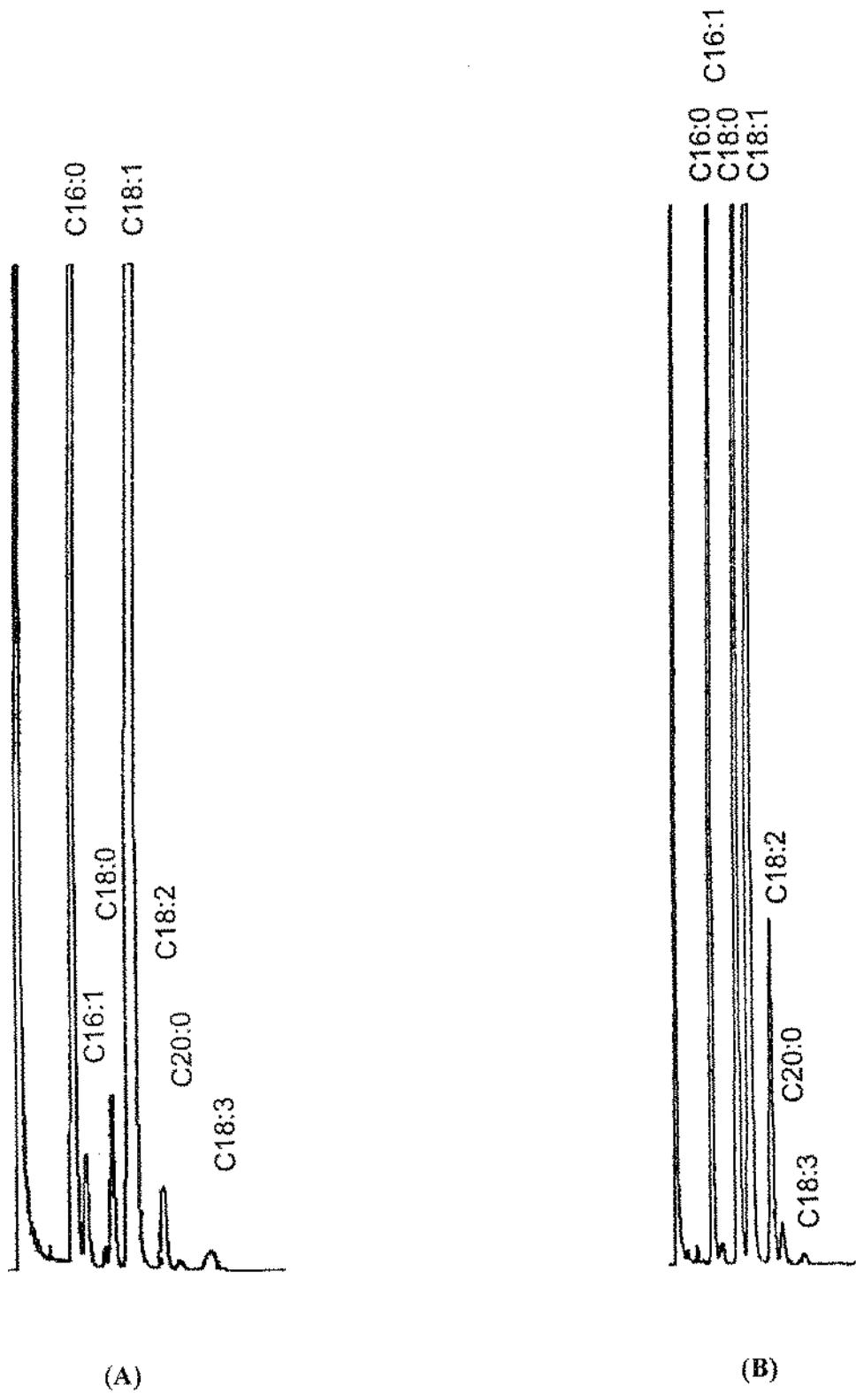


Figura 18 -Cromatograma de ácidos graxos (CG) do óleo de piqui obtido artesanalmente (A) e da manteiga de cacau da variedade *Forasteiro* (B)

4.3. Composição Triglicéridica do óleo de piqui e da manteiga de cacau

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos dos principais triglicéridos para óleo de piqui original, manteiga de cacau padrão e para efeito de comparação, os dados de composição triglicéridica da fração média do óleo de palma (POMF).

A Tabela apresenta a %AEI como citado no item 3.3.3, considerando-se os valores encontrados para os triglicéridos POP, POS e SOS. O acompanhamento das reações de interesterificação poderão ser realizados através do dado de 44% de incorporação de ácido esteárico com o objetivo de obtenção de composição triglicéridica similar à da manteiga de cacau.

Observa-se que a manteiga de cacau de procedência nacional utilizada como padrão nesta pesquisa apresenta valores de SOS e POS abaixo dos valores encontrados na literatura (Tabela 3).

Tabela 8: Composição triglicéridica do óleo de piqui, manteiga de cacau e fração média do óleo de palma (POMF).

TRIGLICERÍDEO	TEOR % (p/p)		
	ÓLEO PIQUI	MANTEIGA CACAU	POMF ¹
LOO	3,8	3,6	--
POL	2,7	3,1	1,1
OOO	5,4	3,4	2,0
POO	22,9	16,2	4,0
POP	27,6	20,3	65,0
SOO	9,1	12,3	1,2
POS	18,2	25,8	15,8
PPS	0,3	0,7	1,0
SOS	8,7	13,2	2,4
%AEI	32,6	44,0	12,4

1 - Bloomer, 1990

Por comparação da composição triglicéridica do óleo de piqui com a manteiga de cacau, observa-se que há a necessidade de aumento dos triglicéridos POS, SOS e SOO e redução dos triglicéridos POP e POO do óleo de piqui. Portanto, a incorporação do ácido esteárico deve ser nas posições 1 e/ou 3 das moléculas dos seus triglicéridos.

Uma lipase *sn* 1,3-3,1 pode levar à incorporação de ácido esteárico em reações de interesterificação nas quais esta enzima atue como catalisador.

