

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

Nara Lúcia Facioli e Lireny A.G.Gonçalves

Departamento de Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - 13.083-970 - Campinas -SP

Recebido em 28/11/96; aceito em 19/8/97

PIQUI (*Caryocar brasiliense* Camb) OIL TRIGLYCERIDE COMPOSITION MODIFICATION BY ENZYMATIC WAY. Piqui (*Caryocar brasiliense* Camb) oil was transformed into a cocoa butter-like fat through an enzymatic interesterification reaction using Lipozyme in the presence of stearic acid that was incorporated in the *sn* 1,3-3,1 position into triglyceride. Stearic acid incorporation was determined by HPLC, based on the quantification of the principal triglycerides (POP, POS e SOS) found in cocoa butter. The proposed process was feasible with a reaction time of 240 minutes with 10% of Lipozyme at 70°C and substrate weight ratio of 0,33 (stearic acid:piqui oil).

Keywords: enzymatic interesterification; cocoa butter-like fat; lipozyme.

INTRODUÇÃO

As propriedades físicas de uma gordura dependem do tipo de ácido graxo e da sua posição na molécula do glicerol¹.

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 da amêndoa de palma (palmiste), têm pontos de fusão semelhantes aos da manteiga de cacau, mas quando misturados à mesma, formam misturas eutéticas com características indesejáveis².

Vários estudos têm sido realizados no sentido de se modificar gorduras para produzir equivalentes da manteiga de cacau: por cristalização fracionada em solvente³, interesterificação química⁴ ou hidrogenação⁵, mas com sucessos limitados. A hidrogenação catalítica produz rearranjos estruturais na molécula dos triglicerídeos com formação de isômeros *trans*, além de isômeros posicionais formados pela mudança da localização das duplas ligações nos ácidos graxos dos triglicerídeos, enquanto que a interesterificação química produz triglicerídeos de forma casual, 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 desejável⁶.

Vários processos enzimáticos têm sido estudados visando a obtenção de 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 tem recebido considerável atenção, pois os resultados obtidos demonstram boa eficiência do processo. Estudos estão sendo realizados principalmente com a fração intermediária do óleo de palma⁷ e com gorduras de frutos de plantas exóticas da Índia como sal, mahua, kokum, mango e dhupa⁶.

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 palmítico⁸, enquanto que a manteiga de cacau apresenta altos teores de ácidos oléico, palmítico e esteárico⁹.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito 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, obtida do fungo *Mucor miehei*¹⁰, para se obter um produto com composição triglicerídica semelhante à da manteiga de cacau⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

A extração do óleo de piqui foi realizada à maneira artesanal, submetendo a polpa do fruto a um cozimento intensivo com água e separando o óleo sobrenadante. Em seguida, secou-se o produto em recipiente metálico sobre uma chapa quente até que o mesmo perdesse a opacidade que é causada pela umidade. Finalmente, o óleo obtido foi filtrado em papel de filtro.

As características físico-químicas do óleo de piqui (umidade, acidez, índices de peróxido, iodo e saponificação) foram determinadas segundo métodos oficiais¹¹.

A composição em ácidos graxos, para se determinar a pureza do ácido esteárico e para se caracterizar o óleo de piqui e a manteiga de cacau padrão, foi determinada seguindo-se metodologia oficial¹¹, por cromatografia à gás, utilizando cromatógrafo Sigma 3B, Perkin-Elmer, com detector de ionização de chama e coluna de aço inoxidável com 1/8" de diâmetro, 4m de comprimento e empacotada com 10% de Silar 10C em Chromosorb W-HP (100-120 mesh). As condições empregadas foram: fluxo de nitrogênio de 25 mL/min., temperatura do injetor = 225°C, temperatura da coluna = 175°C e temperatura do detector = 225°C. Os ésteres metílicos foram preparados segundo método oficial¹² e em seguida, uma amostra de 1 a 3 µL foi injetada no cromatógrafo. A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com padrões (Standard Nu-Chek). A quantificação foi realizada por normalização de áreas calculadas pelo integrador LCI-100, Perkin-Elmer.

