



**Universidad de la República, Facultad de química
Departamento de ciencia y Tecnología de Alimentos
Laboratorio de Grasas y Aceites**



Tesis de Doctorado en Química:

***“Valorización de grasas y aceites comestibles de
origen nacional mediante interesterificación
enzimática”***

Ing. Alim Nadia Segura

**Director: Dr. Iván Jachmanián
Facultad de Química, UDELAR**

Defensa: 15 de julio de 2013



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mi familia, el pilar más importante de mi vida. A Luis, mi esposo, por el apoyo incondicional y su comprensión durante el desarrollo de la tesis. A él y a mi hijo Joaquín por su amor y cariño. A mis padres, Leda y Eduardo, por ayudarme a encontrar mi camino y por su apoyo cuando elegí estudiar química, lo que me ayudó a afrontar las críticas y los primeros cursos.

Al Dr Iván Jachmanián, director de esta tesis, por la confianza y el apoyo a lo largo de la misma. Por el tiempo, el conocimiento y las oportunidades que me brindó durante todo el desarrollo del trabajo. Y la paciencia durante las correcciones finales.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Grasas y Aceites, los actuales, Antonia, Bruno, Ignacio, Cecilia, Nicolás, Natalia y Yenny y los que ya se fueron, Nahir, Mercedes, María José y Natalie, por el apoyo, comprensión y colaboración siempre.

Al Dr. Villeneuve y su equipo del Laboratorio de Lipotecnica en CIRAD, Francia por recibirme. Especialmente a Jerome y Bruno, quienes me ayudaron durante mi estancia en Montpellier.

Al Prof. Luiz Antonio Gioelli y su equipo de la Facultad de Farmacia de USP, Brasil por la hospitalidad y disposición a recibirme durante las pasantías allí realizadas. Especialmente a Fabiana, Roberta y Juliana quienes me acompañaron a lo largo del trabajo allí realizado.

Al Prof Leopoldo Suescun, Lab. Cryssmat, DETEMA, por el tiempo y dedicación durante la pasantía. Por su colaboración en la realización de los ensayos cuando no me fue posible acercarme al equipo de rayos X, y por su disposición ante cualquier duda que pudo surgirme.

Al Frigorífico Tacuarembó y Novozymes-Latinoamerica por la contribución con las muestras utilizadas en el trabajo.

A la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República por la “Beca de apoyo a docentes para estudios de posgrado en la Universidad de la República” otorgada.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la Beca de Doctorado otorgada.

A el Programa ECOS, al programa de Pasantías en el exterior de la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República y el programa de Escala Docente de la Asociación de Universidades de Grupo Montevideo por el apoyo económico recibido para las pasantías realizadas en el exterior .

Al PEDECIBA-Química por el apoyo recibido.

Y a todos aquellos que de alguna forma aportaron su granito de arena para la realización de esta tesis.

Resumen

La grasa vacuna (BT) es un material graso de alta disponibilidad y relativo bajo costo en Uruguay, motivo por el cual se ha destinado tradicionalmente a la industria alimentaria, pese a que su composición en ácidos grasos le confiere algunas propiedades fisicoquímicas y nutricionales adversas. Numerosos antecedentes indican que entre los posibles métodos para el mejoramiento de las propiedades de este material graso, su interesterificación con aceites de origen vegetal mediante catálisis enzimática resulta una alternativa muy versátil y funcional para la obtención de un producto mejorado.

En esta tesis se estudiaron los parámetros del proceso de interesterificación enzimática de mezclas de la BT con dos aceites vegetales de particular interés producidos en nuestro país, se determinaron los cambios en la composición de los triacilglicerol de la mezcla y en varias propiedades fisicoquímicas vinculadas a la funcionalidad de los productos obtenidos para diferente tipo de usos en la industria alimentaria.

Para ello se identificaron dos aceites de producción creciente en nuestro medio como los más atractivos para destinar a este proceso: el aceite de girasol de alto oleico (HOSFO) y el aceite de salvado de arroz (RBO) dado que, además de que no existen antecedentes sobre el uso de los mismos para este fin, poseen una composición y propiedades muy diferente entre sí y muy particulares. El HOSFO se ha ido introduciendo en forma creciente en la región y constituye un aceite muy valorado desde el punto de vista nutricional por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (~88% de ác. oleico), lo que además le confiere una alta estabilidad oxidativa. El RBO es un aceite producido tradicionalmente en nuestro país como subproducto de la industria arrocera, es de los menos conocidos en la región y posee varias características diferenciales, como su alto contenido de ácidos grasos saturados (ác. palmítico ~18%) y su elevado contenido de insaponificables, entre los que se destacan tocoferoles, tocotrienoles y los orizanoles, todos de elevado valor nutricional.

Se utilizaron mezclas de BT con HOSFO o con RBO en diferentes proporciones (10 a 50% de aceite) y como catalizador para las interesterificaciones se utilizó la enzima comercial Lipozyme TL IM (*Thermomices lanuginosus*), adicionando un 10% en peso en relación a la mezcla a interesterificar. Las incubaciones se realizaron en un agitador orbital a 200 rpm termostatzado a 60°C, durante un período de 24 h.

Tanto las mezclas como los productos fueron caracterizados mediante diferentes análisis de rutina en el Lab. De Grasas y Aceites de la Facultad de Química (composición en ácidos grasos por GC, calorimetría diferencial de barrido (DSC), estabilidad oxidativa por Rancimat) y mediante métodos específicos que debieron ponerse a punto en el marco de esta tesis (análisis de triacilglicerol por HPLC/ELSD, determinación de los ácidos grasos en la posición *sn*-2 por hidrólisis con lipasa

pancreática, análisis de tocoles y orizanoles por HPLC, estudio de morfología cristalina mediante microscopía de luz polarizada y análisis por difracción de rayos X).

Debe considerarse que sólo la mezcla de los aceites con la BT presentó varios aspectos ventajosos desde el punto de vista nutricional con respecto a la BT pura: mayor grado de insaturación, menor concentración de colesterol y presencia de componentes minoritarios valiosos como los antioxidantes naturales.

La interesterificación produjo cambios importantes en la composición de triacilglicerol (TAG) de las mezclas, observándose para las mezclas con ambos aceites que en general disminuyó la concentración de TAG tipo SSS (trisaturados) y se incrementó la de los tipo SUU (monosaturado diinsaturado), dependiendo el grado de variación de la proporción y tipo de aceite en la mezcla.

Estos cambios produjeron modificaciones en las características de los termogramas de los productos obtenidos por DSC con respecto a los de las mezclas. Si bien en ambos casos los puntos de fusión total disminuyeron por efecto de la interesterificación, los productos con HOSFO presentaron menor contenido de sólidos que aquellos conteniendo el mismo porcentaje de RBO, como consecuencia del mayor aporte de ácidos grasos saturados de este último. También en ambos casos, si bien con más moderación en aquellos conteniendo RBO, los rangos plásticos de los productos se desplazaron hacia temperaturas más próximas a la ambiente, lo que resulta interesante para su posible aplicación como fases grasas para shortenings o margarinas.

Las imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada mostraron que la BT cristaliza en una red cristalina densa de esferulitos y pequeñas agujas de tamaño muy diverso. Si bien la adición de aceite produjo la dilución de esta microestructura y cierta reducción en el tamaño de los cristales sin introducir cambios sustanciales en su morfología, el proceso de interesterificación modificó drásticamente sus características. Los productos de interesterificación, incluido el obtenido a partir de BT pura, presentaron cristales más regulares y una cristalización más homogénea que la de las mezclas originales.

Los análisis de difracción de Rayos-X mostraron también variaciones en la forma cristalina preferida por los productos, los que presentaron una mayor tendencia a cristalizar bajo la forma β' que las mezclas. Esto también constituye un efecto favorable dado que la forma β' es la deseable para grasas destinada a la industria alimentaria, dadas sus características superiores de textura y fluidez que las de la forma β (termodinámicamente más estable), la cual suele conferir arenosidad y/o cerosidad a alimentos con alto contenido graso.

Si bien el proceso de interesterificación enzimática en todos los casos repercutió negativamente sobre la estabilidad oxidativa de las mezclas estudiadas, mediante el estudio de diversos aditivos se identificaron algunos (como el ácido cítrico) capaces de corregir este efecto.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que mediante la mezcla de BT con aceites como el HOSFO y el RBO producidos localmente y su posterior interesterificación enzimática es posible el mejoramiento de las características fisicoquímicas y nutricionales de la BT de partida y sus mezclas. El proceso estudiado presenta además una elevada versatilidad, pudiendo ajustarse las características del producto en función de los parámetros del mismo, lo que permite el diseño de fases grasas con diferentes propiedades según el tipo de uso al que las mismas se destinen. Dado que esta alternativa no involucra el incremento del contenido de ácidos grasos *trans* (TFA), a diferencia de la tradicional hidrogenación de aceites, la misma resulta del mayor interés en un contexto donde la reducción en el contenido de TFA en las grasas comestibles es uno de los mayores desafíos en la agenda de la industria alimentaria.

Capítulo 1.- Introducción

1.1.- Generalidades sobre modificación de grasas y aceites comestibles	1.2
1.2.- Interesterificación enzimática	1.3
1.3.- Aplicaciones de la interesterificación	1.4
1.4.- La grasas vacuna como materia prima para la industria alimentaria	1.6
1.5.- Aceites seleccionados	1.8
1.6.- Objetivos y aportes de este trabajo	1.9
1.7.- Bibliografía	1.11

Capítulo 2.- Materiales y métodos analíticos

2.1.- Materiales	2.2
2.2.- Métodos	2.2
2.2.1.- Proceso de interesterificación enzimática	2.2
2.2.2.- Determinación de la composición en ácidos grasos	2.3
2.2.3.- Determinación de la composición en triacilglicerol	2.3
2.2.4.- Determinación de perfiles de cristalización y de fusión y curvas contenido de grasa sólida	2.3
2.2.5.- Determinación de tocoles	2.4
2.2.6.- Determinación de orizanoles	2.5
2.3.- Bibliografía	2.6

Capítulo 3.- Obtención y caracterización de los productos de interesterificación

3.1.- Introducción	3.2
3.2.- Materiales y métodos	3.4
3.2.1.- Composición en ácidos grasos de la posición sn – 2	3.5
3.2.2.- Interesterificación mediante catálisis química	3.5
3.3.- Resultados y discusión	3.6
3.3.1.- Composición de las mezclas iniciales y sus productos de interesterificación enzimática	3.6
3.3.1.1.- Composición en ácidos grasos	3.6
3.3.1.2.- Composición en triacilglicerol	3.10
3.3.1.3.- Composición en ácidos grasos de la posición sn-2	3.19
3.3.2.- Comparación de los productos obtenidos mediante catálisis enzimática con los obtenidos mediante catálisis química	3.26
3.4.- Conclusión	3.28
3.5.- Bibliografía	3.30

Capítulo 4.- Propiedades térmicas

4.1.- Introducción	4.2
4.2.- Métodos	4.4
4.3.- Resultados y discusión	4.4
4.3.1.- Termogramas de fusión	4.4
4.3.2.- Termogramas de cristalización	4.12
4.3.3.- Contenidos de grasa sólida (CS)	4.23
4.3.4.- Efecto de la interesterificación sobre la plasticidad	4.28
4.3.5.- Comparación de las propiedades térmicas de los productos obtenidos con productos similares utilizados en la industria alimentaria	4.30
4.4.- Conclusión	4.34
4.5.- Bibliografía	4.35

Capítulo 5.- Microestructura cristalina y polimorfismo

5.1.- Introducción	5.2
5.2.- Métodos	5.6
5.2.1.- Microscopia de luz polarizada (PLM)	5.6
5.2.2.- Purificación de los TAG con alúmina	5.6
5.2.3.- Difracción de rayos-X (XRD)	5.7
5.3.- Resultados y Discusión	5.8
5.3.1.- Morfología y microestructura cristalina por análisis por PLM	5.8
5.3.1.1.- Morfología y microestructura cristalina de los materiales purificados	5.15
5.3.2.- Polimorfismo por XRD	5.21
5.4.- Conclusiones	5.28
5.5.- Bibliografía	5.30

Capítulo 6.- Estabilidad oxidativa

6.1.- Introducción	6.2
6.1.1.- Fundamento de los métodos de enranciamiento acelerado para la determinación de la estabilidad oxidativa	6.7
6.1.2.- Aspectos vinculados a la estabilidad oxidativa de las materias primas de interés y posibles efectos de la interesterificación sobre esta propiedad.	6.8
6.2.- Materiales y métodos	6.11
6.2.1.- Enranciamiento acelerado	6.11
6.2.2.- Estudio del efecto de la interesterificación enzimática sobre la concentración de los antioxidantes naturales de interés	6.12
6.2.3.- Eliminación de antioxidantes nativos	6.12
6.2.4.- Adición de antioxidantes	6.13

6.3.- Resultados y Discusión	6.13
6.3.1.- Estabilidad oxidativa de las materias primas, sus mezclas y los productos de interesterificación	6.13
6.3.2.- Análisis de peróxidos	6.18
6.3.3.- Efecto de la interesterificación enzimática sobre el contenido de antioxidantes naturales	6.20
6.3.3.1.- Análisis de mezclas y productos	6.20
6.3.3.2.- Estudio de un sistema “modelo” simplificado	6.21
6.3.4.- Efecto del reordenamiento de los ácidos grasos en la molécula de glicerol	6.26
6.3.5.- Efecto de la adición de antioxidantes sintéticos sobre la estabilidad oxidativa de los productos	6.29
6.4.- Conclusión	6.33
6.5.- Bibliografía	6.35

Capítulo 7.- Conclusiones generales

Anexos

A.1.- Tiempo de incubación	A.2
A.2.- Publicaciones	A.4
A.2.1- Trabajos presentados en congresos	A.4
A.2.2.- Trabajos publicados en revistas	A.5
A.3.- Becas obtenidas	A.6

Capítulo 1

Introducción general

1.1.- Generalidades sobre modificación de grasas y aceites comestibles.....	2
1.2.- Interesterificación enzimática	3
1.3.- Aplicaciones de la interesterificación	4
1.4.- La grasa vacuna como materia prima para la industria alimentaria.....	6
1.5. Aceites seleccionados	8
1.6.- Objetivos y aportes de este trabajo.....	9
1.7.- Bibliografía	11

1.1.- Generalidades sobre modificación de grasas y aceites comestibles

Históricamente la abundancia de grasas de determinadas propiedades no ha coincidido con la distribución de la demanda de una industria alimentaria que requiere de aceites y grasas con características particulares (dureza, índice de grasa sólida, propiedades reológicas, etc.), a la medida de los diferentes productos alimenticios que se vayan a formular. Por este motivo diferentes tipos de tecnologías han sido desarrolladas para la conveniente modificación de las propiedades de las materias primas grasas. En general, la mayoría de estos procedimientos están dirigidos a la modificación de aceites de origen vegetal para la obtención de materiales grasos de mayor temperatura de fusión, elevando la “dureza” de los mismos y ajustando su curva de fusión a un perfil acorde con el uso final del producto (Gunstone 2006).

En general el diseño de productos “ajustados” a una demanda insatisfecha a partir de la modificación de productos más abundantes y económicos resulta obviamente del mayor interés para cualquier cadena productiva, ya que involucra la valorización de los materiales destinados a dicho proceso.

En particular la tecnologías vinculadas a la modificación de las grasas y los aceites comestibles, un campo que se ha desarrollado en forma importante desde hace varias décadas, se vincula al diseño de métodos de modificación de aceites vegetales para la obtención de materiales grasos de mayor temperatura de fusión, elevando la “dureza” de los mismos y posteriormente ajustando su curva de fusión a un perfil acorde con el uso final del producto. Esta obtención de “dureza” se ha canalizado tradicionalmente por el conocido proceso de hidrogenación, el cual básicamente eleva el punto de fusión de un aceite vegetal por la acción combinada del aumento de su grado de saturación y por la generación de isómeros *trans*. Dado que en los últimos años se ha reconocido el efecto adverso sobre la salud humana de la ingesta de grasas con elevados niveles de ácido graso *trans* (TFA), diferentes agencias vinculadas al área alimentaria (FDA, OMS, etc.) recomiendan controlar la inclusión del contenido de este tipo de grasas en la dieta. Si bien lo relativo a los niveles recomendables es un tema de debate, a partir de estas recomendaciones en la mayoría de los países se ha dispuesto la inclusión en el etiquetado del contenido total de ácidos grasos *trans*, a los efectos de informar al consumidor sobre la calidad en los alimentos. Debido a que en el consumidor se ha difundido en cierto grado la idea de la “mala reputación” de este tipo de grasas, se puede constatar que el tema ha sido utilizado con fines comerciales, mediante el destaque en los envases de varios productos del aviso tipo “0% grasas *trans*”.

Esta realidad ha conducido a que la industria alimentaria haya recurrido a diversas alternativas para abastecerse de materiales grasos de cierta dureza que no provengan de la hidrogenación parcial de aceites vegetales. Estas alternativas en general han implicado recurrir a materiales grasos de elevado grado de saturación, diseñados por

diferentes metodologías como el fraccionamiento de grasas, la interesterificación de mezclas de materiales grasos de diferente origen, la hidrogenación total de diferentes aceites, que luego se someten a procesos de interesterificación, etc.

El fraccionamiento, consiste en la separación de los triacilglicerolos constituyentes de los aceites en función de su temperatura de cristalización, por tanto no involucra modificaciones en la estructura de los triacilglicerolos (TAG) constitutivos del material de partida. Presenta algunos inconvenientes, como ser la producción de dos fracciones de proporciones fijas, una de mayor interés y otra que debe destinarse a un uso secundario (O'Brien 2009; Gunstone 2006).

La interesterificación consiste en el intercambio de ácidos grasos entre las moléculas de los TAG constituyentes de una mezcla, por lo que únicamente actúa sobre el enlace éster de los TAG y no se introducen cambios en la estructura de los ácidos grasos presentes en el material de partida. Este proceso tradicionalmente se realiza mediante catálisis química (en general Na, K y aleaciones o sus alcóxidos) a una temperatura de entre 80 y 250°C, según el caso.

Si bien la interesterificación es preferida a la hidrogenación debido a que transcurre sin una generación, al menos importante, de TFA, del mismo modo que en la hidrogenación se presentan problemas vinculados a la calidad final de los TAG. El sometimiento de los mismos a elevadas temperaturas por períodos que pueden ser prolongados, suele favorecer la ocurrencia de reacciones de oxidación que conducen a la formación de compuestos indeseables, que además de ser tóxicos, condicionan la estabilidad oxidativa del producto terminado.

1.2.- Interesterificación enzimática

Una alternativa al proceso químico es la catálisis enzimática la cual minimiza los efectos indeseables propios de la catálisis química antes mencionados. En los últimos años ha surgido un número considerable de lipasas comerciales disponibles para la catálisis de este tipo de proceso y se han desarrollado tecnologías en las cuales los catalizadores químicos clásicamente utilizados para la transformación de los materiales grasos son remplazados por biocatalizadores enzimáticos. Estos últimos permiten operar en condiciones de temperatura y presión moderadas y sin la necesidad de utilizar solventes orgánicos.

Otro aspecto a destacar de este bioproceso son las características de especificidad que ofrecen las lipasas que permiten el diseño de productos con propiedades únicas (Foglia *et al.* 1993), siendo posible, por ejemplo, elegir la regiodistribución de los ácidos grasos entre las posiciones del glicerol, lo que representa una herramienta de gran utilidad para conferirle propiedades nutricionales y reológicas únicas al producto (Seriburi y Akoh 1998; Criado *et al.* 2007).

En efecto, las propiedades fisicoquímicas de un material graso están determinadas no sólo por su composición en ácidos grasos, sino también por la regiodistribución de los mismos en el esqueleto del TAG. A diferencia de los catalizadores químicos utilizados en la interesterificación de grasas y aceites, que provocan la “randomización” (distribución aleatoria de los ácidos grasos entre las tres posiciones del glicerol), muchas lipasas presentan especificidad posicional (activas preferentemente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3).

En el mismo sentido, desde el punto de vista nutricional los ácidos grasos situados en la posición *sn*-2 del triacilglicerol no son equivalentes a los de la posición *sn*-1 y *sn*-3. Durante la digestión, estos últimos son hidrolizados preferentemente por la lipasa pancreática (1,3-específica) y son absorbidos menos eficientemente, ya que forman sales insolubles con el calcio intestinal. Por el contrario, los ácidos grasos de la posición central de la molécula son preferencial y eficazmente absorbidos a través de la pared intestinal, bajo forma de β -monoacilgliceroles.

Esta característica única de los catalizadores enzimáticos permite el diseño de grasas con una distribución dirigida, de manera de modelar las propiedades fisicoquímicas y nutricionales del producto.

Entre las desventajas de la catálisis enzimática deben considerarse los mayores precios del catalizador y la menor velocidad de las reacciones, requiriéndose tiempos más prolongados que los necesarios para los procesos catalizados químicamente. También a los efectos de preservar la actividad del catalizador es necesario utilizar sustratos libres de impurezas, como trazas metálicas y peróxidos que afectan en forma importante la actividad de las lipasas.

1.3.- Aplicaciones de la interesterificación

Entre las variadas aplicaciones de la interesterificación se puede mencionar la formulación de grasas para bases de margarinas y shortenings con bajo contenido de ácidos grasos *trans*. Además de ésta ventaja, la interesterificación resulta de utilidad también para modificar las características de cristalización, promoviendo la cristalización β' (preferida) en grasas con tendencia hacia a cristalizar en la forma β (indeseable, ya que genera cristales grandes y de mayor dureza, lo que confiere una “arenosidad” característica al material graso).

Se ha demostrado que la interesterificación de diferentes materiales grasos con clara tendencia β modifican drásticamente su comportamiento hacia la cristalización β' cuando son interesterificados con materiales ricos en ácido palmítico, como ser la estearina (fracción “dura”, de mayor punto de fusión, obtenida por fraccionamiento térmico de un aceite) obtenida a partir de aceite de algodón, el aceite de palma o la estearina de palma, existiendo varias patentes registradas que utilizan procedimientos

de este tipo para el diseño de grasa con características excepcionales de palatabilidad.

No solo la cantidad de palmítico es importante en la cristalización, también lo es su posición dentro del TAG. Esto es evidente al comparar la grasa de cerdo y el aceite de algodón. Ambos poseen aproximadamente un 23% de palmítico, el aceite de algodón cristaliza preferentemente en forma β' , en cambio la grasa de cerdo lo hace en forma β . Esta diferencia se debe a que en ésta última el palmítico se encuentre en posición *sn*-2, en cambio en el algodón está en posición *sn*-1 y *sn*-3. El hábito cristalino de la grasa de cerdo puede cambiarse a β' mediante su randomización (O'Brien 2009).

Otro tipo de aplicación de la interesterificación es la obtención de lípidos estructurados. Se denominan así a aquellos lípidos cuyos triacilgliceroles han sido diseñados con una composición en ácidos grasos y una regiodistribución de los mismos particular, definida de forma tal de conferirle al producto propiedades especiales, tanto desde el punto de vista nutricional como de sus propiedades fisicoquímicas.

Esta tecnología se desarrolló a partir de los años 80 y desde entonces ha tenido un impulso considerable, existiendo al día de hoy varios productos comerciales constituidos por triacilgliceroles estructurados obtenidos por diferentes tecnologías, entre ellas la enzimática.

Entre las aplicaciones de la interesterificación se destaca el diseño de alternativas a la manteca de cacao muy costosa, por materiales que presentan una curva de fusión similar (conocidos como sustitutos o equivalentes de ésta) y que, dado su menor costo, pueden utilizarse en lugar de la misma en diferentes alimentos o coberturas. En general entre las materias primas utilizadas con este fin se encuentra el aceite de palma y el de coco (Akoh 2005).

Por equivalentes de la manteca de cacao se identifican aquellas grasas diseñadas de forma tal que además de presentar características similares a la manteca de cacao, pueden mezclarse en cualquier proporción con la misma sin modificar sus propiedades físicas. En general se trata de materiales compuestos por TAG que siguen el patrón predominante en la manteca de cacao, es decir del tipo SUS (saturado-insaturado-saturado), donde U corresponde al ácido oleico. Es en la elaboración de este tipo de material que encuentran aplicación las lipasas, dado que, como ya se mencionó, su característica única de regioespecificidad permite direccionar los procesos hacia la síntesis del tipo de TAG deseado (Akoh 2005).

Otra aplicación de la interesterificación lo constituyen los lípidos de bajas calorías, mediante los cuales ha sido posible reducir contenido calórico desde las 9 Kcal/g de una grasa convencional hasta valores de entre 3 y 6 Kcal/g, según el caso.

Uno de estos productos se conoce con el nombre comercial SalatrimTM, un sustituto de materiales grasos de bajas calorías comercializado por la sociedad Nabisco en los Estados Unidos y obtenido por interesterificación del aceite de colza o de soja totalmente hidrogenado con triacilgliceroles de cadenas cortas tales como triacetina o

tributirina. El proceso se dirige convenientemente de manera de que los TAG sintetizados contengan mayoritariamente el ácido graso de cadena corta en la posición *sn*-2, el que será eficazmente absorbido a nivel intestinal bajo la forma del 2-monoacilglicerol correspondiente, mientras que los ácidos grasos de 18 carbonos o más de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 serán pobremente absorbidos (Akoh 2005).

Otro producto de este tipo lo constituye el Caprenin, constituido por triglicéridos de cadena media (MCT, como tricaprina y tricaprilina), interesterificados con tribehenina (behénico=C22, saturado). Debido a que los ácidos grasos saturados con elevado nº de carbono (>18) son pobremente absorbidos a nivel intestinal, el resultado es un material con un contenido calórico efectivo reducido (del orden de 6 Kcal/g). Triglicéridos del tipo MCT son rápidamente asimilados, siguiendo una ruta diferente a la de los ácidos grasos largos, por lo que son de particular interés en individuos con un alto requerimiento energético o algún tipo de dificultad digestiva (anoréxicos, pacientes de SIDA y cáncer, quemados, bebés prematuros, etc) (Akoh 2005).

Han surgido diferentes métodos con el objetivo de imitar la composición y el valor nutricional de los lípidos de la leche materna. Ésta contiene aproximadamente un 23% de ácido palmítico que mayoritariamente se encuentra en posición *sn*-2, mientras que los aceites vegetales de uso común son muy pobres en palmítico o no lo contienen en posición *sn*-2 (como es el caso del aceite de algodón, pese a tener un 25% de éste ácido). Por este motivo han surgido numerosas patentes relacionadas con el diseño de grasas que involucran la interesterificación de aceites de origen vegetal con aceites ricos en palmítico como el de palma, o coco, las que han demostrado ser nutricionalmente superiores que las simples mezclas de los mismos.

De esta manera, la sociedad Loders-Croklaan, filial de Unilver en los Estados Unidos, comercializa el Betapol™ (sustituto de la grasa de la leche materna), el Marinol™ o el Clarinol™, aceites enriquecidos, respectivamente, en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 (DHA y EPA) o en ácidos linoléicos conjugados (CLA) y que son utilizados como complementos alimenticios (Akoh 2005).

1.4.- La grasa vacuna como materia prima para la industria alimentaria

La grasa vacuna es una materia prima relativamente abundante y atractiva para ser destinada a procesos de mejoramiento para su destino a usos alimentarios. Éste material graso se produce en grandes cantidades como subproducto de la industria cárnica y su valor es relativamente bajo en comparación al de los aceites vegetales. La mayor cantidad de lo producido es destinada a la exportación, otra parte es utilizada en la elaboración de alimentos por industrias locales, previa refinación, y finalmente una fracción se destina a otros usos menores (como, jabonería, velería, etc). La elevada dureza y la composición de la grasa vacuna la convierten en un producto de

uso restringido a algunos tipos de alimentos, principalmente productos de panadería. Pero, a su vez, estas características lo convierten en un material graso capaz de proveer “dureza” a formulaciones obtenidas por mezclado con aceites de diferente origen o al mezclado combinado con procesos de interesterificación.

Además de su alta disponibilidad y de su relativo bajo costo, otras ventajas de este material graso para su destino a productos alimenticios que se suelen destacar son su alta estabilidad térmica y oxidativa, su adecuada plasticidad a temperatura levemente superiores a la ambiente y su sabor típico, apreciado en un medio habituado a su consumo (Grompone y Moyna 1983; Jachmanián *et al.* 2002)

A pesar de esto, para muchas aplicaciones del área alimentaria la grasa vacuna presenta características fisicoquímicas que la vuelven inconveniente. Entre ellas se destaca el alto contenido de sólidos que presenta en el rango de temperaturas de 32 a 38 °C, lo que produce una sensación residual “cerosa” en la boca indeseable. A esto se suma que presenta un contenido importante de triglicéridos saturados (~13%) que contribuyen a la formación de cristales de elevada dureza y tamaño (diámetros de 2 a 3 mm o aún más) que también producen una sensación indeseable de “arenosidad” (Jin *et al.* 2007).

Otro aspecto cuestionable se vincula con sus propiedades nutricionales, dado fundamentalmente por su elevado contenido de ácidos grasos saturados (~57%), su aporte de ácidos grasos trans (~ 5 a 6 %) y, en menor grado, el de colesterol (~0,12%) (Grompone y Moyna 1983). En los últimos años se ha encontrado que estos TFA naturales (ácidos trans vaccénico y linoleico conjugado) no son perjudiciales como los formados durante la hidrogenación, incluso se les atribuye efectos beneficiosos para la salud de los animales de estudio (Barman *et al.* 1999).

Existen antecedentes y trabajos previos realizados en el Laboratorio de Grasas y Aceites, en Montevideo, Uruguay, acerca de la conveniente conversión de la grasa vacuna mediante interesterificación enzimática con aceite de girasol. Mediante los mismos fue posible la obtención de productos con características nutricionales superiores y mejores propiedades fisicoquímicas que los materiales de partida (Jachmanián *et al.* 2002).

Se ha reportado también que la interesterificación con metóxido de sodio de grasa vacuna y aceite de girasol modifica el comportamiento térmico de la mezcla, llevando el rango fusión a temperaturas más bajas (Chobanov y Chobanova 1977). Así mismo se encontró que este mismo tipo de interesterificación de una mezcla de grasa vacuna y aceite de soya puede dar una grasa alternativa a la hidrogenada para la producción de margarinas (Lo y Handel 1983).

También se reportó la obtención de grasas como posible sustituto de shortenings mediante la interesterificación de grasa vacuna y aceite de girasol. Observándose una disminución en el punto de fusión y de la dureza respecto a la mezcla inicial (Rodríguez *et al.* 2001).

Existen también antecedentes relativos a la interesterificación enzimática de grasa vacuna con aceite de canola donde se encontraron la reducción en el contenido de sólidos y en el punto de fusión de la grasa respecto a la mezcla de partida, también se destacó que esta reducción depende de la cantidad de grasa vacuna en la mezcla inicial, obteniéndose una mayor reducción cuanto menor es la cantidad de la misma (Forssell *et al.* 1992).

Foglia *et al.* (1993) realizaron la interesterificación con varias lipasas de la grasa vacuna por un lado con aceite de soya y por otro con aceite de girasol de alto oleico, ambos al 50%. Encontraron que el contenido de grasa sólida puede ser alterado por este tipo de proceso siendo por ello una alternativa a la mezcla o la interesterificación química y concluyeron además, que la catálisis enzimática tiene la ventaja frente a la química de la posibilidad de controlar la posición de los ácidos grasos en la molécula de glicerol selectivamente.

Resulta por tanto interesante explorar qué tipo de modificación sufre la estructura de los triacilglicerolos cuando la grasa vacuna es interesterificada en diferente proporción con otros materiales grasos de diferente origen, a los efectos de evaluar su potencial nutricional y determinar sus propiedades fisicoquímicas. Se estima que mediante este tipo de procedimiento es posible obtener un producto significativamente superior desde el punto de vista nutricional a varios de los que se utilizan actualmente en Uruguay en la industria alimentaria (como la grasa vacuna pura o grasas hidrogenadas con elevado contenido de TFA).

1.5. Aceites seleccionados

Se realizó un estudio sobre las características de los diferentes aceites locales que pudieran ser destinados a este tipo de proceso junto con la grasa vacuna y se escogieron dos aceites vegetales producidos en Uruguay: el aceite de girasol de alto oleico (HOSFO) y el aceite de salvado de arroz (RBO).

La selección de estos aceites se basó en que, además de que su producción es creciente en nuestro medio, presentan muy diferente composición, lo que le confiere características particulares a los productos, destacándose además que no existen antecedentes sobre el destino de los mismos para este uso.

El HOSFO es una variedad derivada del girasol “común”, obtenida con el objetivo de modificar la composición en ácidos grasos mediante el aumento en la proporción de oleico y la disminución de la de linoleico (O’Brien 2009). Constituye un aceite muy valorado desde el punto de vista nutricional por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados de la familia *n*-9 (~88% de ác. oleico), además de poseer una muy alta estabilidad oxidativa, por lo que también se lo recomienda como aceite de fritura.

El RBO es producido como subproducto de la industria arroceras y es de los menos conocidos en la región. Posee varias características particulares, como su alto

contenido de ácidos grasos saturados (~18% de ácido palmítico) y un elevado contenido de insaponificables entre los que se destacan tocoferoles, tocotrienoles y los orizanoles característicos (familia constituida por ésteres de diversos fitoesteroles con ácido ferúlico), todos ellos con importantes propiedades antioxidantes (Nam *et al.* 2005).

Debe considerarse también el aporte de componentes minoritarios de estos aceites al ser mezclados con la grasa vacuna, ya que varios de ellos poseen poder antioxidante, por lo que es muy valorada su presencia en alimentos. En particular el HOSFO aportará tocoferoles a la mezcla, mientras que el RBO fundamentalmente contribuirá con sus orizanoles característicos. Se ha reportado que los orizanoles mejoran los patrones de lípidos plasmáticos, reduce el colesterol plasmático, aumenta las HDL (lipoproteínas de alta densidad) e inhibe el agregado plaquetario (Cicero and Gaddi, 2001). Nam *et al.* (2005) reportan que además de su actividad como antioxidante, presenta actividad antimutagénica y anticarcinogénica.

1.6.- Objetivos y aportes de este trabajo

Por lo mencionado anteriormente, en esta tesis se estudiarán las características del proceso de interesterificación enzimática de las mezclas de la grasa vacuna con dos aceites identificados como de interés para destinar a su interesterificación enzimática. Se definirán las condiciones adecuadas de reacción para una eficiente actividad del catalizador y se verificarán los cambios introducidos en el proceso en la composición de cada una de las mezclas. Adicionalmente, se estudiarán las propiedades térmicas de las mezclas de partida y de los productos así como las características de cristalización de los mismos, dado que estas propiedades definen la calidad de los mismos para su eventual uso como componente de alimentos.

Los antecedentes mencionados permiten plantear como hipótesis de trabajo que mediante la interesterificación enzimática de la grasa vacuna con diferentes aceites comestibles de origen nacional será posible la obtención de productos mejorados desde el punto de vista de sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales, atractivos para su uso en la formulación de alimentos y por lo tanto con un mayor valor agregado que los materiales de partida.

El objetivo general de esta tesis por lo tanto será el estudio de modificaciones que sufren las mezclas de grasa vacuna con distintas proporciones de los aceites vegetales seleccionados al ser interesterificadas con un catalizador enzimático, a los efectos de evaluar su potencial nutricional y determinar sus propiedades fisicoquímicas y las características de cristalización de los productos obtenidos.

En el marco del desarrollo de estos trabajos se contó con la colaboración con el grupo del Dr. Pierre Villeneuve (Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD, Montpellier,

Francia), grupo especializado en la aplicación de procesos biocatalíticos en la modificación de lípidos.

También, dada la complejidad y costo en equipamiento que se requiere para la aplicación de métodos actualizados en el área del estudio de las características de cristalización de estos materiales, se contó con la colaboración del Laboratorio de Cristalografía (DETEMA), que dispone de equipamiento para la realización de análisis por difracción de rayos-X y del Departamento de Tecnología Bioquímica de la Universidad de San Pablo (USP), a los efectos del análisis de los materiales mediante microscopía de luz polarizada.

Por lo tanto, además del cumplimiento del objetivo general planteado anteriormente, mediante la ejecución de estos trabajos se generaron nexos con otros grupos de investigación del medio local y del exterior para la incorporación de metodologías novedosas para nuestro país en el área de las grasas y los aceites comestibles.

1.7.- Bibliografía

Akoh C C. 2005. Structured and Specialty Lipids. In: Akoh C C; Lai O M, editors. Healthful lipids. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 591-606.

Chobanov D, Chobanova R. 1977. Alterations in glyceride composition during interesterification of mixtures of sunflower oil with lard and tallow. J Am Oil Chem Soc 54: 47-50.

Cicero A F G, Gaddi A. 2001. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. Phytotherapy Res 15 2001: 277-289

Criado M, Hernández-Martín E, López-Hernández A, Otero C. 2007. Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat. Characterization of the reaction and its products. J Am Oil Chem Soc 84:717-726 .

Foglia TA, Petruso K, Fearheller SH. 1993. Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures. J Am Oil Chem Soc 70:281-285.

Forssell P, Kervinen R, Lappi M, Linko P, Suortti T, Poutanen K. 1992 Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture. J Am Oil Chem Soc 69:126-129.

Grompone M A, Moyna P. 1983. Characteristics of uruguayan beef tallow. J. Am. Oil Chem. Soc. 60: 1331-1332.

Gunstone FD. 2006. Modifying lipids for use in food. CRC Press: Boca Raton.

Jachmanián I, Gil M, Grompone MA. 2002. Mejoramiento de las propiedades térmicas y nutricionales de la grasa vacuna uruguaya mediante interesterificación enzimática. Aceites y Grasas 46:84-92.

Jin Q, Gao H, Shan L, Liu Y, Wang X. 2007. Study on grainy crystals in edible beef tallow shortening. Food Res Int 40:909-914

Lai O M, Ghazali H M, Chong C L. 1998. Effect of enzymatic transesterification on the melting points of palm stearin-sunflower oil mixtures. J Am Oil Chem Soc 75:881-886.

Lee J H, Akoh C C, Lee K T. 2008. Physical properties of trans-free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. J Am Oil Chem Soc 85:1-11.

Lo Y, Handel A. 1983. Physical and chemical properties of randomly interesterified blends of soybean and tallow for use as margarine oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 60: 815-818.

Marangoni A G, Rousseau D. 1998. The influence of chemical interesterification on the physicochemical properties of complex fat systems. 1. Melting and crystallization. J Am Oil Chem Soc 75: 1265-1271.

Nam S H, Choi S P, Kang M Y, Kozukue N, Friedman M. 2005. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 816-822

O'Brien RD. 2009. *Fats and oils. Formulating and processing for applications*. CRC Press: Boca Raton.

Petrauskaite V, De Greyt W, Kellens M, Huyghebaert A. 1998 Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends. *J Am Oil Chem Soc* 75:489-493.

Pokorný J; Parkányiová J. 2005. Lipids with antioxidant properties. In: Akoh C C; Lai O-M, editors. *Healthful lipids*. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 273-300.

Reshma M V, Saritha S S, Balachandran C, Arumughan C. 2008. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. *Bioresource Technology* 99: 5011-5019.

Rodríguez A, Castro E, Salinas M C, López R, Miranda M. 2001. Interesterification of tallow and sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc* 78:431–436

Seriburi V, Akoh C C. 1998. Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats. *J Am Oil Chem Soc* 75:1339-1345.

Zeitoun M A M, Neff W E, List G R, Mounts T L. 1993. Physical properties of interesterified fat blends. *J Am Oil Chem Soc* 70:467-471.

Zeitoun M A M, Neff W E, Mounts T L. 1992. Interesterification of soybean oil using a sn - 1,3 – triacylglycerol lipase. *Rev Fr Corps Gras* 39:58-90.

Capítulo 2

Materiales y métodos analíticos

2.1.- Materiales	2
2.2.- Métodos.....	2
2.2.1.- Proceso de interesterificación enzimática	2
2.2.2.- Determinación de la composición en ácidos grasos.....	2
2.2.3.- Determinación de la composición en triacilglicerolos	3
2.2.4.- Determinación de perfiles de cristalización y de fusión y curvas contenido de grasa sólida	3
2.2.5.- Determinación de tocoles	4
2.2.6.- Determinación de orizanoles.....	5
2.3.- Bibliografía	6

2.1.- Materiales

Se utilizaron dos aceites vegetales refinados de diferente origen, ambos de calidad comestible, los mismos se adquirieron en comercios locales: el aceite de girasol de alto oleico fue producido por la empresa COUSA (Montevideo, Uruguay) y el aceite de salvado de arroz por la empresa ARROZUR (Treinta y Tres, Uruguay)

La grasa vacuna de primer jugo fue donada gentilmente por el Frigorífico Tacuarembó (Tacuarembó, Uruguay). Como catalizador se utilizó la Lipozyme TL IM (*Thermomices lanuginosus*) suministrada gentilmente por la empresa Novozymes Latinoamérica.

Los solventes orgánicos, estándares y reactivos derivatizantes requeridos para algunos pasos del análisis de lípidos fueron adquiridos en Dexin S.R.L., Montevideo, Uruguay (representante de Sigma-Aldrich Company).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Proceso de interesterificación enzimática

Como primer paso se realizó el acondicionamiento de la lipasa comercial. Se eliminó el agua contenida en el catalizador en un evaporador rotatorio a vacío por un período de 30 min a 60°C.

El material graso a interesterificar se incubó con un 10% (m/m) de catalizador enzimático en recipientes de vidrio con tapa rosca. Antes de cerrar los mismos se hizo pasar nitrógeno para eliminar el oxígeno del espacio de cabeza y de esta forma preservar los materiales del deterioro oxidativo.

Las incubaciones se realizaron en un agitador orbital a 60°C con una velocidad de agitación de 200 rpm por un período de 24 horas.

Los productos obtenidos se separaron por decantación de la enzima y se preservaron para su posterior análisis.

2.2.2.- Determinación de la composición en ácidos grasos

Los lípidos se derivatizaron a sus ésteres metílicos (método AOCS Ce 2-66), los ésteres metílicos así preparados se analizaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo GC-2014, equipado con FID y provisto de una columna capilar Supelco SP 2330 (25m x 0,5mm x 0,25 µm). Se utilizó nitrógeno de alta pureza a 40

kPa como gas portador, con una relación de split de 1:80. El programa de temperatura se inició a 160°C, seguido de un calentamiento a 4°C/min hasta 230°C, temperatura que se mantuvo por 10 min.

En los casos que se requirió la separación de los isómeros *cis* y *trans* de los ácidos grasos (por ejemplo en el caso del análisis de la grasa vacuna) se equipó el GC mencionado anteriormente con una columna capilar SP 2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm). El programa de temperaturas se inició a 50 °C, seguido de una rampa a 5 °C/min hasta 220 °C. Se utilizó nitrógeno de alta pureza a 250 kPa como gas portador, con una relación de split de 1:80.

En todos los casos la identificación de los picos se realizó mediante el análisis de estándares de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés (Sigma).