O óleo de piqui pode ser considerado adequado como substrato, comparando o seu perfil triglicéridico com o da POMF, pois esta, é considerada adequada na interesterificação enzimática catalisada por Lipozyme na obtenção de CBE (BLOOMER *et alii*, 1990, 1991 e 1992). Ambos são ricos em POP e pobres em POS e SOS. Além desse fato, a % AEI no óleo de piqui é bem maior do que na POMF. A partir dos resultados obtidos, observamos que o óleo de piqui tem aproximadamente três vezes mais ácido esteárico incorporado em seus triglicérides (32,6%) que a POMF (12,4%).

Em se considerando que há variações na composição em ácidos graxos para manteigas de cacau de diferentes origens, conseqüentemente também serão encontradas diferenças no perfil triglicéridico, conforme mostra a Tabela 3, descritas por SHUKLA *et alii* (1985).

As Figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas de triglicérides (CLAE) do óleo de piqui e da manteiga de cacau.

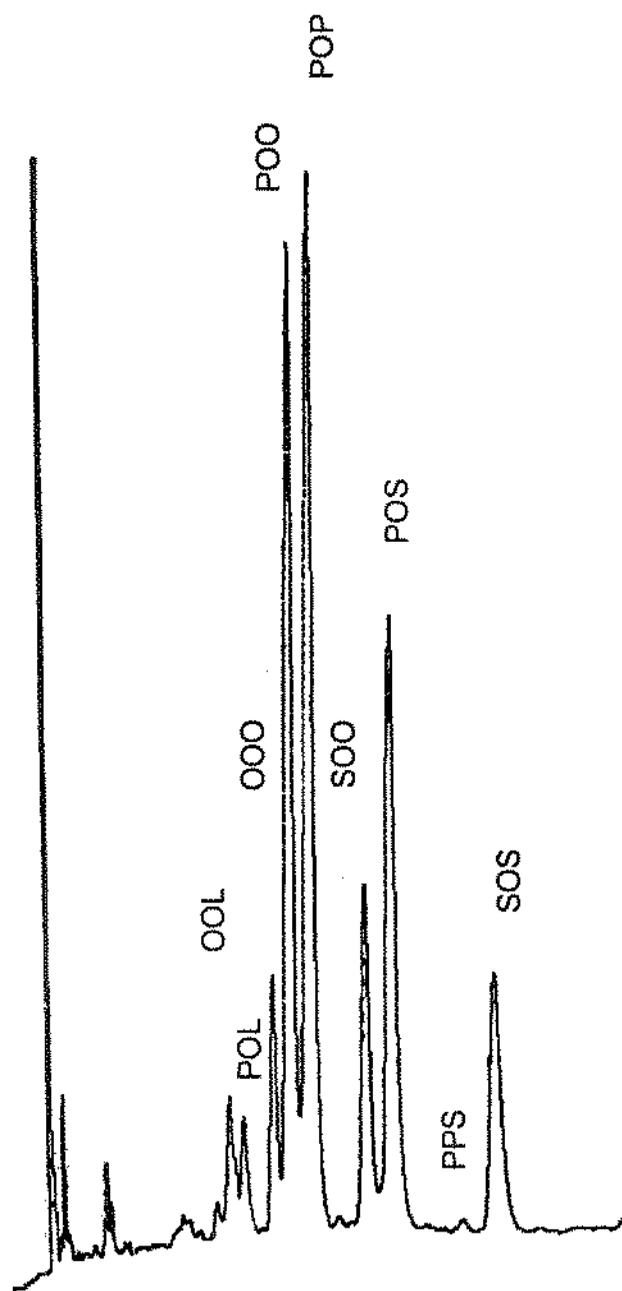


Figura 19 Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) do óleo de piqui obtido artesanalmente.

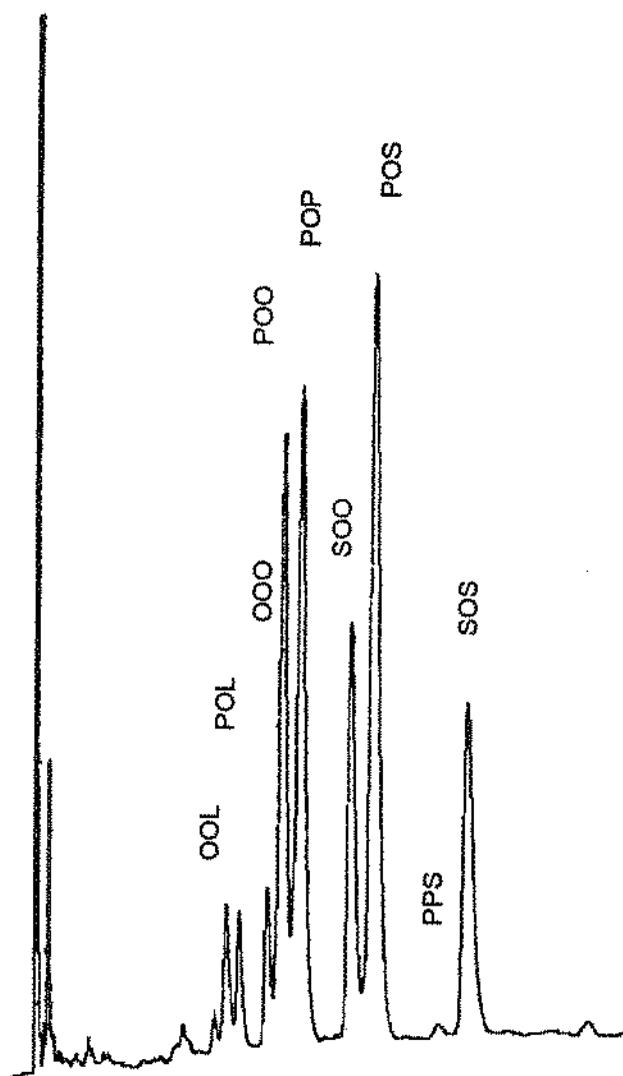


Figura 20 - Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) da manteiga de cacau da variedade *Forasteiro*.

4.4. Estudo das Condições de Reação na Interesterificação do Óleo de Piqui

Óleo de piqui, ácido esteárico e Lipozyme foram submetidos a testes de interesterificação a 70°C. Umidade de Lipozyme, concentração dos substratos e concentração da enzima foram os parâmetros estudados.

Em escala laboratorial deseja-se definir as melhores condições de reação para modificação enzimática do óleo de piqui a fim de se obter uma composição triglicéridica semelhante à da manteiga de cacau.