As reações de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico catalisadas pela lipase *sn* 1,3-3,1 específica foram realizadas em micro escala, em sistema aberto, por batelada e com agitação magnética em banho termostático de glicerol a 70°C em equipamento IKA Werk, modelo HBR-250, equipado com termômetro de contato. A lipase utilizada (Lipozyme TM) é comercializada pela Novo Industri - Dinamarca e apresenta as seguintes características: imobilização em resina aniônica macroporosa, atividade de 49 BIU/g e umidade de 2,36%.

A escolha das condições ideais de reação está baseada na obtenção de gorduras especiais a partir da fração intermediária do óleo de palma⁷. O emprego de 70°C como temperatura de reação é justificado por ser um valor ligeiramente superior ao ponto de fusão do ácido esteárico (67-68°C), estar dentro da faixa de temperatura ótima de atuação da Lipozyme e não ser necessário a retirada da água formada durante a reação, pois nesta temperatura a evaporação ocorre naturalmente minimizando, dessa forma, a reação de hidrólise.

Foi estudada a atuação da lipozyme sob 2 condições de umidade: 2,36%, que é a sua umidade original e 10%, que é a umidade indicada pelo fabricante¹⁰. As concentrações de enzima utilizadas nos experimentos foram de 6%; 8%; 10%; 12% e 14% em relação ao peso dos substratos (ácido esteárico + óleo piqui). A partir dos resultados obtidos de umidade e concentração da lipase, variou-se a razão de concentração em peso dos substratos: 0,33; 0,80; 1,20; 1,60 e 2,00. Para cada parâmetro estudado, submeteu-se à avaliação um número limitado de ensaios que se enquadrasse dentro de uma faixa de tempo suficiente para que a incorporação de ácido esteárico necessária ocorresse (44%). Os resultados reportados neste trabalho foram obtidos através de análise de amostras em triplicata e portanto, representam um valor médio das determinações.

Após as reações de interesterificação os triglicerídios foram isolados por cromatografia de camada delgada (CCD) com: hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v)¹³. A verificação da classe de triglicerídios foi constatada por comparação com Rf de padrões de ácidos graxos, mono, di e triglicerídios. Utilizou-se o Fluotest (254 e 365 nm) para localização dos triglicerídios e sua posterior recuperação.

Como é a composição triglicerídica que define as propriedades físicas de um óleo/gordura, adotou-se esta determinação para monitoramento das reações de interesterificação do óleo de piqui, quantificando-se os triglicerídios principais (POP, POS e SOS) presentes na manteiga de cacau.

A taxa de interesterificação é determinada pelo percentual de incorporação de ácido nos triglicerídios monoinsaturados do óleo ou gordura e definida pela fórmula⁷:

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

O ácido esteárico incorporado no óleo de piqui foi calculado pela fórmula acima e o monitoramento das reações de interesterificação foi realizado por CLAE. O final da reação foi determinado quando os produtos de reação (POP, POS, SOS) forneceram um valor de taxa de incorporação semelhante ao da manteiga de cacau padrão (44%).

Para a determinação da composição triglicerídica do óleo de piqui e da manteiga de cacau foi empregada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema de fase reversa¹⁴. As amostras, dissolvidas em acetona, foram introduzidas com seringa de 10 µL na válvula injetora do cromatógrafo líquido Series 10, Perkin-Elmer equipado com detector de índice de refração e coluna de aço inoxidável com 4,0 mm de diâmetro, 25 cm de comprimento e empacotada com Lichrosorb RP-18 (5 µm), Merck. Foi empregada como fase móvel, mistura de acetona:acetonitrila (62:38, v/v) e fluxo de 1 mL/min. Para a identificação dos triglicerídios foram utilizados padrões individuais e misturas padrões. A ordem de eluição dos triglicerídios foi estabelecida por comparação com cromatograma CLAE do óleo de palma¹⁴ e análises de misturas do óleo de piqui com padrões individuais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características químicas do óleo de piqui utilizado nos ensaios foram: 0,065% de umidade, 0,27% (em ácido oléico) de ácidos graxos livres, 1,38 meq/kg de índice de peróxido, 50

cg I₂/g de índice de iodo e 200 mg KOH/g de índice de saponificação. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura⁸ e demonstram boa qualidade na extração do óleo pelo baixo teor de ácidos graxos livres e pelo bom estado oxidativo (índice de peróxido baixo).

A tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos do óleo de piqui e da manteiga de cacau padrão, onde se verifica que o óleo de piqui tem apenas 9,2% do total do ácido esteárico presente na manteiga de cacau, indicando a necessidade de incorporação desse ácido na molécula do triglicerídio para que se obtenha um teor de ácido esteárico semelhante ao da manteiga de cacau.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos de óleo de piqui e de manteiga de cacau

Ácido Graxo	Teor % (p/p)			
	Óleo Piqui	Óleo Piqui ⁸	Manteiga Cacau	Manteiga Cacau ⁹
Palmitico (16:0)	40,2	34,4	27,0	26,0
Palmitoléico (16:1)	1,4	2,1	0,2	0,3
Esteárico (C18:0)	2,3	1,8	25,3	34,4
Oléico (C18:1)	53,9	57,4	40,4	34,8
Linoléico (C18:2)	1,5	2,8	5,9	3,0
Linolênico (C18:3)	0,7	1,0	0,3	0,2
Araquídico (C20:0)	0,2	-	0,9	1,0

A tabela 2 apresenta os valores obtidos da composição triglicerídica para o óleo de piqui e a manteiga de cacau utilizados.

Tabela 2. Composição triglicerídica do óleo de piqui e da manteiga de cacau.

Triglicerídio	Teor % (p/p)		
	Óleo Piqui	Manteiga Cacau	Manteiga Cacau ¹⁵
LOO	3,8	3,6	0,2
POL	2,7	3,1	2,4
OOO	5,4	3,4	-
POO	22,9	16,2	2,2
POP	27,6	20,3	18,9
SOO	9,1	12,3	2,4
POS	18,2	25,8	41,3
PPS	0,3	0,7	-
SOS	8,7	13,2	29,7

A partir dos dados encontrados, conclui-se a necessidade de redução nos teores dos triglicerídios POP e POO e aumento dos triglicerídios SOS, POS e SOO do óleo de piqui. Teoricamente, a interesterificação enzimática deste óleo com ácido esteárico (C18:0), catalisada por uma lipase *sn* 1,3 específica, é adequada para obtenção de equivalente da manteiga de cacau.

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados obtidos a partir das reações de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico catalisadas pela Lipozyme TM.

Os ensaios realizados mostraram a eficiência da Lipozyme como catalisador da reação de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico para se obter triglicerídios modificados com uma composição em POP, POS e SOS e com um percentual de AEI semelhante ao da manteiga de cacau (44%).

A eficiência catalítica da enzima é maior quando utilizada com sua umidade original (2,36%) com tempo de reação de 50

Tabela 3. Efeito da umidade da Lipozyme sobre o tempo de reação.

Lipozyme	Tempo de Reação (min)	Triglicerídios % (p/p)		
		POP	POS	SOS
2,36% umidade	50	20,4	32,1	12,7
10% umidade	80	19,1	33,0	12,1

10% de Lipozyme, C18:0/óleo piqui = 2:1 (p/p) e T = 70°C

Tabela 4. Efeito da concentração de Lipozyme sobre o tempo de reação.

Lipozyme % (p/p)	Tempo de Reação (min)	Triglicerídios % (p/p)		
		POP	POS	SOS
6	140	20,1	31,1	12,4
8	70	20,2	29,3	13,2
10	50	20,4	32,2	12,7
12	45	19,7	32,4	12,4
14	40	18,5	30,6	12,2

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

Tabela 5. Efeito da razão de concentração dos substratos sobre o tempo de reação.