2.2.3.- Determinación de la composición en triacilgliceroles

Las muestras lipídicas se disolvieron en acetona en una concentración de 5 mg/mL. El análisis se realizó directamente en un HPLC Shimadzu 20A provisto de un detector evaporative light scattering Shimadzu ELSD-LT II, dos columnas SUPELCOSIL™ C-18 (25cm x 4.6mm x 5 μm).

Se inyectaron 20 μL de la muestra. La fase móvil se compuso inicialmente de acetona/acetonitrilo 50:50 con un flujo de 1 ml/min, desde el comienzo se aplicó un gradiente lineal que elevó la cantidad de cloroformo hasta alcanzar una composición 40:40:20 de acetona/acetonitrilo/cloroformo a los 60 min, esta composición se mantuvo constante durante 20 min. Finalmente, a los 85 min, se volvió a la proporción de solventes inicial.

Los picos principales se identificaron utilizando estándares de TAG puros y los minoritarios considerando el orden de elusión de acuerdo a número de partición $ECN = CN - 2n$, donde CN es el número de carbonos y n es el número de dobles enlaces. Los TAG de cada ECN determina un rango de tiempo de elusión, la asignación de cada pico a cada TAG dentro de un mismo ECN se realizó mediante el análisis de una gran variedad de aceites y su posterior comparación con bibliografía, ya que se contó con un número limitado de estándares.

2.2.4.- Determinación de perfiles de cristalización y de fusión y curvas contenido de grasa sólida

Los termogramas de cristalización y de fusión se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un calorímetro TA Q20 (TA Instruments Q20) equipado con un sistema de refrigeración RSC90, de acuerdo al programa de temperaturas recomendado en el método AOCS Cj 1-94. Se pesó una masa del entorno a los 15

mg de la muestra fundida en una capsula de aluminio. Como referencia se utilizó una capsula vacía idéntica a la utilizada para la muestra.

El programa de temperatura utilizado es el siguiente; como primer paso se calentó la muestra hasta los 85°C. Esta temperatura se mantuvo durante 10 min para permitir el borrado de la memoria térmica del material. Luego se realizó un enfriamiento hasta -60°C a una velocidad de 10°C/min. Esta temperatura se mantuvo por un período de 30 min para permitir la completa cristalización de la muestra. Finalmente se realizó un calentamiento de la muestra hasta los 85°C a una velocidad de 5 °C/min.

Del proceso de enfriamiento (de 85 a -60 °C) se obtuvieron los termogramas de cristalización de las muestras y del de calentamiento (de -60 a 85 °C) los de fusión.

Las temperaturas de pico (Tp), temperaturas on-set (Ton) y las entalpías de fusión o cristalización (ΔH) fueron calculados a través de las herramientas del software TA Universal Analysis 2000 (versión 3.9A).

Las curvas de contenido de grasa sólida (CS) en función de la temperatura se obtuvieron por integración parcial de las curvas de fusión por medio del software TA Universal Analysis 2000 (version 3.9A). La calibración del DSC se realizó utilizando un estándar de Indio patrón.

2.2.5.- Determinación de tocoles

Las muestras se disolvieron en isopropanol en una concentración de 30 mg/mL. El análisis se realizó directamente en un HPLC Shimadzu Prominence 20A (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) provisto de un detector de fluorescencia Shimadzu RF 20A XS, una columna SUPELCOSIL™ C-18 (25cm x 4.6mm x 5µm).

Se inyectó 20 µL de muestra y el análisis se inició con el bombeo de 1 mL/min de una fase móvil compuesta por Agua (5% HAc)/Metanol/ Acetonitrilo en una proporción 69:18:13. Su composición varió hasta la proporción 0:58:42 a los 25 min, manteniéndose sin variar por un período de 5 min. Transcurrido este tiempo se comenzó a bombear isopropanol hasta alcanzar una proporción metanol:isopropanol:acetonitrilo igual a 23:60:17 a los 45 min. Luego se aplicó un gradiente hasta alcanzar 100% acetonitrilo a los 46 minutos y se mantuvo durante 2 minutos más el suministro de acetonitrilo puro a 1,7 mL/min. Finalmente a los 57 min se volvió a la proporción de solventes y al flujo utilizados al inicio del análisis.

Se fijó el detector con una λ de excitación de 290 nm y la de emisión a 330 nm. Para la cuantificación se realizaron las curvas de calibración con los estándares de α , β , γ y δ -tocoferol.

2.2.6.- Determinación de orizanoles

El análisis se realizó de acuerdo a lo descrito por Pestrana et al. (2009). Las muestras se disolvieron en la mezcla de solventes acetonitrilo/metanol/isopropanol en proporción 50:40:10 en una concentración de 40 mg/mL. El análisis se realizó directamente en un HPLC Shimadzu Prominence 20A (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) provisto de un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A, una columna SUPELCOSIL™ C-18 (25cm x 4.6mm x 5µm).

La fase móvil se compuso inicialmente de acetonitrilo/metanol/isopropanol en la proporción 50:40:10, a un flujo de 1 mL/min durante 10 min. Luego se aplicó un gradiente hasta alcanzar la proporción 30:65:5 a los 15 min, la que se mantuvo hasta los 20 min, recuperándose la composición inicial a los 30 min.

Se registró el cromatograma a 325 nm y para la cuantificación se realizó la curva de calibración correspondiente con un estándar de γ -orizanol.

2.3.- Bibliografía

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed.; Walker, R. E., Ed.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, 1990.

Pestana V R, Zambiasi R C, Mendonça C R B, Bruscatto M H, Ramis-Ramos G. 2009. Influencia del procesamiento industrial sobre las características químico-físicas y contenido en lípidos y antioxidantes del salvado de arroz. Grasas y aceites, 60:184-193.

Capítulo 3

Obtención y caracterización de los productos de interesterificación

3.1.- Introducción	2
3.2.- Materiales y métodos	4
3.2.1.- Composición en ácidos grasos de la posición sn – 2.....	5
3.2.2. Interesterificación mediante catálisis química.....	5
3.3.- Resultados y discusión	6
3.3.1.- Composición de las mezclas iniciales y sus productos de interesterificación enzimática.....	6
3.3.1.1.- Composición en ácidos grasos	6
3.3.1.2.- Composición en triacilglicerolos.....	10
3.3.1.3.- Composición en ácidos grasos de la posición <i>sn</i> -2	19
3.3.2.- Comparación de los productos obtenidos mediante catálisis enzimática con los obtenidos mediante catálisis química	26
3.4.- Conclusión.....	28
3.5.- Bibliografía	30

3.1.- Introducción

La grasa vacuna, como se mencionó, es un material graso de alta disponibilidad y relativo bajo costo en Uruguay, motivo por el cual se ha destinado tradicionalmente a la industria alimentaria, pese a que por su composición en ácidos grasos y elevado punto de fusión resulta poco adecuada para la elaboración de alimentos de alta calidad. Varios antecedentes indican que entre los posibles métodos para el mejoramiento de las propiedades de este material graso se destaca su interesterificación con aceites de origen vegetal mediante catálisis enzimática.

Entre los aceites de mayor interés aparece el aceite de girasol de alto oleico (HOSFO), dado que se ha ido introduciendo en forma creciente en la región y constituye un aceite muy valorado desde el punto de vista nutricional por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. En el mismo sentido resulta también interesante el aceite de salvado de arroz (RBO), atractivo por su alto contenido en componentes minoritarios de alto valor nutricional (orizanoles y tocoferoles).

El primer efecto de someter la grasa vacuna (BT) a un proceso de interesterificación con un material de diferente origen lo constituye la modificación de la composición en ácidos grasos del producto, por el simple mezclado. Esto, en el caso de la mezcla de una grasa saturada con aceites vegetales (de mayor grado de insaturación), produce un material más insaturado (en proporción al porcentaje de aceite adicionado) y también tiene un efecto de “dilución” sobre los ácidos grasos *trans* y sobre el colesterol aportados exclusivamente por la BT. En forma adicional, según el aceite vegetal elegido para el proceso, éste le aportará a la mezcla valiosos componentes minoritarios (fitosteroles, antioxidantes naturales, etc.).

Existe un gran número de lipasas disponibles en el mercado capaces de catalizar la reacción de interesterificación de interés. Estas difieren en sus características de especificidad y selectividad según su origen, en la velocidad que le pueden conferir a la reacción, en la estabilidad en el medio y las condiciones de reacción a utilizar y, obviamente, en su costo, aspecto a tener en cuenta al diseñar un proceso que eventualmente puede ser de interés tecnológico.

Para el trabajo en un medio de baja actividad de agua como lo es una mezcla de lípidos, es recomendable la utilización de lipasas inmovilizadas en un soporte sólido, ya que esto permite obtener un catalizador más activo y con mayor estabilidad en las condiciones de operación. Otro aspecto ventajoso de la utilización de catalizadores inmovilizados lo constituye la facilidad de separación de la enzima de los productos y su reutilización, así como la posibilidad de trabajar en un proceso continuo mediante el uso del catalizador empacado en un reactor tubular.

Numerosas referencias indican a la enzima Lipozyme RM IM, preparado comercializado por Novozymes (*sn*-1,3 específica y proveniente del *Rhizomucor miehei*) como una alternativa muy conveniente desde el punto de vista de su actividad

y estabilidad. Sin embargo también es uno de los preparados de mayor costo (en el entorno de los 1000 USD/Kg), lo que aleja la posibilidad de diseñar procesos que sean atractivos para su eventual transferencia posterior a una escala industrial.

También la misma empresa comercializa un preparado enzimático obtenido a partir de *Thermomyces lanuginosus* conteniendo la lipasa inmovilizada en gránulos de sílice, el cual se comercializa con el nombre de Lipozyme TL IM (Novozymes, Dinamarca). Ésta enzima es muy activa en medio no acuoso, muy eficiente en la catálisis de procesos de interesterificación y, si bien ha sido reportada como 1,3-específica (Zhang *et al.* 2001) algunos autores indican lo contrario, debido a la ocurrencia de procesos de acil migración (Li *et al.* 2010). A diferencia del catalizador mencionado anteriormente, su costo se ubica en el entorno de los 80 USD/Kg, lo que la convierte en una alternativa muy interesante, motivo por el cual ha sido muy estudiada para éste y otros tipos de procesos en el área de las grasas y aceites comestibles y sus derivados (Christian, 2012). Se ha identificado al diseño de este tipo de catalizadores enzimáticos de bajo costo como el aspecto clave para permitir la diseminación del uso de la catálisis enzimática para el diseño de grasas comestibles de propiedades térmicas específicas a costos competitivos en relación con la tradicional interesterificación por catálisis química (Zhang *et al.* 2001).

Zhang *et al.* (2001) estudiaron la interesterificación enzimática de mezclas de estearina de palma y aceite de coco, encontrando que la Lipozyme TL-IM presentó una actividad similar a la obtenida con Lipozyme RM-IM.

Existen antecedentes relativos a la interesterificación enzimática de grasa vacuna con aceite de canola donde se reporta la reducción en el contenido de sólidos y en el punto de fusión del producto respecto a la mezcla de partida (Forssell *et al.* 1992). Dicha reducción depende de la cantidad de grasa vacuna en la mezcla inicial, obteniéndose una mayor reducción cuanto menor es la proporción de la misma.

Mediante la interesterificación catalizada por lipasas de la grasa vacuna con aceite girasol en diferentes proporciones ha sido posible la obtención de productos con valores significativamente más bajos de contenido de sólidos y con mejoras desde el punto de vista nutricional en comparación con la grasa vacuna de partida, atractivos para la sustitución de margarinas y shortenings hidrogenados de uso habitual en la industria alimentaria uruguaya (Jachmanián *et al.* 2002).

Foglia *et al.* (1993) estudiaron la interesterificación catalizada por varias lipasas de la grasa vacuna mezclada al 50 % con aceite de soya o con aceite de girasol de alto oleico, encontrando que el contenido de grasa sólida y el punto de fusión de las mezclas disminuyeron por efecto del proceso, el que aparece como una alternativa a la interesterificación tradicional mediante catálisis química. La catálisis enzimática además es indicada como ventajosa dada su capacidad de controlar la regiodistribución de los ácidos grasos en los productos, mediante la selección de la lipasa con las características de selectividad adecuada, mientras que la catálisis

química conduce a productos donde los ácidos grasos se distribuyen al azar (productos randomizados).

La regiodistribución no sólo es determinante de las propiedades fisicoquímicas de un material graso, también las propiedades nutricionales pueden modificarse en función de la misma. Por ejemplo, Reena y Lokesh (2007) compararon las propiedades nutricionales de mezclas de aceite de coco con RBO o con aceite de sésamo antes y después de su interesterificación, encontrando que las propiedades nutricionales fueron superiores para los productos, pese a que el proceso no introduce cambio alguno en la composición en ácidos grasos.

En este capítulo se interesterificaron mezclas de BT con HOSFO y mezclas de BT con RBO en diferentes proporciones utilizando la enzima Lipozyme TL-IM como catalizador. Se estudiaron las modificaciones introducidas por el proceso en la composición en triacilglicérol de las diferentes mezclas y se determinó si la enzima presentó algún tipo de selectividad o especificidad en las condiciones del proceso.

3.2.- Materiales y métodos

Se utilizaron los materiales grasos, estándares y reactivos generales indicados en **2.1**. Además para este capítulo fue utilizada la Lipasa pancreática porcina (PPL, Lipase from porcine páncreas Type II, Sigma-Aldrich), también se utilizaron placas de sílica soportadas en vidrio para TLC (10x20 cm, 0.25 mm, FLUKA). Las placas fueron preparadas mediante asperjado con ácido bórico (5% en metanol), para minimizar fenómenos de acil migración previo a su utilización, se secaron y se activaron en estufa a 110-120 °C durante 1h.

Se interesterificaron muestras de BT pura y sus mezclas con HOSFO o RBO, conteniendo 10, 20, 30, 40 y 50 % de aceite. Los ensayos de interesterificación se realizaron en batch, a 60°C, en un agitador orbital a 200 rpm durante 24 horas, de acuerdo al método descrito en el punto **2.2.1**. La enzima utilizada fue el preparado comercial Lipozyme TL IM (de *Thermomices lanuginosus*, Novozymes), donde la enzima se encuentra soportada sobre gránulos de sílice, el cual se adicionó a una relación másica del 10 % respecto a la masa de lípidos. Luego del período de reacción el catalizador se separó de los productos por decantación y se almacenaron en freezer a -20 °C bajo atmósfera de N₂ hasta su análisis.

La composición en ácidos grasos y la composición en triacilglicéridos se determinaron mediante los métodos ya descritos en los puntos **2.2.3** y **2.2.4**, respectivamente.

3.2.1.- Composición en ácidos grasos de la posición sn – 2

Se determinó la composición en ácidos grasos de la posición *sn*-2 de los triacilgliceroles de los materiales de partida y de los productos de interesterificación mediante el método de hidrólisis parcial con lipasa pancreática porcina (PPL), basado en la norma AOCS Ch 3-91.

Purificación del sustrato: Previamente se realizó la purificación de los TAG del material graso mediante el pasaje del mismo a través de una columna de alúmina (activada a 200°C, 3h). La columna se cargó con 2 g de alúmina suspendidos en 4 mL de hexano. Se preparó una solución de la muestra a analizar en hexano de una concentración de aproximadamente 200 mg/mL, la cual se pasó a través de la columna en un volumen tal que no se superara la relación de 333 mg de lípidos por gramo de alúmina. Luego de pasar por la columna la solución conteniendo la muestra se pasó 1 mL de hexano a los efectos de completar la elución de los lípidos de interés. Se eliminó el solvente del eluato mediante corriente de nitrógeno y el residuo lipídico constituido por los TAG purificados se destinaron a la hidrólisis catalizada por PPL.

Hidrólisis con PPL: Se colocó 0,1 g de los TAG purificados en un tubo de centrifuga y se agregó 0,2 mL de Hexano, se adicionó 20 mg de lipasa, 2 mL de solución buffer pH 8,0 de tris-hidroximetil-aminometano, 0,5 mL de solución de colato de sodio (1 g/L) y 0,2 mL de solución de cloruro de calcio (220 g/L). Se tapó el tubo, se agitó cuidadosamente y se colocó en un baño de agua a 40 °C donde se mantuvo por exactamente 1 min. Transcurrido este tiempo el tubo se retiró del baño a 40 °C y se agitó en vortex por exactamente 2 min. Se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico (6 N) y 1 mL de dietiléter y se agitó en vortex nuevamente. Se separó la capa orgánica conteniendo los lípidos de interés.

Separación de los 2-MAG generados: La solución conteniendo los lípidos se sembró en una banda continua sobre una placa para TLC, la que se desarrolló utilizando una fase móvil compuesta por hexano/dietileter/ácido acético (50:50:1). La placa se expuso a vapores de yodo y se identificó la banda correspondiente a los 2-monoacilgliceroles (2-MAG), se raspó la faja de sílice conteniendo la misma y se la reservó en un tubo de ensayo. Sobre las sílice conteniendo los 2-MAG (sin la extracción previa de los mismos) se procedió a realizar la derivatización de los mismos a sus correspondientes ésteres metílicos (método de derivatización utilizando BF₃/MeOH) para su posterior análisis por GC, como se describe en 2.2.2.

3.2.2. Interesterificación mediante catálisis química

El proceso se desarrolló según lo reportado por Rousseau et al. (1996). Se colocaron 8 g de la mezcla de lípidos a interesterificar en un tubo con tapa rosca. Se

pasó un flujo de nitrógeno a través del material graso durante 2 horas a 50 °C para eliminación del agua y el aire que el mismo pudiera contener.

Luego se agregó un 0,5 % (m/m) de metóxido de sodio como catalizador de la reacción, y se eliminó el oxígeno del espacio de cabeza del tubo por venteo con nitrógeno. La reacción se llevó a cabo en un baño de agua a 80 °C y con agitación magnética durante 1 hora.

Luego se adicionó un exceso de ácido cítrico para finalizar la reacción. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 12 mL de agua a 70 °C. El material resultante se secó con sulfato de sodio y se destinó al análisis de TAG.

3.3.- Resultados y discusión

3.3.1.- Composición de las mezclas iniciales y sus productos de interesterificación enzimática

3.3.1.1.- Composición en ácidos grasos

Se determinó la composición en ácidos grasos de las tres materias primas de interés (BT, HOSFO y RBO) y a partir de éstas la de las diferentes mezclas fue determinada por cálculo, considerando la proporción de cada material en cada mezcla. Dado que el proceso de interesterificación no implica modificación alguna en la estructura de los ácidos grasos contenidos en la mezcla de reacción, la composición en ácidos grasos de las mezclas de partida es la misma que la de los productos interesterificados.

En la **Tabla 3.1** se muestra los principales ácidos grasos de la BT y el HOSFO puros y la de sus mezclas.

Se destaca la alta proporción de ácido oleico en el HOSFO que alcanza a un 88,2 %, característica por la cual este aceite suele presentar una estabilidad oxidativa muy alta. En cuanto a la BT se observa que está compuesta principalmente por los ácidos esteárico, palmítico y oleico en una concentración de 26,7; 25,7 y 37,9 %, respectivamente. Es importante destacar que dentro del contenido de oleico están incluidos los isómeros *trans* del mismo, los que corresponden a un 5,2 % del total de ácidos grasos de BT. Otro aspecto importante es que los SFA constituyeron más de un 50 % de los ácidos grasos, lo cual confiere a la BT la característica de grasa “dura”, con un elevado punto de fusión.

Obviamente el aumento en la proporción de aceite en la mezcla incrementó la concentración de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, característicos del

HOSFO), a la vez que disminuyó la concentración de los ácidos grasos saturados (SFA, propios de la BT). Dado que el HOSFO no aporta cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), el porcentaje de los mismos en las mezclas alcanza un máximo de tan solo 3,1 % (correspondiente a la mezcla conteniendo 50 % de HOSFO).

Tabla 3.1.- Composición en ácidos grasos de la BT y el HOSFO puros y de sus mezclas en diferente proporción

Ácido graso ⁽¹⁾	BT	HOSFO	Proporción de HOSFO (%m)				
			10	20	30	40	50
14:0	2,8	nd ⁽²⁾	2,5	2,2	2,0	1,7	1,4
16:0	25,7	3,5	23,5	21,3	19,0	16,8	14,6
16:1	2,8	nd ⁽²⁾	2,5	2,2	2,0	1,7	1,4
17:0	1,4	nd ⁽²⁾	1,3	1,1	1,0	0,8	0,7
17:1	0,5	nd ⁽²⁾	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3
18:0	26,7	2,5	24,3	21,9	19,4	17,0	14,6
18:1	37,9 ⁽³⁾	88,2	42,9	48,0	53,0	58,0	63,1
18:2	0,8	4,6	1,2	1,6	1,9	2,3	2,7
18:3	0,7	nd ⁽²⁾	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4
SFA⁽⁴⁾	56,6	6,0	51,5	46,5	41,4	36,4	31,3
MUFA⁽⁵⁾	41,2	88,2	45,9	50,6	55,3	60,0	64,7
PUFA⁽⁶⁾	1,5	4,6	1,8	2,1	2,4	2,7	3,1

Notas: (1) sólo se muestran los ácidos grasos contenidos en un 0,5 % o más en los materiales grasos puros, (2) no se detectó, (3) incluye aprox. un 5 % del isómero trans, (4) ácidos grasos saturados, (5) ácidos grasos monoinsaturados, (6); ácidos grasos poliinsaturados.

Dado que ambos materiales grasos aportan ácido oleico, éste estará presente en cantidad importante en todas las mezclas BT/HOSFO, acompañado por los ácidos palmítico y esteárico aportados en cantidad significativa por la BT. En la **Figura 3.1** se observa la concentración de estos tres ácidos grasos en función del porcentaje de aceite en la mezcla. Obviamente la concentración de ác. oleico se incrementó con la proporción de HOSFO, mientras que los ácidos saturados aportados por la BT disminuyeron su concentración.

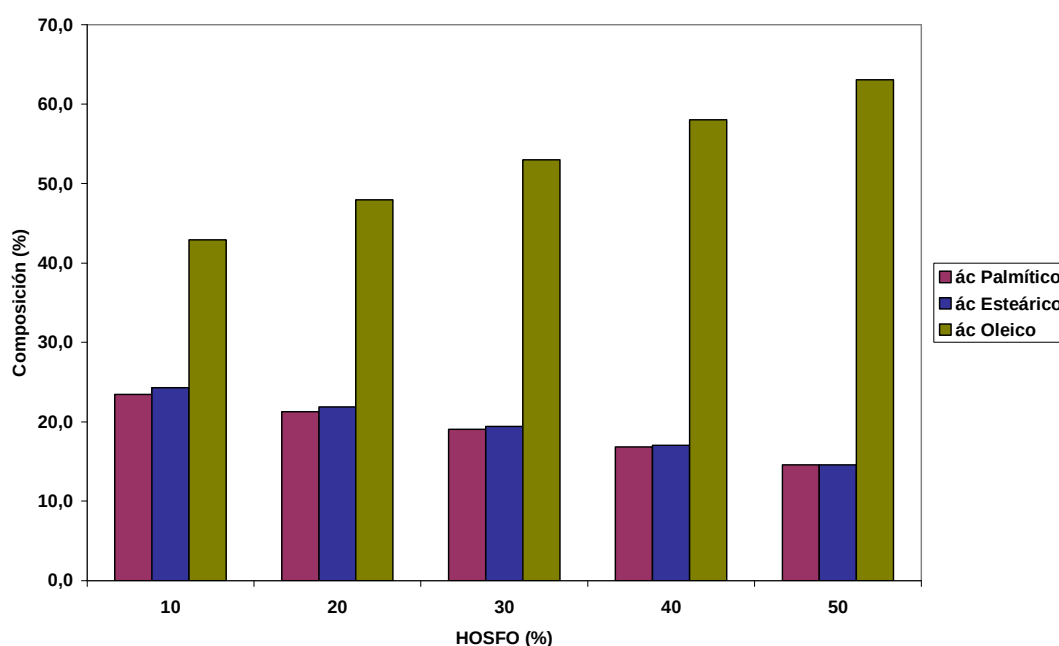


Figura 3.1.- Porcentaje de los ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico en las mezclas BT/HOSFO en función del porcentaje de aceite.

La **Tabla 3.2** muestra la composición en ácidos grasos de la BT y el RBO puros y de sus mezclas en diferente proporción. Se observa que, además del contenido relativamente elevado de los ácidos grasos oleico (41,3 %) y linoléico (33,4 %), este aceite presenta la particularidad de un alto contenido en ácidos grasos saturados, particularmente palmítico (18,2 %).

Al igual que para el caso de las mezclas que contienen HOSFO, el aumento en la proporción de aceite produjo un gradual descenso en el contenido de ácidos grasos saturados en la mezcla. Sin embargo, dado que el contenido de MUFA en ambos materiales grasos es prácticamente el mismo, todas las mezclas presentaron un contenido de estos ácidos similar (en el entorno del 41 %). Ya que ambos materiales grasos presentan diferencias significativas en el contenido de PUFA, el aumento de la proporción de RBO incrementó el contenido de este grupo de ácidos grasos (constituido prácticamente en su totalidad por 18:2) en las mezclas.

Tabla 3.2.- Composición en ácidos grasos de la BT y el RBO puros y de sus mezclas en diferente proporción.

	BT	RBO	Proporción de RBO (%m)				
			10	20	30	40	50
14:0	2,8	<i>nd</i>	2,5	2,2	2,0	1,7	1,4
16:0	25,7	18,2	25,0	24,2	23,5	22,7	22,0
16:1	2,8	<i>nd</i>	2,5	2,2	2,0	1,7	1,4
17:0	1,4	<i>nd</i>	1,3	1,1	1,0	0,8	0,7
17:1	0,5	<i>nd</i>	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3
18:0	26,7	1,8	24,2	21,7	19,2	16,7	14,3
18:1	37,9	41,3	38,2	38,6	38,9	39,3	39,6
18:2	0,8	33,4	4,1	7,3	10,6	13,8	17,1
18:3	0,7	1,4	0,8	0,8	0,9	1,0	1,1
SFA	56,6	20,0	52,9	49,3	45,6	42,0	38,3
MUFA	41,2	41,3	41,2	41,2	41,2	41,2	41,3
PUFA	1,5	34,8	4,8	8,2	11,5	14,8	18,2

Nota: la nomenclatura es la misma que se utilizó en la **Tabla 3.1**.

Los ácidos grasos principales en estas mezclas son los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico. En la **Figura 3.2** se observa el comportamiento de la concentración de los mismos frente al aumento de la proporción de RBO en la mezcla. Dado que ambos materiales contienen ac. palmítico y ac. oléico en cantidades importantes, la concentración de los mismos en las mezclas no cambia en forma importante con el aumento en la proporción de RBO.

El ácido esteárico, al igual que en las mezclas BT/HOSFO disminuye con el aumento de la cantidad de aceite, ya es aportado exclusivamente por la BT. En cambio el ácido linoleico, propio del RBO, aumenta gradualmente con la cantidad de aceite en la mezcla.

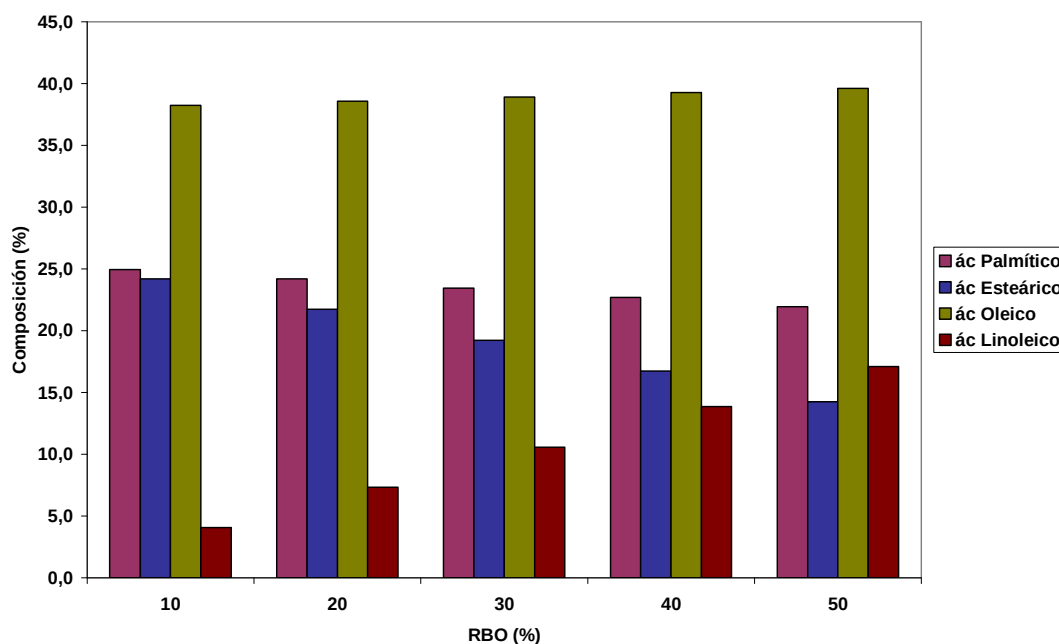


Figura 3.2.- Porcentaje de los ácidos grasos palmítico, estearico y oleico en las mezclas BT/RBO en función del porcentaje de aceite.

La dilución de los SFA constatada para ambos aceites es un aspecto positivo desde el punto de vista nutricional. Junto con ellos también se diluyen los ácidos grasos *trans* y el colesterol de la BT en la medida que aumenta la cantidad de aceite. Estos se encuentran en una concentración de 5,2 % de ácidos grasos *trans* y 1090 ppm de colesterol (Firestone 2006) en la BT original y por tanto a medida que la misma disminuye en la mezcla la concentración de los mismos también disminuye en forma proporcional.

3.3.1.2.- Composición en triacilgliceroles

A diferencia de lo que ocurre con la composición en ácidos grasos de las mezclas, que se mantiene constante durante la interesterificación, la composición en TAG sufre cambios significativos durante este proceso, siendo en definitiva éste el efecto que se busca cuando se aplica este tipo de proceso y lo que le confiere interés tecnológico al mismo.

La **Figura 3.3** muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC (descrito en 2.2.3) de las tres materias primas de interés. En este tipo de análisis el tiempo de retención aumenta con un parámetro llamado “número equivalente de carbono” (ECN) el cual se define como el número total de carbonos de los tres ácidos grasos constituyentes del TAG menos dos veces el número total de insaturaciones del mismo ($ECN = CN - 2NI$). Por este motivo, como se observa en la **Figura 3.3**, la mayoría de los TAG de la BT (más saturado) presentará tiempos de retención superiores a la mayoría de los TAG

de los aceites. Prácticamente no hay coincidencia en los tiempos de retención de los picos principales de la BT y el HOSFO o de la BT y el RBO (excepto algunos pocos). Esta característica del método lo convierte en muy conveniente a la hora de analizar las mezclas de la BT con ambos aceites, si bien luego los productos de interesterificación contendrán una población de TAG más compleja y de más difícil resolución que las mezclas de partida. Se debe considerar que el método no separa isómeros posicionales, por lo que cuando, por ejemplo, se identifica el pico como correspondiente al POO, sólo se está indicando que el mismo corresponde al conjunto de los TAG constituidos por un ácido palmítico y dos ácidos oleicos (pudiendo ser además de POO, OPO, OOP, o una combinación de cualquiera de ellos).

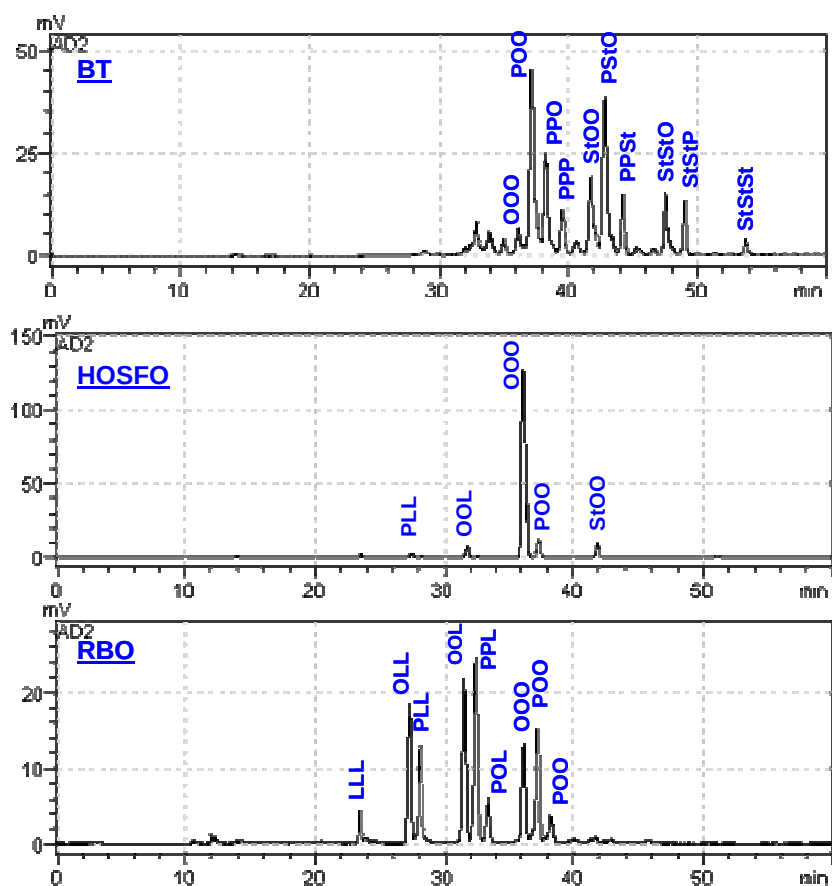


Figura 3.3.- Cromatogramas obtenidos por análisis por HPLC de los triacilglicérols constituyentes de las tres materias primas de interés (BT, HOSFO y RBO), según el método descrito en 2.2.3

En la **Tabla 3.3** se muestra la composición en triacilglicérols de la BT y el HOSFO puros, de sus mezclas en diferentes proporciones y de los productos obtenidos de la interesterificación enzimática de las mezclas durante 24 h.

Como era de esperar el HOSFO presentó una alta concentración de TAG triinsaturados (UUU), correspondientes casi en su totalidad a la trioleína (OOO), que alcanzó un 85,5 % del total de TAG. Asimismo, no se detectó la presencia de TAG

trisaturados (SSS) o disaturados monoinsaturados (SSU), lo que es coherente con la baja concentración de SFA en este aceite.

En cambio la BT mostró su población de TAG distribuida principalmente entre los dos grupos de grado de saturación intermedia: SSU y SUU, 39,0 y 39,6 % respectivamente. Si bien la concentración de TAG tipo SSS fue inferior (15,4 %) su nivel no es despreciable, mientras que el contenido de TAG tipo UUU si fue claramente minoritario (3,0 %).

Tabla 3.3.- Composición en triacilgliceroles de la BT y el HOSFO puros, de sus mezclas en diferentes proporciones y de los productos obtenidos por interesterificación enzimática (Lipozyme TL IM) de las mismas durante 24 h.

TAG	BT	HOSFO	Proporción de HOSFO (%m)										
			0	10		20		30		40		50	
			P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
OLL	nd	0,5	nd	0,1	nd	0,1	nd	0,2	nd	0,2	nd	0,3	nd
OOL	nd	1,9	nd	0,2	nd	0,4	nd	0,6	nd	0,8	nd	1,0	nd
PoOO	0,5	nd	0,9	0,5	1,0	0,4	2,3	0,4	2,6	0,3	2,1	0,3	2,8
PPoO	4,2	nd	3,9	3,8	4,1	3,4	4,7	2,9	4,3	2,5	3,9	2,1	3,5
MiOO	2,7	nd	3,1	2,4	2,3	2,2	2,7	1,9	2,0	1,6	1,4	1,4	1,2
MiPO	1,1	nd	1,4	1,0	1,0	0,9	1,5	0,8	0,8	0,7	0,6	0,6	0,5
OOO	2,5	85,5	4,5	10,8	7,2	19,1	10,7	27,4	16,1	35,7	24,2	44,0	30,9
POO	22,4	5,9	15,5	20,8	18,4	19,1	19,4	17,5	22,1	15,8	23,3	14,2	22,7
PPO	11,9	nd	13,3	10,7	11,4	9,5	9,9	8,3	7,9	7,1	6,0	6,0	4,6
PPP	3,8	nd	1,4	3,4	3,5	3,0	3,2	2,7	2,0	2,3	1,6	1,9	1,2
StOO	10,3	3,6	10,4	9,6	11,4	9,0	15,0	8,3	17,1	7,6	17,8	7,0	17,3
PStO	18,8	nd	18,8	16,9	16,2	15,0	13,7	13,2	11,7	11,3	9,0	9,4	6,4
PPSt	5,4	nd	6,2	4,9	4,5	4,3	3,0	3,8	2,0	3,2	1,2	2,7	0,8
StStO	7,2	nd	6,0	6,5	7,4	5,8	4,8	5,0	4,3	4,3	3,3	3,6	2,4
PStSt	4,7	nd	4,3	4,2	3,5	3,8	1,8	3,3	1,3	2,8	0,9	2,4	0,4
StStSt	1,5	nd	1,0	1,4	0,8	1,2	0,6	1,1	0,3	0,9	nd	0,8	nd
SSS	15,4	0,0	12,8	13,9	12,3	12,3	8,6	10,8	5,7	9,2	3,7	7,7	2,4
SSU	39,0	0,0	39,5	35,1	35,9	31,2	29,8	27,3	24,8	23,4	18,9	19,5	13,9
SUU	39,6	9,5	32,9	36,6	36,2	33,6	41,8	30,6	45,4	27,6	46,5	24,6	44,7
UUU	3,0	87,9	5,5	11,5	8,2	20,0	13,0	28,5	18,7	37,0	26,3	45,5	33,7

M: mezcla original; P: producto de interesterificación (24 horas). Mi: mirístico (14:0); P: palmítico (16:0); Po: palmitoleico (16:1); St: esteárico (18:0); O: oleico (18:1); L: linoleico (18:2). SSS: trisaturado; SSU: disaturado monoinsaturado; SUU: monosaturado diinsaturado; UUU: triinsaturado. nd: no se detectó.

Al igual que la composición en ácidos grasos, la composición en TAG de las mezclas es consecuencia de la proporción entre sus constituyentes. En este caso se observa un aumento en la cantidad de TAG del tipo UUU a medida que aumentó el porcentaje de aceite, el cual contiene un 87,9 % de este tipo de TAG. Asimismo, se observó la dilución de los restantes tipos de TAG, propios de la BT, como muestra la **Figura 3.4**.

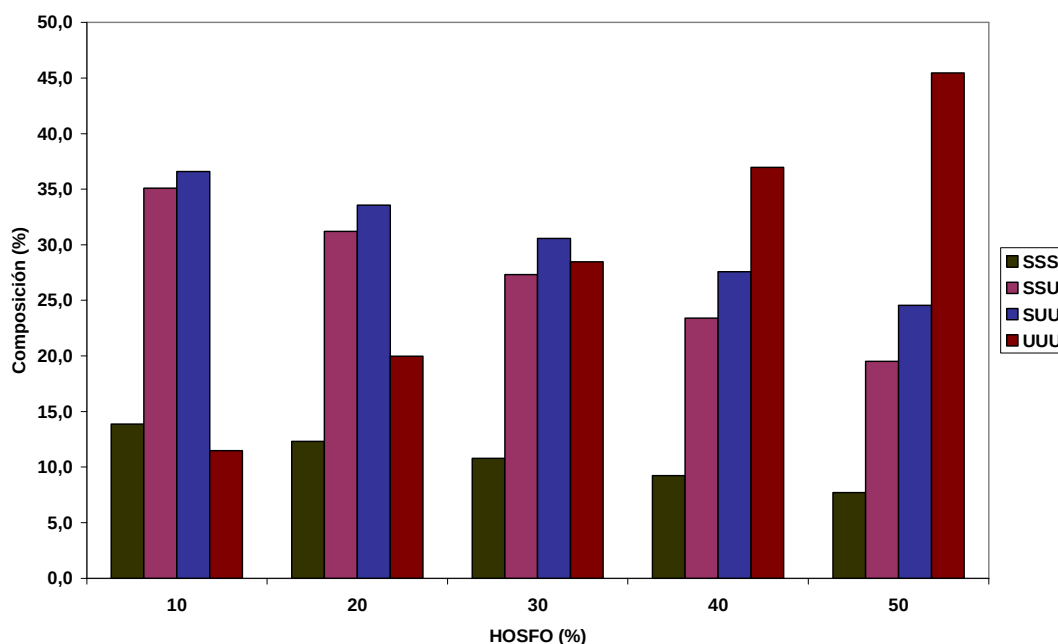


Figura 3.4.- Composición según el tipo de triacilglicerol de las mezclas BT/HOSFO en función del porcentaje de aceite.

En la **Tabla 3.3** los valores correspondientes a la columna conteniendo 0% de HOSFO corresponden al producto obtenido por la interesterificación enzimática de BT 100 %, sin ningún agregado de aceite. Se observan que la interesterificación produjo variaciones pequeñas en su composición en TAG individuales o por tipo de TAG. En general estas variaciones no superaron al 2 %, con la excepción del POO que disminuyó del 22,4 % en el BT al 15,5 % en el producto.

En el caso de las mezclas BT/HOSFO los principales efectos del proceso de interesterificación fueron la disminución en la cantidad de trioleína (OOO) y el aumento de los TAG constituidos por dos ácidos oleico en su molécula (POO y StOO), efectos que resultaron más notorios a medida que se incrementó la proporción de aceite en la mezcla de partida (**Figura 3.5**). Otro TAG importante de la mezcla es el PStO, el cual proviene de la BT y es por ello que disminuye con el aumento en la proporción de aceite en la mezcla, luego del proceso de interesterificación se observa que la concentración del mismo disminuye en todas las proporciones. Estas modificaciones en la composición de los TAG como consecuencia de la interesterificación conducen a

un producto con una población en TAG distribuida de forma más “heterogénea” que la mezcla de partida, por lo que es de esperar que aumente la “compatibilidad” de los componentes de la misma.

Además, estos cambios importantes verificados en la composición en TAG son el primer indicio de que el catalizador fue muy activo y que el proceso de interesterificación ocurrió en forma eficiente.