No estudo de cada parâmetro, foram efetuados vários testes, em condições pré-determinadas, onde em cada etapa foram determinados os teores de POP, POS e SOS do produto interesterificado e conseqüentemente a percentagem de AEI. O parâmetro de controle do final da reação é a obtenção de um percentual próximo de 44% de AEI no produto interesterificado.

4.4.1. Efeito do teor de Umidade da Enzima

Sabe-se da importância da água para ativação da enzima e para que a reação de interesterificação ocorra, pois as lipases atuam na interface água-óleo (MACRAE, 1983). Entretanto, a partir de determinada umidade do meio, a reação de hidrólise é favorecida, aumentando a formação de ácidos graxos livres, mono e diglicérides (POSORSKE, 1988).

Neste trabalho, a reação de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico foi estudada utilizando-se a Lipozyme com duas umidades diferentes: a original (2,36%) e com 10% de umidade, como recomenda o fabricante (Novo Industri). Este recomenda a secagem da enzima sob vácuo caso a sua umidade atinja valores superiores a 15%. Portanto, não tem sentido estudos de interesterificação com valores de umidade acima de 10%. Em estudos com leito fixo de enzima há necessidade de se regenerar a umidade da enzima caso esta se reduza a níveis que possam causar perda da sua atividade catalítica durante a reação. Para tanto, se recomenda a regeneração por hidratação com solvente e substratos saturados com água. No caso específico a ser estudado em escala laboratorial esta rehidratação não é necessária. Para se estudar o efeito da umidade da Lipozyme durante a reação de interesterificação do óleo de piqui fixou-se a razão em peso dos substratos em condições de excesso de ácido esteárico em relação ao óleo de piqui (2 : 1), temperatura de 70°C e

10% de concentração de enzima, conforme recomendação do fabricante. Nesta razão em peso escolhida existe suficiente substrato para ocorrer a interesterificação e o equilíbrio da reação ficar deslocado para favorecê-la. A escolha destas condições de reação está baseada na obtenção de gorduras especiais (CBE) citada e justificada no item 3.3.4.

A Tabela 9 apresenta os resultados, em ácidos graxos principais, correspondentes somente à fração triglicéridica do óleo de piqui interesterificado a 70°C com 10% de Lipozyme e fixando-se a razão em peso de 2,0 (ácido esteárico/óleo piqui).

Tabela 9: Efeito da umidade da Lipozyme sobre a composição em ácidos graxos dos triglicérides interesterificados do óleo de piqui

TEMPO REAÇÃO (min)	TEOR % (p/p)									
	Lipozyme 2,36% umidade					Lipozyme 10% umidade				
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
20	34,0	0,5	17,2	46,9	1,1	35,2	0,8	14,5	47,9	1,2
30	29,6	0,8	21,8	45,8	1,2	33,1	0,6	17,9	46,9	1,1
40	29,0	0,8	25,7	44,5	1,2	31,3	0,7	20,5	45,3	1,5
50	27,1	0,8	26,5	43,9	1,3	30,2	0,8	22,8	44,8	1,1
60	26,9	0,7	28,6	42,0	1,1	27,7	0,6	26,4	43,7	1,1
Óleo Piqui	40,2	1,4	2,3	53,9	1,5					
M. Cacau	27,0	0,2	25,3	40,4	5,9					

10% de Lipozyme , ác.C18:0/óleo piqui = 2,0 (p/p) e T = 70°C

Podemos observar a velocidade de incorporação do ácido esteárico nos triglicerídeos do piqui em função do tempo de reação. O valor desejado de ácido esteárico é o mais próximo do teor encontrado na manteiga de cacau (25,3%). Observa-se que na reação de interesterificação utilizando a enzima com sua umidade original (2,36%), houve uma redução gradual nos teores dos ácidos oléico e palmítico e uma incorporação inicial rápida de ácido esteárico. Com 20 minutos de reação, este valor se elevou de 2,3 para 17,2% e após este tempo, o aumento da incorporação deste ácido foi gradual até obter-se o valor de 25,7% com 40 minutos de reação.

Na reação com enzima a 10% de umidade, observa-se o mesmo comportamento dos ácidos graxos quando comparados ao da reação utilizando a enzima na sua umidade original, mas com velocidade de interesterificação inferior. O tempo aproximado para se obter o teor de ácido esteárico incorporado desejado foi de 60 minutos.

Os produtos obtidos com os dois níveis de umidade de enzima testados, 2,36 e 10%, com tempos de reação de 40 e 60 minutos respectivamente, não apresentaram diferenças significativas em suas composições de ácidos graxos.

A incorporação do ácido esteárico nos triglicerídeos do piqui, utilizando a Lipozyme como catalisador, mostrou-se efetiva e a capacidade catalítica da enzima apresentou-se maior operando-a com baixa umidade (2,36%).

A Tabela 10 apresenta o perfil triglicéridico principal do óleo de piqui interesterificado obtido nas duas umidades de Lipozyme testadas. As amostras dos triglicerídeos utilizados para análise foram as mesmas utilizadas para se determinar a composição em ácidos graxos.

Frações de mono e diglicerídeos não foram monitoradas durante os experimentos por problema técnico de equipamento para sua quantificação.

Tabela 10: Efeito da umidade da Lipozyme sobre a composição triglicéridica principal do óleo de piqui interesterificado

TEMPO REAÇÃO (min)	TEOR % (p/p)							
	Lipozyme 2,36% umidade				Lipozyme 10% umidade			
	POP	POS	SOS	%AEI	POP	POS	SOS	%AEI
20	25,7	22,9	9,5	36,1	26,7	21,9	8,9	34,4
30	22,5	27,6	11,3	40,9	25,1	25,2	8,9	36,7
40	21,7	28,5	10,3	40,6	23,4	29,2	10,4	39,7
50	20,4	32,1	12,7	44,2	23,2	29,6	10,9	40,3
60					21,7	30,3	11,4	41,8
70					20,8	31,4	11,6	42,8
80					19,1	33,0	12,1	44,5
Óleo Piqui	27,6	18,2	8,7	32,6				
M. Cacau	20,3	25,8	13,2	44,0				

10% de Lipozyme , ác. C18:0/óleo piqui = 2,0 (p/p) e T = 70°C

Observa-se que nas reações de interesterificação com a mistura de triglicérides do óleo de piqui e um ácido graxo livre, utilizando a enzima com umidade original (2,36%) e 10% de umidade, os teores dos triglicérides POS e SOS aumentaram gradualmente e o de POP diminuiu, levando à formação de maiores teores de POS e SOS nos produtos interesterificados. A formação de novos triglicérides enriquecidos com o ácido graxo adicionado comprova a migração dos grupos acila dos triglicéridos nas condições da reação, conforme esperado.