Razão de Concentração dos Substratos % (p/p)	Tempo de Reação (min)	Triglicerídios % (p/p)		
		POP	POS	SOS
0,33	240	20,6	28,0	13,1
0,80	110	18,9	35,2	11,5
1,20	90	18,5	32,3	11,4
1,60	80	18,7	35,5	12,5
2,00	50	20,4	32,2	12,7

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

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

Observa-se que a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de Lipozyme, variando de 140 a 40 minutos para concentrações de enzima de 6 a 14% respectivamente. Não se observou diferenças significativas (menores que 10%) na cinética de interesterificação na faixa de 10 a 14% de Lipozyme. Em todos os casos, obteve-se uma composição triglicéridica com altos teores de POS. Esse fato pode ser devido ao atingimento rápido do percentual desejado de incorporação de ácido esteárico, com tempo insuficiente para a interesterificação do POS formado em SOS. Pode-se aqui dizer que a concentração de 10% de enzima é um valor limitante aceitável, pois a partir desse valor, a tendência é a estabilização do tempo de reação.

Observa-se que o tempo de reação é inversamente proporcional à razão de concentração dos substratos (ácido esteárico/óleo piqui), variando de 50 a 240 minutos para razões dos substratos

de 2,0 a 0,33 respectivamente e que nestes dois pontos a composição triglicéridica dos produtos interesterificados mais se aproxima da composição da manteiga de cacau, embora com teores de POS ligeiramente elevados. A reação com razão 0,33 apresentou maior eficiência na formação dos triglicerídios 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%. Verifica-se que a partir da razão de substratos de 1,2 não há interferência significativa na velocidade da reação, porém, aumentariam os custos de produção e de purificação dos triglicerídios desejados, devido ao alto custo do ácido esteárico e da maior quantidade do mesmo a ser retirada do meio 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 avaliados em escala piloto. Portanto, a seleção do processo depende da definição de critérios como: qualidade desejada e custos de produção e purificação.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que as melhores condições da reação de interesterificação do óleo de piqui com ácido esteárico para se obter um produto com composição triglicéridica semelhante à manteiga de cacau são: 10% de Lipozyme com sua umidade original (2,36%), razão em peso de ácido esteárico/óleo piqui de 0,33 e temperatura de reação 70°C, com um tempo de reação de 240 minutos.

Para a continuidade do trabalho de pesquisa sugere-se o estudo da reação em escala piloto, para que seja possível o estudo de purificação dos triglicerídios interesterificados e posterior qualificação da gordura obtida por CLAE e RMN (Ressonância Nuclear Magnética).

As figuras 1, 2 e 3 apresentam os cromatogramas CLAE do óleo de piqui original, manteiga de cacau padrão e do óleo de piqui interesterificado em condições ideais de reação.

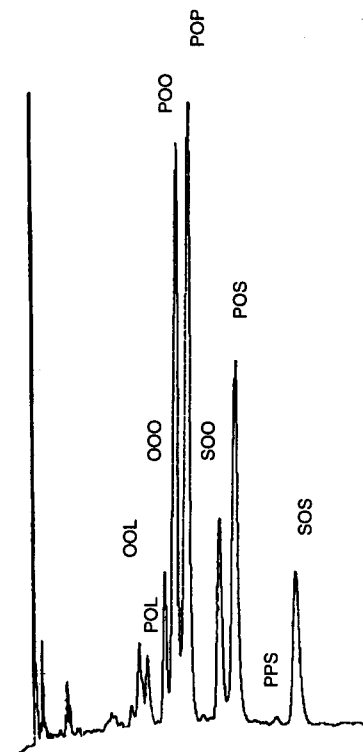


Figura 1. Cromatograma de triglicerídios (CLAE) do óleo de piqui obtido artesanalmente.

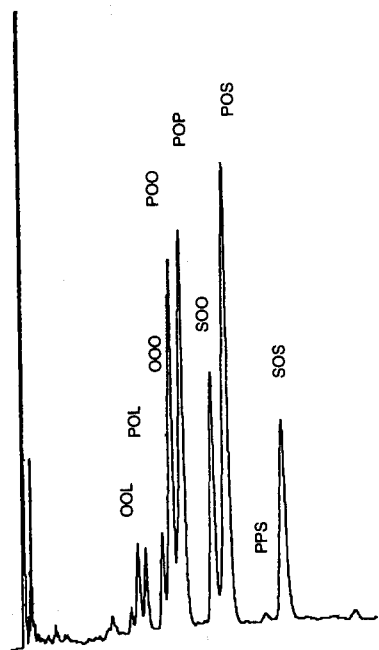


Figura 2. Cromatograma de triglicerídios (CLAE) da manteiga de cacau da variedade Forasteiro.