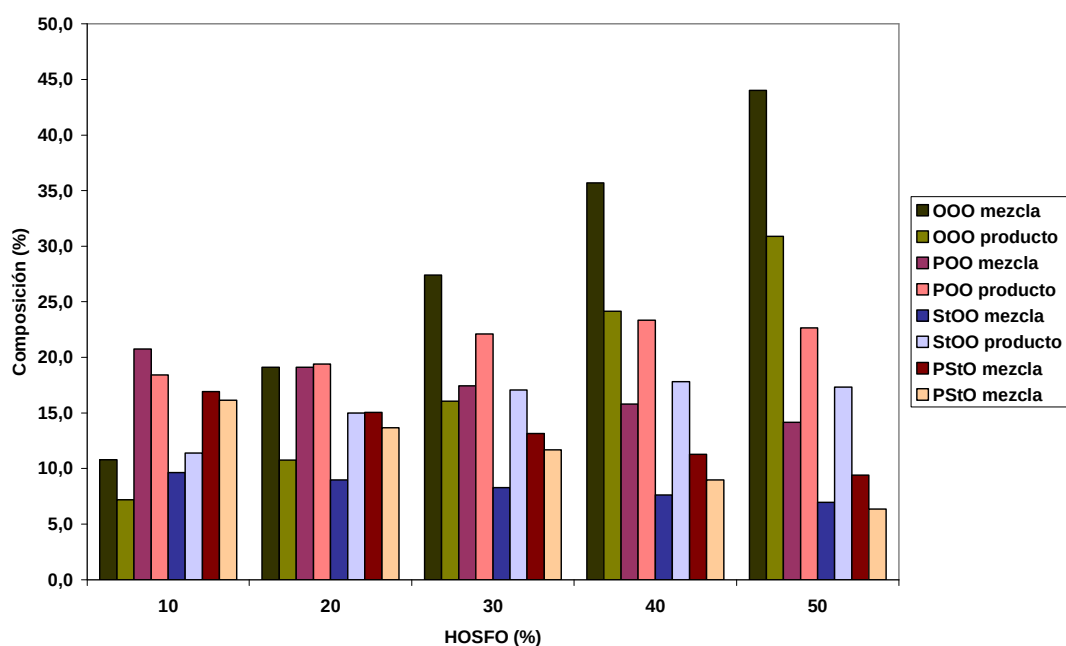


Figura 3.5.- Porcentaje de OOO, POO, PStO y StOO en las mezclas BT/HOSFO y sus respectivos productos de interesterificación en función del contenido de aceite.

Dado que todos los TAG tienen diferente concentración, en lugar analizar el porcentaje “absoluto” de variación de la concentración de cada componente resulta útil definir un parámetro que exprese la variación relativa de la concentración. Además, si a los efectos de simplificar el análisis se agrupan los TAG en tipos según los ácidos grasos que lo componen (S: saturado, U: insaturado), se puede definir el *porcentaje de variación relativo* (RV) como:

$$RV = 100 \frac{(TAG_i)_P - (TAG_i)_M}{(TAG_i)_M}$$

Donde $(TAG_i)_P$ es el porcentaje del TAG_i en el producto y $(TAG_i)_M$ es el porcentaje del TAG_i en la mezcla de partida. Dado que este parámetro se determina considerando sólo las concentraciones de los TAG en la mezcla de partida y el producto correspondiente, permite evaluar el efecto únicamente del proceso de

interesterificación, independientemente del efecto que produjo sobre la composición en TAG el simple mezclado inicial de ambos materiales grasos.

La **Figura 3.6** muestra los valores de RV para los distintos tipos de TAG en función del porcentaje de HOSFO en las mezclas.

Se puede observar que a partir de un 20 % de HOSFO en las mezclas los TAG del tipo SUU aumentaron por efecto de la interesterificación y que el efecto fue mayor a medida que se incrementó la proporción de aceite en la mezcla original. Asimismo se observa el efecto contrario para los TAG del tipo SSS, los que a partir de un 10 % de aceite disminuyeron por efecto de la interesterificación, disminución que fue más importante con el aumento de la proporción de aceite en la mezcla. Los otros dos tipos de TAG mostraron una disminución con la interesterificación creciente con la proporción de aceite en el caso de los TAG tipo SSU y sin una tendencia definida con el porcentaje de aceite en el caso de los tipo UUU.

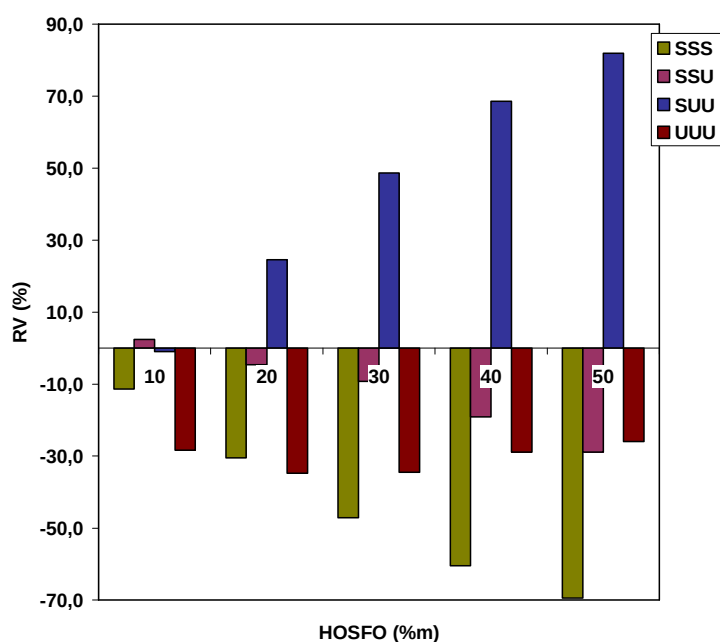


Figura 3.6.- Variación relativa de cada tipo de TAG en las mezclas BT/HOSFO en función del porcentaje de HOSFO (24 h de interesterificación con Lipozyme TL IM).

La **Tabla 3.4** muestra la composición en TAG de la BT y el RBO puros, sus mezclas en diferentes proporciones y los productos obtenidos de la interesterificación enzimática de las mezclas durante 24 h.

Se observa que la mayoría de los TAG constituyentes del RBO corresponden a los tipos UUU y SUU (44,0 y 46,0 %, respectivamente), presentando una pequeña proporción de SSU (7,0 %) y sin que se detectara ninguno del tipo SSS. A diferencia del HOSFO, este aceite no contiene un único TAG preponderante, siendo el principal

el POL con un 22,5 %. Se observa también que las mezclas de la BT con el RBO presentaron una población mayor y más heterogénea de TAG que las mezclas de la BT con el HOSFO.

Tabla 3.4.- Composición en triacilglicerol de la BT y el RBO puros, de sus mezclas en diferentes proporciones y de los productos obtenidos por interesterificación enzimática (Lipozyme TL IM) de las mismas durante 24 h.

TAG	BT	RBO	Proporción de RBO (%m)										
			0	10		20		30		40		50	
			P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
LLL	nd	2,1	nd	0,2	nd	0,4	nd	0,6	nd	0,8	nd	1,1	nd
OLL	nd	13,3	nd	1,3	nd	2,7	nd	4,0	0,7	5,3	1,7	6,7	4,2
PLL	nd	10,5	nd	1,1	2,9	2,1	1,6	3,2	1,9	4,2	2,5	5,3	5,4
OOL	nd	17,1	nd	1,7	1,7	3,4	2,4	5,1	3,7	6,8	6,5	8,6	10,6
PoOO	0,5	nd	0,9	0,5	1,1	0,4	nd	0,4	nd	0,3	nd	0,3	nd
POL	nd	22,5	nd	2,2	2,1	4,5	1,8	6,7	7,4	9,0	14,6	11,2	17,8
PPoO	4,2	nd	3,9	3,8	4,1	3,4	5,9	2,9	2,3	2,5	nd	2,1	nd
PPL	nd	4,7	nd	0,5	nd	0,9	nd	1,4	nd	1,9	nd	2,4	nd
MiOO	2,7	nd	3,1	2,4	4,2	2,2	3,1	1,9	3,6	1,6	4,3	1,4	4,3
MiPO	1,1	nd	1,4	1,0	2,0	0,9	1,2	0,8	1,0	0,7	0,8	0,6	0,5
OOO	2,5	11,5	4,5	3,4	4,8	4,3	4,2	5,2	4,4	6,1	5,3	7,0	4,6
POO	22,4	13,1	15,5	21,5	16,2	20,5	18,0	19,6	17,8	18,7	21,0	17,8	18,3
PPO	11,9	2,3	13,3	10,9	11,9	10,0	12,3	9,0	13,3	8,1	11,3	7,1	8,0
PPP	3,8	nd	1,4	3,4	4,3	3,0	3,3	2,7	3,1	2,3	2,0	1,9	1,5
StOO	10,3	nd	10,4	9,3	9,6	8,2	9,1	7,2	8,5	6,2	7,1	5,2	5,1
PStO	18,8	nd	18,8	16,9	14,4	15,0	14,2	13,2	13,3	11,3	10,0	9,4	6,7
PPSt	5,4	nd	6,2	4,9	4,8	4,3	4,7	3,8	3,8	3,2	2,4	2,7	1,5
StStO	7,2	nd	6,0	6,5	4,0	5,8	4,2	5,0	3,4	4,3	2,2	3,6	1,3
PStSt	4,7	nd	4,3	4,2	2,6	3,8	3,0	3,3	2,2	2,8	1,3	2,4	0,6
StStSt	1,5	nd	1,0	1,4	0,6	1,2	0,6	1,1	nd	0,9	nd	0,8	nd
SSS	15,4	0,0	12,8	13,9	12,3	12,3	11,6	10,8	9,1	9,2	5,7	7,7	3,6
SSU	39,0	7,0	39,5	35,8	32,3	32,6	31,9	29,4	31,0	26,2	24,3	23,0	16,5
SUU	39,6	46,0	32,9	40,2	39,1	40,9	39,5	41,5	41,5	42,2	49,5	42,8	50,9
UUU	3,0	44,0	5,5	7,1	7,6	11,2	6,6	15,3	8,8	19,4	13,5	23,5	19,4

Nota: la nomenclatura es la misma que se utilizó en la **Tabla 3.3**.

La **Figura 3.7** presenta la composición por tipo de TAG de las mezclas BT/RBO. Se puede observar que en las mezclas disminuyeron los TAG más saturados y aumentaron los del tipo UUU en la medida que la proporción de aceite aumentó. Este efecto fue observado también en las mezclas de BT/HOSFO y como en ese caso se debe a que los TAG con mayor número de insaturados provienen del aceite mientras que los de mayor número de saturados provienen de la BT. También un muy leve incremento gradual de la concentración de los TAG tipo SUU (que casi permanecen constantes) con el incremento del porcentaje de aceite, mientras que los TAG con dos o tres ácidos grasos saturados (SSS y SSU) disminuyen su concentración

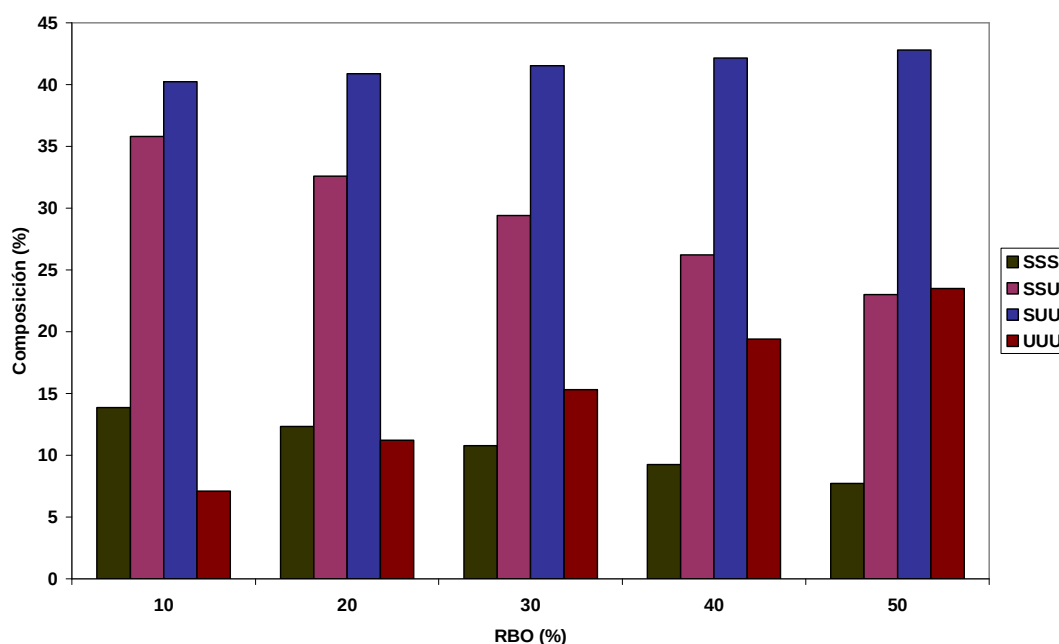


Figura 3.7.- Composición según el tipo de triacilglicerol de las mezclas de BT/RBO en función del porcentaje de aceite.

En la **Figura 3.8** se presentan la composición de algunos de los TAG de las mezclas de BT/RBO y en sus respectivos productos de interesterificación. Se observa que cada TAG dependiendo de su origen aumenta o disminuye al aumentar la proporción de aceite, aumentan los provenientes del RBO y disminuyen los provenientes de la BT. En cuanto a POO que está presente en ambas materias primas, este disminuye ya que está en mayor proporción en BT (22,4 % en BT y 13,1 % en RBO). Luego del proceso de interesterificación se observan comportamientos diferentes según el TAG y la proporción de aceite en la mezcla.

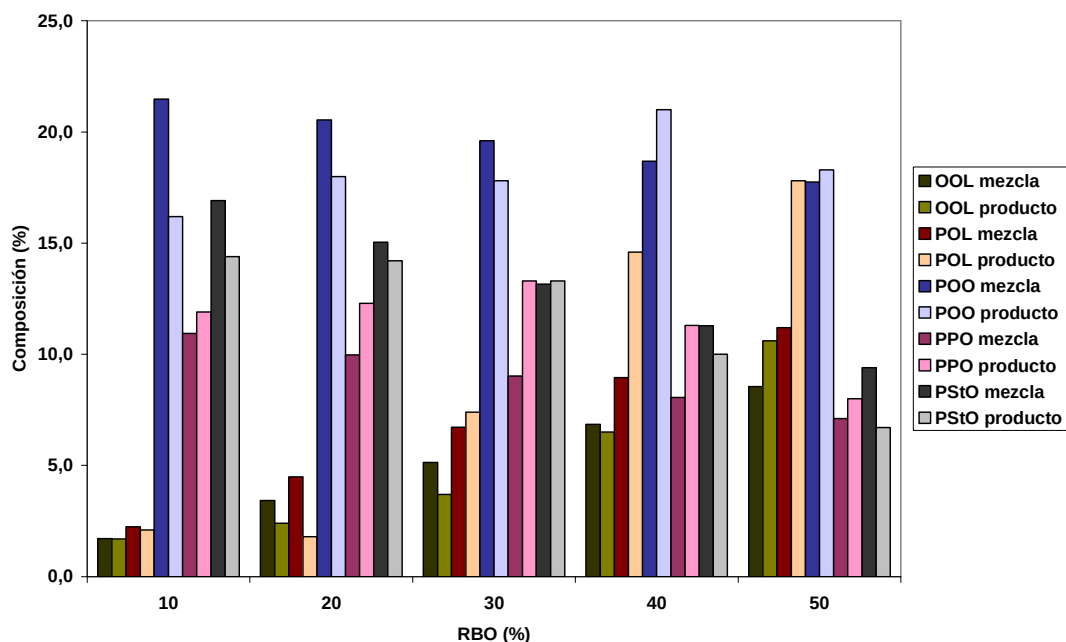


Figura 3.8.- Porcentaje de OOL, POL, POO, PStO y PPO en las mezclas BT/RBO y sus respectivos productos de interesterificación en función del contenido de aceite.

La variación de los valores de RV, calculados como se indicó anteriormente, en función del porcentaje de RBO en las mezclas se muestra en la **Figura 3.9**. Se observan valores de RV positivos para los TAG del tipo SUU, lo que significa que su concentración se incrementó por efecto de la interesterificación. Este efecto fue más importante a medida que aumentó la proporción de aceite en la mezcla. La concentración de los TAG del tipo SSS también disminuyeron por efecto de la interesterificación, excepto en la mezcla conteniendo un 20% de RBO, que mostró un RV levemente positivo. Luego, a mayores concentraciones de aceite la disminución en la concentración de este tipo de TAG en los productos se volvió más notoria (valores de RV muy negativos) En el caso de los TAG tipo UUU su concentración disminuyó para todas las proporciones de aceite en la mezcla excepto para la 10%, mientras que la variación de los TAG tipo SSU no mostraron una tendencia definida con la proporción de aceite.

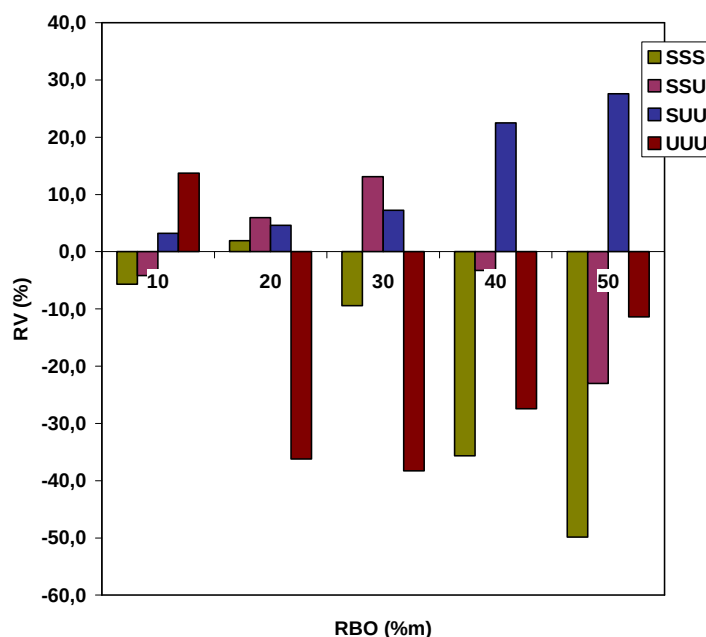


Figura 3.9.- Variación relativa (RV) para cada tipo de TAG producida por la interesterificación enzimática durante 24 h de las mezclas BT/RBO en diferente proporción.

3.3.1.3.- Composición en ácidos grasos de la posición *sn*-2

Las propiedades fisicoquímicas y el valor nutricional de las grasas y los aceites no son únicamente determinados por su composición en ácidos grasos y en TAG, sino que dependen también de la distribución de los diferentes tipos de ácidos grasos constituyentes de los TAG entre las tres posiciones del glicerol (o regiodistribución de los ácidos grasos). Por este motivo resulta interesante analizar qué modificaciones introduce el proceso enzimático en relación a este aspecto hasta el momento desconocido, ya que como se mencionó anteriormente la composición en TAG determinada por HPLC sólo indica qué ácidos grasos constituyen el TAG, pero no la regiodistribución de los mismos.

La **Tabla 3.5** muestra la composición global en ácidos grasos de los tres materiales grasos de interés (datos ya mostrados en la **Tabla 3.2**), la composición en ácidos grasos de la posición *sn*-2 (determinada por el método de hidrólisis con lipasa pancreática (ver punto 3.2.1) y la distribución porcentual de cada ácido graso entre las posiciones *sn*-2 y la suma de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3.

Se observa que los SFA prácticamente no se encuentran presentes en la posición *sn*-2 de ninguno de los aceites, verificándose sólo un 2,2 y un 5,3 % del total de los SFA en esta posición para el HOSFO y el RBO, respectivamente. Esta tendencia se ha observado en general para los aceites vegetales, en los que los SFA se ubican

preferentemente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 mientras que la posición *sn*-2 se enriquece en ácidos grasos insaturados (Bockisch 1993).

Tabla 3.5.- Regiodistribución de los ácidos grasos en los TAG constituyentes de las tres materias primas de interés.

Ácido graso	BT				HOSFO				RBO			
	Composición ⁽¹⁾		Distribución ⁽²⁾		Composición		Distribución		Composición		Distribución	
	Global	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3	Global	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3	Global	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3
14:0	2,8	4,7	56,0	44,0	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>	<i>nd</i>
16:0	25,7	13,7	17,8	82,2	3,5	0,2	1,9	98,1	18,2	2,7	4,9	95,1
16:1	2,8	4,1	48,8	51,2	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>	<i>nd</i>
17:0	1,4	1,0	23,8	76,2	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>	<i>nd</i>
17:1	0,5	0,8	53,3	46,7	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>	<i>nd</i>
18:0	26,7	13,8	17,2	82,8	2,5	0,2	2,7	97,3	1,8	0,5	9,3	90,7
18:1	37,9	49,4	43,4	56,6	88,2	95,9	36,2	63,8	41,3	46,1	37,2	62,8
18:2	0,8	1,5	62,5	37,5	4,6	3,4	24,6	75,4	33,4	50,1	50,0	50,0
18:3	0,7	0,6	28,6	71,4	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1,4	<i>nd</i>	<i>Nd</i>	<i>nd</i>
SFA	56,6	33,2	19,6	80,4	6,0	0,4	2,2	97,8	20,0	3,2	5,3	94,7
MUFA	41,2	54,3	43,9	56,1	88,2	95,9	36,2	63,8	41,3	46,1	37,2	62,8
PUFA	1,5	2,1	46,7	53,3	4,6	3,4	24,6	75,4	34,8	50,1	48,0	52,0

Notas: (1) composición "global" en ácidos grasos de cada material graso y composición de la posición *sn*-2. (2) Distribución porcentual de cada ácido graso entre las posiciones *sn*-2 y (*sn*-1 + *sn*-3).

También la BT mostró alguna tendencia en el mismo sentido, si bien en este caso el porcentaje del total de los SFA ubicados en *sn*-2 alcanzó a un 19,6 %.

Considerando que una distribución aleatoria de un ácido graso implicaría un 33,3 % del mismo en la posición *sn*-2 y un 66,7 % en la suma de posiciones *sn*-1 y *sn*-3, se observa que prácticamente no se encontró una distribución preferencial para los MUFA para los aceites (36,2 y 37, 2 % en HOSFO y RBO, respectivamente). En el caso de la BT, la proporción de MUFA en posición *sn*-2 alcanza un 43,9 %, lo que indica cierto grado de preferencia de estos ácidos grasos por esta posición.

En cuanto a la distribución de los PUFA, tanto la BT como el RBO presentaron cierta preferencia por ubicar estos ácidos grasos en posición *sn*-2, con porcentajes de los mismos de 46,7 y 48,0 % en dicha posición para la BT y el RBO, respectivamente. En cambio en el caso del HOSFO estos ácidos grasos presentaron preferencia por las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, alcanzando un 75,4 % de PUFA en las mismas.

Estos resultados coinciden en gran medida con lo informado por Jennings y Akoh (2009) para el RBO, quienes encontraron un 7; 38 y 50 % de los SFA, MUFA y PUFA, respectivamente, en la posición *sn*-2 de los TAG de dicho aceite.

En el caso del HOSFO Fernández-Moya *et al.* (2005) estudiaron la regiodistribución en diferentes variedades de aceite de girasol e informaron para el HOSFO un 3,4 % de los SFA, un 37,4 % de los MUFA y un 23,2 % de los PUFA en la posición *sn*-2 de los TAG, lo que está de acuerdo a lo encontrado en este trabajo.

La **Tabla 3.6** muestra el efecto de la interesterificación sobre la regiodistribución de los ácidos grasos en la BT. Se pueden observar algunos cambios importantes en la composición de la posición *sn*-2: el ácido palmítico pasó de un 13,7 % en la BT a un 23,7 % en IBT, el ácido esteárico de un 13,8 % a un 23,9 % y el ácido oleico de un 49,4 % a un 35,9 % respectivamente. Este efecto no se esperaba, ya que, como se mencionó anteriormente, el catalizador utilizado ha sido reportado como *sn*-1,3 específico, por lo que de ser así la posición *sn*-2 de los TAG debería haber permanecido inalterada.

Tabla 3.6.- Composición en ácidos grasos en el TAG y en las distintas posiciones del TAG de BT y su producto de interesterificación de 24 horas de incubación.

Ácido graso	BT				IBT			
	Composición ⁽¹⁾		Distribución ⁽²⁾		Composición ⁽¹⁾		Distribución ⁽²⁾	
	Global	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3	Global	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1 + <i>sn</i> -3
14:0	2,8	4,7	56,0	44,0	2,8	3,1	36,9	63,1
16:0	25,7	13,7	17,8	82,2	25,7	23,7	30,7	69,3
16:1	2,8	4,1	48,8	51,2	2,8	2,9	34,5	65,5
17:0	1,4	1,0	23,8	76,2	1,4	1,4	33,3	66,7
17:1	0,5	0,8	53,3	46,7	0,5	0,6	40,0	60,0
18:0	26,7	13,8	17,2	82,8	26,7	23,9	29,8	70,2
18:1	37,9	49,4	43,4	56,6	37,9	35,9	31,6	68,4
18:2	0,8	1,5	62,5	37,5	0,8	0,9	37,5	62,5
18:3	0,7	0,6	28,6	71,4	0,7	0,5	23,8	76,2
SFA	56,6	33,2	19,6	80,4	56,6	52,1	30,7	69,3
MUFA	41,2	54,3	43,9	56,1	41,2	39,4	31,9	68,1
PUFA	1,5	2,1	46,7	53,3	1,5	1,4	31,1	68,9

Nota: la nomenclatura es la misma que se utilizó en la **Tabla 3.5**.

La **Figura 3.10** muestra la composición en tipo de ácido graso en la posición *sn*-2 para las mezclas de BT/HOSFO y sus respectivos productos de interesterificación.

Para las mezclas se pueden observar las tendencias en la composición de posición *sn*-2 de los TAG esperadas en función del aporte de cada componente: la proporción de los MUFA en posición *sn*-2 aumenta mientras que la de los SFA disminuye en la medida que el porcentaje de aceite aumenta. Los PUFA no presentaron variaciones notorias ya que en se encuentran en muy baja concentración en ambos componentes de la mezcla.

En relación a los cambios introducidos por el proceso de interesterificación se observa que los SFA incrementaron su proporción en *sn*-2, mientras que los MUFA mostraron una disminución. Como se mencionó anteriormente estos cambios resultaron relativamente inesperados a juzgar por los reportes relativos a la especificidad 1,3 del catalizador utilizado.

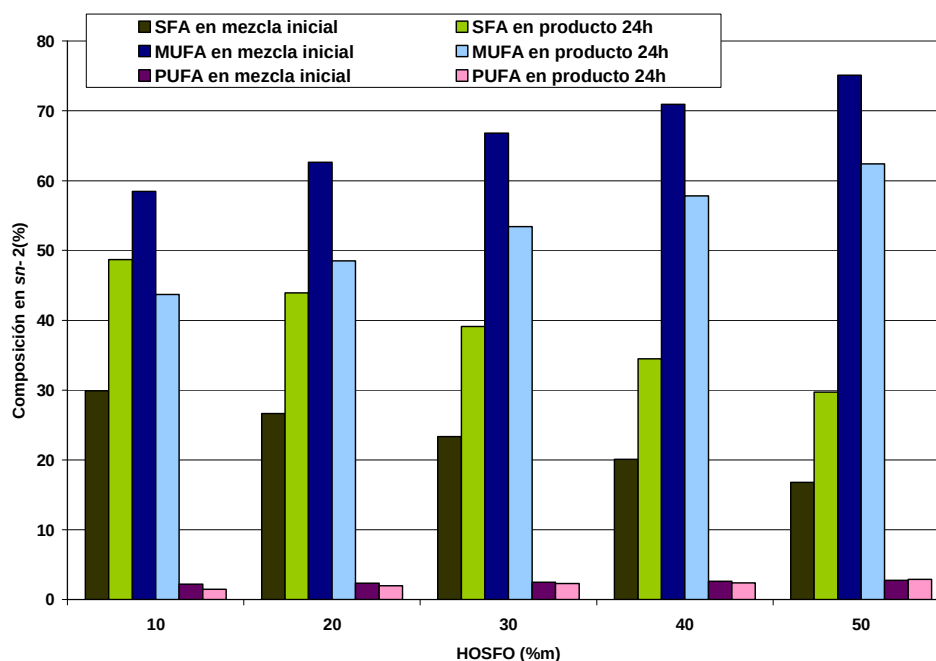


Figura 3.10.- Composición en tipo de ácido graso de la posición *sn*-2 de los TAG de las mezclas BT/HOSFO y sus respectivos productos de interesterificación.

Las **Tablas 3.7 y 3.8** muestran para las mezclas y productos de los sistemas BT/HOSFO y BT/RBO la distribución porcentual de cada ácido graso entre las posiciones *sn*-2 y la suma de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. Se aprecia que los porcentajes en *sn*-2 para los productos se aproximan al 33 % en todos los casos, lo que sugiere que el proceso de interesterificación transcurre sin especificidad posicional alguna y que se aproxima a lo que se conoce como una randomización (típica de los procesos en los que se utiliza catalizadores químicos, no específicos).

Tabla 3.7.- Porcentaje de cada ácidos grasos en la posición *sn*-2 de los TAG de las mezclas BT/HOSFO y sus productos de interesterificación.

Ácido graso	HOSFO (% m)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
14:0	56,0	38,4	56,0	40,2	56,0	35,7	56,0	37,7	56,0	38,1
16:0	17,5	31,8	17,2	31,8	16,9	31,7	16,4	32,1	15,9	31,7
16:1	48,8	34,4	48,8	32,7	48,8	32,3	48,8	35,7	48,8	35,7
17:0	23,8	34,4	23,8	32,7	23,8	34,0	23,8	35,7	23,8	33,3
17:1	53,3	37,0	53,3	41,7	53,3	38,1	53,3	33,3	53,3	40,0
18:0	17,1	30,3	16,9	30,2	16,7	30,7	16,4	30,4	16,0	30,8
18:1	42,0	31,5	40,8	31,8	39,9	32,1	39,1	32,0	38,4	32,0
18:2	47,7	31,1	40,2	34,2	35,6	32,6	32,5	30,2	30,2	32,1
18:3	28,6	21,2	28,6	23,8	28,6	27,2	28,6	23,8	28,6	28,6
SFA	19,4	31,5	19,1	31,5	18,8	31,5	18,4	31,6	17,9	31,6
MUFA	42,5	31,7	41,3	31,9	40,3	32,2	39,4	32,1	38,7	32,1
PUFA	41,1	27,6	37,1	31,4	34,2	31,6	31,9	29,2	30,1	31,7

Nota: M: mezcla original; P: producto de interesterificación (24 horas). SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. *nd*: no se detecto

La composición en tipo de ácido graso en la posición *sn*-2 de las mezclas BT/RBO y sus productos de interesterificación se muestra en la **Figura 3.11**. Se observa que en este caso la proporción de SFA en *sn*-2 también se incrementó por efecto de la interesterificación, de manera similar a lo informado para las mezclas con HOSFO. También de la misma manera que en las mezclas con HOSFO se puede apreciar un descenso en el porcentaje de PUFA en *sn*-2 por efecto del proceso. Sin embargo ahora la proporción de PUFA es importante y se observa con claridad que la interesterificación "empobrece" la posición *sn*-2 en este tipo de ácido graso.

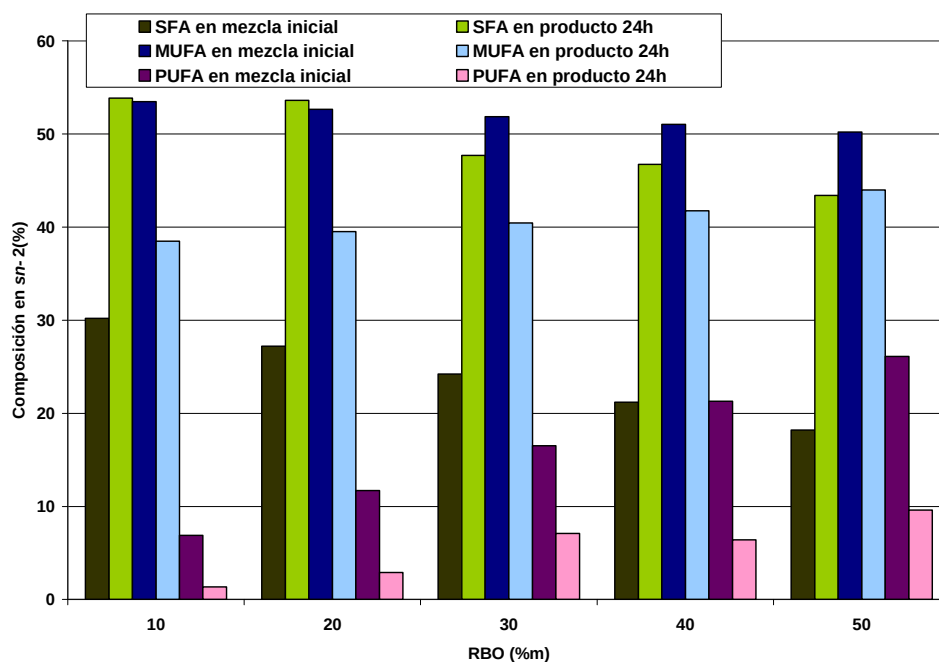


Figura 3.11.- Composición según tipo de ácido graso en la posición *sn*-2 del TAG de las mezclas BT/RBO y sus respectivos productos de interesterificación.

Para los productos de las mezclas BT/RBO, si bien se observó variación en la posición *sn*-2 la misma no alcanzó al 33 %, pero se ubicó próxima a esta, por lo tanto se podría considerar que aquí también la interesterificación ocurrió sin especificidad posicional.

La aparente discrepancia entre la variación en la composición de la posición *sn*-2 de los TAG y la eventual especificidad reportada para este catalizador enzimático, puede explicarse si se consideran los fenómenos de acilmigración de los ácidos grasos. Este efecto por el cual los ácidos grasos en posición *sn*-2 pueden migrar a las posiciones *sn*-1 o *sn*-3 ha sido reportado en varios trabajos sobre catálisis enzimática y en particular para la enzima Lipozyme TL IM (Seriburi y Akoh 1998B). Se trataría de un fenómeno paralelo a la interesterificación propiamente dicha y capaz de ocurrir a una velocidad dependiente de las condiciones del proceso, acelerándose con el aumento de la temperatura y ocurriendo en mayor extensión en incubaciones prolongadas.

Tabla 3.8.- Porcentaje de cada ácidos grasos en la posición *sn*-2 de los TAG de las mezclas BT/RBO y sus productos de interesterificación.

FA	RBO (% m)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
14:0	56,0	41,7	56,0	46,7	56,0	41,3	56,0	45,7	56,0	43,7
16:0	16,8	35,1	15,8	37,1	14,8	35,3	13,7	38,3	12,5	38,0
16:1	48,8	33,9	48,8	38,7	48,8	35,0	48,8	37,2	48,8	40,3
17:0	23,8	34,1	23,8	38,0	23,8	35,9	23,8	38,7	23,8	40,6
17:1	53,3	35,4	53,3	32,8	53,3	35,9	53,3	37,4	53,3	36,1
18:0	17,2	31,8	17,1	34,2	17,0	33,6	16,9	34,6	16,7	36,7
18:1	42,8	30,9	42,1	31,5	41,5	32,5	40,8	33,6	40,2	35,4
18:2	52,2	11,2	51,1	13,1	50,7	21,7	50,4	14,8	50,3	18,1
18:3	23,4	0,0	19,0	0,0	15,4	7,3	12,2	8,0	9,5	9,3
SFA	19,0	33,9	18,4	36,3	17,7	34,9	16,8	37,1	15,8	37,8
MUFA	43,3	31,1	42,6	31,9	41,9	32,7	41,2	33,8	40,6	35,5
PUFA	47,6	9,4	47,8	11,8	47,9	20,6	47,9	14,4	47,9	17,6

Nota: la nomenclatura es la misma que se utilizó en la **Tabla 3.7**.

Para corroborar si debido a lo prolongado del tiempo de incubación utilizado (24h) el efecto de la acilmigración se vio favorecido, se analizó la regiodistribución en los productos obtenidos de la incubación durante sólo 4,5 h de varias de las mezclas de interés (30, 40 y 50 % de aceite). De acuerdo a ensayos previos que se describen en el **Anexo A.1**, a 4,5h ya se alcanza la conversión completa de la reacción de interesterificación.

La distribución de los ácidos grasos en la posición *sn*-2 correspondiente a los productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO y BT/RBO obtenidos luego de 4,5 horas de incubación se muestran en la **Tabla 3.9**. No se observan diferencias importantes entre las composiciones de los productos luego de 4,5 h de incubación con aquellos obtenidos luego de incubaciones prolongadas de 24h (**Tablas 3.7 y 3.8**), por lo que el tiempo de incubación no fue determinante sobre la especificidad del proceso. Si bien el proceso no es específico se desconoce si esto es debido a la existencia de una acil-migración con una cinética muy rápida o si la enzima no se comporta con especificidad alguna.

Tabla 3.9.- Porcentaje de cada ácidos grasos en la posición *sn*-2 de los TAG en los productos obtenidos por interesterificación durante 4,5 h de las mezclas BT/HOSFO y BT/RBO conteniendo 30, 40 y 50 % de aceite.

Ácido graso	HOSFO (%m)			RBO (%m)		
	30	40	50	30	40	50
14:0	51,0	43,7	47,6	45,9	47,6	52,4
16:0	32,2	35,3	35,2	33,8	31,4	35,5
16:1	51,0	39,7	45,2	45,9	59,5	61,9
17:0	34,0	39,7	42,9	40,8	31,7	<i>nd</i>
18:0	31,4	40,7	39,3	36,1	31,1	49,8
18:1	31,1	30,4	29,9	32,3	29,6	32,5
18:2	27,5	25,9	25,9	28,0	27,7	18,9
SFA	32,8	38,3	37,8	35,4	31,9	40,8
MUFA	31,6	30,5	30,1	32,7	30,6	33,3
PUFA	21,9	21,9	23,0	25,8	25,9	17,8

Nota: SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. *nd*: no se detectó

3.3.2.- Comparación de los productos obtenidos mediante catálisis enzimática con los obtenidos mediante catálisis química

Si bien los resultados obtenidos indican que la catálisis enzimática no mostró ninguna especificidad por lo que produjo productos con una composición muy próxima a la correspondiente a los productos randomizados, resulta interesante comparar dichos productos con los obtenidos mediante una randomización "verdadera", es decir, un proceso conducido mediante un catalizador químico no específico.

Con este fin se realizó la interesterificación catalizada mediante metóxido de sodio de las mezclas BT/ HOSFO y BT/RBO conteniendo 50 % de aceite y se determinó la composición en TAG de los productos obtenidos.

En la **Tabla 3.10** se muestran los resultados obtenidos en comparación con aquellos vistos anteriormente para la catálisis enzimática.

Tabla 3.10.- Composición en TAG de los productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO y BT/RBO con 50 % de aceite, obtenidos mediante catálisis química con metóxido de sodio (MeONa) y mediante catálisis enzimática con lipozyme TL IM.

TAG	HOSFO (%m)		RBO (%m)	
	Lipozyme TL IM	MeONa	Lipozyme TL IM	MeONa
OLL	nd	nd	4,6	3,0
PLL	nd	nd	6,0	2,6
OOL	nd	nd	11,7	9,7
PoOO	2,8	3,3	nd	nd
POL	nd	nd	19,7	16,6
PPoO	3,5	3,8	nd	nd
MiOO	1,2	1,2	4,8	4,6
MiPO	0,5	nd	0,6	nd
OOO	30,9	30,4	5,1	6,4
POO	22,7	23,3	20,2	22,8
PPO	4,6	5,3	8,8	12,3
PPP	1,2	1,1	1,7	1,6
StOO	17,3	19,2	5,6	6,8
PStO	6,4	7,5	7,4	9,2
PPSt	0,8	0,7	1,7	2,1
StStO	2,4	2,7	1,4	1,5
PStSt	0,4	0,3	0,7	0,8
SSS	2,4	2,1	4,0	4,5
SSU	13,9	15,5	18,3	23,0
SUU	44,7	47,5	56,3	53,4
UUU	33,7	34,9	21,5	19,1

Se observa que los productos de la mezcla de BT/HOSFO obtenidos por uno y otro tipo de catálisis presentaron una composición en TAG muy similar, lo que confirma el comportamiento no específico del catalizador enzimático.

En el caso de la mezcla BT/RBO se observa alguna diferencia entre los productos obtenidos por ambos tipos de catálisis algo superior a las del caso anterior, sin embargo las diferencias son relativamente menores, pudiéndose afirmar que también

en este caso el producto de la catálisis enzimática tiene una composición muy próxima a las del producto obtenido por randomización química.

3.4.- Conclusión

Los productos obtenidos se pueden considerar "mejorados" desde el punto de vista nutricional si se considera su composición en ácidos grasos frente a la BT pura, ya que por el sólo mezclado con cada uno de los aceites utilizados disminuyeron los SFA y los TFA propios de la BT y se incrementó la concentración de los ácidos grasos insaturados. Este efecto obviamente fue más evidente cuando se incrementó la proporción de aceite en las mezclas.

Por efecto del mezclado de la BT con el HOSFO se constató el aumento de la proporción de los TAG del tipo UUU, proveniente del aceite y una disminución en la cantidad de los otros tipos de TAG. En el caso de las mezclas conteniendo RBO también se incrementó la proporción de los TAG del tipo UUU, disminuyó la de los TAG tipo SSS y SSU, mientras que los tipo SUU no presentaron variaciones importantes, dado que tanto la BT como el RBO contienen TAG de este tipo en cantidad importante.

La interesterificación produjo cambios importantes en la composición de los TAG de las mezclas, indicando que el proceso ocurrió eficientemente. También en el caso de la incubación de la BT pura se produjeron varios cambios en la composición de los TAG, si bien en este caso de menor importancia que en las mezclas.

Por efecto de la interesterificación la proporción de los TAG del tipo SUU en los productos de las mezclas BT/HOSFO se incrementó, efecto que se acentuó con el aumento de la proporción de aceite en la mezcla inicial, mientras que el resto de los TAG disminuyeron luego del proceso.

También en el caso de las mezclas BT/RBO se constató el aumento en la proporción de los TAG tipo SUU por efecto de la interesterificación, así como la disminución de la de los TAG del tipo SSS, efectos también más importantes al aumentar la proporción de aceite. La proporción de los otros tipos de TAG mostraron aumento o disminución, dependiendo de la proporción de aceite en la mezcla.

Se observaron modificaciones en la composición en ácidos grasos de la posición *sn*-2 de los TAG luego del proceso de interesterificación enzimática, la cual en los casos de la BT pura y de las mezclas BT/HOSFO indicaron que el proceso transcurrió con carácter de randomización, lo que se confirmó cuando se comparó la composición de los TAG con la de los productos obtenidos mediante catálisis química. En cuanto a las mezclas BT/RBO si bien las variaciones que se observaron en la composición de ácidos grasos en *sn*-2 no alcanzan la randomización, la misma se encuentra muy próxima.

Los resultados obtenidos demostraron que el proceso de mezclado de la grasa con ambos aceites seguido de la interesterificación enzimática permitió generar nuevos materiales grasos, mejorados desde el punto de vista nutricional en relación a la grasa vacuna de partida y con una población en TAG que sugiere una mayor compatibilidad que la correspondiente al simple mezclado.