Estes ensaios foram suficientes para mostrar que a Lipozyme é uma lipase eficiente como catalisador da reação de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico para se obter triglicerídeos modificados com uma composição em POP, POS e SOS que forneçam um percentual de AEI semelhante ao da manteiga de cacau (44%). A eficiência catalítica da Lipozyme é maior quando utilizada com sua umidade original (2,36%), pois o tempo de reação foi menor (50 minutos) quando comparado com o tempo necessário utilizando-se a enzima com 10% de umidade (80 minutos), o que representa 60% de acréscimo no tempo de reação.

Comparando-se a técnica de CG e CLAE verifica-se que a composição triglicéridica constitui-se na técnica de monitoramento de reação de interesterificação mais importante que a composição em ácidos graxos. Comparando-se as Tabelas 9 e 10, observa-se que o tempo necessário para se atingir o valor desejado de ácido esteárico (25,3 %) foi menor que o tempo de incorporação do mesmo para obtenção dos triglicerídeos POP, POS e SOS em teores próximos a % AEI = 44. Com 40 minutos de reação, utilizando-se enzima com sua umidade original, apesar do teor de ácido esteárico nos triglicerídeos totais interesterificados apresentar-se 25,7%, o percentual de ácido esteárico incorporado foi de 40,6 %, mostrando que, além da necessidade de incorporação do ácido esteárico, esta deve ser eficiente na formação dos produtos desejados. Somente a análise triglicéridica pode avaliar com precisão os compostos formados.

Comparando-se os valores encontrados para POP, POS e SOS a 50 minutos e 80 minutos de reação com enzima a 2,36 e 10% de umidade respectivamente, observa-se que as diferenças nos teores desses triglicerídeos são menores que 4% para POS e SOS e de 7% para POP, indicando que o efeito principal da variação da umidade da enzima se reflete sobre o tempo de reação.

Os resultados encontrados estão em desacordo com a recomendação do fabricante da enzima que indica 10 % como sendo a umidade ótima de atuação da Lipozyme. Também diferem dos resultados obtidos por BLOOMER, 1990, na reação de interesterificação de POMF com etil-estearato, quando observou-se que a umidade da Lipozyme (de 2 a 10 %) praticamente não influenciou no teor de incorporação de estearato. Deve-se considerar o fato deste pesquisador ter fixado o tempo de reação e determinado o percentual de AEI.

Os resultados encontrados por BLOOMER *et alii* (1990, 1992) e ERGAN *et alii* (1990) ao estudarem o efeito da umidade da Lipozyme nas reações de interesterificação do óleo de girassol com etil-estearato e do glicerol com ácido oléico, estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Estes autores reportaram maior velocidade de interesterificação quando empregou-se Lipozyme com

umidades tão baixas como 0,01 % e uma menor formação de ácidos graxos livres e diglicerídeos, indesejáveis como produtos de reação. A Lipozyme quando utilizada como catálise de interesterificação sob condições nas quais o teor de umidade no sistema é restrita, tem na interesterificação sua reação predominante, minimizando reações de hidrólise.

Verificamos que a velocidade de reação de interesterificação não depende somente da umidade da enzima, mas do meio de reação como um todo, conforme citado no item 2.8.

4.4.2. Efeito da Concentração de Lipozyme.

Estudou-se o efeito da concentração da Lipozyme sobre o tempo de reação de interesterificação, utilizando-se enzima com 2,36% de umidade, temperatura de 70°C e razão em peso de 2,0 (ácido esteárico / óleo de piqui). A concentração de substratos foi fixada neste valor para que houvesse um excesso de ácido esteárico no meio da reação e a concentração de enzima fosse o único parâmetro a ter interferência na interesterificação do óleo de piqui.

A Figura 21 ilustra o comportamento da % AEI em função do tempo de reação, variando-se as concentrações de Lipozyme (6% ; 8% ; 10% ; 12% e 14%).