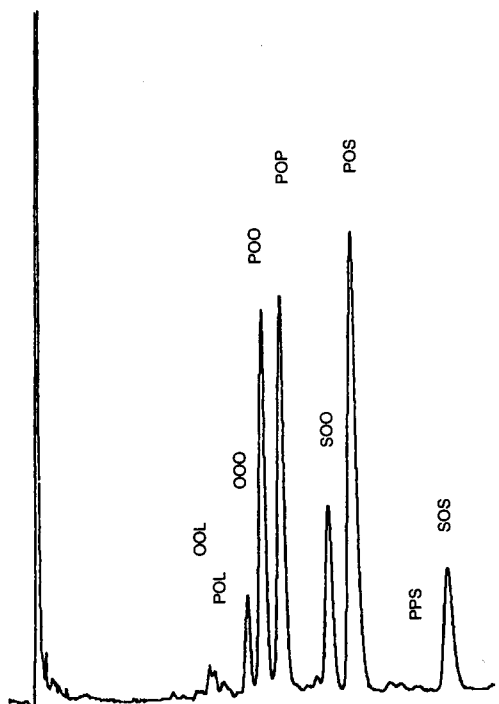


Figura 3. Cromatograma de triglicerídios (CLAE) do óleo de piqui interesterificado. Condições de reação: 10% Lipozyne (2,36% de umidade), C18:0/óleo piqui=0,33 (p/p), T=70°C e t=240 minutos.

CONCLUSÕES

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

- O óleo da polpa de piqui apresenta múltiplas vantagens como matéria-prima na interesterificação enzimática devido à sua composição triglicéridica adequada e eficiência como substrato na reação estudada, além de, no futuro, poder exercer influência positiva no fator sócio-econômico da região produtora.

- A lipase microbiana Lipozyme mostrou-se eficiente na incorporação de ácido esteárico nos triglicéridios do óleo de piqui.

- As condições ideais para a interesterificação enzimática em micro escala 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, com um tempo de processo de 240 minutos.

REFERÊNCIAS

1. Stevenson, R. W.; Luddy, F. E.; Rothbart, H. L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 676.
2. Posorske, L. H.; Lefebvre, G. K.; Miller, C. A.; Hansen, T. T.; Glenvig, B. L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 922.
3. Baliga, B. P.; Shitole, A. D.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 110.
4. Bhattacharyya, D. K.; Banerjee, K.; *Fat Sci. Technol.* **1987**, *89*, 130.
5. Ghosh, C. P.; Chakrabarti, M. M.; Bhattacharyya, D. K.; *Fat Sci. Technol.* **1983**, *85*, 259.
6. Sridhar, R.; Lakshminarayana, G.; Kaimal, T. N. B.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 726.
7. Bloomer, S.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 519.
8. Brasil MIC-STI, Ministério da Indústria e do Comércio - Secretaria de Tecnologia e Indústria; *Produção de Combustíveis Líquidos a partir de Óleos Vegetais*; Coordenadoria de Informações Tecnológicas; Brasília, 1985; p 161.
9. Padley, F. B.; Gunstone, F. D.; Harwood, J. L.; *In The Lipids Handbook*; Gunstone, F.D.; Harwood, J. L.; Padley, F. B. Ed.; Chapman and Hall; London, 1995; p 49.
10. Eigtved, P.; Hansen, T. T.; Sakaguchi, H.; *J. Oil Chem. Soc. Meeting*; American Oil Chemists' Society; Honolulu, 1986; p 1.
11. A.O.C.S.; *Official Methods and Recommended Practices*; American Oil Chemists' Society, 4th. ed.; Champaign, 1993; v I e II.
12. Hartman, L.; Lago, R. C. A.; *Lab. Pract.* **1973**, *22*, 475.
13. Schuch, R.; Mukherjee, K. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 1005.
14. Deffense, E.; *Rev. Fr. Corps Gras.* **1984**, *31*, 123.
15. Chong, C. N.; Hoh, Y. M.; Wang, C. W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 137.