3.5.- Bibliografía

- Bockisch M. 1993. Fats and oils handbook. AOCS PRESS: Champaign, Illinois
- Cicero A F G, Gaddi A. 2001. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytotherapy Res* 15 2001: 277-289
- Criado M, Hernández-Martín E, López-Hernández A, Otero C. 2007. Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat. Characterization of the reaction and its products. *J Am Oil Chem Soc* 84:717-726
- Christian H H. 2012. Novozymes-Dinamarca, comunicación personal
- Fernández-Moya V, Martínez-Force E, Garcés R. 2005. Oils from improved high stearic acid sunflower seeds. *J Agric Food Chem* 53:5326-5330.
- Firestone D. 2006. Physical and Chemical Characteristic of Oil, Fats and waxes, 2nd edition. AOCS Press. Washington, D.C.
- Foglia TA, Petruso K, Fearheller SH. 1993. Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures. *J Am Oil Chem Soc* 70:281-285
- Forssell P, Kervinen R, Lappi M, Linko P, Suortti T, Poutanen K. 1992 Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture. *J Am Oil Chem Soc* 69:126-129
- Jachmanián I, Gil M, Grompone MA. 2002. Mejoramiento de las propiedades térmicas y nutricionales de la grasa vacuna uruguaya mediante interesterificación enzimática. *Aceites y Grasas* 46:84-92.
- Jennings B H, Akoh C C. 2009. Characterization of a rice bran oil structured lipid. *J Agric Food Chem* 57:3346-3350.
- Li D, Adhikari P, Shin J A, Lee J H, Kim Y J, Zhu X M, Hu J N, Jin J, Akoh C C, Lee K T. 2010. Lipase catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero *trans* shortening fats. *LWT-Food Sci Technol* 43: 458-464
- Nam S H, Choi S P, Kang M Y, Kozukue N, Friedman M. 2005 Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem* 53: 816-822
- Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed.; Walker, R. E., Ed.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, 1990.
- Pokorný J; Parkányiová J. 2005. Lipids with antioxidant properties. In: Akoh C C; Lai O-M, editors. *Healthful lipids*. Urbana, Illinois: AOCS Press. p. 273-300.

Pal P K, Bhattacharyya D K, Ghosh S. 2001. Modifications of butter stearin by blending and interesterification for better utilization in edible fat products. J Am Oil Chem Soc 78: 31-36

Reena M B, Lokesh B R. 2007. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. J Agric and Food Chem 55: 10461-10469.

Rousseau D, Forestière K, Hill A R, Marangoni A G. 1996. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behaviour and triacylglycerol modifications. J Am Oil Chem Soc 73:963-972.

Seriburi V, Akho C C. 1998A. Enzymatic Interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats. J Am Oil Chem Soc 75:1339-1345

Seriburi V, Akoh C C. 1998B. Enzymatic transesterification of triolein and stearic acid and solid fat content of their products. J Am Oil Chem Soc 75: 511-516

Zhang H, Xu X, Nilsson J, Mu H, Adler-Nissen J, Hoy C E. 2001. Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated *Thermomyces lanuginosa* lipase in a large-scale study. J Am Oil Chem Soc 78: 57-64

Capítulo 4

Propiedades térmicas

4.1.- Introducción	2
4.2.- Métodos.....	4
4.3.- Resultados y discusión	4
4.3.1.- Termogramas de fusión.....	4
4.3.2.- Termogramas de cristalización.....	12
4.3.3.- Contenidos de grasa sólida (CS)	23
4.3.4.- Efecto de la interesterificación sobre la plasticidad	28
4.3.5.- Comparación de las propiedades térmicas de los productos obtenidos con las de productos similares utilizados por la industria alimentaria	30
4.4.- Conclusión.....	34
4.5.- Bibliografía	35

4.1.- Introducción

La interesterificación, como ya se ha mencionado, que consiste básicamente en el reordenamiento de los ácidos grasos en los triacilglicerolos (TAG) de una mezcla, por lo que representa una alternativa para la modificación de las propiedades térmicas que, a diferencia de otros métodos de modificación como la hidrogenación, no incrementa el contenido de ácidos grasos *trans* del material de partida. Éste proceso presenta diferentes aplicaciones, como cambiar el punto de fusión o el perfil térmico de un producto graso, aumentar la compatibilidad de una mezcla de TAG al estado sólido, modificar su plasticidad y sus propiedades de cristalización, así como su textura y propiedades reológicas.

Los cambios de fase de interés en un aceite o grasa de uso comestible obviamente se vinculan con la fusión y la cristalización. La cristalización de un aceite líquido involucra la contracción de volumen y la liberación de calor (exotérmico), mientras que la fusión conlleva los efectos opuestos (expansión y proceso endotérmico). Es bien sabido que las características de los fenómenos de fusión y cristalización de las grasas y aceites comestibles son determinantes sobre las propiedades de los productos que los contienen. Estas propiedades térmicas son consecuencia del perfil de triacilglicéridos (TAG) de las grasas y aceites comestibles (Tan y Che Man 2002).

Es conocido que en los termogramas de fusión de las grasas y los aceites comestibles presentan características muy complejas que no son fácilmente interpretables, lo que es resultado de la naturaleza compleja de los TAG en dichas muestras, fundamentalmente debido a la alta diversidad de estructuras presentes. Además de esto, la posibilidad de las moléculas de TAG de ordenarse de forma diferente en la red cristalina generando diferentes formas (según el tipo de TAG y tratamiento térmico al que se lo somete) da origen a lo que se conoce como fenómeno de polimorfismo, el cual ha sido y es objeto de investigación durante muchos años. Tan y Che Man (2000). La diversidad de moléculas de las muestras y el fenómeno del polimorfismo suelen conducir a perfiles de fusión (o congelación) muy complejos, obteniéndose en general picos superpuestos o con numerosos hombros, que no pueden atribuirse a un único proceso.

Se han publicado diversos trabajos donde se estudia la modificación de las propiedades térmicas de la grasa vacuna (BT) mediante su interesterificación con aceites vegetales mediante la utilización de catalizadores químicos, que conducen a la obtención de un producto randomizado (con sus ácidos grasos distribuidos al azar entre las 3 posiciones del glicerol).

En el trabajo de Chobanov y Chobanova (1977), se obtuvo el producto de randomización de una mezcla de BT con aceite de girasol, obteniéndose un producto muy diferente a los materiales de partida, con un rango de fusión desplazado a

temperaturas más bajas que la mezcla original, como consecuencia del cambio en la composición de TAG alcanzada luego del proceso.

Rodríguez *et al.* (2001) interesterificaron también BT con aceite de girasol con el objetivo de obtener un shortening libre de ácidos grasos *trans* (TFA). En dicho trabajo se informa una disminución en las temperaturas de fusión de las mezclas con respecto a la BT de partida. La interesterificación produjo una reducción adicional en el contenido de sólidos y una mayor plasticidad, obteniéndose un producto con las características similares a un shortening de panadería.

También existen trabajos donde la interesterificación de la BT con aceites vegetales se realiza mediante el uso de catalizadores enzimáticos, como ya se mencionó, estos pueden presentar cierto grado de especificidad posicional o de selectividad por determinado tipo de los ácidos grasos, lo que puede utilizarse para conferirle determinadas propiedades al producto obtenido.

Forssell *et al.* (1992) estudiaron la interesterificación de la BT con aceite de canola catalizada por una lipasa inmovilizada comercial sn-1,3- específica de *Mucor miehei*. En dicho trabajo se indica que los productos presentaron una composición en TAG más compatibles que la de la mezcla inicial y que temperaturas de fusión menores que las mezclas de partida en diferente grado según la proporción de aceite en la misma.

Mediante la interesterificación con lipasas específicas de la BT mezclada con aceite de soya y con aceite de girasol de alto oleico fue posible modificar notoriamente las curvas de contenido de sólidos y mejorar las características físicas y térmicas de la BT original (Foglia *et al.* 1993). A diferencia del proceso de interesterificación química, el producto obtenido no sufrió randomización, por lo que la interesterificación enzimática se ha señalado como una alternativa viable al mezclado e interesterificación química tradicional.

Más recientemente Jachmanián *et al.* (2002) estudiaron la interesterificación de la BT con aceite de girasol en distintas proporciones con solvente como medio de reacción, encontrando que con este tipo de proceso es posible obtener un producto más “blando” que BT y que este “ablandamiento” depende de la lipasa utilizada y la composición de la mezcla inicial.

En el capítulo anterior se estudió el efecto del mezclado de la BT con dos aceites de diferentes características, el de girasol de alto oleico (HOSFO) y el de salvado de arroz (RBO), sobre la composición del producto y el efecto sobre ésta del proceso de interesterificación enzimático. En éste capítulo se describen las características de las mismas mezclas en relación a sus propiedades térmicas, termogramas de fusión y cristalización y contenido de sólidos en función de la temperatura, así como el efecto del proceso de interesterificación sobre dichos parámetros, dado que estas propiedades son determinantes sobre el tipo de alimento al que estos materiales grasos pueden destinarse por parte de la industria alimentaria.

Por este motivo, también se compararon las propiedades de los materiales obtenidos con datos de bibliografía relativos a los valores que presentan para estas

mismas propiedades varios productos grasos existentes en el mercado, de diferentes características según el uso para el que se diseñaron.

4.2.- Métodos

Se utilizaron los materiales grasos, estándares y reactivos generales indicados en **2.1**. Se prepararon las mezclas BT/HOSFO y BT/RBO conteniendo 10, 20, 30, 40 y 50 % en masa de aceite, como se describió anteriormente y se obtuvieron los productos de interesterificación de las mismas según el método descrito en **2.2.1**.

Los productos se separaron del catalizador por decantación y se destinaron a los siguientes métodos analíticos: determinación de los termogramas de cristalización y fusión por DSC y, a partir de este último se obtuvieron las curvas de contenido de grasa sólida (CS) en función de la temperatura (método **2.2.4**).

4.3.- Resultados y discusión

4.3.1.- Termogramas de fusión

Se obtuvieron los termogramas de fusión, de acuerdo al método mencionado anteriormente, en el cual la muestra es inicialmente fundida completamente a 85 °C durante 10 min, a los efectos de destruir su memoria cristalina, luego se la enfría a 10 °C/min hasta -60 °C, se la deja a esta temperatura durante 30 min y finalmente se la calienta a una velocidad de 5 °C/min desde -60 a 85 °C. Los termogramas de fusión correspondieron al registro del flujo de calor durante esta última etapa del ciclo.

En la **Figura 4.1** se muestra el termograma de fusión de la BT, se observaron dos zonas de fusión endotérmicas, una localizada a rangos de temperatura bajos (III, Temperatura de pico (Tp) de 4,5 °C) y la otra a temperaturas altas (I, Tp = 45,6 °C). Esto, sumado a los datos de composición en triacilgliceroles de la BT sugiere, en principio, que la primer zona correspondería a la fusión de los TAG más insaturados (SUU + UUU = 42,6 %) y por lo tanto de menor temperatura de fusión, y la segunda a los más saturados (SSS + SSU = 54,4 %), de mayor temperatura de fusión.

También se observó un pico exotérmico (II, Tp = 21,9 °C) lo que, si bien en principio es llamativo ya que la muestra está siendo sometida a un ciclo de calentamiento, indica la ocurrencia de transformaciones polimórficas durante el proceso fusión (Lovegren y Gray 1978). Considerando que la BT es considerado un material con fuerte tendencia a la cristalización β' debido a la heterogeneidad de la población de TAG que la constituyen (Foubert *et al.* 2007), se puede suponer que ésta forma

cristalina es la generada durante las etapas previas de enfriamiento y estacionamiento a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego, como las transiciones polimórficas durante un calentamiento necesariamente involucran la conversión de una fase más inestable (de menor punto de fusión) a una más estable (de mayor punto de fusión), (Timms 2003) el pico exotérmico observado se puede asociar a la transformación $\beta' \rightarrow \beta$. Obviamente esto se deberá confirmar con estudios más detallados, en particular mediante análisis por difracción de rayos-X.

También la existencia de picos exotérmicos en termogramas pueden ser el resultado de una serie de varios procesos ocurriendo en forma simultánea, que pueden involucrar, además de transiciones, fusiones y cristalizaciones (Oh et al., 2005). Por lo tanto en este caso, además de la transición polimórfica mencionada, no se puede descartar la ocurrencia de fusión de cristales β' y cristalización de cristales β en el rango de temperaturas correspondiente al pico exotérmico.

La existencia de transiciones polimórficas sumada a la posibilidad de que TAG cristalizados en β' se fundan y cristalicen en forma β , contradice en cierta medida la pertenencia de cada tipo de TAG, según su grado de insaturación, a uno u otro de los picos endotérmicos del termograma de la BT, como se mencionó anteriormente. Si bien debe considerarse que los termogramas de fusión de la BT siempre presentan dos picos endotérmicos, independientemente del tipo de tratamiento previo a que se someta.

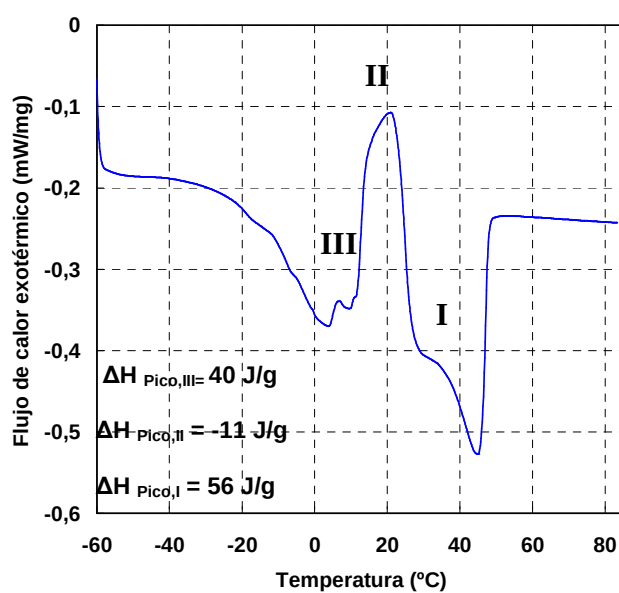


Figura 4.1.- Termograma de fusión de la grasa vacuna.

En el termograma del HOSFO, mostrado en la **Figura 4.2**, se observa un único pico endotérmico ($T_p = -6,4\text{ }^{\circ}\text{C}$), el que corresponde a la trioleína (OOO), TAG mayoritario en este aceite (85,5 %). Está reportado que la trioleína pura puede presentar múltiples formas β' con los siguientes puntos de fusión: β'_3 : $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, β'_2 : $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y β'_1 : $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$

(Hagemann *et al.*, 1972), por lo que de acuerdo con esto el pico endotérmico obtenido para el HOSFO podría corresponder a la fusión de cristales β'_2 o β'_1 de la trioleína o, eventualmente, una mezcla de ambos.

Se pudo observar también un pico exotérmico a temperaturas menores ($T_p = -23,4$ °C), lo que indicaría una transición polimórfica. Considerando que el punto de fusión de los cristales de la forma α de la trioleína es cercana a los -37 °C (Hagemann *et al.* 1972), este pico exotérmico obtenido para el HOSFO se podría asignar a la transición de la forma α a la β' de la OOO.

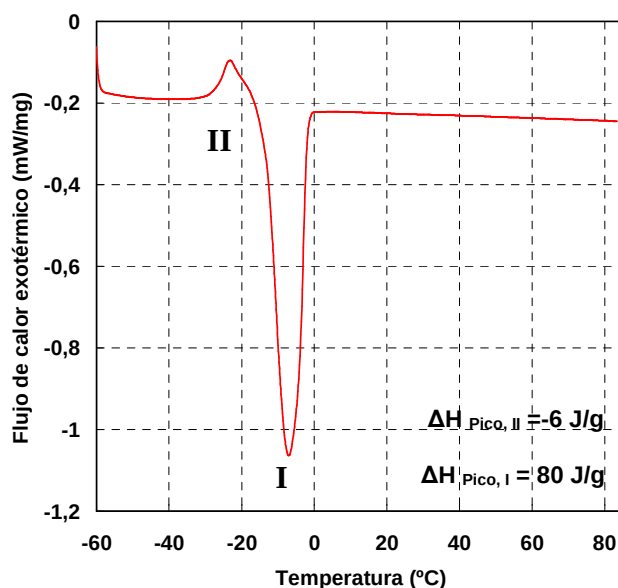


Figura 4.2.- Termograma de fusión del aceite de girasol de alto oleico.

En cuanto al termograma del RBO, como se muestra en la **Figura 4.3**, el mismo presentó al menos tres picos parcialmente solapados, los dos más importantes con temperaturas de pico de $-19,8$ (II) y $-8,9$ °C (I) y uno más pequeño a temperaturas menores (III; $T_p = -29,7$ °C).

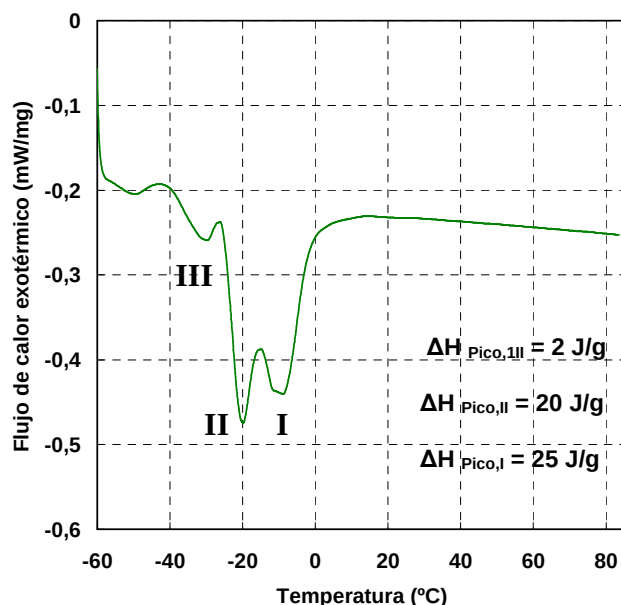


Figura 4.3.- Termograma de fusión del aceite de salvado de arroz.

Estos picos observados en el termograma de fusión RBO se presentaron muy solapados lo que era esperable considerando su composición en TAG muy diversa, la cual no presentó ningún TAG mayoritario. Se puede considerar que el pico I correspondería la fusión de los TAG del tipo SUU (46 %), mientras que los otros dos podrían corresponder mayoritariamente a la fusión de los TAG del tipo UUU (44 %).

En la **Figura 4.4** se muestran los termogramas de fusión de la BT y del mismo luego de 24 horas de interesterificación catalizada por la enzima Lipozyme TL IM (IBT). Luego de la interesterificación se observó la desaparición del pico exotérmico, que como se comentó anteriormente, se asignó a la transición polimórfica de β' a β . Esto podría implicar la desaparición de la transición polimórfica por efecto de la interesterificación y que los TAG de la IBT cristalizada en las condiciones del método generen preferentemente un único tipo de polimorfo, lo que deberá confirmarse mediante análisis de difracción de Rayos-X.

También se observaron 3 picos endotérmicos correspondientes a la fusión de los TAG, dos de ellos en la región correspondiente a TAG más insaturados, donde se observa una clara disminución del área total luego del proceso. Esto se podría explicar por los cambios de composición mostrados en la **Tabla 3.3**, donde se observa que los TAG SUU (asignados a esta zona del termograma) disminuyeron de 39,6 a 32,9 % (principalmente el TAG POO que pasó de 22,4 a 15,5 %) luego de la interesterificación.

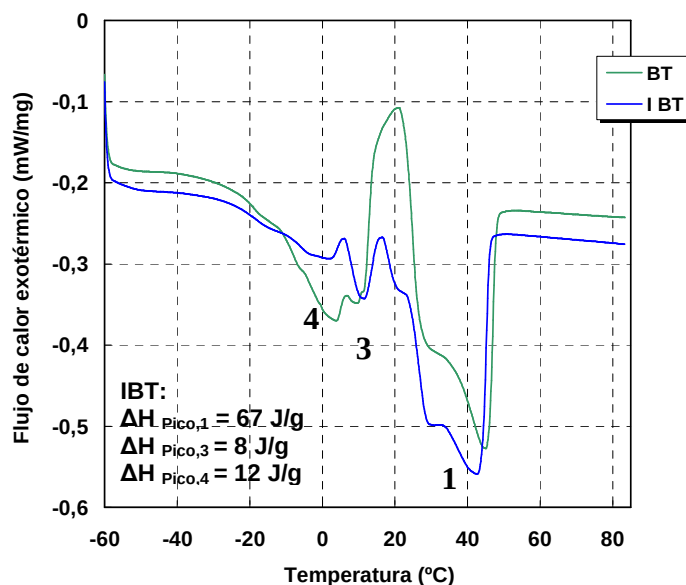


Figura 4.4.- Termogramas de fusión para BT pura y para el mismo luego de su interesterificación (IBT) catalizada por la enzima Lipozyme TL IM durante 24 h, a 60°C.

Al analizar las mezclas de la BT con el HOSFO (**Figura 4.5** y **Tabla 4.1**) se observó la paulatina dilución del pico endotérmico de mayor temperatura (pico 1) cuanto mayor es a cantidad de aceite, acompañada por el aumento de la suma de las áreas de los picos endotérmico de menor temperatura (pico 3 y 4). Este efecto es esperable ya que, al aumentar la cantidad de HOSFO en la mezcla, éste le confiere a la misma las características de fusión propias de su termograma, el cual presenta un único pico a -6,5 °C debido a su alto contenido de trioleína (**Figura 4.2**). También se observó un corrimiento de todos los picos a temperaturas menores en la medida que el porcentaje de HOSFO aumentó (**Tabla 4.1**).

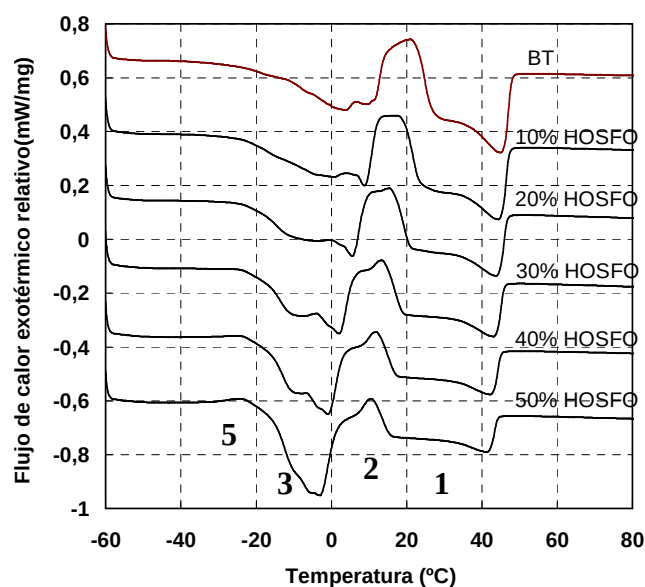


Figura 4.5.- Termogramas de fusión de las mezclas BT/HOSFO.

Las mezclas de BT con RBO (**Figura 4.6** y **Tabla 4.2**), presentaron una disminución en el pico endotérmico de mayor temperatura (pico 1) similar a la observada para las mezclas con HOSFO, lo que, al igual que en el caso anterior, se debe a la dilución de los TAG más saturados de BT con el aceite. El aumento en la cantidad de aceite también aumentó la suma de los picos endotérmico a bajas temperatura (picos 3 y 4), como se esperaba ya que el RBO puro presenta picos por debajo del 0 °C (**Figura 4.3**).

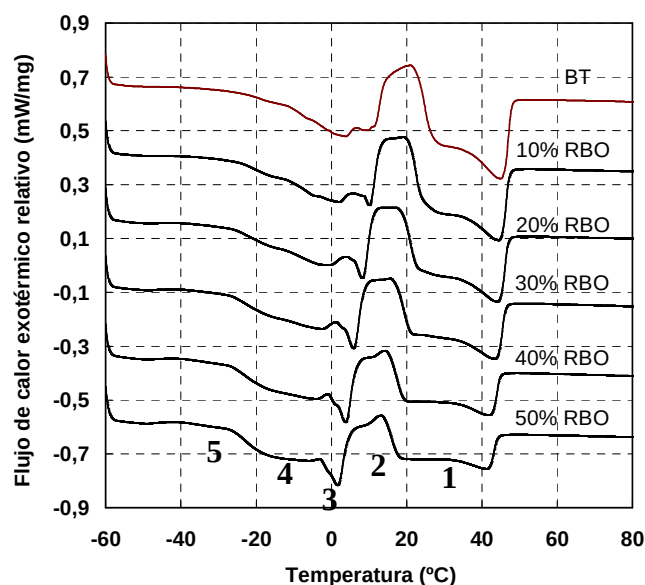


Figura 4.6.- Termogramas de fusión de las mezclas BT/RBO.

En ambos casos se observó una disminución en el tamaño del pico exotérmico con el incremento de aceite en la mezcla, correspondiente a la transición polimórfica $\beta' \rightarrow \beta$ en la BT, lo cual es coherente con la progresiva dilución de la BT (**Tablas 4.1** y **4.2**). Es interesante notar que este pico desaparece completamente luego de la interesterificación de las mezclas (**Figuras 4.7** y **4.8**), fenómeno que ya se observó en el caso de la BT pura (**Figura 4.4**). Esto podría sugerir que los productos de interesterificación presentaron una baja tendencia a la formación de cristales β , lo cual representaría una ventaja ya que los cristales β' son más pequeños y blandos de los β , por lo que son deseables para muchos tipos de grasas comestibles, como margarinas y distintos tipos de shortenings. Este aspecto como ya se mencionó debe confirmarse mediante análisis por difracción de Rayos-X.

También en los productos de ambas mezclas se observó la disminución del área del pico endotérmico a mayor temperatura (pico 1) luego de la interesterificación, además de un corrimiento del mismo a temperaturas menores (**Tablas 4.1** y **4.2**). Éste efecto se acentuó con el aumento en la cantidad de aceite en la mezcla original. Dicho comportamiento era esperable ya que la concentración de los TAG de mayores puntos de fusión (más saturados) disminuyen como resultado del proceso, lo que se acentúa con el aumento en el contenido de aceite (**Tablas 3.3** y **3.4**).

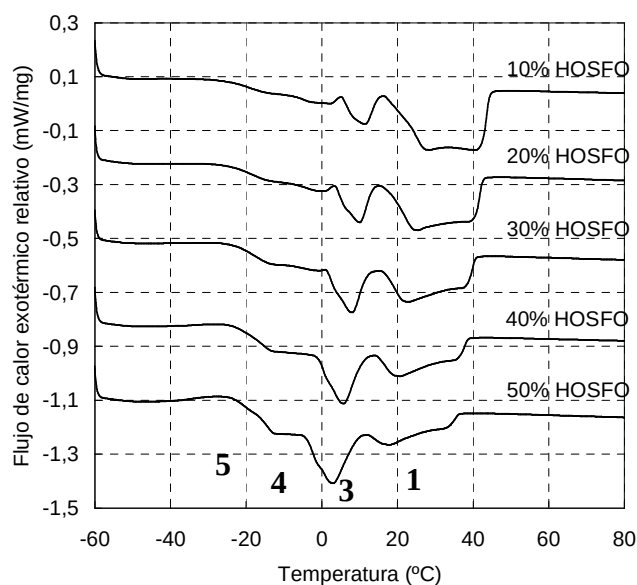


Figura 4.7.- Termogramas de fusión de los productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO.

Tabla 4.1.- Valores de T_p y ΔH correspondientes a los principales picos de los termogramas de fusión de las mezclas BT/HOSFO (**Figura 4.5**) y de sus productos de interesterificación (**Figura 4.7**).

	Proporción de HOSFO (%)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
$T_{Pico,1} (^{\circ}C)$	44,4	28,4	43,8	25,4	43,0	22,9	42,2	20,6	41,3	17,7
$\Delta H_{Pico,1} (J/g)$	58	60	56	51	52	41	45	33	37	26
$T_{Pico,2} (^{\circ}C)$	17,6	nd	15,4	nd	13,5	nd	12,0	nd	10,7	nd
$\Delta H_{Pico,2} (J/g)$	-9	nd	-6	nd	-4	nd	-2	nd	-1	nd
$T_{Pico,3} (^{\circ}C)$	8,9	11,5	5,6	10,0	2,0	8,1	-0,8	5,7	-3,0	3,0
$\Delta H_{Pico,3} (J/g)$	39	13	39	18	41	24	43	46	48	52
$T_{Pico,4} (^{\circ}C)$	nd	1,9	nd	-0,6	nd	-0,9	nd	nd	nd	nd
$\Delta H_{Pico,4} (J/g)$	nd	16	nd	18	nd	15	nd	nd	nd	nd
$T_{Pico,5} (^{\circ}C)$	nd	nd	nd	nd	nd	-28,6	-25,0	-27,0	-24,1	-26,8
$\Delta H_{Pico,5} (J/g)$	nd	nd	nd	nd	nd	-2	-1	-3	-2	-4

Nota: T_{Pico} : temperatura de pico; los picos fueron numerados de mayor a menor temperatura. M: mezcla, P: producto. nd: no detectado

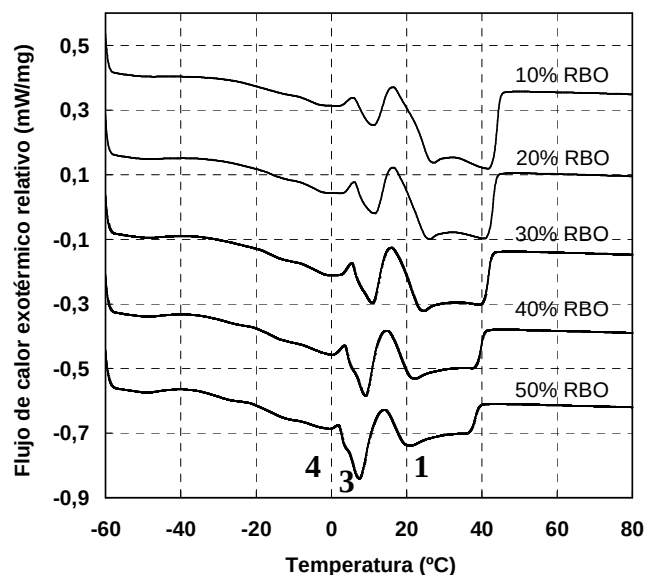


Figura 4.8.- Termogramas de fusión de los productos de interesterificación de las mezclas BT/RBO.

Tabla 4.2.- Valores de T_p y ΔH correspondientes a los principales picos de los termogramas de fusión de las mezclas BT/RBO (**Figura 4.6**) y de sus productos de interesterificación (**Figura 4.8**).

	Proporción de RBO (%)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
$T_{Pico,1} (^{\circ}C)$	44,4	41,5	44,1	26,1	43,5	24,5	42,0	22,2	41,2	20,7
$\Delta H_{Pico,1} (J/g)$	57	60	55	53	49	46	41	38	35	31
$T_{Pico,2} (^{\circ}C)$	19,1	nd	17,1	nd	15,6	nd	14,3	nd	13,4	nd
$\Delta H_{Pico,2} (J/g)$	-10	nd	-9	nd	-7	nd	-5	nd	-3	nd
$T_{Pico,3} (^{\circ}C)$	10,0	11,3	8,1	11,6	5,8	10,8	3,7	9,0	1,5	7,3
$\Delta H_{Pico,3} (J/g)$	9	10	9	11	11	13	12	17	14	21
$T_{Pico,4} (^{\circ}C)$	1,9	-1,5	-1,9	-1,0	-2,8	-0,5	-4,3	0,0	-6,5	-0,6
$\Delta H_{Pico,4} (J/g)$	34	17	33	21	30	21	29	24	27	25
$T_{Pico,5} (^{\circ}C)$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-41,3	nd	-41,3	nd
$\Delta H_{Pico,5} (J/g)$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-1	nd	-1	nd

Nota: T_{Pico} temperatura de pico; los picos fueron numerados de mayor a menor temperatura. nd: no detectado.

En cuanto al segundo pico endotérmico, pico 3 de las mezclas, se observó que luego de la interesterificación el mismo se separa en dos picos (picos 3 y 4) en ambos casos. Al aumentar la cantidad de aceite el pico 4 redujo su área hasta que pasa a ser un hombro del pico 3, el cual a su vez creció con el aumento en el contenido de aceite. Este efecto podría estar relacionado con el aumento en la intersolubilidad de los TAG que componen los productos, por efecto de la randomización observada en el **Capítulo 3**.

4.3.2.- Termogramas de cristalización

Si bien el análisis térmico de los diferentes materiales se destinó fundamentalmente al análisis de los termogramas de fusión, resulta interesante analizar también los termogramas de cristalización, los cuales se obtuvieron durante la etapa de enfriamiento de las diferentes muestras de acuerdo al método descrito anteriormente. Los termogramas de cristalización correspondieron entonces al registro del flujo de calor durante la etapa de enfriamiento a 10 °C/min comprendida entre la fusión total de la muestra a 85 °C durante 10 min y la etapa isotérmica a -60 °C.

Se debe tener en cuenta que en algunos casos cuando se comparan termogramas de fusión con los de cristalización es frecuente la no coincidencia en el número de picos, las temperaturas de los mismos y las áreas. En principio la diferencia en el sentido de la transferencia de calor contribuye a que un pico de congelación (exotérmico) de un TAG se observe a temperatura menor que el pico correspondiente a la fusión del mismo TAG. Además, dependiendo de la velocidad de enfriamiento y calentamiento y del tiempo de templado previo a la etapa de fusión, el tipo de transiciones polimórficas que pueden ocurrir en uno y otro proceso modifica el número de picos y las áreas de los mismos (Tan y Che Man 2002).

Para ilustrar esto se muestran a continuación algunos termogramas de cristalización realizados con estándares de TAG homogéneos, los que fueron analizados en el DSC mediante el programa de temperatura cíclico ya mencionado, a los efectos de comparar sus termogramas de cristalización con los de fusión.

En la **Figura 4.9** se observan los termogramas de cristalización de tres estándares de TAG homogéneos: triestearina (StStSt), tripalmitina (PPP) y trioleína (OOO). Se observa un único pico asociado a la cristalización de cada TAG, a una temperatura de pico T_p (temperatura del máximo del pico) de 49,8 °C para StStSt, 40,6 °C para PPP y -45,1 °C para OOO.

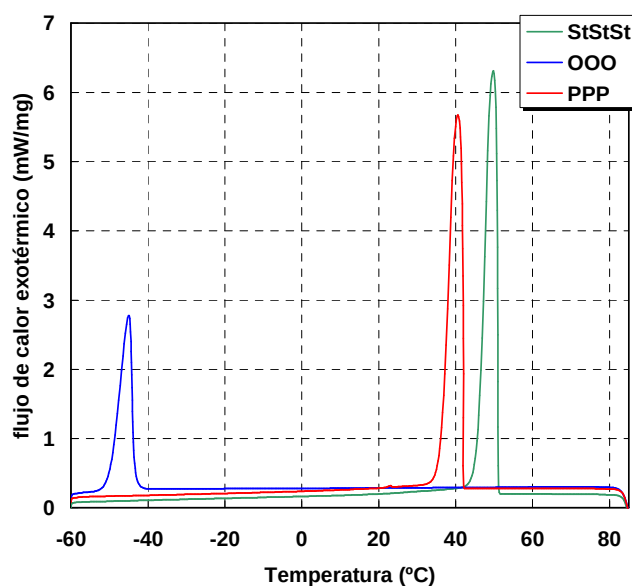


Figura 4.9.- Termogramas de cristalización de los estándares triestearina, tripalmitina y trioleína (enfriamiento a 10 °C/min).

La **Figura 4.10** muestra los termogramas correspondientes a la fusión de dos de estas muestras de estándares homogéneos (PPP y StStSt), obtenidos a continuación del enfriamiento descrito y del subsiguiente templado a -60°C durante 30 minutos. Se observa que cada TAG presenta dos picos endotérmicos (negativos) correspondientes a la fusión de los polimorfos α y β y un pico exotérmico (positivo) intermedio, que puede atribuirse a una serie de procesos ocurriendo en forma simultánea: fusión de α , cristalización de β y transición polimórfica (Oh *et al.* 2005). Si se observan los termogramas de congelación para estos mismos TAG (**Figura 4.9**) es notoria la no correspondencia entre un tipo de termograma y otro, tanto en el número de picos como en la temperatura de los mismos. Los picos correspondientes a la fusión de los polimorfos α se ubican a una temperatura de unos 5 °C más alta que la de congelación de los TAG correspondientes, lo que sugiere que la congelación observada en la **Figura 4.9** corresponde la formación de estos mismos polimorfos. Luego los termogramas de fusión muestran transiciones polimórficas y picos de fusión de polimorfos β que no están presentes en los termogramas de congelación. Por lo tanto en estos casos la cristalización ocurre bajo la forma α y la forma β sólo se genera durante el calentamiento posterior, como resultado de la transformación de α y/o de su fusión y posterior cristalización bajo la forma β . Esto es atribuido al valor decreciente en la velocidad de cristalización de los diferentes polimorfos en el orden α , β' y β (como resultado de una energía de activación creciente) y a que la etapa de nucleación sea la determinante de la velocidad global del proceso de cristalización (Kellens *et al.* 1990).

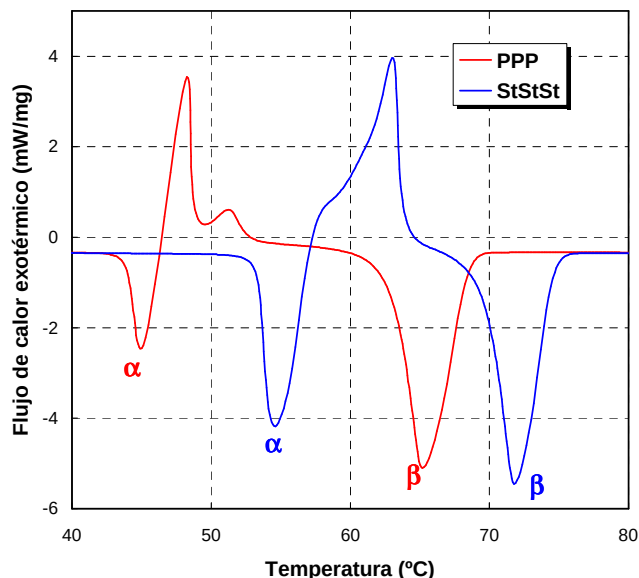


Figura 4.10.- Termogramas de fusión obtenidos por análisis por calorimetría diferencial de barrido DSC de dos triacilglicérols homogéneos saturados puros: PPP y SSS a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min.

Estos ejemplos, relativamente simples si se los compara con la diversidad de TAG constituyentes de las muestras naturales, ilustran la complejidad de los fenómenos de cristalización y fusión y las dificultades que pueden presentarse al comparar uno y otro tipo de termograma.

El termograma de cristalización de la BT se muestra en la **Figura 4.11**, se observaron dos picos con T_p de 26,7 y 3,7 °C (identificados como 1 y 2, respectivamente), esto estaría de acuerdo con los resultados de los termogramas de fusión donde también se observaron dos picos, en el cual el de mayor temperatura se asignó a los TAG tipo SSS y SSU y el de menor temperatura a los SUU y los UUU. La existencia de picos en rangos de temperatura relativamente coincidentes entre uno y otro tipo de termograma sugiere cierto grado de coincidencia también entre los grupos de TAG involucrados en cada pico, lo que permite descartar situaciones similares a las observadas en el caso de los estándares de TAG homogéneos, en los que varios picos de fusión correspondían a varios polimorfos de un mismo TAG.

Los picos de los termogramas de cristalización presentaron temperaturas menores que los de fusión, lo que es habitual dado que fenómenos de sobreenfriamiento y de transferencia de calor contribuyen en el mismo sentido a este corrimiento, como ya se mencionó.

Asimismo se observa que el pico 1, con una temperatura on-set (T_{on}) de 27,8 °C, se inicia en forma abrupta, prácticamente vertical, lo que estaría indicando la existencia de fenómenos de sobreenfriamiento importantes y la ocurrencia de nucleación instantánea (Philippaerts *et al.* 2011). En cambio el pico 2, con una T_{on} de

9,8 °C, crece en forma más gradual, dado que la cristalización ocurre en un medio donde ya existen cristales.

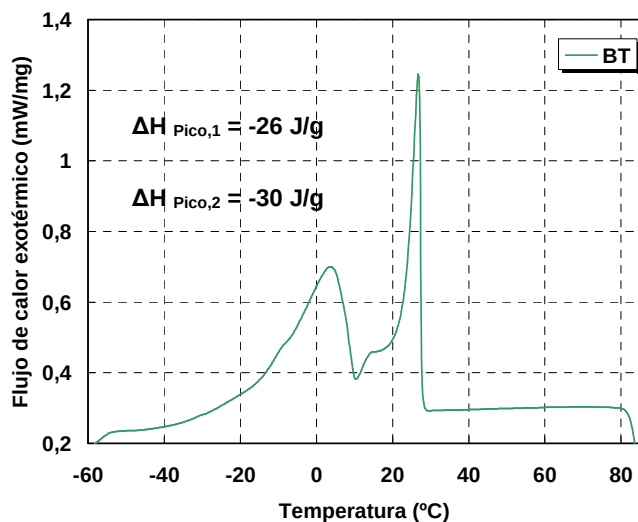


Figura 4.11.- Termograma de cristalización de la grasa vacuna (enfriamiento a 10 °C/min desde 85 °C).

En la **Figura 4.12** se muestra el termograma de cristalización del aceite de girasol de alto oleico, en el mismo se observa un único pico a una T_p de -43,3 °C, cercana a la observada para la cristalización del estándar de OOO (**Figura 4.9**). Esto está de acuerdo con lo observado para el termograma de fusión del HOSFO (**Figura 4.2**) donde la temperatura del pico observado en el mismo coincide con la fusión de un polimorfo β' de la OOO. La T_{on} observada para este pico del HOSFO fue de -40,2 °C.

Estos resultados coinciden con lo reportado para la cristalización de aceites ricos en ácido oleico (aceite de oliva, aceite de canola y aceite de avellana), los que mostraron un pico importante cercano a los -50 °C debido a la alta proporción de OOO en estos aceites (Tan y Che Man, 2000).

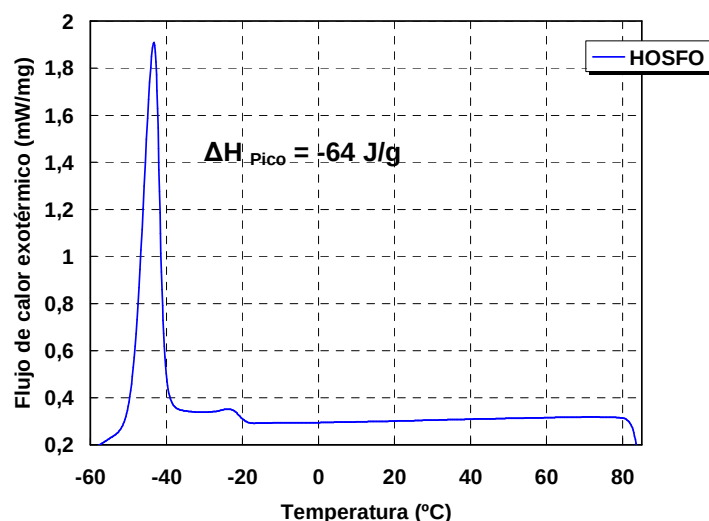


Figura 4.12.- Termograma de cristalización del aceite de girasol de alto oleico (enfriamiento a 10 °C/min desde 85 °C).

En cuanto al aceite de salvado de arroz (**Figura 4.13**), su termograma de cristalización muestra dos picos con T_p de -11,5 y -39,6 °C (Ton de -9,2 y -33,1 °C, picos 1 y 2, respectivamente). Esto coincide con lo observado en su termograma de fusión (**Figura 4.3**), el cual también presentó dos picos mayoritarios. Resulta llamativo el valor del calor de cristalización total ($\Delta H_1 + \Delta H_2 = -27 \text{ J/g}$) muy inferior al del resto de las muestras analizadas.