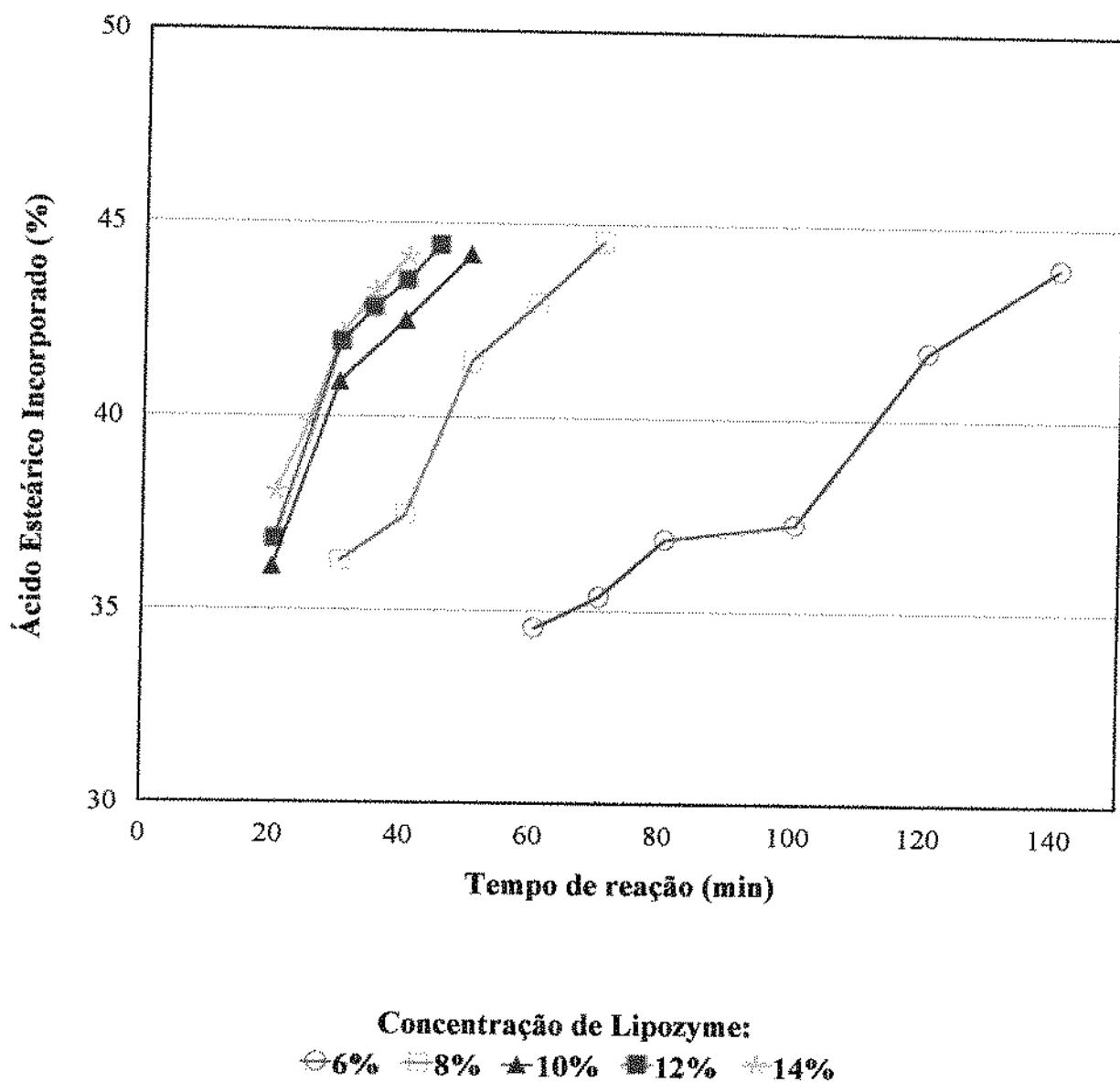


Figura 21: Relação do tempo de reação em função da concentração de Lipozyme enzima com 2,36 % de umidade, ác. C18:0/óleo piqui=6,0 (mol/mol) e T=70 C

Observa-se que a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de Lipozyme, variando de 140 minutos, quando se utilizou 6 % de enzima, até 40 minutos com 14 % de enzima. Este fato deve ser devido ao aumento da probabilidade de formação do complexo acil-enzima, o que favorece a reação de interesterificação (Figura 2).

Não se observou diferenças significativas da cinética de interesterificação na faixa entre 10 e 14% de Lipozyme. Pode-se aqui dizer que a concentração de 10% de enzima é um valor limitante aceitável.

A Tabela 11 mostra a composição triglicéridica principal do óleo de piqui interesterificado em função do teor de enzima utilizada, calculada sobre o peso dos substratos, para se obter % AEI = 44.

Tabela 11: Efeito da concentração de Lipozyme sobre o tempo de reação na formação de triglicérides

TRIGLICERÍDEOS	TEOR % (p/p)				
	6%	8%	10%	12%	14%
POP	20,1	20,2	20,4	19,7	18,5
POS	31,1	29,3	32,2	32,4	30,6
SOS	12,4	13,2	12,7	12,4	12,2
%AEI	43,9	44,5	44,2	44,4	44,9
TEMPO DE REAÇÃO (min)	140	70	50	45	40

ác. C18:0/óleo piqui = 2,0 (p/p) , diferentes concentrações de Lipozyme com 2,36 % de umidade e T = 70°C

Na faixa de concentração de enzima estudada não foi observada diferença significativa na composição triglicéridica do óleo de piqui interesterificado (menores que 10%). Independente do tempo de reação, obteve-se uma composição próxima à da manteiga de cacau padrão, mas com altos teores de POS. Esse fato pode ser devido a se atingir rapidamente o percentual desejado de incorporação, com tempo insuficiente para a interesterificação do POS formado em SOS.

O aumento da concentração de enzima leva a uma menor formação de diglicerídeos e triglicerídeos saturados (BLOOMER, 1990, BLOOMER *et alii*, 1991, 1992), aqui não quantificados.

O tempo necessário para incorporação de 44% de ácido esteárico no óleo de piqui diminui rapidamente com o aumento da concentração de Lipozyme de 6 para 8%. Verifica-se que dobrando a concentração de enzima de 6 para 12%, o tempo de reação diminui aproximadamente três vezes. Observa-se que a partir de 10% de Lipozyme, a tendência é a estabilização do tempo de reação, ou seja, a partir desse ponto, o aumento da concentração de enzima não tem influência significativa sobre a velocidade de reação. Portanto, no estudo do efeito da concentração de substratos sobre a reação de interesterificação do óleo de piqui tomaremos como ideal a concentração de 10% de Lipozyme.

4.4.3. Efeito da Razão de Concentração dos Substratos.

Após ter-se fixado a temperatura de reação, determinado que na sua umidade original a enzima exibe melhor atuação na interesterificação e determinado que a utilização de 10% de Lipozyme em peso sobre os substratos é adequada, estudou-se o efeito da razão de concentração dos substratos na reação de interesterificação do óleo de piqui e ácido esteárico para obtenção de triglicerídeos modificados com as características já mencionadas.

Foram estudadas as razões molares de ácido esteárico / óleo de piqui: 1 ; 2,4 ; 3,6 ; 4,8 e 6,0 que correspondem às seguintes razões em peso: 0,33 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 e 2,0 respectivamente.

A Figura 22 ilustra o comportamento do percentual de AEI em função do tempo da reação de interesterificação.