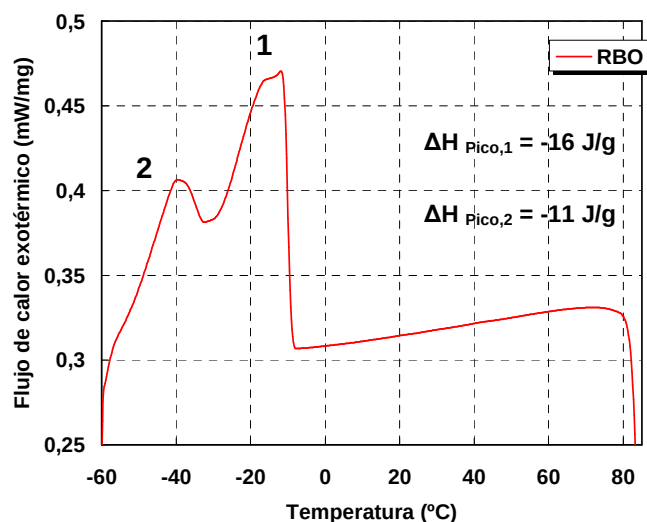


Figura 4.13.- Termograma de cristalización del aceite de salvado de arroz (enfriamiento a 10 °C/min desde 85 °C).

La **Figura 4.14** muestra la superposición de los termogramas de cristalización de BT antes y después de su interesterificación. Se observa una gran coincidencia entre ambos termogramas, excepto por un leve incremento de T_p de 3,7 a 7,9 °C para el pico 2 (ubicado a las temperaturas más bajas) luego de la interesterificación. Esta leve diferencia entre ambos termogramas está de acuerdo con la también leve modificación

de la composición en TAG producida por la interesterificación (**Tabla 3.3**). Si bien, como ya se mencionó, el análisis de TAG no diferencia entre isómeros posicionales, por lo que no se detectan mediante el mismo eventuales cambios en la regiodistribución de los ácidos grasos.

Se observó un leve descenso del valor absoluto ΔH de cristalización total, el que puede considerarse despreciable, ya que como se vio la composición en TAG es muy similar.

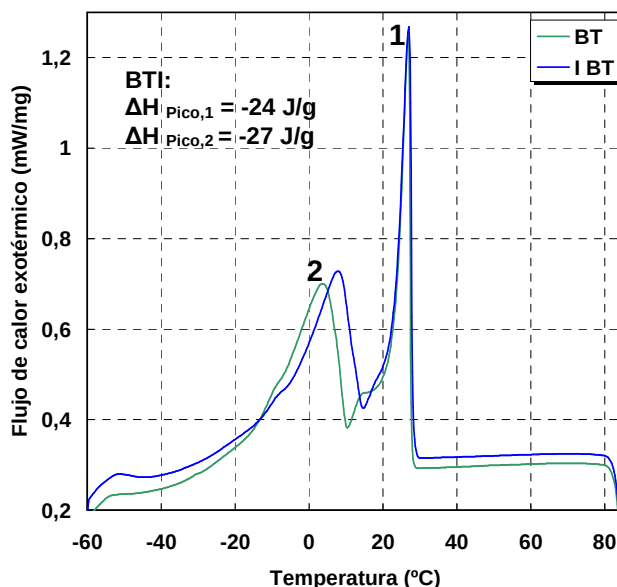


Figura 4.14.- Termogramas de cristalización de la grasas vacuna (BT) y de la grasa vacuna interesterificada (IBT) mediante su incubación con la enzima TL IM durante 24 h a 60 °C.

Los termogramas de cristalización de las mezclas de BT con HOSFO (**Figura 4.15**) presentaron tres picos, uno con valores de T_p entre -47 y -45 °C, similares a la T_p del pico característico del HOSFO puro (**Figura 4.12**), cuyo ΔH se incrementó con la proporción de aceite en la mezcla, por lo que dicho pico se puede atribuir a la cristalización de los TAG aportados por este aceite. Los otros dos picos presentaron valores de T_p entre -5,6 y 2,2 °C y entre 20,6 y 26 °C, próximos a los de los dos picos presentados por la BT pura (**Figura 4.11**) y cuyas áreas disminuyeron gradualmente con el aumento de la proporción de aceite en la mezcla, por lo que los mismos pueden atribuirse a la cristalización de los TAG aportados por la BT. La **Figura 4.15** muestra también que los valores de T_p para el pico característico del HOSFO se incrementaron levemente con la proporción de aceite en la mezcla, mientras que en el caso del los picos aportados por la BT las T_p disminuyeron en forma muy significativa (**Tabla 4.3**). Esto último se puede explicar si se considera que los fenómenos de cambio de fase no sólo son resultado de la temperatura de fusión de los TAG involucrados sino también de fenómenos de intersolubilidad de los TAG, los que en el caso del análisis de mezclas puede resultar determinante. En el caso de los picos correspondientes a TAG aportados por la BT, su cristalización ocurre a partir de una mezcla más rica en líquido

a medida que aumenta el porcentaje de HOSFO en la mezcla, lo que es coherente con una gradual disminución en sus valores de T_p . El mismo comportamiento lo presentaron los valores de T_{on} obtenidos (**Tabla 4.3**).

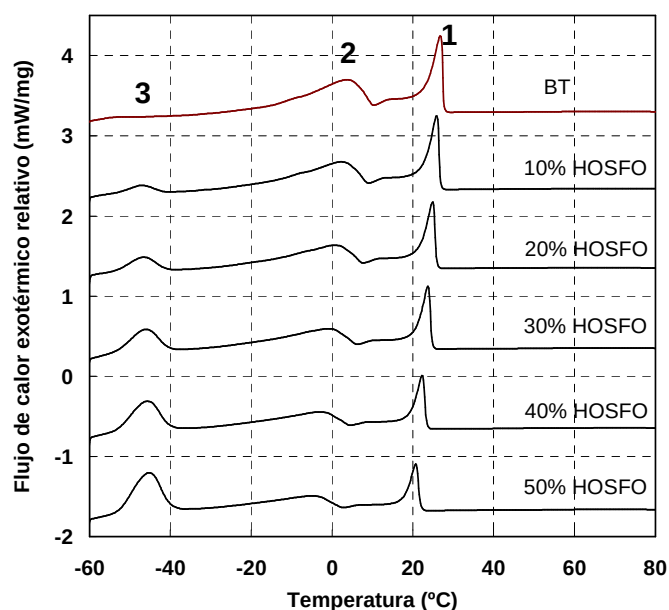


Figura 4.15.- Termogramas de cristalización de la BT y sus mezclas con HOSFO.

Se observó que los termogramas de las muestras interesterificadas presentaron, al igual que las muestras sin interesterificar, 3 picos principales (**Figura 4.16**). En todos los casos se observó que la interesterificación produjo una reducción en los ΔH de los picos 1 y 3 (**Tabla 4.3**), mientras que el del pico 2 se incrementó levemente.

También se observó que la interesterificación modificó los valores de T_p de los picos 1 y 2, disminuyendo la T_p del pico 1 y aumentando la correspondiente al pico 2 (**Tabla 4.3**). Por lo tanto el incremento del área relativa (o el ΔH) del pico 2 se puede asociar al aumento de la población de TAG tipo SUU y el consecuente aumento del calor asociado a la cristalización de los mismos.

Obviamente el incremento verificado en los TAG tipo SUU y el peso relativo del pico 2 se produce a expensas de la reducción de otros TAG de la mezcla de partida. Efectivamente se observa que el pico 3, asociado a la trioleína del HOSFO, y el pico 1, vinculado a los trisaturados de BT, reducen su peso relativo luego de la interesterificación.

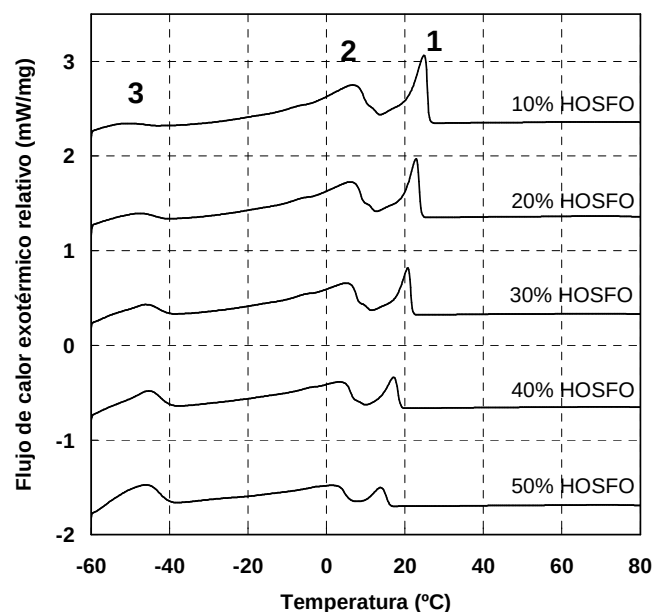


Figura 4.16.- Termogramas de cristalización de los productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO.

Tabla 4.3.- Valores de T_p , T_{on} y ΔH correspondientes a los principales picos de los termogramas de cristalización de las mezclas BT/HOSFO (**Figura 4.15**) y de sus productos de interesterificación (**Figura 4.16**).

	Proporción de HOSFO (%)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
$T_{Pico,1} (^{\circ}C)$	26,0	24,8	25,0	22,9	23,8	20,8	22,2	17,2	20,6	13,8
$T_{on,1} (^{\circ}C)$	26,9	26,1	26,2	24,3	24,9	21,9	23,4	19,1	22,2	16,1
$\Delta H_{Pico,1} (J/g)$	24,0	19,0	21,2	14,4	19,3	10,5	16,1	7,1	13,2	3,9
$T_{Pico,2} (^{\circ}C)$	2,2	6,7	0,6	6,2	-1,2	5,0	-3,6	3,2	-5,6	1,3
$T_{on,2} (^{\circ}C)$	8,6	13,3	7,4	12,2	5,8	11,1	4,1	9,6	2,3	6,2
$\Delta H_{Pico,2} (J/g)$	25,9	29,4	24,6	32,2	22,4	32,5	18,4	28,0	15,0	21,1
$T_{Pico,3} (^{\circ}C)$	-47,1	-51,5	-46,6	-48,0	-46,1	-46,2	-45,6	-45,3	-45,4	-46,1
$T_{on,3} (^{\circ}C)$	-41,5	-43,8	-40,8	-41,4	-40,4	-40,2	-40,0	-39,8	-39,2	-39,8
$\Delta H_{Pico,3} (J/g)$	3,9	1,8	8,5	4,9	14,2	8,7	18,5	12,4	23,8	15,7

Nota: T_{Pico} temperatura de pico; T_{on} temperatura on-set; los picos fueron numerados de mayor a menor temperatura.

Las curvas correspondientes a las mezclas de BT/RBO (**Figura 4.17**) muestran diferencias importantes con las obtenidas para las mezclas con HOSFO, en este caso se siguen presentando dos picos muy próximos a los que presentó el termograma de cristalización de la BT pura. El aumento en la proporción de aceite produjo una gradual disminución en los ΔH de ambos picos y de sus respectivas T_p (**Tabla 4.4**).

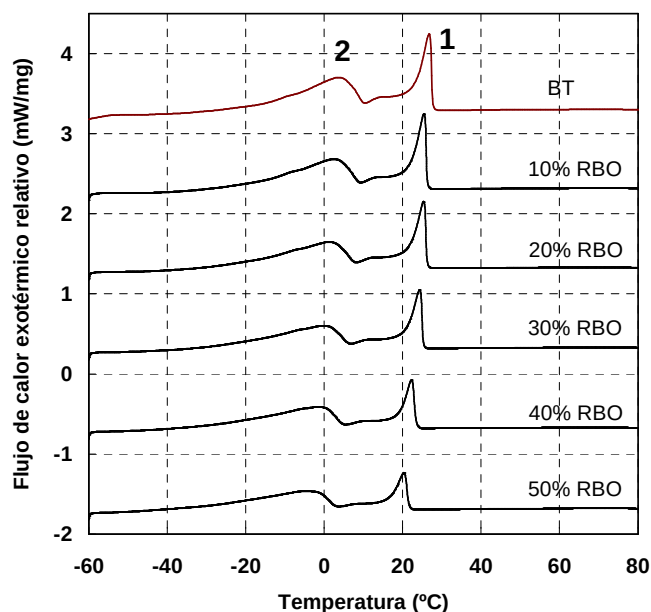


Figura 4.17.- Termogramas de cristalización de la BT y sus mezclas con RBO.

Luego del proceso de interesterificación el pico 1 presentó T_p menores a la de la mezcla correspondiente, mientras que el pico 2 presentó T_p mayores a la de sus correspondientes mezclas (**Figura 4.18**). Por lo que se verificó un acercamiento de ambos picos, lo que se aprecia claramente en los valores de estos parámetros en la **Tabla 4.4**. Los valores de ΔH de cristalización se redujeron para ambos picos luego del proceso, reducción que fue incrementándose para el pico 2 con el aumento de la proporción de aceite en la mezcla, mientras que para el pico 1 se mantuvo prácticamente constante. Los efectos observados en este caso también se pueden explicar por el aumento en los TAG de saturación intermedia y la reducción en TAG trisaturados observados luego del proceso de interesterificación en el **Capítulo 3**, estos cambios probablemente mejoran la intersolubilidad de los TAG reduciendo de esta forma el ΔH de cristalización.

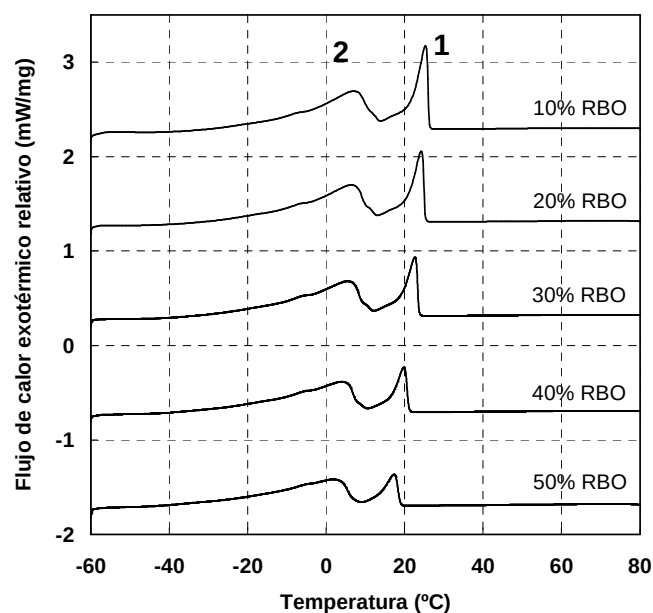


Figura 4.18.- Termogramas de cristalización de los productos de interesterificación de las mezclas BT/RBO

Tabla 4.4.- Valores de T_p , T_{on} y ΔH correspondientes a los principales picos de los termogramas de cristalización de las mezclas BT/RBO (**Figura 4.17**) y de sus productos de interesterificación (**Figura 4.18**).

	Proporción de RBO (%)									
	10		20		30		40		50	
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
$T_{Pico,1}$ (°C)	25,42	25,22	25,29	24,16	24,27	22,56	22,33	19,77	20,26	17,20
$T_{on,1}$ (°C)	26,32	26,18	26,18	25,18	25,22	23,71	23,82	21,09	21,60	18,91
$\Delta H_{Pico,1}$ (J/g)	24,3	20,5	22,5	17,5	19,7	14,3	15,7	10,6	12,8	8,1
$T_{Pico,2}$ (°C)	2,33	7,07	1,09	6,30	-0,47	5,34	-1,71	3,79	-5,48	1,67
$T_{on,2}$ (°C)	8,70	13,48	7,53	12,07	6,15	11,69	4,57	9,58	2,76	7,43
$\Delta H_{Pico,2}$ (J/g)	30,0	31,2	28,9	33,5	26,6	34,6	26,0	32,2	23,4	31,0

Nota: la nomenclatura es la misma que se utilizó en la **Tabla 4.3**

En la **Figura 4.19** se muestran superpuestos los termogramas de cristalización de la mezcla de la BT al 50% y de su producto de interesterificación para cada aceite. Se observa que el proceso de interesterificación modificó los picos provenientes de la BT de la misma forma en ambos aceites. Esto se explica por la reducción de los TAG trisaturados lo que genera una disminución del ΔH de cristalización y un corrimiento a temperaturas menores para el pico a mayores temperaturas. Para el pico de menores temperaturas, se observó un aumento del mismo que es acompañado por el aumento de los TAG de saturación intermedia, por lo tanto, estaría aumentando la cantidad de TAG que cristalizan en el rango de temperaturas correspondiente a este pico lo que explica su aumento. Asimismo la mezcla BT/HOSFO presentó un pico más en el entorno de los $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, proveniente de su alta concentración de OOO, el mismo luego de la interesterificación se reduce acompañando la disminución de la concentración de este TAG que provoca el proceso.

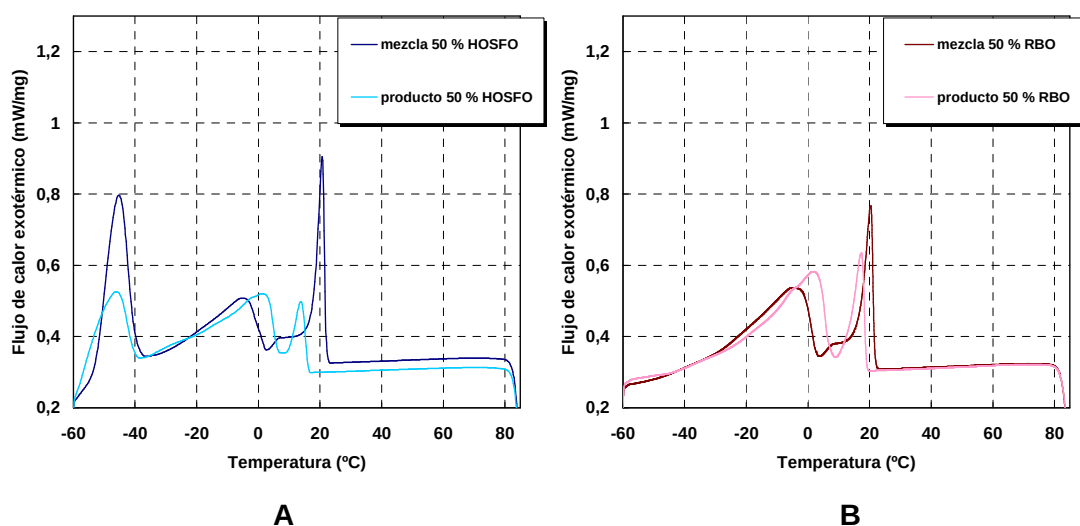


Figura 4.19.- Termogramas de cristalización de las mezclas 50 % HOSFO (A) y 50 % RBO (B) y sus productos de interesterificación.

Al comparar los termogramas de fusión y cristalización, se observa que las mezclas de BT/RBO en ambos casos presentan 2 picos. Luego del proceso de interesterificación el pico a temperaturas altas disminuye. A bajas temperaturas en el termograma de fusión se observan dos picos algo solapados, mientras que en el termograma de cristalización se observa un único pico, se observa también que en esta zona aumenta el área de los picos y consecuentemente el ΔH .

En el caso de las mezclas de BT/HOSFO, se observan también los dos picos provenientes de la BT tanto en el termograma de fusión como en el de cristalización, pero en el de cristalización aparece un tercer pico proveniente de la cristalización de la OOO. Este pico posiblemente corresponda a la cristalización en forma α de este TAG, la cual pasaría a su forma β' durante la estabilización de los materiales a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, razón por la que no aparece en el termograma de fusión. En este último se observó un

pequeño pico exotérmico, que aumenta conforme aumenta la cantidad de HOSFO, el cual también aparece en el termograma de fusión del aceite y se adjudicó a la transición polimórfica del TAG OOO de $\alpha \rightarrow \beta'$. Por tanto en la fusión este TAG está incluido en el pico de bajas temperaturas observado en las mezclas.

Luego del proceso de interesterificación, los picos provenientes de BT presentan un comportamiento similar al descrito para las mezclas BT/RBO en ambos termogramas, en tanto el pico de cristalización de la OOO disminuyó luego del proceso, lo que en el termograma de fusión se observó en el conjunto de picos de la zona de bajas temperaturas.

4.3.3.- Contenidos de grasa sólida (CS)

Se construyeron las curvas de contenido de sólidos en función de la temperatura por integración parcial de los termogramas de fusión anteriores. Estas curvas son del mayor interés para un material graso ya que informan respecto a la cantidad de sólido presente en la muestra a una temperatura dada, lo que va a ser determinante de la dureza y la fluidez que el mismo presenta. Se debe considerar que el método más adecuado para construir este tipo de curvas es mediante el análisis por RMN, método recomendado por las normas oficiales de la AOCS. Esto se debe a que el método de DSC presenta varios inconvenientes para esta determinación. En primer lugar el método de integración estrictamente consiste en determinar el porcentaje de área de un termograma en función de la temperatura, lo que sólo será igual al porcentaje de muestra al estado líquido si todos los TAG que funden presentan el mismo ΔH de fusión. Esto obviamente no es así, por lo que este suele ser uno de los principales inconvenientes del método. También el método de RMN presenta varias ventajas frente al DSC para este análisis, como la de no ser un método dinámico como el DSC, en el que la temperatura varía en forma continua provocando fenómenos que distorsionan la determinación como la aparición de picos correspondientes a transiciones polimórficas exotérmicas. Estas transiciones exotérmicas aparecen en la curva integrada como un aumento en el contenido de sólidos, lo que no tiene sentido físico ni relación alguna con lo que ocurre en la muestra. De todas maneras, pese a estos inconvenientes, es un método utilizado por varios investigadores ya que permite realizar comparaciones entre muestras analizadas de la misma manera.

Las curvas de contenido de grasa sólida (CS) de las tres materias primas son mostradas en la **Figura 4.20**. Se observa que a 0 °C el HOSFO es totalmente líquido (CS = 0 %) y que presenta un rango de fusión muy estrecho, ya que funde por completo en un rango próximo a los 10 °C, lo que es coherente con su composición en TAG relativamente homogénea (aproximadamente un 80 % de OOO). En cambio el RBO a 0 °C aún conserva un 2,5 % de sólidos y presenta también un rango de fusión más amplio (de aproximadamente unos 45 °C), ambas características debidas

posiblemente a la fracción de TAG disaturados presente en este aceite y a una población más diversa de tipos de TAG que lo constituyen,

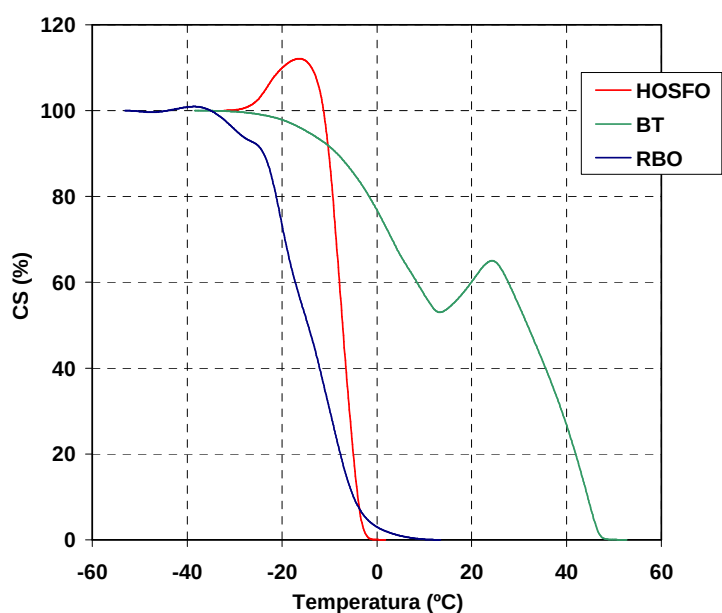


Figura 4.20.- Curvas de contenido de grasa sólida (CS) en función de la temperatura para las tres materias primas utilizadas.

En cuanto a la BT, su rango de fusión es el más amplio de los tres (aproximadamente 75 °C) y su temperatura de fusión total alcanza los 48 °C. Esto constituye una de las principales desventajas que presenta este material para ser utilizado sin modificar en alimentos, ya que a la temperatura de boca (~ 37 °C) presenta un contenido de sólidos del 36 %, lo que suele provocar sensaciones de arenosidad y/o cerosidad desagradables al consumidor.

Tanto en la curva del HOSFO como en la de la BT se observan zonas con incrementos del CS con la temperatura, lo que responde a los cambios polimórficos mencionados en cada caso y no a aumentos reales del contenido de sólidos.

La **Figura 4.21** muestra las curvas de contenido de sólido de BT y su producto de interesterificación. Como se observó anteriormente, luego de la interesterificación desaparece la transición polimórfica $\beta' \rightarrow \beta$ comentada anteriormente (**Figura 4.4**) y, en consecuencia, el aparente incremento en la curva de sólidos. Excepto por esta diferencia significativa entre ambas curvas, existe una alta coincidencia a temperaturas por encima de los 27 °C, se apreció además una leve disminución en la temperatura de fusión total, que pasa de 46 a 49 °C luego del proceso.

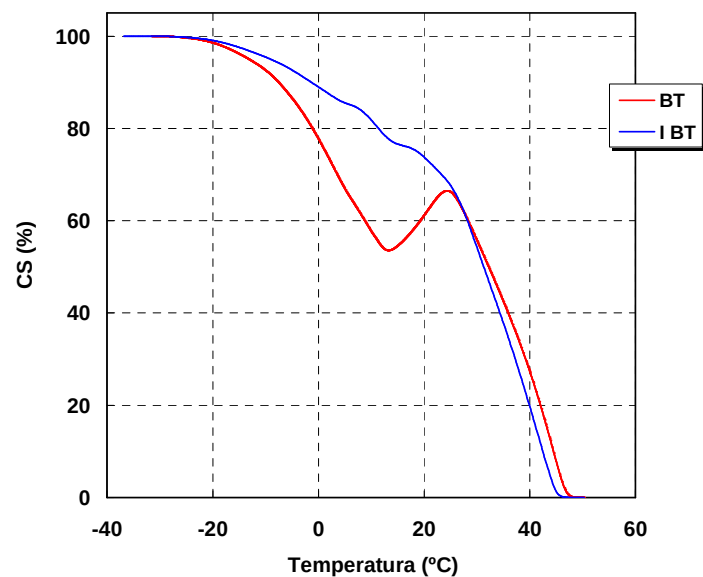


Figura 4.21.- Curvas de contenido de grasa sólida (CS) en función de la temperatura para la grasa vacuna antes y después de su interesterificación (BT e IBT, respectivamente).

El aumento de la proporción de aceite en ambas mezclas, como ya se comentó, generó la disminución en el pico correspondiente a la transición polimórfica en los termogramas de fusión, lo que se manifiesta en las curvas de contenido de sólido mediante el descenso de la distorsión correspondiente (**Figuras 4.22 y 4.23**). El aumento en la cantidad de aceite también generó un gradual descenso de los valores de CS a una temperatura dada, lo que obviamente se vincula a la dilución de los TAG más saturados de la BT. Este efecto coincide con lo reportado previamente para mezclas de BT con aceite de girasol (Rodríguez *et al.*, 2001) o con aceite de soja (Lo y Handel, 1983).

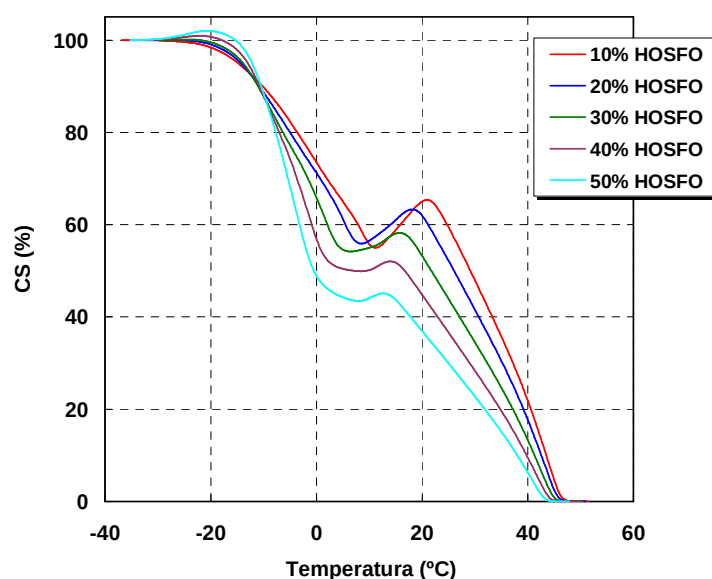


Figura 4.22.- Curva de contenido de sólidos en función de la temperatura para las mezclas BT/HOSFO.

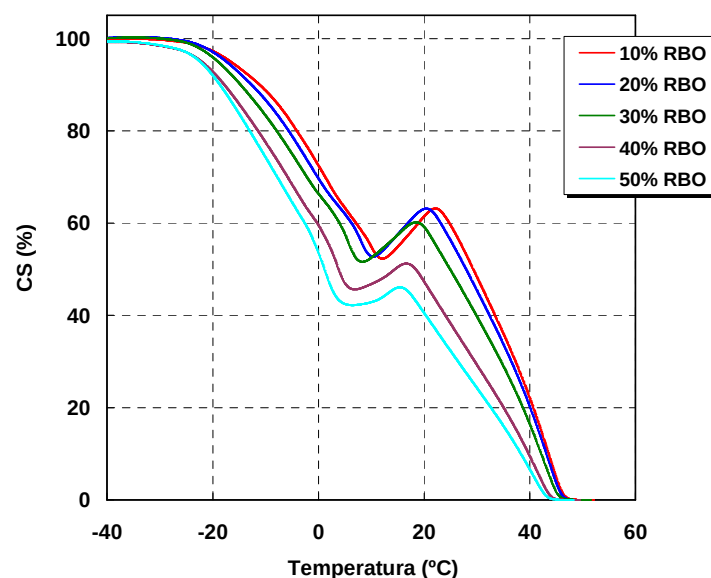


Figura 4.23.- Curva de contenido de sólidos en función de la temperatura para las mezclas BT/RBO.

A diferencia de las curvas de CS de las mezclas con ambos aceites, se observó que las obtenidas para los productos decrecieron en forma continua con el aumento de temperatura (**Figuras 4.24 y 4.25**), no presentando la distorsión correspondiente al pico exotérmico de los termogramas de fusión. Este efecto es similar a lo comentado previamente para el caso de la BT pura (**Figura 4.21**).

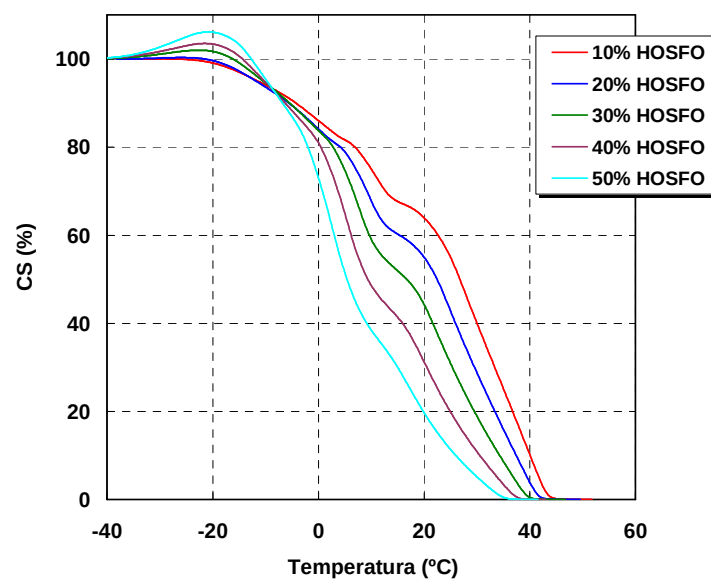


Figura 4.24.- Curva de contenido de sólidos en función de la temperatura para los productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO.

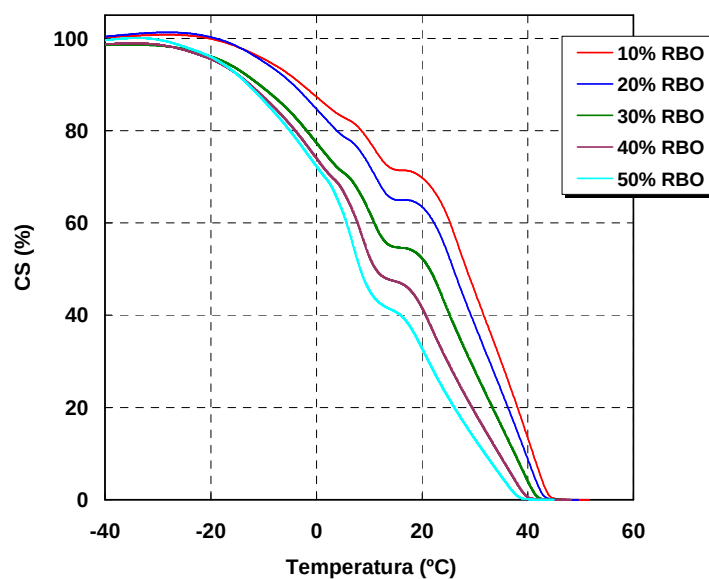


Figura 4.25.- Curva de contenido de sólidos en función de la temperatura para los productos de interesterificación de las mezclas BT/RBO.

Al igual que en las mezclas, a cualquier temperatura los valores de CS de los productos fueron menores al aumentar la cantidad de aceite, lo que era esperable dado el incremento en el grado de insaturación del material graso.

Como se observa en la **Figura 4.26** los CS resultaron menores en el producto que en su correspondiente mezcla inicial a temperaturas mayores a los 0 °C, posterior al salto provocado por el pico exotérmico en las mezclas.

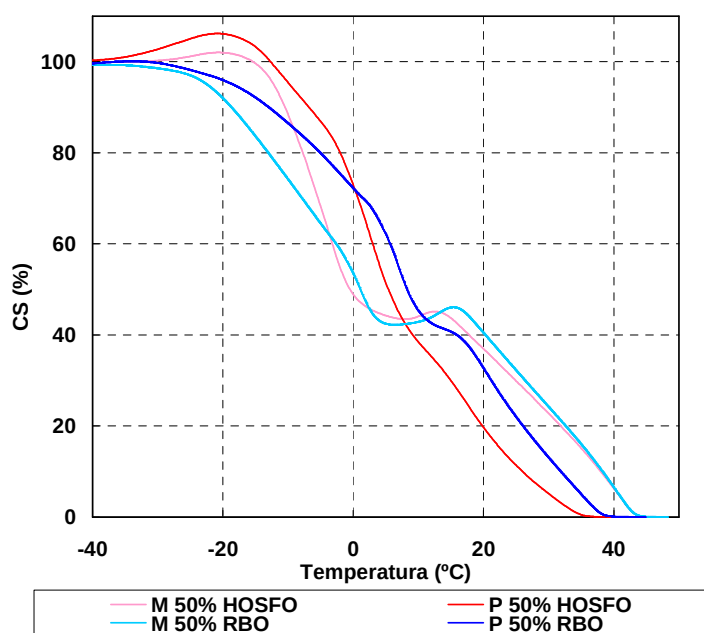


Figura 4.26.- Curvas de contenido de sólidos en función de la temperatura de las mezclas de 50 % de BT/HOSFO y de BT/RBO y sus respectivos productos de interesterificación.

Este efecto también fue reportado para la interesterificación de mezclas de BT con aceite de girasol catalizada por la lipasa Lipozyme TL IM (Jachmanián *et al.*, 2002).

También se observa en la **Figura 4.26** que los productos con HOSFO presentaron menor CS que los que contienen el mismo porcentaje de RBO, esto probablemente como consecuencia del mayor aporte de ácidos grasos saturados de este último.

4.3.4.- Efecto de la interesterificación sobre la plasticidad

El contenido de grasa sólida es responsable de muchas características importantes de las grasas, como la apariencia física, las propiedades organolépticas y la untabilidad. La plasticidad o consistencia de un producto graso comestible depende de la cantidad de sólidos y de la variación del contenido de grasa sólida con la temperatura. La amplitud del rango de fusión y otros factores como la morfología cristalina determinan el rango dentro del que una grasa puede ser considerada plástica (Rao *et al.* 2001). De acuerdo con De Man (1992), se puede considerar que un material graso presenta una untabilidad adecuada si el contenido de sólidos se sitúa dentro del rango de 15 a 35 %, rango al que se lo denomina “rango plástico”.

A partir de las curvas de contenido de sólido es posible determinar el rango de temperaturas correspondiente al rango plástico para cada mezcla y su producto de interesterificación, de manera de determinar el efecto de este proceso sobre dicho parámetro (**Figuras 4.27 y 4.28**).

La BT pura (0 % aceite) presentó un rango estrecho entre los 37 y 43 °C, que como ya se comentó este se encuentra a temperaturas por encima de la ambiente lo que lo hace un material con poca utilidad para la industria de los alimentos. Luego de interesterificar, la BTI presentó un rango entre 36 y 41 °C, muy similar a la BT original.

En el caso de las mezclas con ambos aceites se observa que el rango plástico correspondió a un rango de temperaturas más amplio a medida que aumentó el contenido de aceite, además de que se desplazó hacia temperaturas menores. Por ejemplo, mientras la mezcla conteniendo 10 % de HOSFO su rango plástico se ubicó entre 35 y 42 °C (con una amplitud de tan sólo de 7 °C), aquella conteniendo un 50 % de dicho aceite presentó un rango plástico entre 21 y 35 °C (con una amplitud de 14 °C) (**Figura 4.27**). Si bien las mezclas con ambos aceites mostraron este fenómeno, el efecto fue algo menor en el caso del RBO, pudiéndose observar que si bien prácticamente coincidieron las temperaturas a las cuales ambas mezclas presentaron un 15 % de sólidos (máxima temperatura del rango plástico) aquellas conteniendo HOSFO presentaron un 35 % de sólidos a temperaturas menores que aquellas conteniendo RBO en la misma proporción. Por ejemplo, el rango plástico para la mezcla con 50% de RBO se ubicó entre 23 y 36 °C,

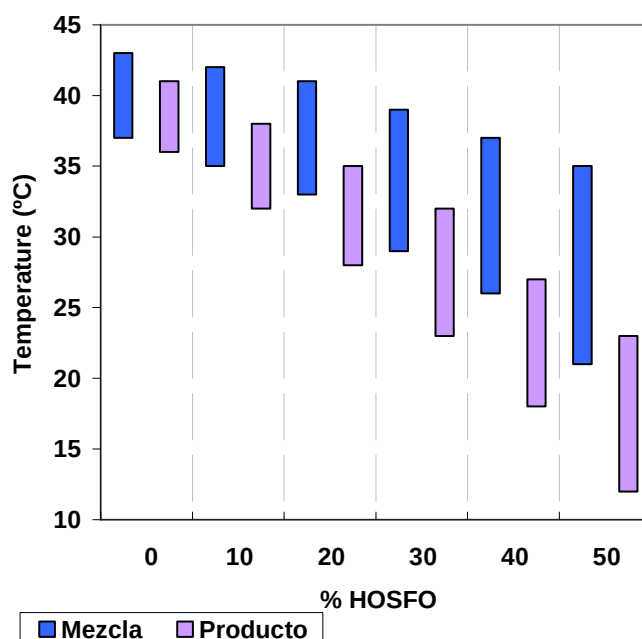


Figura 4.27.- Rango de temperatura correspondiente al rango plástico (CS entre 15 y 35%) para las mezclas BT/HOSFO y sus productos de interesterificación.

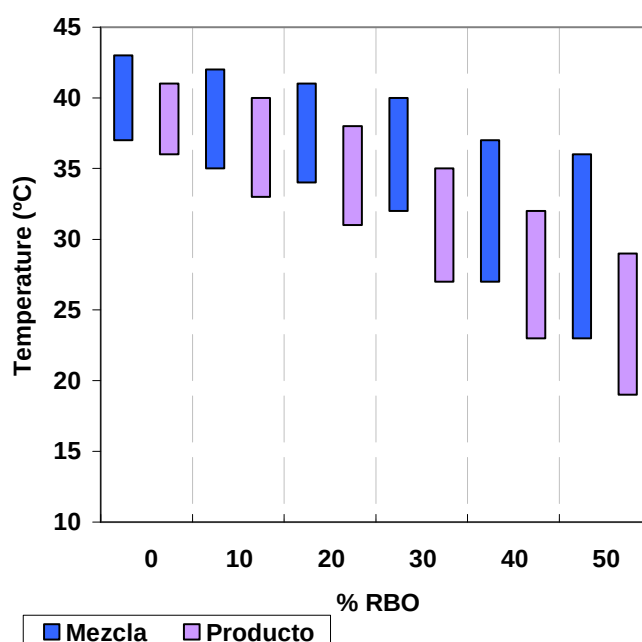


Figura 4.28.- Rango de temperatura correspondiente al rango plástico (CS entre 15 y 35%) para las mezclas BT/RBO y sus productos de interesterificación.

Estos resultados sugieren que la máxima temperatura del rango plástico (correspondiente al 15 % de sólidos) es consecuencia fundamentalmente de la presencia de los TAG más saturados aportados por la BT, mientras que la temperatura mínima (correspondiente al 35 % de sólidos) es la más afectada por las características

de los TAG del aceite y la intersolubilidad de los TAG en la mezcla, siendo el aceite de mayor grado de insaturación el que permite alcanzar un contenido de sólidos de 35 % a una menor temperatura.

Pese a las diferencias entre ambas mezclas es interesante notar la modificación de las características de plasticidad producida por el simple mezclado de la BT con un aceite vegetal, motivo por el cual el mezclado de materiales grasos de diferente “dureza” ha sido el proceso más simple utilizado tradicionalmente para la regulación de la plasticidad, pese a presentar varios inconvenientes vinculados a la compatibilidad de los TAG en la mezcla, como ya se ha mencionado.

En cuanto al efecto de la interesterificación sobre el rango plástico, se observa que todos los productos presentaron rangos plásticos desplazados hacia valores de temperatura más bajos que las mezclas de partida. Este efecto fue más importante al aumentar el contenido de aceite, por ejemplo para el producto con 10 % de HOSFO el rango se ubicó entre 32 y 38 °C (amplitud de 6 °C), mientras que en el caso de 50 % de HOSFO el mismo fue entre 12 y 23 °C (amplitud de 11 °C) al igual que lo observado en las mezclas. En el caso de las mezclas conteniendo RBO, si bien mostraron el mismo fenómeno, el efecto fue bastante mas moderado, presentando por ejemplo la mezcla conteniendo 50 % de RBO un rango plástico de entre 19 y 29 °C con una amplitud de 10 °C. También se observa que la amplitud del rango plástico luego de la interesterificación resultó algo menor que en la mezcla original.

Es interesante notar que los productos obtenidos a partir de mezclas conteniendo al menos un 40 % de aceite presentaron un rango plástico a temperatura ambiente y una cantidad de sólidos moderada a 37 °C, lo que resulta atractivo para materiales grasos destinados a la elaboración de diversos tipos de alimentos.

4.3.5.- Comparación de las propiedades térmicas de los productos obtenidos con las de productos similares utilizados por la industria alimentaria

Luego del detallado análisis realizado en este capítulo de las propiedades térmicas de los productos obtenidos en esta tesis resulta del mayor interés contrastar los resultados con datos reportados en la bibliografía para diferentes materiales grasos utilizados habitualmente por la industria de los alimentos para la elaboración de diferentes tipos de productos, a los efectos de evaluar posibles aplicaciones de estos productos.

La **Tabla 4.5** muestra valores típicos de contenido de sólidos a diferentes temperaturas publicados por Ghotra *et al.* (2002) para diferentes tipos de margarinas y shortenings, por lo que resulta una referencia muy conveniente

Para facilitar la comparación en la **Tabla 4.6** se muestran los contenidos de sólido (a las mismas temperaturas de la **Tabla 4.5**) correspondientes a los productos obtenidos en esta tesis mediante la interesterificación enzimática de las mezclas del BT con ambos aceites.

Tabla 4.5.- Valores típicos de contenido de sólidos a diferente temperatura para diferentes tipos de margarinas y shortenings (Ghotra *et al.* 2002).

Tipo de shortening	Temperatura (°C)					
	10	21,1	26,7	33,3	37,8	40
	SFC (%)					
Margarina en barra	28	16	12	2-3	0	NR
Margarina de tubo	13	8	6	2	0	NR
Margarina de panadería	27	18	16	12	8	NR
Margarina Roll-in	29	24	22	16	12	NR
Shortening todo propósito	23	19	NR	14	NR	11
	26	19	NR	13	NR	7
Shortening para heladería	34	28	27	22	18	NR
Shortening para masa de pastel	23	20	18	12	NR	4
Shortening fluido	8	8	NR	7	NR	6
Grasa de fritura	42	29	NR	13	NR	3
Grasa para rellenos	44	30	25	13	NR	2,5
Shortening para hojaldre	26	24	23	22	21	NR
	NR	21	20	16	15	NR

NR: no reportado

Los materiales más “blandos” incluidos en la **Tabla 4.5** son la margarina de tubo y el shortening fluido, con contenidos de sólidos a 10 °C de 8 y 13 %, respectivamente, son los únicos con menos de 15 % de sólidos a temperatura ambiente por lo que se trata de materiales extremadamente fluidos en comparación con cualquiera de los productos obtenidos (**Tabla 4.6**).

Tabla 4.6.- Contenido de sólidos a las mismas temperaturas que la **Tabla 4.5** para los productos obtenidos en esta tesis.

Producto de interesterificación	Temperatura (°C)					
	10	21,1	26,7	33,3	37,8	40
	CS (%)					
BTI	82	73	64	44	28	20
10% HOSFO	75	63	50	30	17	10
20% HOSFO	68	53	37	20	8	4
30% HOSFO	59	42	26	12	3	0
40% HOSFO	49	29	16	6	0	0
50% HOSFO	38	18	9	2	0	0
10% RBO	78	69	55	35	21	13
20% RBO	73	62	48	28	16	9
30% RBO	62	50	36	20	9	4
40% RBO	53	39	26	12	4	1
50% RBO	45	30	19	8	1	0

Al comparar los valores de contenido de sólidos (CS) obtenidos para los productos de interesterificación, se observa que los correspondientes al producto conteniendo 50 % de HOSFO son los más bajos. El comportamiento de éste producto se acerca al de la margarina en barra como se puede apreciar en la **Figura 4.29**, aunque presenta un CS algo más elevado a 10 °C, igual al 38 %, frente al 28 % de dicha margarina, siendo muy próximos los valores de CS a las demás temperaturas.

El resto de los shortenings y margarinas (margarinas de panadería y margarina roll-in, así como los shortening todo propósito, de pastelería, de helados y de hojaldres) contienen a la temperatura ambiente dentro de su rango plástico. También presentan perfiles de sólidos muy planos, poca variación en el rango de temperatura, por lo que los productos obtenidos comienzan a temperaturas bajas con una cantidad de sólidos superior a la necesaria y terminan a temperaturas altas con una inferior.

Los productos de 40 % HOSFO y de 50 % RBO se acercan al comportamiento de una grasa de fritura como se puede observar en la **Figura 4.29**. Para este tipo de grasa también es muy importante la estabilidad de la grasa frente al proceso térmico. Para ello otro aspecto a considerar son los componentes minoritarios de la grasa, principalmente los antioxidantes de la misma y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que la compongan. Los productos seleccionados contiene una cantidad interesante de antioxidantes naturales aportados por los aceites y su contenido de poliinsaturados no es muy alto, principalmente en el caso del producto de 40 % HOSFO.

El perfil de la grasa para rellenos, se acerca a los perfiles de los productos de 30 y 40 % HOSFO y de 40 y 50 % RBO (**Figura 4.29**). Los de 30% HOSFO y 40 % RBO tienen un poco más de sólidos que el de referencia a temperatura más baja, mientras que los otros dos productos presentan menos sólidos que el de referencia a temperaturas más altas. En este tipo de shortening, utilizado por ejemplo para rellenos en galletería, es necesario que la fase grasa le confiera firmeza al relleno a temperatura ambiente para que el alimento no se deforme fácilmente. Además, al momento del consumo del alimento la fase grasa debe fundir a la temperatura de la boca para evitar sensaciones indeseables como la cerosidad y arenosidad o granulosidad.

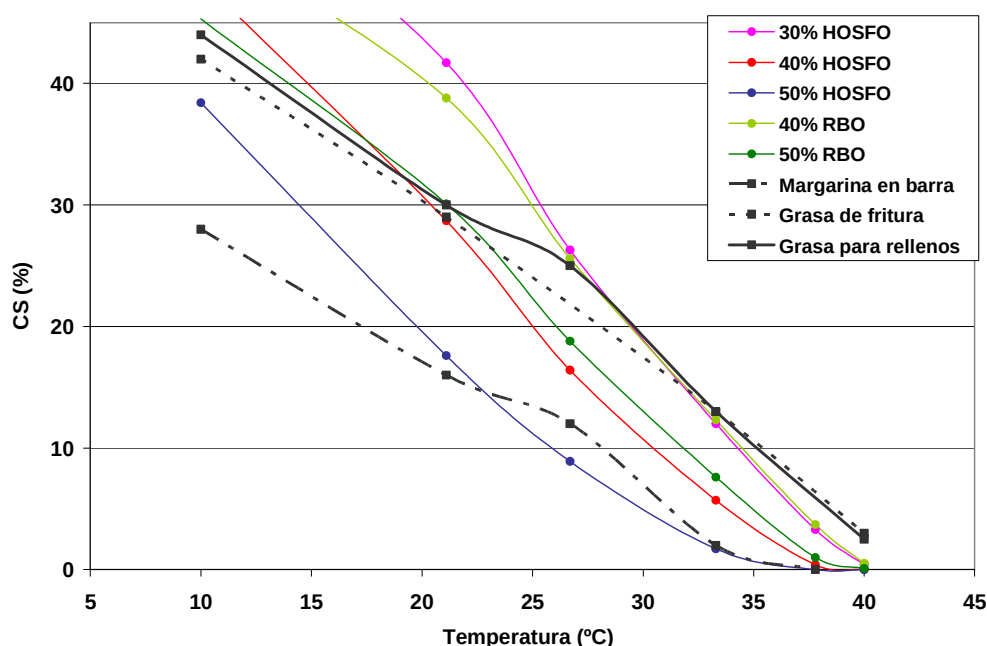


Figura 4.29.- Curvas de contenido de sólidos en función de la temperatura para algunos de diferentes tipos de shortenings y margarinas (Según Ghotra *et al.* 2002) y para algunos productos de interesterificación de las mezclas BT/HOSFO y BT/RBO que mejor se ajustan a los mismos.

Otros autores señalan valores de SFC para estos tipos de productos grasos comerciales un poco diferentes a los de la **Tabla 4.6**, esto se debe a tanto por diferencias climáticas o por hábitos de consumo diferentes entre distintos países una fase grasa destinada a un mismo tipo de uso puede presentar distintas propiedades según el mercado al que se destine. Por ejemplo Rodríguez *et al.* (2001) mencionan que un shortening para panadería debería tener un SFC de 35-37 % a 21 °C y 28-30 % a 25 °C, requerimientos que pueden ser satisfechos por los productos de interesterificación de las mezclas conteniendo entre 20 y 30 % de HOSFO o los provenientes de mezclas conteniendo entre 30 y 40 % de RBO. De todas formas, se

puede concluir que según la mezcla utilizada, o sea la cantidad y el tipo de aceite, se puede obtener un producto que se adecua mejor a cada propósito.

4.4.- Conclusión

Las mezclas de la BT con ambos aceites estudiados en diferentes proporciones mostraron perfiles térmicos distintos y con menores puntos de fusión. Estos cambios fueron más importantes conforme se aumentó la cantidad de aceite en la mezcla, ya que obviamente son consecuencia de los cambios en composición de la mezcla con la incorporación de aceite.

El simple mezclado de la BT con cada aceite produjo modificaciones en el rango plástico, el cual se amplió y se desplazó hacia temperaturas más bajas. Este último efecto se acentuó notoriamente luego del proceso de interesterificación.

El mezclado de la BT con cada aceite produjo, como era de esperar, la disminución de los picos propios de la BT en los termogramas, debido al efecto de dilución de sus TAG por el agregado de aceite.

La interesterificación produjo modificaciones importantes en los perfiles de fusión, constatándose la reducción en el contenido de sólidos y la desaparición del pico exotérmico atribuido a una transición polimórfica en la BT y sus mezclas.

Dado el cambio en la composición de TAG que se observó luego del proceso, el pico de fusión a baja temperatura aumenta y el de altas disminuye y se desplaza a temperaturas menores, lo que implica una disminución en la temperatura de fusión del material. Este comportamiento se acentuó cuanto mayor es la proporción de aceite en la mezcla inicial.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de interesterificación enzimática estudiado permitió modificaciones sustanciales en las propiedades térmicas de los materiales grasos de interés y sus mezclas, obteniéndose productos cuyas propiedades térmicas pueden ajustarse en función de la cantidad y el tipo de aceite utilizado.

Se encontraron coincidencias entre las propiedades de varios de los productos obtenidos y las de algunos productos comerciales reportados en bibliografía, lo que sugiere la viabilidad de su eventual aplicación como sustituto de éstos últimos.

Algunas características de los perfiles térmicos obtenidos sugieren que el proceso habría favorecido la tendencia a cristalizar en la forma β' , lo que dado el interés para la industria de este tipo de comportamiento resulta interesante un estudio más profundo de las características de cristalización de los productos, lo cual será objetivo de estudio en el capítulo siguiente.

4.5.- Bibliografía

- Bockisch M. 1993. Fats and oils handbook. AOCS PRESS: Champaign, Illinois.
- Chobanov D, Chobanova R. 1977. Alterations in glyceride composition during interesterification of mixtures of sunflower oil with lard and tallow. J Am Oil Chem Soc 54: 47–50.
- De Man J M. 1992. Fats and oils: chemistry, physics and applications. In: Hui H D (Ed), Encyclopedia of food science and technology. New York: John Wiley y Sons, pp 823–824.
- Foglia T A, Petruso K, Fearheller S H. 1993. Enzymatic interesterification of tallow–sunflower oil mixtures. J Am Oil Chem Soc 70: 281–285.
- Forssell P, Kervinen R, Lappi M, Linko P, Suortti T, Poutanen K. 1992 Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture. J Am Oil Chem Soc 69:126–129.
- Foubert I, Dewettinck K, Van de Walk D, Dijkstra A J, Quinn P J. 2007. Physical properties: structural and physical characteristics. In: Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (eds) The lipid handbook. CRC Press, Boca Raton, pp 471–534.
- Ghotra B S, Dyal S D, Narine S S. 2002. Lipid shortenings: a review. Food Res Int 35: 1015–1048.
- Hagemann J W, Tallent W H, Kolb KE. 1972. Differential scanning calorimetry of single acid triglycerides: effect of chain length and unsaturation. J Am Oil Chem Soc 49: 118–123.
- Jachmanián I, Gil M, Grompone M A. 2002. Mejoramiento de las propiedades térmicas y nutricionales de la grasa vacuna uruguaya mediante interesterificación enzimática. Aceites y Grasas 46: 84–92.
- Kellens M, Meeussen W, Reynaers H. 1990. Crystallization and phase transition studies of tripalmitin. Chemistry and Physics of Lipids, 55: 163-178
- Lo Y, Handel A. 1983. Physical and chemical properties of randomly interesterified blends of soybean and tallow for use as margarine oils. J Am Oil Chem Soc 60: 815–818.
- Lovegren N V, Gray M S. 1978. Polymorphism of saturated triglycerides: I. 1,3-distearo triglycerides. J Am Oil Chem Soc 55: 310–316.
- Oh J H, McCurdy A R, Clark S, Swanson B G. 2005. Stabilizing polymorphic transitions of tristearin using diacylglycerols and sucrose polyesters. J Am Oil Chem Soc 82:13-19.
- Philippaerts A, Breesch A, De Cremer G, Kayaert P, Hofkens J, Van den Mooter G, Jacobs P, Sels B. 2011. Physical properties of nutritive shortenings produced from

regioselective hardening of soybean oil with Pt containing Zeolite. J Am Oil Chem Soc 88: 2023–2034.

Rao R, Sankar K U, Sambaiah K, Lokesh B R. 2001. Differential scanning calorimetric studies on structured lipids from coconut oil triglycerides containing stearic acid. Eur Food Res Techno 212: 334-343.

Rodríguez A, Castro E, Salinas M C, López R, Miranda M. 2001. Interesterification of tallow and sunflower oil. J Am Oil Chem Soc 78: 431–436.

Tan C P, Che Man Y B. 2000. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: comparison of thermal properties and chemical composition. J Am Oil Chem Soc 77: 143–155.

Tan C P, Che Man Y B. 2002. Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. Food Chem 76: 89–102.

Capítulo 5

Microestructura cristalina y polimorfismo

5.1.- Introducción	2
5.2.- Métodos.....	6
5.2.1.- Microscopía de luz polarizada (PLM).....	6
5.2.2.- Purificación de los TAG con alúmina.....	6
5.2.3.- Difracción de rayos-X (XRD)	7
5.3.- Resultados y Discusión	8
5.3.1.- Morfología y microestructura cristalina por análisis por PLM	8
5.3.1.1- Morfología y microestructura cristalina de los materiales purificados	15
5.3.2.- Polimorfismo por análisis por XRD.....	21
5.4.- Conclusiones	28
5.5.- Bibliografía	30

5.1.- Introducción

Las grasas y los aceites naturales están constituidos por triacilgliceroles (TAG), aproximadamente en un 98 %, por este motivo la composición en TAG de una grasa o aceite es el principal determinante de las características de las mismas cuando cristalizan, si bien debe tenerse en cuenta que frecuentemente la concentración y naturaleza de los componentes minoritarios pueden ejercer un efecto muy importante sobre dichas características, principalmente en las grasas y aceites sin refinar, donde se encuentran en mayor concentración.

Es conocido que las grasas y los aceites comestibles pueden solidificar originando diferentes formas cristalinas, dando origen al fenómeno conocido como polimorfismo. Este fenómeno es del mayor interés en el área alimentaria ya que el tipo de cristal afecta propiedades fundamentales como el punto de fusión, el contenido de sólidos, la plasticidad y la textura (Rao *et al.* 2001). Existen tres formas cristalinas predominantes en las grasas, llamadas α , β' y β , en este orden de estabilidad y temperaturas de fusión. La forma α se asocia a una celda unidad hexagonal, la β' a una ortorrómbica y la β a una triclinica (**Figura 5.1**) (Foubert *et al.* 2007).

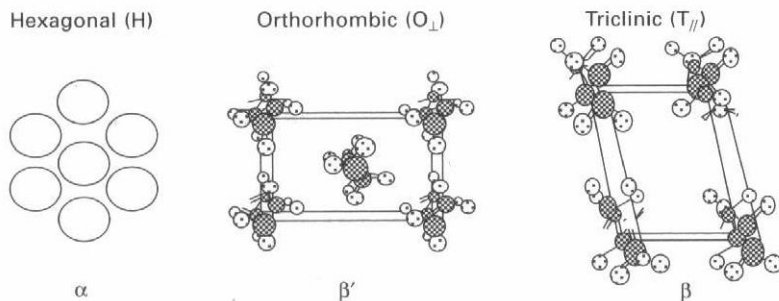


Figura 5.1.- Celdas unidad de los principales polimorfos de los triacilgliceroles (Martini *et al.* 2006)

La **Figura 5.2** muestra el empaquetamiento de la triestearina (StStSt) en los distintos polimorfos. Se observa que en el polimorfo α las cadenas se ubican en posición vertical respecto al plano basal, mientras que en los polimorfos β y β' se presentan inclinadas. La diferencia entre estos últimos es que en β todos los enlaces C-C de los ácidos grasos (zig-zag) están en un mismo plano, mientras que en el β' las cadenas adyacentes se encuentran en planos diferentes (Timms 2003).

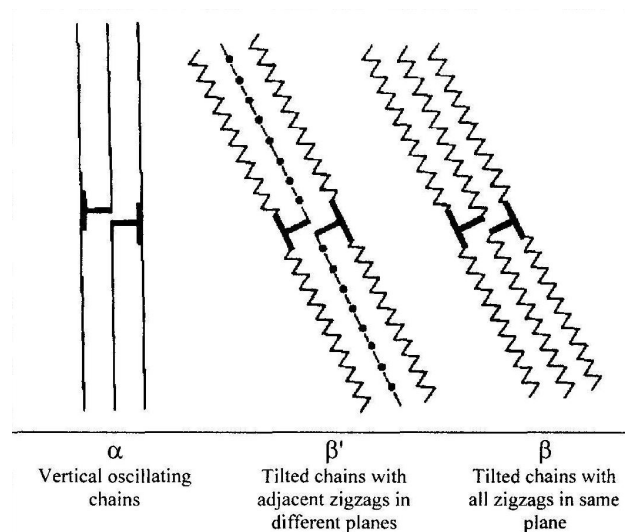


Figura 5.2.- Diagrama esquemático comparativo de los distintos polimorfos de la triestearina (Timms 2003).

Debido al fenómeno del polimorfismo por lo tanto es habitual que durante procesos de cristalización o de fusión de TAG además del cambio de fase se observen procesos de transición polimórfica, exo- o endotérmicos según el caso (Oh *et al.* 2005). En general la velocidad de las transformaciones polimórficas dependerá del largo de las cadenas de ácidos grasos, siendo mayor para cadenas más cortas. En el caso de las grasas y aceites naturales, dado la diversidad en la población de TAG que los componen, las transformaciones ocurren a una velocidad relativamente baja. Generalmente al inicio de un proceso de cristalización se forman cristales del polimorfo α , menos estable, el que puede transformarse rápidamente a la forma β' , la cual, dependiendo de la composición de los TAG, puede permanecer por períodos relativamente cortos (horas) o muy largos (días o más), o incluso perdurar sin transformarse a la forma β , debido a la formación de compuestos o soluciones sólidas que le pueden conferir la estabilidad suficiente (Walstra 1987).

En forma esquemática, se puede considerar que los TAG se orientan en una red cristalina en una configuración tipo silla o tenedor, pudiendo presentar un empaquetamiento doble o triple. La altura de estas estructuras tipo silla y la distancia entre sus moléculas se pueden determinar mediante análisis de difracción por rayos-X en las regiones correspondientes a espaciados largos y cortos, respectivamente (Figura 5.3).

Cada polimorfo se caracteriza por su patrón de difracción de rayos-X en la región de espaciados cortos (que manifiesta la distancia entre los grupos acilo paralelos de los TAG). La forma α se manifiesta por una fuerte señal a 4,14 Å, la forma β' por dos señales fuertes a 3,8 y 4,2 Å y la forma β con una señal fuerte a 4,6 Å.

Los espaciados largos depende de la longitud de la molécula (y por lo tanto del número de átomos de carbono en las cadenas de ácidos grasos) y el ángulo de inclinación entre los ejes de la cadena y el plano basal (Timms 2003).

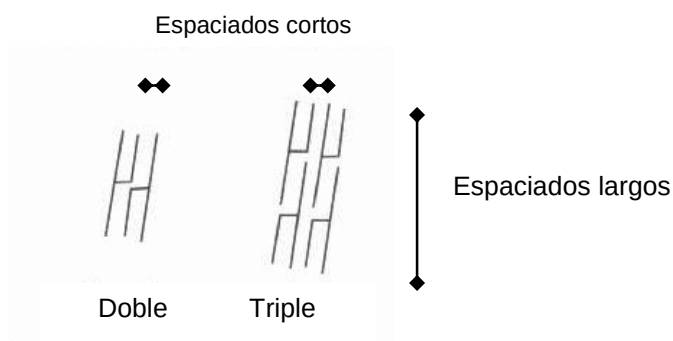


Figura 5.3.- Diagrama de los empaquetamientos de doble largo de cadena (DCL) y Triple largo de cadena (TCL) (Martini *et al.* 2006).

En general, las grasas y los aceites constituidos por una población de TAG relativamente reducida y muy similares tienden a generar preferentemente cristales del tipo β estables. Por el contrario, las grasas con una población de TAG heterogénea tienden a tener una menor preferencia por la formación de cristales tipo β , ya que éstos tienen una menor capacidad que la forma β' para alojar moléculas con una distribución de tamaños más diversos (Foubert *et al.* 2007).

Un ejemplo muy conocido relacionado con lo anterior lo constituye la diferencia entre el TAG simétrico POP (P: ácido palmítico, O: ácido oleico) y su isómero asimétrico PPO, mientras que la forma más estable del primero es el polimorfo β , el segundo presenta una fuerte tendencia hacia la forma β' (Minato *et al.* 1997). Esto deja en evidencia que también la distribución de los ácidos grasos en el TAG es determinante sobre el proceso de cristalización.

Dada la diversidad de TAG constituyentes de la grasa vacuna (BT), la misma es considerada una grasa heterogénea, que tiende a producir cristales β' , los cuales pueden persistir durante largos períodos (Foubert *et al.* 2007).

La grasa vacuna contiene un nivel relativamente alto de triglicéridos saturados que no funden a la temperatura de la boca, produciendo una sensación característica desagradable de cerosidad en el paladar. Además, las fluctuaciones de temperatura en un amplio intervalo durante su manipulación, almacenamiento o transporte, desencadena el crecimiento de cristales granulares con un diámetro de 2 a 3 mm o aún superior. Este fenómeno conocido como la formación de gránulos es una desventaja importante que perjudica la consistencia y la plasticidad de shortenings y margarinas con base BT y, además, es el responsable de la sensación de “arenosidad” en la boca del consumidor (“*sandy mouthfeel*”), que caracteriza a estos productos (Meng *et al.* 2010).

La formación de cristales granulares por efecto de la fluctuación de la temperatura en los shortening constituidos en base a la BT ha sido atribuida a la cristalización de los TAG de mayor punto de fusión (tales como POP, POSt y StOSt) principalmente bajo la forma β (Jin *et al.* 2007). Dado que este fenómeno involucra la aglomeración de dicho tipo de TAG de alto punto de fusión, junto con la formación de cristales β , se lo ha comparado al fenómeno conocido como “*fat bloom*” que ocurre en el chocolate de manteca de cacao, también cuando se lo somete a fluctuaciones importantes de temperatura.

El polimorfo β' suele ser el más funcional en los productos grasos tipo shortening o margarina debido a que su morfología en forma de aguja de tamaño pequeño ($\sim 1 \mu\text{m}$) y fino (Ghotra *et al.* 2002).

Asimismo las propiedades cristalinas tales como el tamaño y la morfología influyen también la estructura cristalina, la cual, a su vez, afecta el comportamiento de la textura, el aspecto y la funcionalidad de las grasas.

La cuantificación de estos parámetros de la microestructura ha sido un aspecto difícil, principalmente por la toma de las imágenes de microestructura, así como la complejidad de las estructuras a este nivel. La microscopía ha sido el método más utilizado para obtener imágenes de la microestructura de grasas, en particular la microscopía de luz polarizada (PLM) ha sido la más utilizada, ya que la anisotropía de la fase cristalina de la red de grasa es birrefringente, lo que permite observar la red bajo polarizadores cruzados (Ghotra *et al.* 2002).

En cuanto a los antecedentes de la influencia del proceso de interesterificación sobre la red cristalina, Rodríguez *et al.* (2001) reportan que tanto el proceso como el simple mezclado de grasa vacuna con aceite de girasol influyen fuertemente la densidad, el tamaño y la forma del cristal. Asimismo Rousseau *et al.* (1998), observaron la alteración en la morfología y la densidad de la red cristalina de una grasa causada por la interesterificación, lo que finalmente afecta la textura y la funcionalidad de dicha grasa.

En el presente capítulo se estudiaron las características de la cristalización (morfología cristalina por PLM y polimorfismo por XRD), de la BT pura y el efecto sobre dichas características del mezclado con el aceite de girasol de alto oleico (HOSFO) y con el aceite de salvado de arroz (RBO). Finalmente se estudio las modificaciones sufridas en los hábitos cristalinos de dichas mezclas luego del proceso de interesterificación enzimática. Ambas metodologías debieron ponerse a punto y ajustarse a las características de las muestras de interés, además de que no existían antecedentes en el Laboratorio de Grasas y Aceites en la realización de dichos análisis.

5.2.- Métodos

Se utilizaron los materiales grasos, estándares y reactivos indicados en **2.1**. Los productos de interesterificación de las mezclas 50 % de HOSFO con BT y 50 % RBO con BT fueron obtenidos por incubación con Lipozyme TLIM durante 24 h en las condiciones descritas en **2.2**.

5.2.1.- Microscopía de luz polarizada (PLM)

Para este análisis se contó con un microscopio Olympus BX 50, equipado con polarizador, una cámara digital (Media Cybernetics) y una platina para muestra calefaccionada Mettler Toledo, FP82-Microscope Hot Stage, propiedad del Departamento de Tecnología Bioquímica-Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo-USP, San Pablo, Brasil. Para la ejecución de estos análisis se contó con la gentil colaboración del Dr. Luiz Antonio Gioielli, director de dicho departamento, y de su equipo de trabajo.

La muestra a analizar contenida en un vial de 4 mL se colocó dentro de una estufa a 70 °C hasta su fusión completa. Luego se homogeneizó y una gota de la misma se transfirió mediante el uso de un tubo capilar a un portaobjeto de vidrio y luego se la cubrió con un cubreobjeto. La muestra así preparada se colocó en un incubador a 25 °C durante 20 horas. Transcurrido dicho período se la colocó en la platina del microscopio termostatzada a 25 °C y se tomaron imágenes de tres vistas diferentes con un aumento de 40x, las que se registraron para luego proceder a su análisis.

Las imágenes se registraron y procesaron mediante el uso del software Image-Pro Plus, versión 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

Se analizaron por este método muestras de las mezclas y los productos obtenidos y, alternativamente, algunas de éstas luego de la purificación de los TAG constituyentes de las mismas, como se describe a continuación. Cada muestra se analizó por duplicado.

5.2.2.- Purificación de los TAG con alúmina

Para estudiar el efecto de la presencia de compuestos minoritarios en las características del modo de cristalización de algunas muestras seleccionadas se procedió a la purificación de sus TAG, para lo que se procedió según lo recomendado en el método AOCS Ch 3-91 (punto "Sample Preparation 2", AOCS 1996).

Se preparó una suspensión de 15 g de alúmina activada en 50 mL de hexano y se empacó la misma en una columna cromatográfica de vidrio. Luego se hizo pasar una solución de 5 g del material graso en 25 mL de hexano a través de la columna y posteriormente se eliminó el solvente del eluato bajo corriente de nitrógeno, obteniéndose los TAG purificados.

5.2.3.- Difracción de rayos-X (XRD)

Los análisis por difracción de rayos-X se realizaron en un Difractómetro de Polvo Rigaku ULTIMA IV (instalado en el Laboratorio de Cristalografía, Cryssmat-Lab/DETEMA, Facultad de Química), equipado con un tubo de ánodo de Cu. Las medidas se efectuaron en el modo θ/θ con un paso de $0,04^\circ$ a razón de 10 seg por paso. El espaciado largo se midió entre 1 y 10° y el espaciado corto entre 10 y 30° . Para la ejecución de este análisis se contó con la gentil colaboración del Dr. Leopoldo Suescun, de dicho laboratorio.

La muestra a analizar, contenida en un vial de 4 mL, se colocó dentro de una estufa a 70°C hasta su fusión completa y, mediante el uso de una pipeta Pasteur, se colocaron varias gotas en un porta muestra de vidrio provisto de cavidad para muestra (20 mm de lado x 0,5 mm de profundidad). La cantidad de muestra se ajustó de manera de nivelar exactamente la superficie de la muestra con el borde de la cavidad. La muestra así preparada se dejó reposar en un horno termostatzado a $20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, permitiendo así su cristalización. Transcurrido dicho período la muestra se colocó en el soporte para muestras del difractómetro de Rayos- X. La temperatura del ambiente del laboratorio donde se encontraba este equipo se ajustó a aproximadamente 20°C mediante el ajuste del aire acondicionado disponible.

Para la identificación de los diferentes polimorfos se analizó la zona de espaciados cortos de los difractogramas, según lo indicado por la Norma AOCS Cj 2-95 (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1: Identificación de formas cristalinas de triacilglicerol según el patrón de difracción de Rayos-X a espaciados cortos de acuerdo (Norma AOCS Cj 2-95, 1996).

Forma cristalina	Línea o pico
α	$4,15 \pm \text{sd } \text{\AA}$
β'	$3,8 \pm \text{sd } \text{\AA}$
	$4,2 \pm \text{sd } \text{\AA}$
β	$4,6 \pm \text{sd } \text{\AA}$

5.3.- Resultados y Discusión

5.3.1.- Morfología y microestructura cristalina por análisis por PLM

El estudio de la estructura cristalina por medio de la microscopía de luz polarizada permite visualizar la distribución de cristales y la forma de agregación de los mismos en la red cristalina.

La **Figura 5.4** muestra las imágenes a 25 °C correspondientes a la BT antes y luego de su interesterificación enzimática durante 24hs (IBT), ambas templadas a 25 °C durante 20 horas. Se observa que la red cristalina de la BT original es una red densa, compuesta mayormente por esferulitos asimétricos y pequeñas agujas (presentando un diámetro máximo de 72,99 μm). Esto se puede atribuir a la diversidad en la población de los TAG que la componen, lo que da origen a agregados de muy diferente morfología. La aparición de dos tipos de cristales diferentes también sugiere que la BT debe haber cristalizado por un proceso de cristalización heterogéneo (aparición de núcleos cristalinos a distintos tiempos en diferentes zonas de la muestra), fenómeno que pudo contemplarse mediante la toma de imágenes secuenciales de la muestra durante la cristalización. Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez *et al* (2001) acerca de las características de la red cristalina de la BT y su forma de cristalización.

La **Figura 5.4.b** muestra la imagen obtenida por microscopía de luz polarizada de una muestra de IBT. En la misma se observan diferencias notorias con respecto a la imagen correspondiente a la muestra sin interesterificar, los cristales son más pequeños y homogéneos, presentando un diámetro máximo de 33,4 μm , sensiblemente menor al diámetro máximo mostrado por los cristales de la BT original. Estas diferencias pueden atribuirse al efecto “homogenizador” de la interesterificación, que ya se demostró que procede como una randomización; sobre la composición en TAG y la consecuente reducción de la concentración de TAG con mayor punto de fusión promotores de la cristalización heterogénea de la BT y por lo tanto, de los cristales de mayor tamaño observados en la red de la BT. Estos TAG, como se vio en el **Capítulo 3**, son los trisaturados que pasan de una concentración de 15,4 % en BT a 12,8 % en IBT.

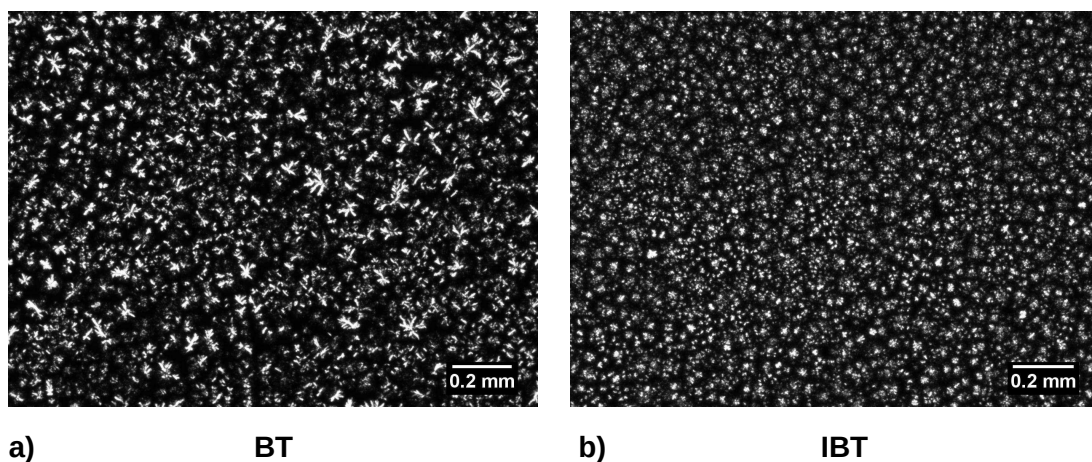


Figura 5.4.- Imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada a 25 °C de **a)** grasa vacuna pura (BT); **b)** grasa vacuna interesterificada (IBT).

La **Figura 5.5 a** muestra las imágenes obtenidas por PLM de las mezclas de BT y HOSFO, también templadas a 25 °C durante 20 horas. Se observa que la proporción de la superficie de la imagen correspondiente a los cristales disminuyó con respecto a la de la **Figura 5.4.a** (BT) y que dicha disminución fue más notoria al crecer la proporción de aceite a 50 %. Esto era esperable ya que el aceite aporta TAG de bajos puntos de fusión (principalmente triincaturados) que actúan diluyendo los TAG más saturados proveniente de la BT. Asimismo, se observa que la morfología de los cristales no se modificó con el aumento de la proporción de HOSFO, lo que es coherente con el hecho de que TAG que cristalizan a la temperatura de trabajo son de la misma naturaleza y en ambos casos son aportados por la BT.

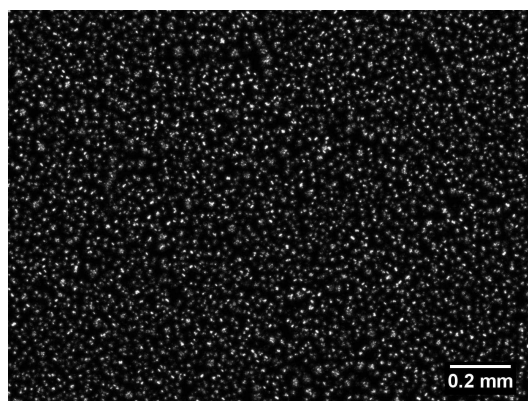
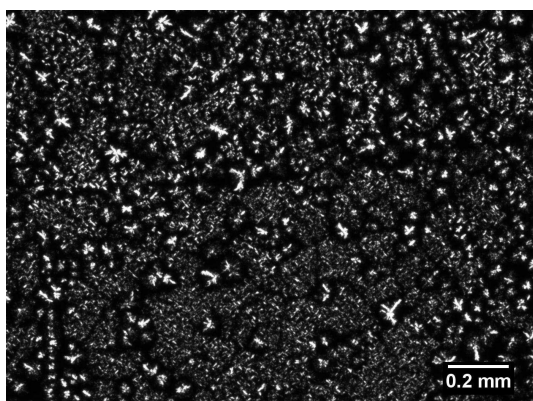
Las **Figuras 5.5.b** muestran que luego del proceso de interesterificación todas las mezclas presentaron cristales más regulares lo que puede atribuirse, al igual que en el caso de la interesterificación de la BT pura, al efecto homogenizador del proceso sobre la composición en TAG.

a)

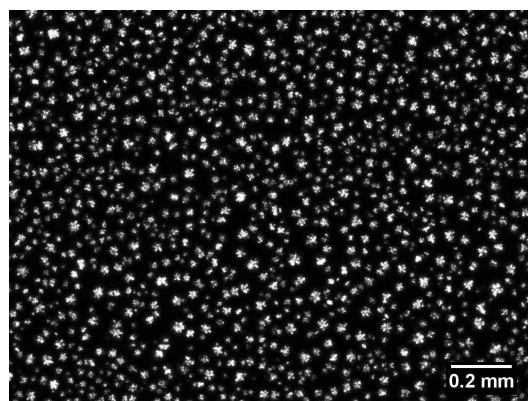
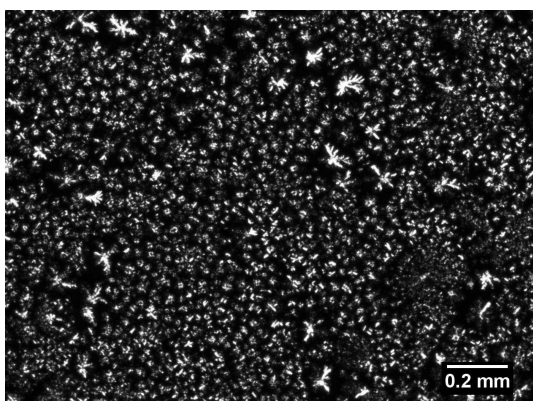
Mezclas

b)

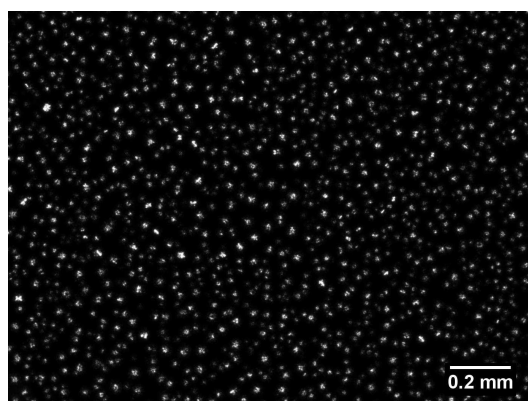
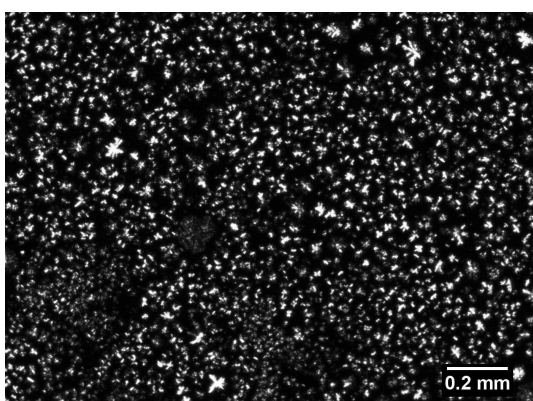
Productos



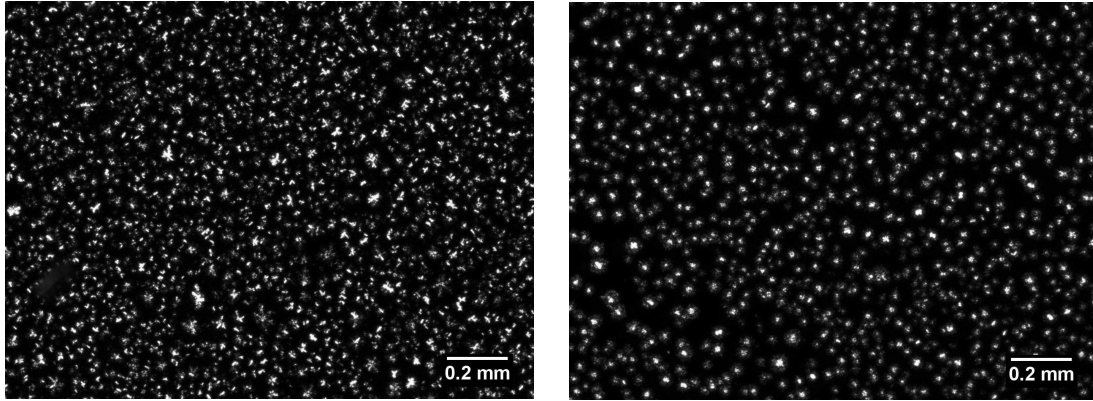
10 % HOSFO



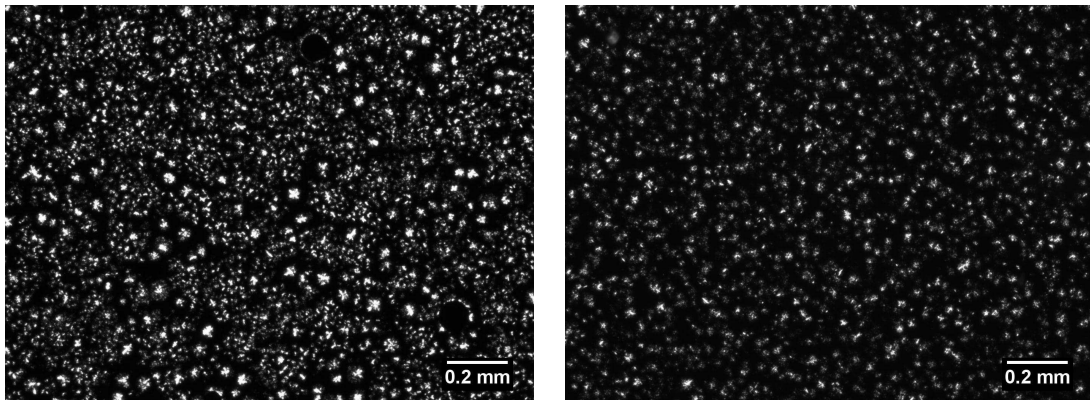
20 % HOSFO



30 % HOSFO



40 % HOSFO



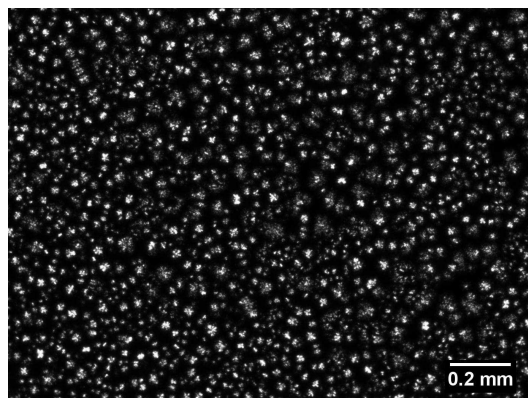
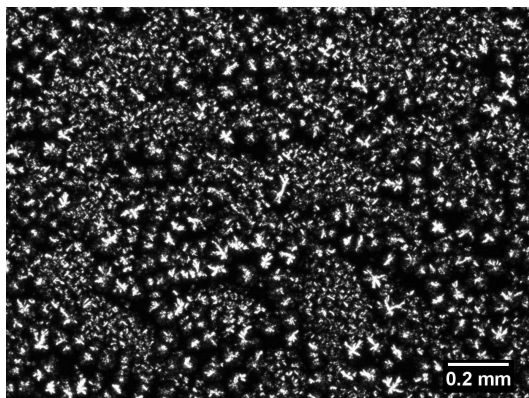
50 % HOSFO