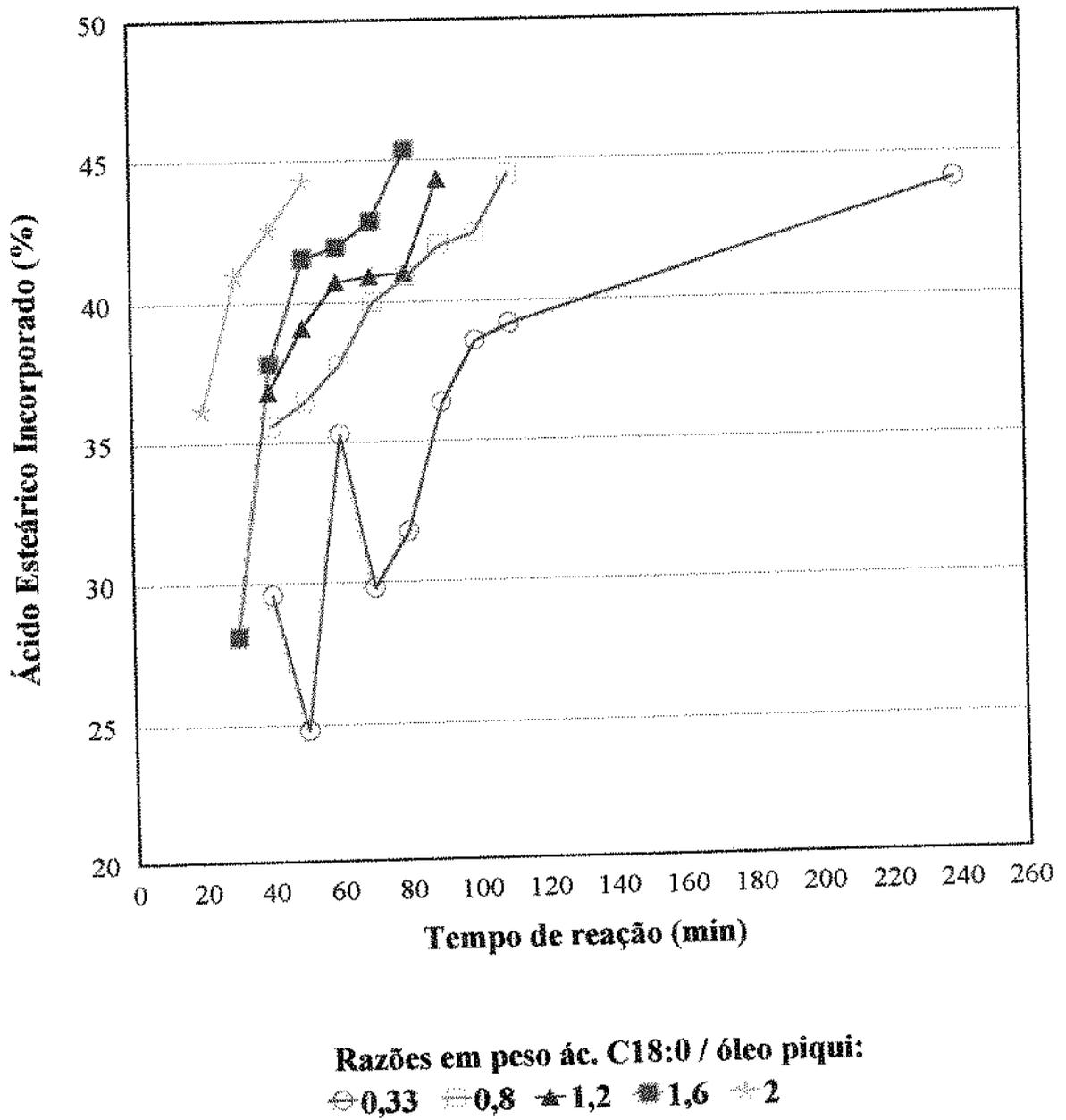


Figura 22: Relação do tempo de reação em função da razão em peso dos substratos

Observa-se na velocidade de incorporação do ácido esteárico nos triglicerídeos do piqui que o tempo de reação é inversamente proporcional à razão de concentração ácido esteárico / óleo de piqui, variando de 50 minutos para razão em peso de 2,0, até 240 minutos para a razão em peso de 0,33.

O ácido esteárico é chamado de acil-doador, pois após formação do complexo acil-enzima, este composto é desacilado e incorporado no diglicerídeo, obtendo-se então o triglicerídeo interesterificado (Figura 2). Aumentando-se a concentração relativa do ácido, o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da interesterificação.

Observa-se que à razão em peso ácido esteárico / óleo piqui de 0,33 (molar de 1,0) há deficiência do reagente acil-doador e discrepâncias são observadas no início da reação, com valores que não mantêm bom desempenho na catálise enzimática, mas que após aproximadamente 70 minutos de reação não se observa mais este comportamento.

Até a faixa de incorporação de substrato estudada observa-se que a reação não atingiu um estado estacionário em nenhuma das condições. A cinética da interesterificação mostrou-se inversamente proporcional ao teor do reagente acil-doador, ou seja, reações mais lentas a menores razões em peso ácido esteárico / óleo piqui.

A partir dos resultados obtidos, confirmou-se a importância em se determinar as concentrações relativas iniciais dos substratos na reação de interesterificação catalisada pela Lipozyme.

A Tabela 12 apresenta os valores encontrados de POP, POS e SOS ao final de cada reação de interesterificação a 70°C, utilizando-se 10% de Lipozyme com sua umidade original e variando-se a razão em peso dos substratos.

Tabela 12: Efeito da razão de concentração dos substratos sobre o tempo de reação na formação de triglicerídeos

TRIGLICERÍDEOS	TEOR % (p/p)				
	0,33	0,8	1,2	1,6	2,0
POP	20,6	18,9	18,5	18,7	20,4
POS	28,0	35,2	32,3	35,5	32,2
SOS	13,1	11,5	11,4	12,5	12,7
%AEI	44,0	44,4	44,3	45,3	44,2
TEMPO DE REAÇÃO (min)	240	110	90	80	50

10% de enzima com 2,36% umidade, diferentes razões em peso dos substratos e T=70°C

A partir desses dados, pode-se determinar a razão de concentração dos substratos mais adequada para se obter um produto interesterificado com composição triglicerídica principal desejada, pré-estabelecida.

Observa-se que as composições triglicerídicas obtidas utilizando-se as razões de substratos em peso de 0,33 e 2,0, com tempos de reação de 240 e 50 minutos respectivamente, são as que mais se aproximam da composição triglicerídica da manteiga de cacau padrão (Tabela 8), embora com teores de POS ligeiramente elevados. A reação com razão 0,33 apresentou maior eficiência na formação dos triglicerídeos desejados, pois a variação no teor de POS foi menor que 8% comparativamente com a manteiga de cacau, enquanto que à razão de 2,0 a variação foi de aproximadamente 15%. Observa-se também uma redução nos teores de POP e aumento de SOS e POS em relação à composição triglicerídica do óleo de piqui original.

Observa-se que a partir da razão molar dos substratos de 3,6, equivalente a 1,2 em peso, o aumento da concentração de ácido esteárico em relação ao óleo de piqui não interfere significativamente na velocidade de reação.