Figura 5.5.- Imágenes obtenidas por microscopia de luz polarizada a 25 °C de las mezclas de BT con HOSFO (a) y sus productos de interesterificación (b)

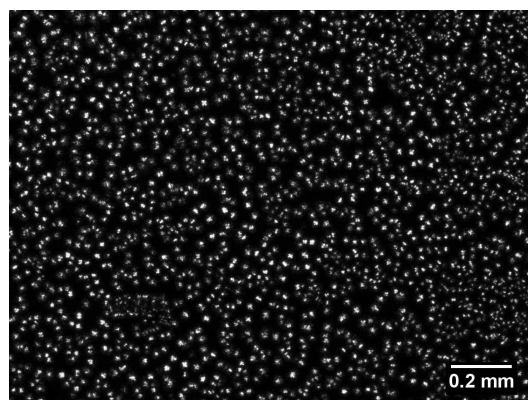
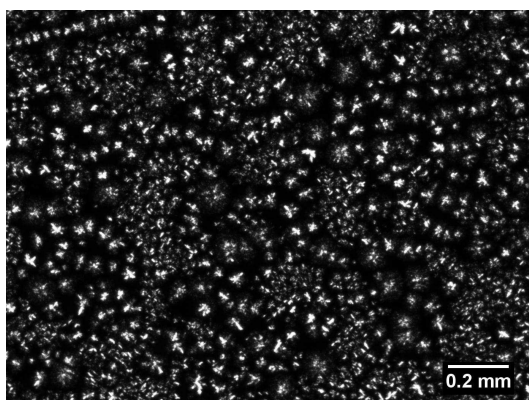
En el caso de las mezclas conteniendo RBO (**Figura 5.6.a**) se observa, al igual que en aquellas conteniendo HOSFO, la disminución en la concentración de cristales con respecto a la observada para la BT pura, y también al aumentar el contenido de aceite de 10 a 50 %. También se observa que se mantiene la irregularidad en las principales características morfológicas de los cristales (tamaño, formas, diámetros, etc.).

a) Mezclas

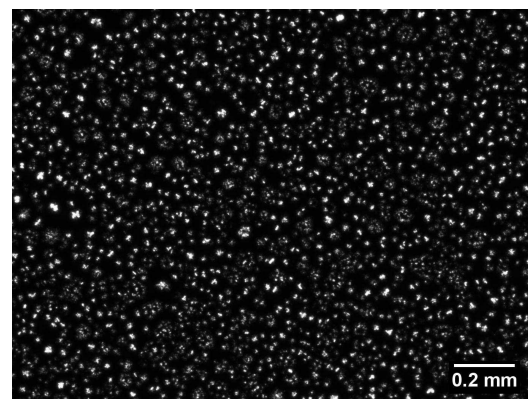
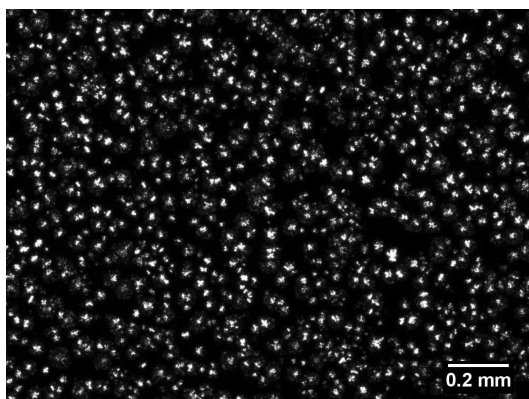
b) Productos



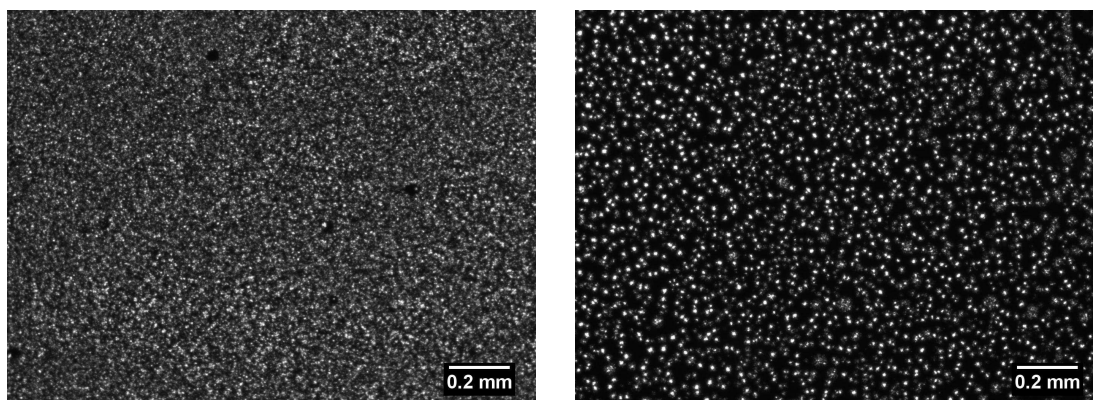
10 % RBO



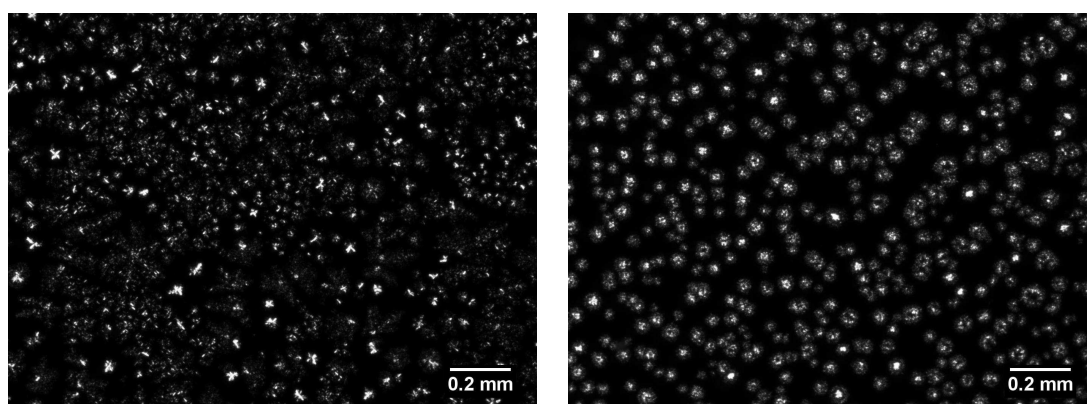
20 % RBO



30 % RBO



40 % RBO



50 % RBO

Figura 5.6.- Imágenes obtenidas por microscopia bajo luz polarizada a 25 °C de las mezclas de BT con RBO (a) y sus productos de interesterificación (b).

Luego del proceso de interesterificación en las mezclas de BT/RBO (**Figura 5.6.b**) también se observa la homogenización de los cristales y la reducción del tamaño de los mismos respecto a la mezcla inicial, efectos ya observando para IBT (**Figura 5.4.b**) y para las mezclas de BT/HOSFO (**Figura 5.5.b**). Ésta reducción y homogeneización de tamaños obviamente responden al mismo efecto en todos los casos, vinculado a la desaparición de los TAG más saturados debido al efecto homogenización sobre la composición de los mismos a causa de la randomización enzimática.

Este mismo efecto fue reportado por Rousseau *et al.* (1998) para la interesterificación de mezclas de grasa de cerdo y por Riveiro *et al.* (2009) para la interesterificación de las mezclas de aceite de algodón totalmente hidrogenado con aceite de canola.

En la **Tabla 5.2** se resumen los datos obtenidos para el diámetro máximo de los cristales para todas las muestras, la BT, la IBT, las 5 mezclas de la BT con cada aceite en diferentes proporciones y sus correspondientes productos de interesterificación.

Para el caso de las mezclas se observa que los diámetros máximos varían en rangos similares para ambos tipos de mezcla: entre 34 y 59 μm para aquellas conteniendo HOSFO y entre 32 y 58 μm para las que contienen RBO. En todos los casos los diámetros máximos fueron menores que los correspondientes a la muestra de BT pura, lo que se explica por el efecto de “dilución” del agregado de aceite sobre los TAG saturados provenientes de BT (como se demostró en el **Capítulo 3**). Resultados en el mismo sentido fueron reportados por Rousseau *et al.* (1998) para el comportamiento cristalino de mezclas de aceite de soya con aceite de palma y de aceite de canola con grasa de cerdo. También se ha reportado este comportamiento para mezclas de aceite de algodón totalmente hidrogenado con aceite de canola (Riveiro *et al.* 2009). En el caso específico de la BT se reportó un efecto similar para sus mezclas con aceite de girasol (Rodríguez *et al.* 2001), lo que los autores atribuyeron al efecto de dilución mencionado anteriormente.

Sin embargo, si bien este efecto de “dilución” es creciente al aumentar la proporción de aceite, por lo que se hubiera esperado que los diámetros máximos disminuyeran con el porcentaje de aceite, los resultados obtenidos en esta tesis no indican la existencia de dicha tendencia. La misma sí fue reportada para mezclas de aceite de algodón totalmente hidrogenado con aceite de canola en el trabajo de Riveiro *et al.* (2009).

Tabla 5.2.- Diámetros máximos (en μm) de los cristales de la BT y las diferentes mezclas con RBO o HOSFO y sus productos de interesterificación.

		Mezcla original	Producto interesterificación
BT		73	33
HOSFO (%)	10	49	22
	20	59	33
	30	52	24
	40	36	25
	50	35	32
RBO (%)	10	58	27
	20	37	23
	30	32	26
	40	48	21
	50	32	33

En relación a los tamaños máximo de cristal obtenidos para los productos de interesterificación, se observa que en el caso de ambos tipo de mezcla los diámetros máximos de los cristales disminuyeron luego del proceso enzimático, obteniéndose diámetros máximos en rangos muy similares para ambas mezclas: entre 22 y 33 μm para las mezclas BT/HOSFO y entre 21 y 33 μm para las mezclas BT/RBO (**Tabla 5.2**). Tampoco en el caso de los productos se aprecia una tendencia clara entre este parámetro y el porcentaje de aceite.

En general los efectos observados sobre las características de los cristales por efecto combinado del mezclado y la posterior interesterificación resultan muy ventajosos para un material graso destinado a la industria alimentaria, dado que la desaparición de los agregados tipo gránulos característicos de la BT y de los TAG altamente saturados sugieren productos que no deberían producir las sensaciones de arenosidad ni cerosidad desagradables al paladar del consumidor.

5.3.1.1.- Morfología y microestructura cristalina de los materiales purificados

Existen numerosos trabajos publicados acerca del efecto de la composición química y en particular de la presencia de componentes minoritarios en las características de cristalización de las grasas naturales. Los efectos observados como consecuencia del proceso de interesterificación lo muestran muy ventajoso, ya que, de esta forma se evitan la formación de gránulos y la sensación de arenosidad en el material graso, características que se busca evitar en las grasas usadas por la industria alimentaria (Martini *et al.* 2006). Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de diacilglicéridos (DAG) en la grasa de leche genera cambios sustanciales en los mecanismos de crecimiento de los cristales (Wright *et al.* 2000).

Se pueden adicionar aditivos y/o componentes menores previamente removidos, ya que los mismos tienen, o se presume que tienen influencia sobre la cristalización, el brillo superficial, la estabilidad de temperatura, la reología, la estabilidad polimórfica, etc. Por supuesto, los componentes menores también pueden ser removidos ya que pueden otorgar sabor extraño al producto, generar inestabilidad oxidativa o simplemente porque valen más como productos independientes. También las partículas sólidas no grasas (por ejemplo, azúcar, proteínas, partículas de cacao) pueden tener influencia en muchas de las propiedades de cristalización de grasa (Smith *et al.* 2011).

Los componentes menores pueden afectar tanto las etapas de nucleación como las de crecimiento cristalino o ambas en diferente grado (Smith *et al.* 2011). Algunos componentes minoritarios pueden estimular la nucleación, mientras que el crecimiento es retardo, o viceversa, otros estimulan o retardan ambos. Los efectos sobre la nucleación pueden ser alteración del tiempo de nucleación, cambio de temperatura de nucleación, y cambio en el número y la naturaleza de los núcleos formados. La

segunda etapa de la cristalización, después de la nucleación, es el crecimiento de los cristales, que también puede estar influenciado por los componentes menores. En ese sentido se encontró que el efecto de los glicéridos parciales sobre la tasa de crecimiento de la cristalización podría ser la promoción del crecimiento por parte de los FFA y la inhibición de la misma por los DAG.

En función de estos antecedentes y la posibilidad de que componentes minoritarios en las muestras analizadas (glicéridos parciales y ácidos grasos libres, principalmente) pudieran haber afectado las características de los cristales en las mismas, se realizó la purificación de los TAG de los distintos materiales de interés, de manera de remover completamente todos los eventuales compuestos minoritarios presentes en los mismos y luego se los destinó nuevamente al análisis por PLM.

En la **Figura 5.7** se muestran los resultados obtenidos para la BT y su producto de interesterificación (IBT) luego de purificados. Se observa que los cristales generados en la BT purificada no presentaron grandes diferencias con los obtenidos para la BT sin purificar (**Figura 5.4**). En el caso de la IBT sí aparecen agrupaciones cristalinas de gran tamaño, que no se encontraron en la muestra sin purificar.

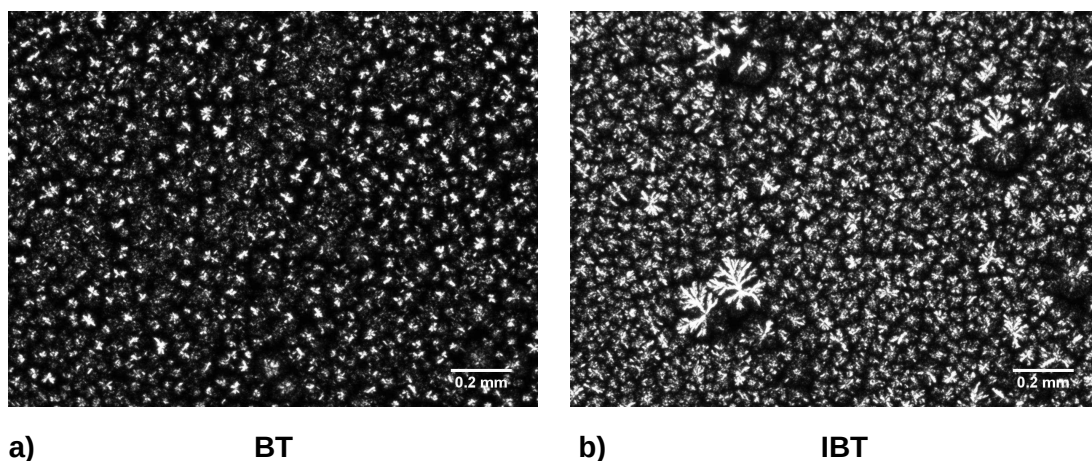


Figura 5.7.- Imágenes obtenidas por microscopia de luz polarizada a 25 °C de **a)** la grasa vacuna (BT) y **b)** la grasa vacuna interesterificada (IBT), luego de purificadas en columna de alúmina.

Se ha estudiado el efecto del agregado de diferentes tipos de emulsionantes sobre la cristalización de grasas de distinto origen, se constató un efecto inhibitor de los mismos sobre la velocidad de cristalización, tanto en la etapa de nucleación como en la del crecimiento cristalino (Martini *et al.* 2006). Los autores proponen dos mecanismos de acción de los emulsionantes, por un lado su acción como “núcleo” cristalino, desencadenando y acelerando el proceso de cristalización. Durante el crecimiento cristalino, estos emulsionantes se depositan sobre la superficie del cristal, lo que inhibe crecimiento ordenado del cristal y generando la modificación de su morfología. En el segundo caso, se observa la co-cristalización de los TAG y el

emulsificante, esto es común cuando los mismos tienen estructuras químicas similares. En cambio, las diferencias en la estructuras entre los TAG y los emulsionantes pueden retardar la nucleación e inhibir el crecimiento cristalino.

Dado el carácter anfipático de los DAG, puede sugerirse su participación en el proceso de cristalización mediante un comportamiento similar al descrito para los emulsionantes. Esto explicaría el aumento en el tamaño de los cristales en la IBT purificada, donde con la desaparición de los DAG desapareció su efecto inhibitor sobre el crecimiento cristalino. Como este efecto no es observado en BT se deduce que estos componentes que actúan sobre la cristalización son formados durante el proceso de interesterificación.

En la **Figura 5.8.a** se muestran las imágenes correspondientes a las mezclas de BT con HOSFO luego de su purificación en columna de alúmina, las que muestran varias diferencias con las imágenes obtenidas para las muestras sin purificar (**Figura 5.5.a**). Se puede observar la formación de dos tipos de cristales, esferulitos de distintas características y agujas. Se observa también que el aumento de la proporción de aceite permite la formación de agregados cristalinos de mayor diámetro que en el caso de las muestras sin purificar, lo que estaría implicando que en ausencia de componentes minoritarios la presencia de una mayor proporción de aceite líquido permite el desarrollo de cristales de mayor tamaño.

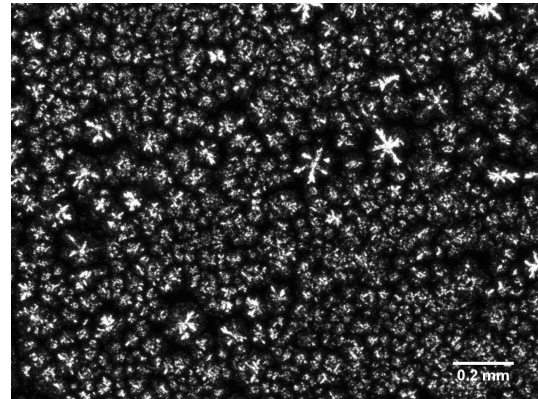
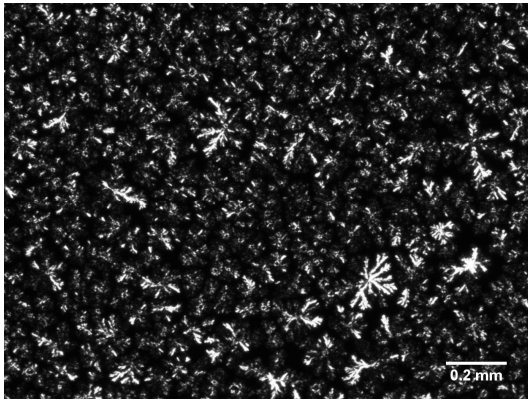
En cuanto a los productos de interesterificación de estas mezclas (**Figura 5.8.b**) se observa que, al igual que en el caso de las mezclas, las diferencias entre las características de los cristales formados en los materiales purificados y los sin purificar (**Figura 5.5.b**) son mayores cuanto mayor es la proporción de aceite, siendo posible la formación de esferulitos de gran tamaño en el producto conteniendo 50 % de aceite. Esto se puede deber a que los componentes eliminados durante la purificación no permitían el crecimiento cristalino y que al aumentar la proporción de aceite los TAG más saturados, que son los que forman los cristales a las temperaturas de trabajo, están en menor proporción, por tanto se ordenan en un número menor de núcleos los cuales crecen sin el efecto inhibitor de los componentes minoritarios.

a)

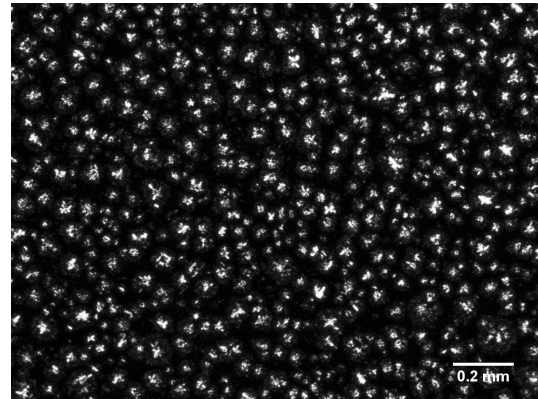
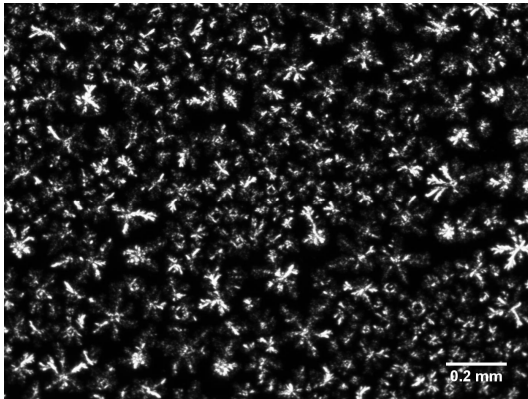
Mezclas

b)

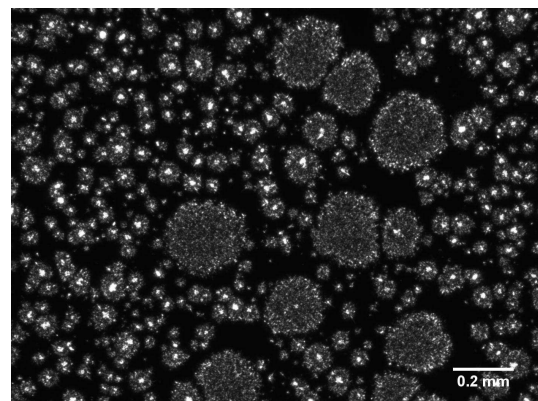
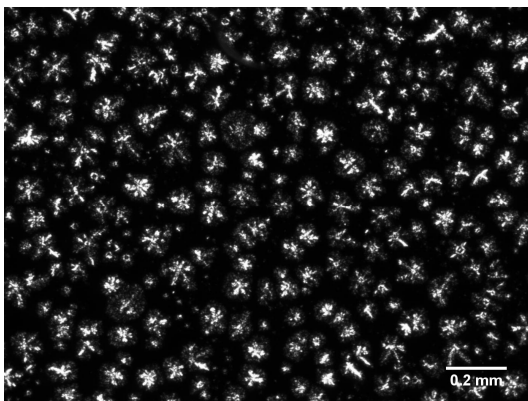
Productos



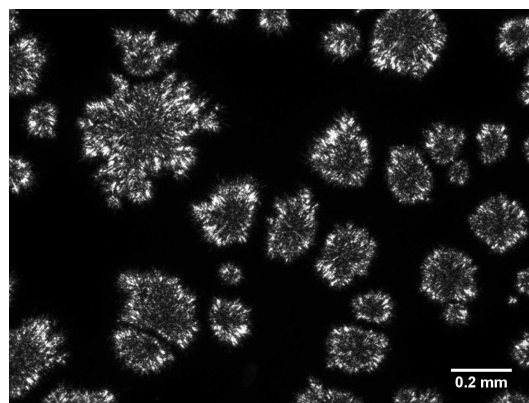
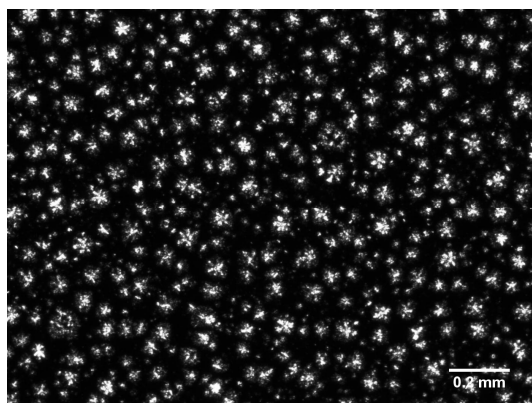
10 % HOSFO



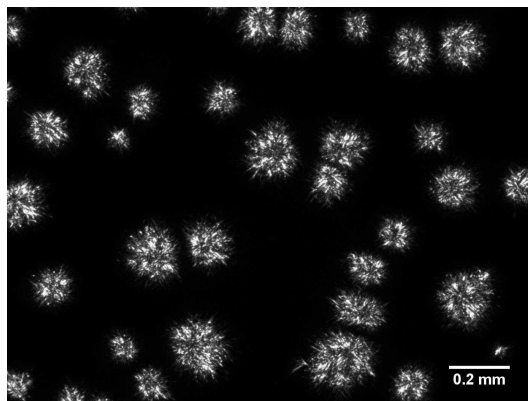
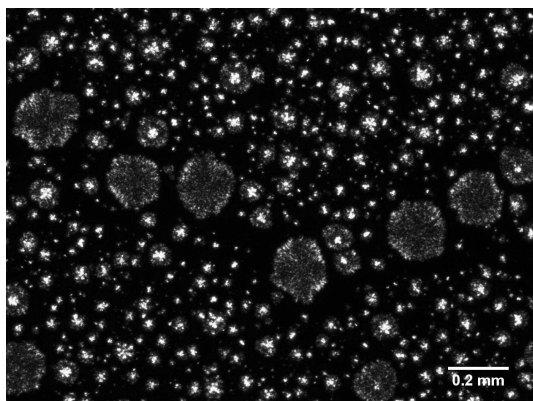
20 % HOSFO



30 % HOSFO



40 % HOSFO



50 % HOSFO

Figura 5.8.- - Imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada a 25 °C de las mezclas de BT con HOSFO **(a)** y sus productos de interesterificación **(b)** luego de purificados en columna de alúmina.

El caso de las mezclas conteniendo RBO (**Figuras 5.9.a**), se observa que el comportamiento es similar al de los materiales con HOSFO, observándose mayores diámetros en los cristales más grandes de las mezclas. En cuanto a los productos de interesterificación de estas mezclas purificados (**Figura 5.9.b**) se observa que los cristales presentan un mayor tamaño muy superior a los del producto antes de ser purificado (**Figura 5.6.b**). Como en el caso anterior esto se puede explicar por la disminución en el contenido de sólidos observado en el **Capítulo 4**, que genera un menor número de núcleos cristalinos, sumado a que el crecimiento cristalino se da sin el impedimento de los compuestos que se eliminaron con el tratamiento con alúmina.

En resumen, la purificación de la BT y sus mezclas con aceite generan cambios significativos en sus patrones de cristalización, los que son más importantes para las mezclas que contienen más de un 20 % de aceite (lo que coincide con lo observado

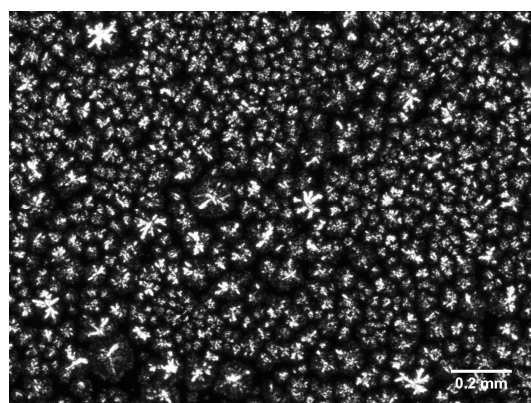
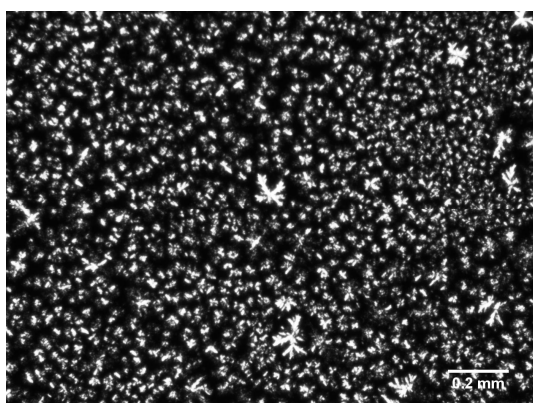
para las mezclas sin purificar). En cambio para los productos de interesterificación, se observa que luego de su purificación generan cristales de tamaños muy superiores a los obtenidos antes de la purificación. Este efecto, como se mencionó anteriormente, puede ser explicado por la eliminación de compuestos minoritarios como los glicéridos parciales y FFA que se pueden haber formado durante el proceso de interesterificación, los que obstaculizan el crecimiento de los cristales en los productos sin purificar.

a)

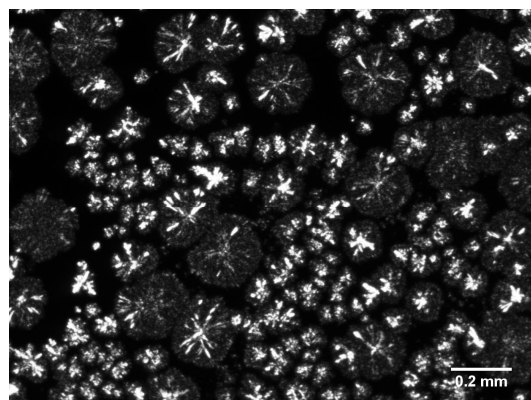
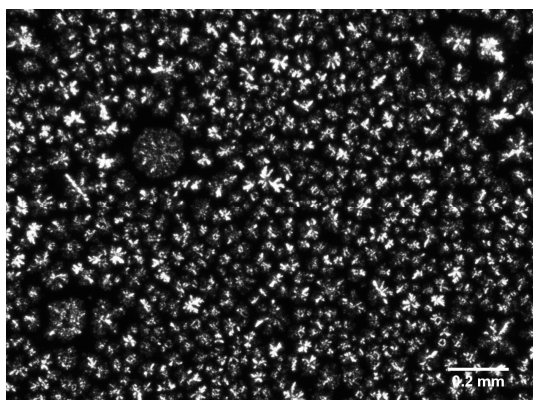
Mezclas

b)

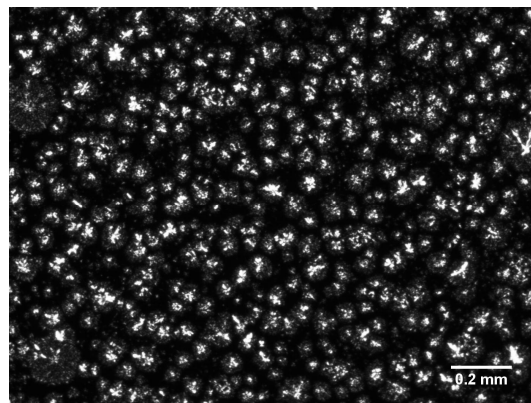
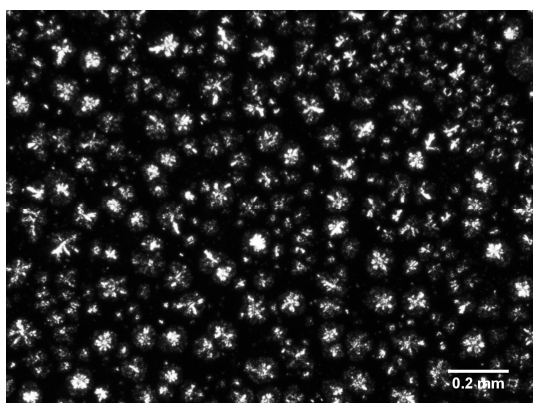
Productos



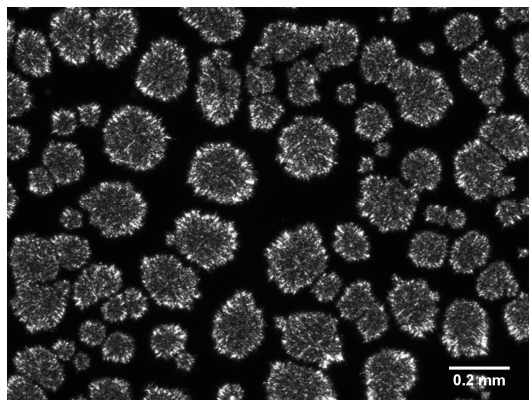
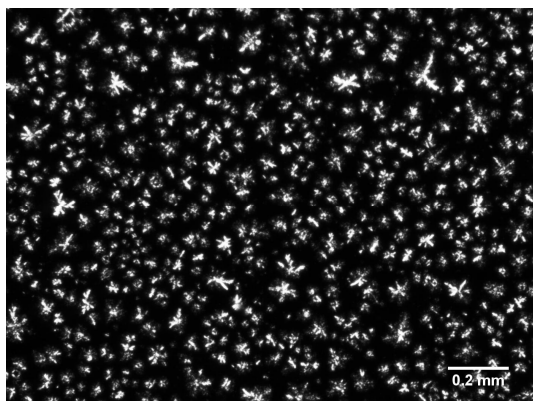
10 % RBO



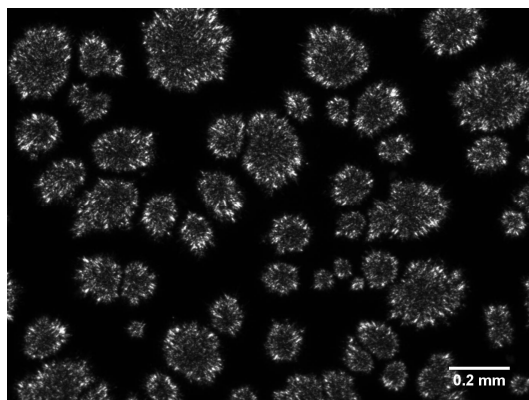
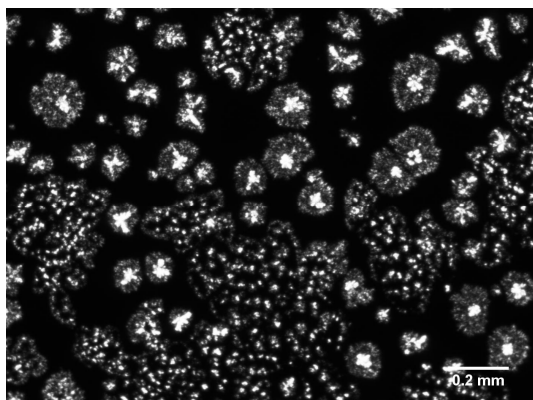
20 % RBO



30 % RBO



40 % RBO



50 % RBO

Figura 5.9.- Imágenes obtenidas por microscopia bajo luz polarizada a 25 °C de las mezclas **(a)** de BT con RBO y sus productos de interesterificación **(b)** luego de purificados en columna de alúmina.

5.3.2.- Polimorfismo por análisis por XRD

Para los estudios de polimorfismo se optó por la estabilización de las muestras a 20 °C, temperatura 5°C menor que la utilizada para los análisis por PLM, a los efectos de incrementar la proporción de sólidos en las muestras y mejorar la calidad del análisis. En la **Figura 5.10.a** se observa el difractograma obtenido para la BT en la región correspondiente a espaciados largos. El patrón de difracción en esta región aporta información sobre la forma en que se disponen las cadenas de ácido graso de los triglicéridos en el cristal.

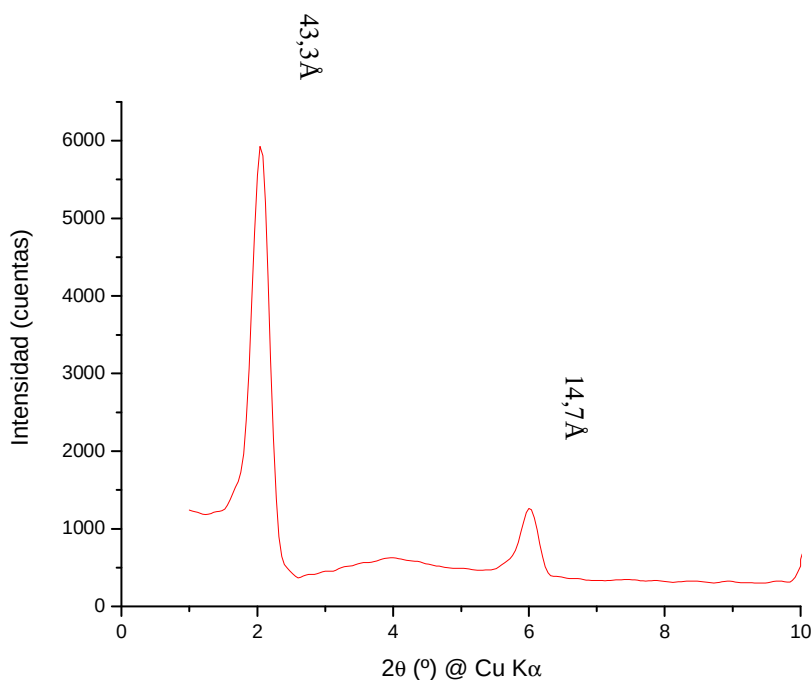
Considerando que el pico de mayor intensidad corresponde a una distancia de 43,3 Å y que el largo de una cadena de entre 16 y 18 carbonos es de aproximadamente 22-

25 Å (aprox. la mitad de la distancia correspondiente a este pico), se deduce que esta muestra presentó un empaque de longitud de doble cadena (DCL), el cual es el más común para triglicéridos constituidos por ácidos grasos con largos de cadena de 16 y 18 carbonos (norma AOCS Cj 2-95).

En la **Figura 5.10.b** se puede apreciar el difractograma a espaciados cortos de la BT, región de difracción que, como se mencionó en la introducción, aporta información sobre la distancia entre cadenas de ácido graso en el cristal. Los picos en la región de espaciados cortos, son característicos para cada polimorfo, pudiendo observarse para esta muestra en particular los picos correspondientes a los cristales β (4,6 Å) y β' (4,2 y 3,9 Å). Dado que el área e intensidad del pico está relacionada con la proporción del polimorfo correspondiente en el cristal, este difractograma sugiere una predominancia del polimorfo β' en esta muestra.

Esto está de acuerdo con la tendencia a formar cristales β' de este tipo de material constituido por ácidos grasos de largo de cadena muy diverso (Foubert *et al.*, 2007), los que eventualmente luego pueden lentamente pasan a la forma β , más estable. También confirma lo supuesto en el **Capítulo 4** respecto a la transición polimórfica observada, lo que refuerza el supuesto de que el pico exotérmico observado en el termograma de la BT corresponde a la transición $\beta' \rightarrow \beta$.

a)



b)

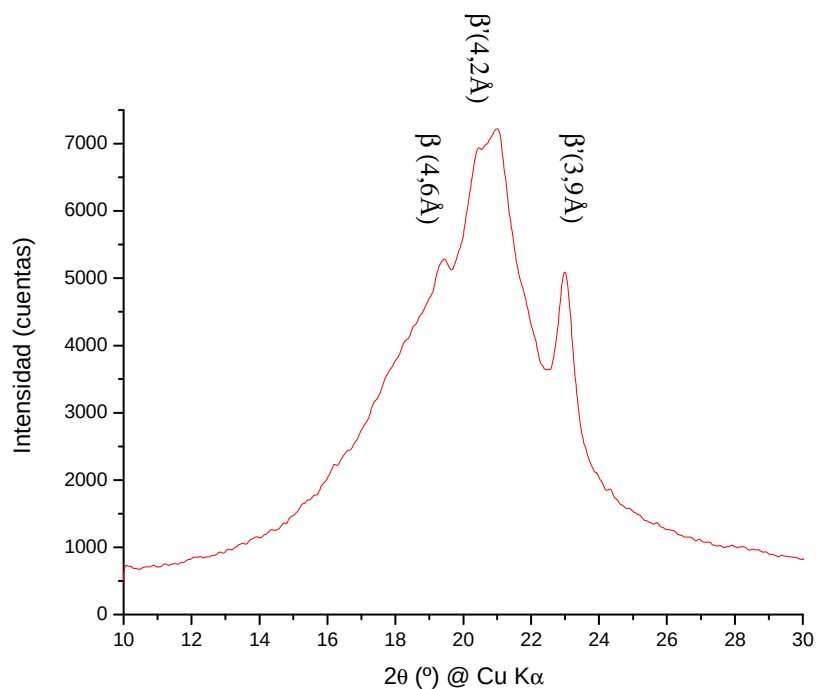


Figura 5.10.- Patrón de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna correspondientes a la región de espaciados largos (a) y a la de espaciados cortos (b).

La **Figura 5.11** muestra el patrón de difracción correspondiente a la región de espaciados cortos para las mezclas de la BT con HOSFO en todas sus proporciones. Se observa que en la medida que la proporción de aceite aumenta, los picos característicos de los cristales β' (4,2 y 3,9 Å) disminuyen, mientras que los correspondientes la forma β (4,6 Å) muestran un leve incremento en comparación con los de la BT pura. Esto indicaría una tendencia decreciente a la formación de cristales β' a medida que se incrementa la proporción de aceite en la mezcla.

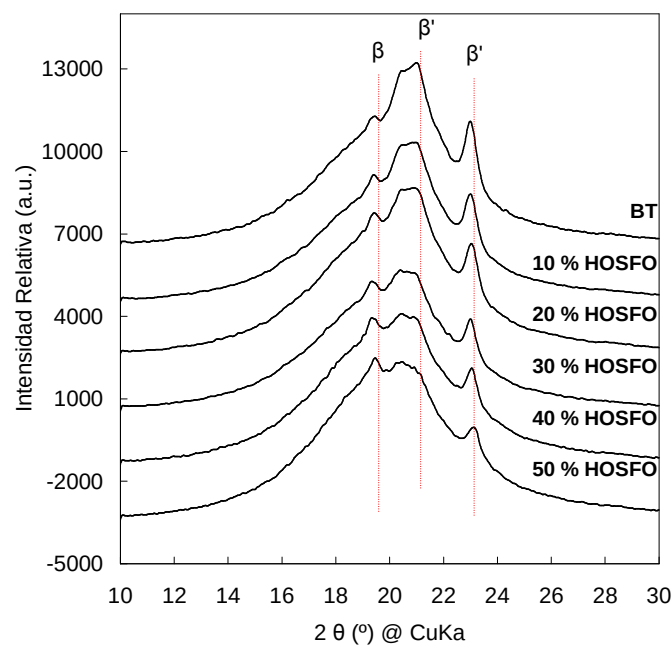


Figura 5.11.- Patrones de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna (BT) y sus mezclas de 10 a 50 % con aceite de girasol de alto oleico correspondientes a la región de espaciados cortos.

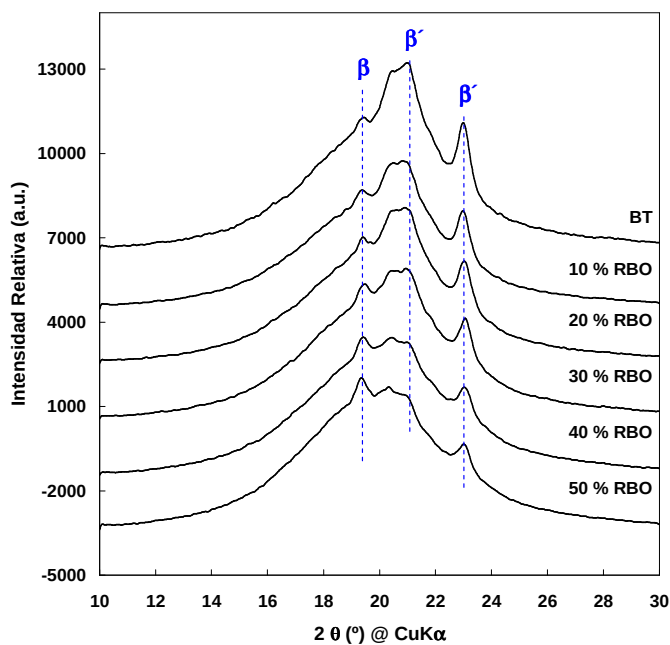


Figura 5.12.- Patrones de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna (BT) y sus mezclas de 10 a 50 % con aceite de salvado de arroz correspondientes a la región de espaciados cortos.