Estes resultados levam à possibilidade de se obter produtos com composição triglicéridica similar à da manteiga de cacau com diferentes cinéticas de interesterificação, que poderão ser avaliadas em escala piloto.

Portanto, a seleção do processo depende da definição de critérios como: qualidade desejada e custos de produção e purificação.

Propõe-se as seguintes condições de reação: 10% de Lipozyme com sua umidade original (2,36%), razão em peso ácido esteárico / óleo piqui de 0,33 e temperatura de 70°C, como as mais adequadas para a interesterificação do óleo de piqui, considerando-se que neste caso os custos de produção e purificação são menores, porém com um tempo maior de reação (240 minutos). Com relação a este fator, pode-se fazer comparação com o tempo de interesterificação da POMF que leva entre 6 e 24 horas de processo (BLOOMER *et alii*, 1992).

A Figura 23 apresenta o cromatograma (CLAE) dos triglicérides do óleo de piqui interesterificado em condições ideais de reação.

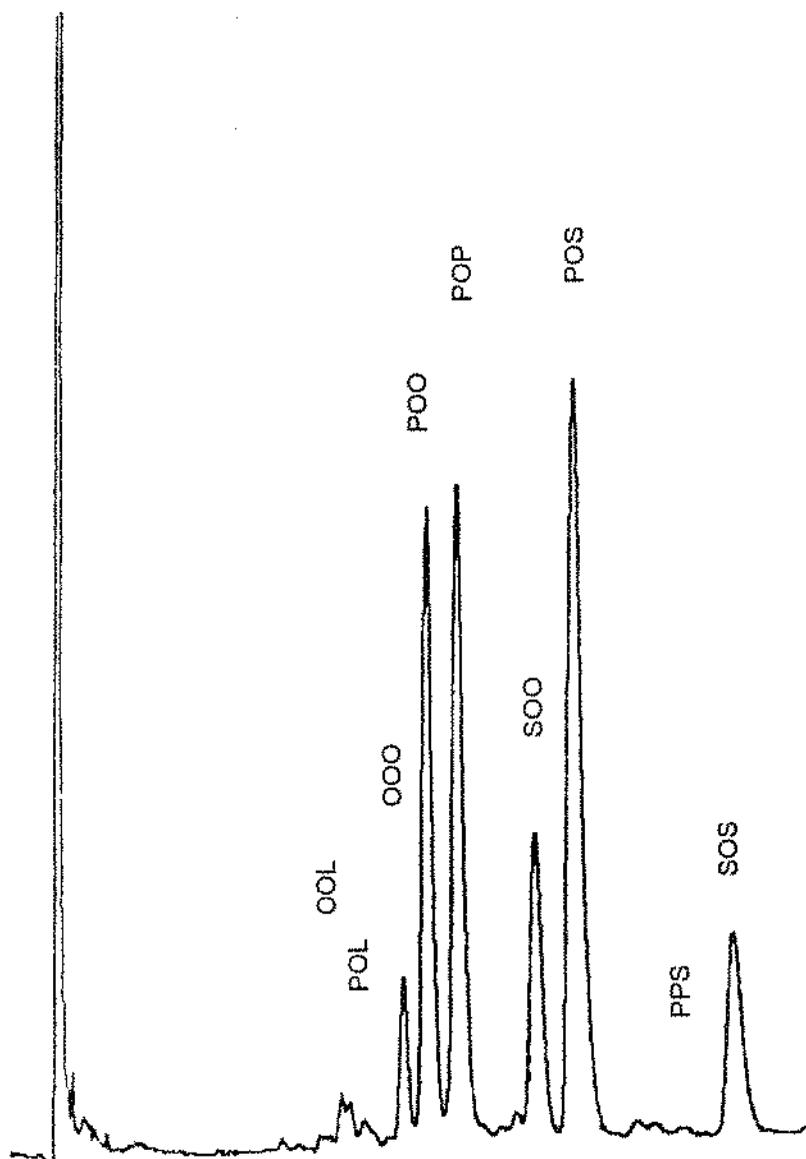


Figura 23 - Cromatograma de triglicerídeos (CLAE) do óleo de piqui interesterificado

Condições de reação:

10% Lipozyme (2,36% de umidade).

ác. C18:0 / óleo piqui = 0,33 (p/p).

T = 70°C e t = 240 minutos.

Podemos notar que o perfil triglicéridico do óleo de piqui foi alterado principalmente quanto ao componente **POS**. Comparando-se a Figura 23 com as Figuras 19 e 20, verifica-se que o perfil cromatográfico (CLAE) do triglicérideo interesterificado obtido é similar ao da manteiga de cacau padrão.

NOTA: Não foram realizadas análises para comparação do comportamento físico dos triglicérideos interesterificados obtidos com a manteiga de cacau, pois as quantidades obtidas dos mesmos, em micro escala, foram insuficientes para determinações físicas (RMN e DSC). Haveria necessidade de produção em escala piloto.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos na modificação enzimática do óleo de piqui visando uma composição triglicéridica similar à da manteiga de cacau, pode-se concluir o seguinte:

- O óleo da polpa de piqui apresenta múltiplas vantagens como matéria-prima na interesterificação enzimática.

- A lipase microbiana Lipozyme mostrou-se eficiente na modificação da composição do óleo de piqui.

- As condições ideais para a interesterificação enzimática foram: 10% de Lipozyme com sua umidade original (2,36%), razão em peso ácido esteárico / óleo piqui de 0,33 e temperatura de 70°C.

- Nas condições acima o tempo do processo é de 240 minutos.

- Razões maiores de substratos (ácido esteárico / óleo piqui) diminuem o tempo de processo porém, aumentam os custos de produção e purificação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOCS - Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 3.ed. Champaign, v.1-2., 1993.
- ASTM E 104-85 - Standard Practice for Maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Solutions. IN: *Annual Book of ASTM Standards*. Easton, MD, USA, vol.08.03, p. 695-697, 1985.
- BALIGA,B.P. & SHITOLE,A.D. - Cocoa Butter Substitutes from Mango, Fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58(2):110-114, 1981.
- BHATTACHARYYA,D.K. & BANERJEE,K. - Modification of Mango Kernel Fat by Monoester - Polyester Interchange Reaction. *Fat Sci. Technol.*, 89(3):130-131, 1987.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. - Triglyceride Interesterification by Lipases. 1. Cocoa Butter Equivalents from a Fraction of Palm Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67(8):519-524, 1990.
- BLOOMER, S. - Triglyceride Interesterification by Lipases. *Licenciate Thesis*. Department of Biotechnology. University of Lund, Sweden, 1990.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. - Triglyceride Interesterification by Lipases. 2. Reaction parameters for the reduction of trisaturated impurities and diglycerides in batch reactions. *Biocatalysis*, 5(2):145-162, 1991.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. - Kilogram Scale Ester Synthesis of Acyl Donor and Use in Lipase - Catalyzed Interesterifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(10):966-973, 1992.
- BRASIL MIC-STI - Ministério da Indústria e do Comércio - Secretaria de Tecnologia e Indústria. IN: *Produção de Combustíveis Líquidos a partir de Óleos Vegetais*. Brasília, p.161-176, 1985.

- CHANG, M.K.; ABRAHAM, G.; JOHN, V.T. Production of Cocoa Butter-Like Fat Interesterification of Vegetable Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67(11):832-843, 1990.
- CHONG, C.N.; HOH, Y.M.; WANG, C.W. - Fractionation Procedures for Obtaining Cocoa Butter-Like Fat from Enzymatically Interesterified Palm Olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(2):137-140, 1992.
- CHRISTIE, W.W. - Positional Distribution of Fatty Acids in Triacylglycerols. IN: *Lipid Analysis*. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, p. 156, 1982.
- DEFFENSE, E. - Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycerides des graisses végétales et animales et de leurs fractions obtenues par cristallisation fractionnée. *Rev. Fr. Corps Gras.*, Paris, 31(3):123-129, 1984.
- EIGTVED, P.; HANSEN, T.T.; SAKAGUCHI, H. - Characteristics of Immobilized Lipase in Ester Synthesis and Effects of Water and Temperature in Various Reactions. IN: *Am. Oil Chem. Soc./J. Oil Chem. Soc. Meeting*. Honolulu: Novo Industri printed, p. 1-24, 1986.
- ERGAN, F.; TRANI, M.; ANDRE, G. - Production of Glycerides from Glycerol and Fatty Acid by Immobilized Lipases in Non-aqueous Media. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(2):195-200, 1990.
- GASELA, P. & HUBBLE, J. - Propiedades Cinéticas y Diseño de Reactores. IN: *Tecnología de las Enzimas*. Zaragoza - Espanha, p. 51-70, 1990.
- GHOSH, C.P.; CHAKRABARTI, M.M.; BHATTACHARYYA, D.K. - Effect of Hydrogenation on the Thermal Properties of Sal, Mango Kernel and Mowrah Fats. *Fat Sci. Technol.*, 85(7):259-262, 1983.
- HANSEN, T.T.; EIGTVED, P. - A New Immobilized Lipase for Interesterification and Ester Synthesis. IN: *Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry*. American Oil Chemists Society. Champaign, IL, p. 365-369, 1986.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. IN: *Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids*. Lab. Pract., London, 22(8):475-476, 1973.

- ISON, A.P.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. - Effect of Solvent Concentration on Enzyme Catalyzed Interesterification of Fats. *Enzyme Microbiology Technology*, 10(1):47-51, 1988.
- LIPOZYME TM. - Preliminary Product Information, Denmark : Novo Industri A/S, 1985.
- LILLY, M.D. & DUNNILL, P. IN: *Annals New York Academy Science*. 501, p.113-118, 1987.
- MACRAE, A.R. - Lipase - Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(2):291-294, 1983.
- MOJOVIC, L.; SILER-MARINKOVIC, S.; KUKIC, G.; VUNJAK - NOVAKOVIC, G. - *Rhizopus arrhizus* lipase - catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.*, vol.15: 438-443, 1993.
- PADLEY, F.B.; GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. - Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. IN: Gustone, F.D.; Harwood, J.L.; Padley, F.B. *The Lipid Handbook*. Chapman and Hall, London, 1995.
- POSORSKE, L.H. - Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fat and Oils Industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(11):1758-1760, 1984.
- POSORSKE, L.H.; LEFEBVRE, G.K.; MILLER, C.A.; HANSEN, T.T.; GLENVIG, B.L. - Process Considerations of Continuous Fat Modification with an Immobilized Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(6):922-926, 1988.
- RATLEDGE, C. - Lipid Biotechnology: A Wonderland for the Microbial Physiologist. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(12):1647-1656, 1987.
- RATTRAY, J.B.M. - Biotechnology and the Fats and Oils Industry. - An Overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(11):1701-1712, 1984.
- SCHUCH, R. & MUKHERJEE, K.D. - Interesterification of Lipids Using an Immobilized sn-1,3-specific Triacylglycerol Lipase. *J. Agric. Food Chem.*, 35(6):1005-1008, 1987.
- SEMERIVA, M.; CHAPUS, C.; BOVIER - LAPIERRE, C.; DESNUELLE, P. - Res. Commun. *Biochem. Biophys.*, 58(3):808-813, 1974.

- SHUKLA, V.K.S.; NIELSEN S.W.; BATSBERG, W. - A Simple and Direct Procedure for the Evaluation of Triglyceride Composition Cocoa Butters by H.P.L.C. IN: *Fette Seifen Anstrichmittel*. - vol.7:274-278, 1985.
- SOON, W.. Malasia, 1991
- SRIDHAR, R.; LAKSMINARAYANA, G.; KAIMAL, T.N.B. - Modification of Select Indian Vegetable Fats into Cocoa Butter Substitutes by Lipase Catalyzed Ester Interchange. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(10):726-730, 1991.
- STEVENSON, R.W.; LUDDY, F.E.; ROTHBART, H.L. - Enzymatic Acyl Exchange to Vary Saturation in Di and Triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56(7):676-680, 1979.
- TANAKA, T.; ONO, E.; ISHIHARA, M.; YAMANAKA, S.; TAKINAMI, K. - *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology. Agric. Biol. Chem.*, 45(10):2387-2390, 1981.
- THOMAS, A.E.; SHAROUN, J.E.; RALSTON, H. - Quantitative Estimation of Isomeric Monoglycerides by Thin-Layer Chromatography. *J. Am. Oil Chem.*, 42(9):789-792, 1965.
- YAMANE, T. Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Overview. IN: *Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats & Oils Industry* - American Oil Society. Champaign, p. 17-22, 1988.