En la **Figura 5.12** se muestran los patrones de difracción de las mezclas de la BT con RBO, los que muestran un comportamiento muy similar al de las mezclas con

HOSFO, incremento del pico correspondiente a los cristales de la forma β y reducción de los correspondientes a la forma β' . Lo cual se hizo más importante conforme aumentó la proporción de aceite

Por lo tanto la gradual desaparición de la tendencia β' de la BT a medida que se incrementa la proporción de aceite en las mezclas no dependió del tipo de aceite, lo que es razonable considerando que ninguno de los aceites aporta sólidos a la temperatura del análisis (20 °C), por lo que ambos producen un efecto similar de dilución de los TAG saturados y una reducción similar en el contenido de sólidos de las mezclas. Posiblemente la mayor fracción de aceite líquido en las mezclas favorezca además la disolución preferentemente de los TAG más heterogéneos, los que, como se mencionó anteriormente, son los promotores de la cristalización β' . De esta manera los sólidos quedarían constituidos por TAG más homogéneos que le imprimirían su tendencia β a la red cristalina. La reducción de la tendencia a formar cristales β' con el incremento de la proporción de aceite también está de acuerdo a lo observado en los termogramas de fusión de las diferentes mezclas, donde el pico exotérmico correspondiente a la transición $\beta' \rightarrow \beta$ también disminuyó con el aumento en la proporción de aceite en las mismas. Este aumento en la tendencia a la cristalización bajo la forma β al aumentar la proporción de aceite también fue reportado para mezclas de aceite de soya con aceite de palma y de aceite de canola con grasa de cerdo (Rousseau *et al.* 1998).

En la **Figura 5.13** se superpone el patrón de difracción de Rayos-X de la BT pura con el correspondiente a la IBT (luego de interesterificada), correspondientes a la región de espaciados, para estudiar el efecto de la interesterificación sobre las características de la red cristalina de la BT pura. Se aprecia claramente que la interesterificación produjo la disminución del pico característico de los cristales β , mientras que aquellos característicos de la forma β' aumentaron, por lo que la interesterificación potenciaría aún más la tendencia β' de la BT. Este efecto se podría atribuir a la randomización del material observada en **3.3.1.3** lo que genera TAG más heterogéneos que estabilizan al polimorfo β' . Este incremento en la tendencia por la forma β' está de acuerdo con lo indicado por los termogramas de fusión de ambas muestras (**Figura 4.4**), donde se observó la desaparición de la transición polimórfica luego de la interesterificación de la BT.

La **Figura 5.14** muestra los patrones de difracción de los productos de interesterificación de las mezclas BT/ HOSFO, se observa que el proceso para todas las proporciones, al igual que en el caso de la BT, genera la disminución del pico correspondiente a los cristales de la forma β y un aumento de los picos correspondientes a la forma β' respecto a la mezcla correspondiente. El aumento de la proporción de aceite en la mezcla original genera una disminución en el tamaño de los picos, lo que se asume es producto de la disminución en el contenido de sólidos presente en la muestra a la temperatura de medida (**Figura 4.24**).

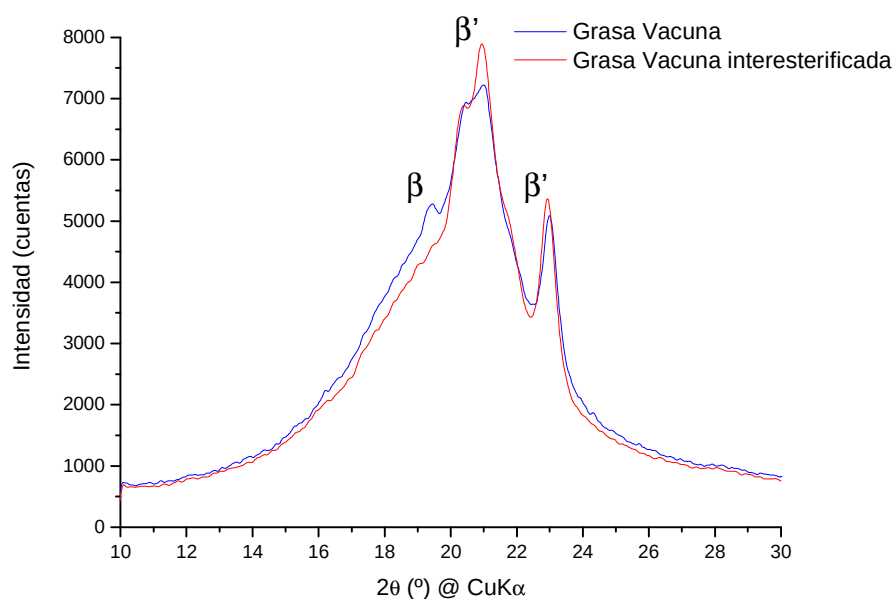


Figura 5.13.- Patrones de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna pura antes y después de su interesterificación enzimática, correspondientes a la región de espaciados cortos.

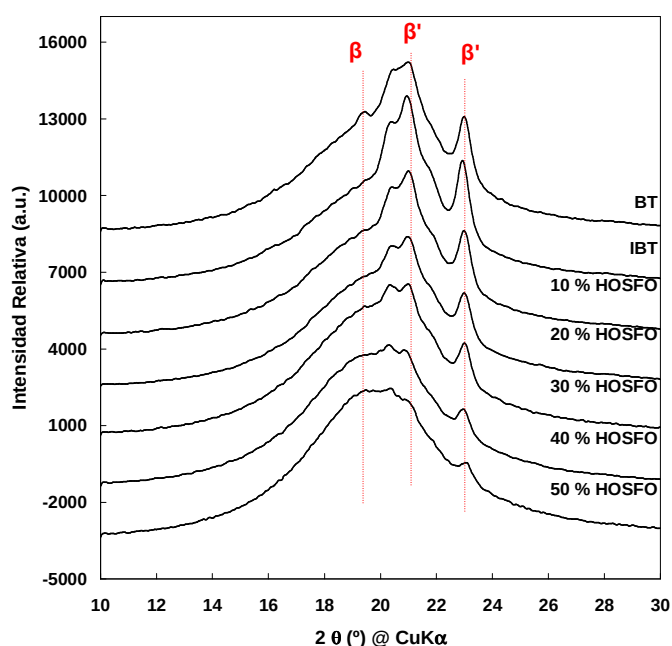


Figura 5.14.- Patrones de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna (BT) y los productos de interesterificación de sus mezclas de 0 a 50 % con aceite de girasol de alto oleico correspondientes a la región de espaciados cortos.

En cuanto a los productos de interesterificación de las mezclas BT/RBO, el comportamiento fue el mismo que el descrito anteriormente para los productos de

interesterificación de las mezclas BT/HOSFO. Para los productos de todas las proporciones (**Figuras 5.15**) se observó la desaparición del pico correspondiente a la forma β y aumento de los correspondiente a la forma β' respecto a la mezcla correspondiente (**Figura 5.12**). Aquí también se observó la reducción de los picos con el aumento de la proporción de aceite ocasionado por la disminución del contenido de sólidos a la temperatura de medida (**Figura 4.25**).

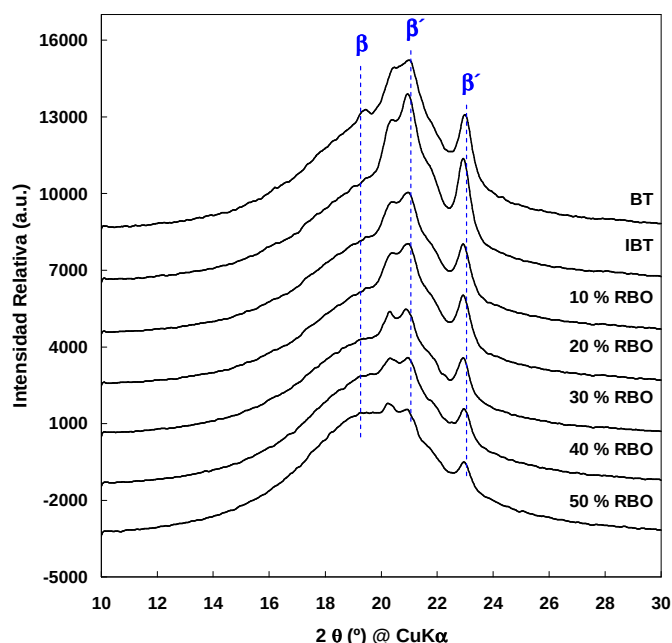


Figura 5.15.- Patrones de difracción de Rayos-X de la grasa vacuna (BT) y los productos de sus mezclas de 0 a 50 % con aceite de salvado de arroz correspondientes a la región de espaciados cortos.

Es conocido que la presencia de ácido palmítico en proporción importante en los TAG de un material graso, su posición en el TAG y el grado de saturación y de randomización del material influyen en el tipo de polimorfo mayoritario. En general, a mayor diversidad de estructuras en la porción de mayor punto de fusión de la grasa, menor es la tendencia a la formación de la forma β . En cuanto a la posición del ácido palmítico en el TAG, una proporción mayor a un 20% estabiliza la forma β' siempre que la misma esté distribuida en forma heterogénea en las posiciones del TAG. En cambio, si el ácido palmítico se encuentra preferentemente en posición *sn*-2, como en el caso de la manteca de cerdo, la cristalización se dará en el polimorfo β . (O'Brien 2009).

Las mezclas utilizadas en el presente estudio presentaron un contenido elevado de palmítico, aportado tanto por la BT como por el RBO. Por ejemplo, la BT pura contiene un 26 % de ácido palmítico, en la mezcla conteniendo un 50 % de RBO éste ácido graso alcanza a un 22 % y en aquella conteniendo un 50 % de HOSFO alcanza a un

15 % y (**Tablas 3.1 y 3.2**). Dada la proporción encontrada en las mezclas de este ácido graso sería de esperar que la cristalización de las mismas en el polimorfo β' fuera la estable, lo que está en oposición a lo observado (**Figuras 5.11 y 5.12**). En cambio los productos de interesterificación, que conservan la misma composición en palmítico, cristalizaron preferentemente en forma β' (**Figuras 5.13, 5.14 y 5.15**). Esto se puede explicar por la randomización observada luego del proceso de interesterificación (**Tablas 3.6; 3.7 y 3.8**) que estabiliza esta forma cristalina.

Resultados similares en el comportamiento polimorfo de productos generados por interesterificación enzimática también fueron reportados para la interesterificación de mezclas de estearina de palma, aceite de soja totalmente hidrogenado y aceite de oliva (Lee *et al.*, 2008). En dicho trabajo se reportó también una tendencia inicial a cristalizar bajo la forma β de las mezclas, la que cambió a β' luego de la interesterificación catalizada con Lipozyme RM IM. Este fenómeno se atribuyó a que el ácido palmítico (aportado a la mezcla por la estearina de palma) es distribuido más uniformemente por la randomización entre el resto de los triglicéridos de la mezcla, incrementando la heterogeneidad de los mismos y eliminando la tripalmitina que confería tendencia β a la mezcla de partida.

También debe considerarse un efecto adicional del proceso vinculado a la formación de una pequeña fracción de diacilglicerolos que suele acompañar a los procesos de interesterificación enzimática. Se ha reportado que una pequeña proporción enlentece la transición de la forma β' a la β , pese a ser más estable, debido a que sus estructuras no permiten el correcto ordenamiento de las moléculas de triglicéridos (Timms 2003). Esto también podría estar contribuyendo a la estabilización de la forma β' en los productos obtenidos.

5.4.- Conclusiones

La grasa vacuna, base de todos los materiales grasos estudiados, presenta cristales de dos tipos, esferulitos y agujas pequeñas, presentando dos tipos de polimorfos: β y β' , siendo este último el claramente predominante.

La mezclas de la grasa vacuna con el aceite de girasol de alto oleico o el de salvado de arroz generó cristales de menor tamaño que la grasa vacuna pura, sin cambios importantes de morfología y mostrando una mayor tendencia a cristalizar bajo la forma polimórfica β .

Luego del proceso de interesterificación tanto la grasa vacuna como las mezclas con ambos aceites produjeron cristales más homogéneos en forma y tamaño, apreciándose también una reducción del diámetro máximo de los cristales. A diferencia de lo observado en las mezclas, la forma polimórfica predominante en los productos de interesterificación fue la β' , lo que puede explicarse como consecuencia

del reordenamiento de los ácidos grasos en los triacilgliceroles debido al proceso enzimático.

Dado que los cristales β' son preferidos a los β en las grasas como las margarinas untables y los diferentes tipos de shortenings destinadas a productos comestibles, este efecto resulta beneficioso para la aplicación de estos materiales a este tipo de producto.

La mezcla de la grasa vacuna con los aceites elegidos y su posterior interesterificación enzimática aparece como una alternativa interesante para generar cambios en la microestructura cristalina y en la tendencia polimórfica de estos materiales grasos que pueden generar productos atractivos para la industria alimentaria.

5.5.- Bibliografía

AOCS. 1996. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign.

Foubert I, Dewettinck K, Van de Walk D, Dijkstra A J, Quinn P J. 2007. Physical properties: structural and physical characteristics. In: Gunstone F D, Harwood J L, Dijkstra A J. The lipid handbook. Boca Raton: CRC Press. p 471- 534

Ghotra B S, Dyal S D, Narine S S. 2002. Lipid shortenings: a review. Food Res Int 35: 1015-1048.

Lee J H, Akoh C C, Himmelsbach D S, Lee K T. 2008. Preparation of intersterified plastic fats from fats and oils free of trans fatty acid. J Agric Food Chem 56: 4039-4046.

Martini S, Awad T, Marangoni A G. 2006. Structure and properties of fat crystal networks. In: Gunstone F D. Modifying lipids for use in food. Boca Raton: CRC Press. p 142-169.

Meng Z, Liu Y, Shan L, Jin Q, Wang X. 2010. Reduction of graininess formation in beef tallow-based plastic fats by chemical interesterification of beef tallow and canola oil. J Am Oil Chem Soc 87:1435–1442

O'Brien R D. 2009. Fat and oils. Formulating and processing for applications. Boca Raton: CRC Press.

Oh J H, McCurdy A R, Clark S, Swanson B G. 2005. Stabilizing polymorphic transitions of tristearin using diacylglycerols and sucrose polyesters. J Am Oil Chem Soc 82:13-19

Rao R, Sankar K U, Sambaiah K, Lokesh B R. 2001. Differential scanning calorimetric studies on structured lipids from coconut oil triglycerides containing stearic acid. Eur Food Res Technol 212: 334-343.

Riveiro A P B, Basso R C, Grimaldi R, Gioielli L A, Oliveira dos Santos A, Cardoso L P, Gonçalves L A G. 2009. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. Food Res Int 42: 1153-162.

Rodríguez A, Castro E, Salinas M C, López R, Miranda M. 2001. Interesterification of tallow and sunflower oil. J Am Oil Chem Soc 78:431–436

Rousseau D, Marangoni A G, Jeffrey K R. 1998. The influence of chemical interesterification on the physicochemical properties of complex fat systems. 2. Morphology and polymorphism. J Am Oil Chem. Soc. 75: 1833-1839.

Smith K W, Bhagga K, Talbot G, van Malssen K F. 2011. Crystallization of fats: influence of minor components and additives. J Am Oil Chem Soc 88: 1085–1101.

Timms R E. 2003. Confectionery fats handbook. Bridgwater, England: The Oil Press.

Walstra P, 1987 Food structure and behaviour. En Blanshard y Lillford, eds. Orlando, Florida, Academic Press 67-85.

Wrighta A J, Hartelb R W, Narinea S S, Marangoni A G. 2000. The effect of minor components on milk fat crystallization. J Am Oil Chem. Soc. 70: 463-475.

Capítulo 6

Estabilidad oxidativa

6.1.- Introducción	2
6.1.1.- Fundamento de los métodos de enranciamiento acelerado para la determinación de la estabilidad oxidativa	7
6.1.2.- Aspectos vinculados a la estabilidad oxidativa de las materias primas de interés y posibles efectos de la interesterificación sobre esta propiedad.....	8
6.2.- Materiales y métodos	11
6.2.1.- Enranciamiento acelerado	11
6.2.2.- Estudio del efecto de la interesterificación enzimática sobre la concentración de los antioxidantes naturales de interés	12
6.2.3.- Eliminación de antioxidantes nativos.....	12
6.2.4.- Adición de antioxidantes.....	13
6.3.- Resultados y Discusión	13
6.3.1.- Estabilidad oxidativa de las materias primas, sus mezclas y los productos de interesterificación	13
6.3.2.- Análisis de peróxidos	18
6.3.3.- Efecto de la interesterificación enzimática sobre el contenido de antioxidantes naturales.....	20
6.3.3.1.- Análisis de mezclas y productos	20
6.3.3.2.- Estudio de un sistema “modelo” simplificado	21
6.3.4.- Efecto del reordenamiento de los ácidos grasos en la molécula de glicerol ...	26
6.3.5.- Efecto de la adición de antioxidantes sintéticos sobre la estabilidad oxidativa de los productos.....	29
6.4.- Conclusión.....	33
6.5.- Bibliografía	35

6.1.- Introducción

Por “estabilidad oxidativa” de los lípidos en general se entiende la capacidad de un material graso para “resistir” a la ocurrencia de procesos de oxidación. Los procesos de oxidación que sufren los lípidos han sido muy estudiados y es conocido que transcurren por mecanismos complejos, dado que hay una gran variedad de factores que afectan la velocidad y las características de los mismos. Entre éstos se encuentra la composición del propio material graso, las condiciones a las cuales éste se encuentra expuesto (temperatura, grado de aireación) y a la presencia de componentes minoritarios vinculados al proceso (desencadenantes o inhibidores).

El principal mecanismo por el cual los lípidos en general sufren procesos de deterioro es mediante el fenómeno conocido como “autooxidación”. La ocurrencia de este fenómeno se vincula estrechamente a la existencia de insaturaciones en la cadena de los ácidos grasos y presenta diferentes velocidades en función del número y posición de los dobles enlaces. El proceso de autooxidación se inicia en los carbonos alílicos (vecinos a un doble enlace), formándose como productos de oxidación primarios los hidroperóxidos alílicos $[-CH=CHCH(OOH)-]$. En esta etapa de oxidación primaria el doble enlace original puede migrar o sufrir isomerización desde su configuración original cis a trans. Los hidroperóxidos son inestables y se descomponen a una variedad de productos de oxidación secundarios. Entre estos se encuentran productos de peso molecular similar al hidroperóxido original, o compuestos más cortos producidos por fraccionamiento de la cadena original (aldehídos, ácidos) o incluso compuestos de elevado peso molecular producidos mediante dimerización.

La oxidación lipídica es promovida por varios factores como la elevada temperatura, la exposición a la luz y la presencia de material exógeno, como metales y otros iniciadores.

La molécula de oxígeno, O_2 , existe en dos formas, el triplete común de baja energía, 3O_2 , constituida por un diradical $\bullet O-O\bullet$, y la forma singulete 1O_2 , estado excitado formado en presencia de luz y más reactiva que la primera por una diferencia de 22,5 kcal/mol. Ambas formas participan en la oxidación lipídica con algunas diferencias importantes: el 3O_2 reacciona con los carbonos alílicos de la cadena de los ácidos grasos insaturados para formar hidroperóxidos alílicos y es a este mecanismo se lo conoce como autooxidación. En cambio, el 1O_2 es muy electrofílico, reacciona con átomos de carbono olefínicos, y a este proceso se lo conoce como fotooxidación, el cual genera también un hidroperóxido alílico. Por lo tanto la estructura y cantidad de hidroperóxidos originados por ambos mecanismos varía.

El factor más importante en la determinación de la velocidad de oxidación es por lo tanto el número de dobles enlaces en la molécula lipídica. En la autooxidación, más precisamente, será determinante el número de carbonos alílicos (vecinos a un doble enlace) y bis-alílicos (grupo metileno separando dos dobles enlaces). En los aceites

vegetales más comunes tales posiciones están presentes en los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (dobles enlaces en $\Delta 9$ y $\Delta 12$, y un carbono bis-alílico en la posición C-11) y el ácido linolénico (con dobles enlaces en $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$, y por lo tanto con dos carbonos bis-alílicos: C-11 y C-14).

La **Tabla 6.1** muestra el efecto de incrementar el número de insaturaciones sobre la velocidad de los dos procesos de oxidación descritos (Gunstone et al., 2007). Se han reportado valores de velocidades relativas de oxidación ligeramente diferentes a los de la Tabla 1: oleato = 1, linoleato = 41, linolenato = 98 y arachidonate = 195 (Frankel, 2005).

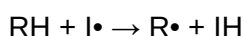
Tabla 6.1.- Velocidades relativas de autooxidación y fotooxidación de los principales ácidos grasos de 18 carbonos (Gunstone et al. 2007).

Reacción	Oleato (18:1)	Linoleato (18:2)	Linolenato (18:3)
Autooxidación, $^3\text{O}_2$	1	27	77
Fotooxidación, $^1\text{O}_2$	3×10^4	4×10^4	7×10^4
Relación (Foto./Auto.)	30000	1500	900

Autooxidación

La autooxidación transcurre mediante un mecanismo de reacción en cadena, incluyendo las tres etapas típicas de este tipo de reacción (iniciación, propagación y terminación).

La iniciación se puede esquematizar como:

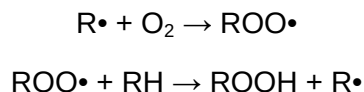


Donde RH es un ácido graso e $\text{I}\cdot$ es el agente iniciador.

La oxidación directa de los lípidos es “espin-prohibida”, dado los espines opuestos de la especie $^3\text{O}_2$ y de los lípidos en su estado más estable. Este impedimento desaparece en presencia de iniciadores, como trazas metálicas, peróxidos e hidroperóxidos presentes como impurezas.

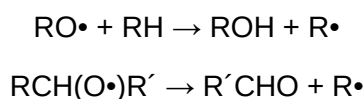
La formación de radicales alquilo $\text{R}\cdot$ y la deslocalización resultante del electrón impar es la causa de la migración observada en el doble enlace de los hidroperóxidos formados. La reacción del radical alquilo de lípidos insaturados con oxígeno para

formar los radicales peroxilo $\text{ROO}\cdot$ procede rápidamente, seguida por una reacción de transferencia de un hidrógeno lábil desde otro ácido graso insaturado. Esta etapa es la que propaga la cadena y es la determinante de la velocidad:

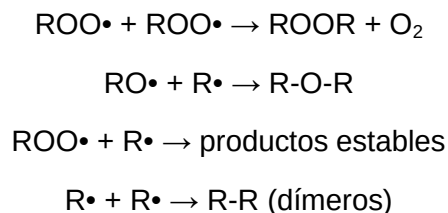


En caso de existir en el medio algún compuesto con propiedades antioxidantes, éste y no otro ácido graso participará de la transferencia de hidrógeno.

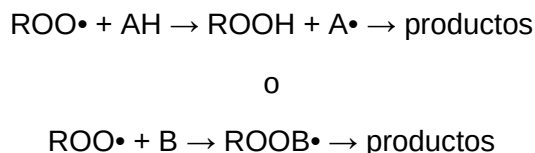
Una de las reacciones de terminación posibles es la homólisis, para producir un radical peroxilo o alcoxilo, que a su vez pueden propagar el mecanismo.



Mientras que la formación de alcoholes remueve especies reactivas, los aldehídos insaturados son inestables. La reacción de los radicales alquilo, alcoxilo y peroxilo conducen a la terminación mediante la formación de dímeros o productos similares:



En caso de existir un antioxidante, la terminación ocurre de la siguiente manera:



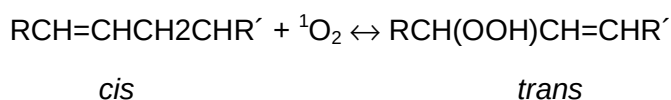
Siendo AH un antioxidante fenólico y B un compuesto tipo β -caroteno. Ambas reacciones implican acciones sobre la etapa de iniciación (reacción con $\text{R}\cdot$), lo que resulta muy conveniente a los efectos de interrumpir el mecanismo en cadena.

La autooxidación generalmente tiene un período de inducción durante el cual el proceso global es lento, luego del cual se inicia una segunda etapa más rápida. El propósito de los antioxidantes consiste en demorar la ocurrencia de las reacciones de iniciación y, además, facilitar la terminación, reduciendo así la posibilidad de propagación.

Fotooxidación

En presencia de luz se forma la especie $^1\text{O}_2$, altamente electrofílica, por lo que la fotooxidación es más rápida que la autooxidación y menos dependiente del grado de insaturación (Tabla 1). La fotooxidación es promovida por la presencia de algunos compuestos minoritarios sensibilizadores (*sensitizers*), como la clorofila nativa de los aceites vegetales, que promueven la formación de $^1\text{O}_2$ a partir de $^3\text{O}_2$.

A diferencia de la autooxidación, la fotooxidación no presenta un período de inducción ni transcurre por un mecanismo de reacción en cadena, ocurre mediante la adición de oxígeno en cualquiera de los extremos de la insaturación, con la consecuente migración del doble enlace a la posición alílica y la isomerización a la posición *trans*.



Los hidroperóxidos formados por fotooxidación pueden servir como iniciadores de la oxidación por radicales libres o autooxidación, por lo que ambos mecanismos se encuentran conectados.

La fotooxidación no se afecta por la presencia de antioxidantes efectivos en la autooxidación, pero sí por extintores (*quenchers*) del $^1\text{O}_2$, como el β -caroteno. La reactividad relativa de oleato, linoleato y linolenato es aproximadamente proporcional al número de dobles enlaces, lo que está de acuerdo con el mecanismo de reacción.

Antioxidantes

Varias medidas se pueden utilizar para prevenir la oxidación o para reducir su velocidad. Obviamente entre ellas se incluye evitar el contacto entre el material lipídico con el aire, o con materiales pro-oxidantes, evitar su exposición a elevadas temperaturas y proteger de la incidencia de luz directa. Dado que estas soluciones muchas veces no son posibles o prácticas o incluso pueden ser suficientes, es de particular interés el uso de compuestos antioxidantes.

El uso de antioxidantes no previene la oxidación, sólo la retarda hasta que el antioxidante mismo se consume y el proceso de oxidación continúa, por lo que siempre su uso se debe acompañar de las medidas preventivas ya mencionadas.

Los antioxidantes pueden estar presentes naturalmente en los lípidos, como la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles: α , β , γ y δ , en cada caso) o pueden ser agregados, para lo que se usan varios compuestos sintéticos: butil-hidroxitoluen (BHT), butil-hidroxianisol (BHA), tert-butilhidroxiquinona (TBHQ) o galato de propilo (PG).

Estos antioxidantes afectan el mecanismo de autooxidación, no el de fotooxidación, salvo por los aspectos que vinculan a ambos procesos (hidroperóxidos en el primero que favorecen al segundo). La fotooxidación sí puede verse afectada por atenuadores del oxígeno singulete, como por ejemplo el β -caroteno.

Los antioxidantes tipo fenoles o aminas contienen un átomo de hidrógeno que puede ser cedido para interrumpir la reacción en cadena, en el caso de los fenoles se convierten en quinonas. Alternativamente pueden reaccionar con el radical libre en una reacción de tipo de adición.

Los antioxidantes sintéticos poseen alguna diferencia de solubilidad y de efectividad en los aceites (por ejemplo, el galato de propilo es el menos soluble de los mencionados). También suelen presentar efecto sinérgico cuando se los usa combinados. Normalmente se los utiliza a niveles de 100 a 200 ppm, existiendo limitaciones en el tipo y niveles de uso cuando se los utiliza en el área alimentaria. Por ejemplo el TBHQ está prohibido en la Unión Europea, no así en la mayoría de los países, incluido USA.

La efectividad de un antioxidante particular depende de una variedad de factores, incluido el perfil de ácidos grasos del material sobre el que se lo va a utilizar, la cantidad de antioxidantes naturales presentes en el mismo, así como las condiciones de almacenamiento.

Otros compuestos con efecto antioxidante incluyen agentes quelantes, como EDTA, ácido cítrico, ácido fosfórico y aminoácidos, que ayudan en eliminar el efecto de los iones metálicos.

Eliminadores ("scavengers", en inglés) de oxígeno o agentes reductores, como ácido ascórbico, pueden regenerar el antioxidante consumido, y extintores ("quenchers", en inglés) de oxígeno singulete como β -caroteno, también se usan como inhibidores de la oxidación.

6.1.1.- Fundamento de los métodos de enranciamiento acelerado para la determinación de la estabilidad oxidativa

Existen varios métodos utilizados para determinar este parámetro en grasas y aceites y, en particular, en biodiesel, consisten en someter a la muestra de interés a condiciones desencadenantes de su oxidación: temperatura elevada y presencia de oxígeno. Ambos factores combinados producen que la oxidación ocurra en un tiempo muy inferior al que lo haría en condiciones normales de almacenamiento.

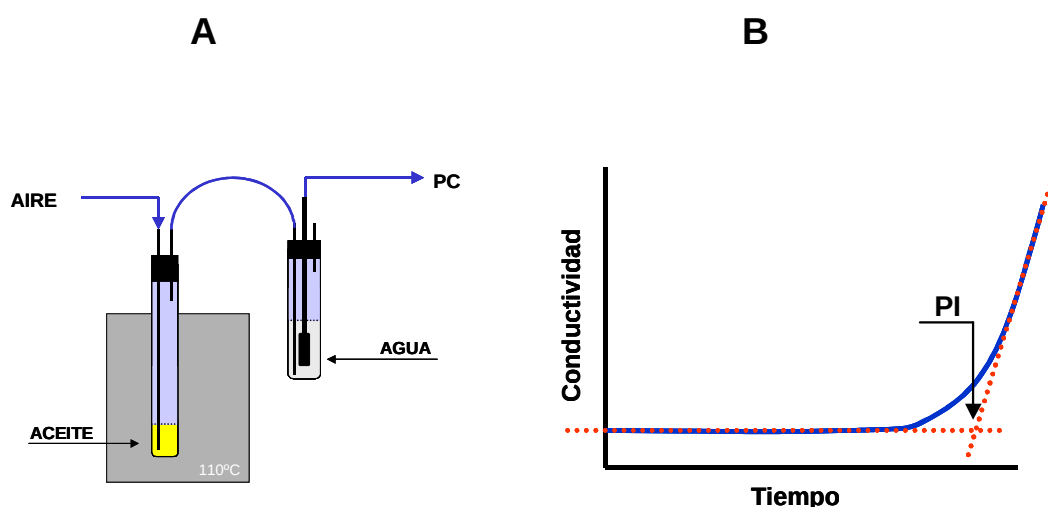


Figura 6.1.- (A) Esquema de funcionamiento del método de enranciamiento acelerado AOCs Cd 12b-92 (B) determinación del período de inducción.

Los métodos más conocidos utilizan el fundamento del método oficial de la American Oil Chemist's Society AOCs Cd 12b-92: Oil Stability Index (OSI). El mismo se basa en que la oxidación se inicia a una velocidad muy lenta hasta un punto en el que el proceso se dispara y se acelera drásticamente. Al tiempo transcurrido hasta que esto ocurre se lo define como el "período de inducción" (PI). La muestra se dispone en un termostato y se pasa aire a través de la misma (**Figura 6.1.A**), el aire luego es conducido a un recipiente conteniendo agua desionizada, cuya conductividad se monitorea en forma continua. Debido a que el aire contiene los productos volátiles producidos por la oxidación (entre ellos el ácido fórmico), cuando el proceso de oxidación se dispara el agua recibirá una carga importante de ácido fórmico y su conductividad se aumentará en consecuencia. El índice de estabilidad (OSI, Oil Stability Index) se define como el tiempo al cual ocurre el máximo cambio en la velocidad de oxidación, lo que matemáticamente equivale al máximo en la derivada segunda de la curva de conductividad contra tiempo (**Figura 6.1.B**).

6.1.2.- Aspectos vinculados a la estabilidad oxidativa de las materias primas de interés y posibles efectos de la interesterificación sobre esta propiedad.

A los efectos de evaluar la diferente vulnerabilidad de las cadenas de ácidos grasos a sufrir oxidación se han definidos parámetros que permiten comparar la estabilidad de diferentes estructuras. Knothe (2002) define las Posiciones Alílicas Equivalentes y las Posiciones Bisalílicas Equivalentes (BAPE), en función de la concentración de carbonos adyacentes a uno o dos dobles enlace, respectivamente:

$$APE = 2 (P16:1 + P18:1 + P18:2 + P18:3)$$

$$BAPE = P18:2 + 2 P18:3$$

Donde P_i es el porcentaje del ácido graso i en la muestra

Según este autor el BAPE es el más significativo de los dos, considerando la gran reactividad de los PUFA y que estos están acompañados por la posición bisalílica. Crosgrave (1987) por su parte define la Oxidabilidad (Ox), este parámetro tiene en consideración la mayor reactividad de los ácidos grasos con mayor número de insaturaciones:

$$Ox = 2 \times 10^{-4} \times P18:1 + 0,01 \times P18:2 + 0,02 \times P18:3$$

Considerando la composición en ácidos grasos de los materiales de partida, en la **Tabla 6.2** se muestra el cálculo de los parámetros de estabilidad definidos. Se observa que según APE la estabilidad de la BT es la mayor y del HOSFO la menor. En cambio para BAPE y Ox, el menos estable es el RBO, manteniéndose como más estable la BT.

La estabilidad de BT, según estos parámetros, esta dada por su menor cantidad de ácidos grasos insaturados. La diferencia en el orden de estabilidad entre los aceites según el parámetro utilizado se debe a que si bien HOSFO es el que tiene mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, los mismos en su mayoría son monoinsaturados (MUFA), en cambio en RBO la mitad de sus ácidos grasos insaturados son PUFA y por tanto RBO tiene mayor cantidad de posiciones bisalílicas, que como se vio son más reactivas y por ende hacen el aceite más inestable.

Tabla 6.2.- Parámetros de composición vinculados con la estabilidad oxidativa

	BT	HOSFO	RBO
14:0	2,8	<i>nd</i>	<i>nd</i>
16:0	25,7	3,5	18,2
16:1	2,8	<i>nd</i>	<i>nd</i>
17:0	1,4	<i>nd</i>	<i>nd</i>
18:0	26,7	2,5	1,8
18:1	37,9	88,2	41,3
18:2	0,8	4,6	33,4
18:3	0,7	<i>nd</i>	1,4
APE ⁽¹⁾	84	186	152
BAPE ⁽²⁾	2	5	36
Ox ⁽³⁾	0,030	0,064	0,370

nd : no detectado; (1): $APE = 2 (P16:1 + P18:1 + P18:2 + P18:3)$ (Knothe 2002); (2): $BAPE = P18:2 + 2 P18:3$ (Knothe 2002); (3): $Ox = 2 \times 10^{-4} P18:1 + 0.01 P18:2 + 0.02 P18:3$ (Cosgrove 1987)

Otro aspecto de composición a tener en cuenta cuando se evalúa la estabilidad oxidativa, es la posición que ocupan estos ácidos grasos en la molécula de glicerol. Raghuvver y Hammond (1967) reportan que un mismo ácido graso es más estable si se encuentra en la posición *sn*-2 del glicerol que si está en posición *sn*-1 o *sn*-3. Esta diferencia al atribuyen a la forma en que se acomoda espacialmente la molécula de TAG.

Este aspecto es muy importante a la hora de comparar la estabilidad de materiales grasos antes y después de la interesterificación, ya que si bien la composición en ácidos grasos no se modifica por el proceso (con lo que APE, BAPE y Ox tampoco lo hacen) la posición de los ácidos grasos se modifica durante el proceso, lo que puede mejorar o no la estabilidad del material en estudio.

Wang *et al.* (2005) relativiza el efecto de la regiodistribución de los ácidos grasos sobre la estabilidad oxidativa ya que si bien reconoce la existencia de algún efecto en este sentido, el mismo tiende a enmascarse cuando se trabaja con materiales con alto grado de instauración.

El contenido de antioxidantes naturales, considerados dentro de los componentes minoritarios de las grasas y aceites, es otro de los aspectos a tener en cuenta cuando se evalúa la estabilidad oxidativa.

En tanto al tratamiento de la misma, el calentamiento y la exposición a la luz, cuando la grasa está en contacto con el oxígeno, acelera el mecanismo de oxidación. por lo cual las condiciones del proceso (la temperatura de incubación y la exposición de la muestra a la luz durante la misma) podrían en principio causar un deterioro de

las grasas procesadas. También los tratamientos posteriores al proceso de interesterificación pueden involucrar la oxigenación de la muestra, por lo que las condiciones en las que los mismos se realizan así como las condiciones de almacenamiento de los productos a estudiar son aspectos importantes a tener en cuenta, ya que pueden influenciar la estabilidad oxidativa de los materiales grasos.

En cuanto al proceso de interesterificación en si mismo, según las condiciones de reacción, el catalizador utilizado, los procesos de purificación del producto utilizado, se encuentran diversos efectos reportados sobre la estabilidad. La gran mayoría de los autores, reportan un descenso de la estabilidad luego de la interesterificación, pero no hay un consenso en cuanto a la causa de dicha pérdida.

Kowalski *et al.* (2005) interesterifican BT con aceite de colza por catálisis química con metóxido de sodio y por enzimática con Lipozyme IM y Novozym 435. Reportan la pérdida de la estabilidad oxidativa tanto en los productos crudos como en los purificados con sílice, independientemente del tipo de catálisis utilizada.

Wang *et al.* (2005) reporta la disminución de la estabilidad oxidativa luego del proceso de randomización del aceite de maíz con metóxido de sodio, este efecto que se revierte cuando se purifican con alúmina los productos obtenidos. Por este motivo reportan la posible existencia de un compuesto que se forma durante el proceso de interesterificación que afecta la estabilidad del producto final. Descartan que se trate de ácidos grasos libre (FFA), monoglicéridos (MAG) y diglicéridos (DAG). Finalmente encuentran que este efecto se revierte con el agregado de EDTA o ácido cítrico.

Hamam y Shahidi (2006) reportan la esterificación de los tocoferoles durante el proceso de acidólisis por catálisis enzimática en un sistema modelo. La esterificación de los tocoferoles genera la pérdida de la actividad antioxidante de los mismos y de esta manera los autores intentan explicar la pérdida de estabilidad oxidativa por este tipo de proceso.

Criado *et al.* (2007) interesterifican con enzimas aceite de oliva extra virgen y aceite de palma totalmente hidrogenado, reportan la disminución de la estabilidad oxidativa luego de la interesterificación independientemente de la lipasa utilizada (prueban Novozym 435, Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM).

Lee *et al.* (2008) reportan la disminución en la estabilidad de mezclas de aceite de soja totalmente hidrogenado, aceite de colza y estearina de palma luego de la interesterificación enzimática con Lipozyme RM IM. Atribuyen esta disminución a la pérdida de tocoferoles en el proceso de destilación que utilizan para purificar los productos.

Adhikari *et al.* (2011) reportaron una disminución significativa en la estabilidad oxidativa luego de la interesterificación de mezclas de aceite de soja totalmente hidrogenado, RBO y aceite de coco con la lipasa Lipozyme TL IM. La atribuyen en parte a la pérdida de antioxidantes naturales durante la purificación del producto (eliminación de ácidos grasos libres por destilación).

En vista de estos antecedentes y la eventualidad de que el proceso de interesterificación de interés pudiera afectar la estabilidad oxidativa de los materiales grasos utilizados, en el presente capítulo se realizó un estudio detallado de este fenómeno. Para ello se interesterificaron mezclas de BT conteniendo 50 % de HOSFO o RBO y luego, mediante un estudio de enranciamiento acelerado, se determinó la estabilidad oxidativa de la mezclas y los productos obtenidos. Así mismo se analizaron las posibles causas de la pérdida de estabilidad en el proceso y se analizó la eficiencia del uso de diferentes aditivos comúnmente utilizados en la industria alimentaria a los efectos de incrementar la estabilidad de los productos.

6.2.- Materiales y métodos

Se utilizaron los materiales grasos, estándares y reactivos generales indicados en 2.1. Además para las actividades descritas en este capítulo fueron utilizados los estándares de triesterain y tripalmitina (Fluka), los estándares de α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol de 95 % de pureza (Calbiochem), alúmina (Sigma-Aldrich), ácido cítrico puro para análisis (Merck) y estándares de los antioxidantes BHA, BHT y TBHQ (Sigma).

Los productos de interesterificación de las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o con 50 % de RBO fueron obtenidos por incubación con Lipozyme TLIM durante 24 h en las condiciones descritas en 2.2.1.

En el presente capítulo se realizó la determinación de la composición en triacilglicéridos, contenido de tocoles y el contenido de orizanoles mediante los métodos ya descritos en 2.2.3, 2.2.5 y 2.2.6 respectivamente. Además se determinó el valor de peróxido (VP) según el método AOCS Cd 8-53.

6.2.1.- Enranciamiento acelerado

Los estudios de enranciamiento acelerado se realizaron en un equipo 873 Biodiesel Rancimat (Methrom, Suiza) a 110 °C, el cual opera de acuerdo a lo descrito en la introducción para este tipo de métodos. Se cargaron 3 g de muestra en el tubo de reacción y se utilizó un flujo de aire de 10 L/h. En este equipo, luego de pasar por la muestra, el aire se conduce a una celda conductimétrica cargada con 50 mL de agua destilada que registra la conductividad del agua en función del tiempo. De la curva de conductividad vs tiempo se determina período de inducción (PI), que corresponde al punto de inflexión de la misma. Las determinaciones se realizaron por duplicado, informándose el promedio de las mismas y la desviación estándar. Los datos se procesaron mediante el software 873 Biodiesel Rancimat Control (versión 1.1), provisto por el mismo fabricante del equipo.

6.2.2.- Estudio del efecto de la interesterificación enzimática sobre la concentración de los antioxidantes naturales de interés

Se realizaron reacciones de interesterificación de mezclas modelo de estándares de triacilgliceroles homogéneos, a los que se les agregó una concentración conocida de los estándares de los antioxidantes nativos en los aceites de interés (tocoferoles y orizanoles) a los efectos de determinar eventuales modificaciones que puedan sufrir los mismos durante el proceso enzimático.

Como catalizadores se utilizaron tres lipasas comerciales de la firma Novozymes: Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), que fue la seleccionada para la modificación de las mezclas estudiadas, y otras dos: Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*, reportada como 1,3-específica igual que la primera) y Novozyme 435 (*Candida antarctica* B, reportada como no-específica).

Se utilizaron mezclas de tripalmitina y triestearina en una relación 1:1, la cual fue aditivada con los antioxidantes de interés antes de la etapa de incubación. Las incubaciones fueron realizadas a 60 °C, en un incubador orbital a 200 rpm, en presencia de solvente (hexano en relación 1:10 lípidos/solvente) y con un 10 % (m/m) de enzima en relación al total de lípidos. La adición de solvente fue necesaria para evitar la solidificación de los TAG de la mezcla, dado que por su alto punto de fusión tienden a separarse de la misma.

Los antioxidantes utilizados fueron: α , β , γ y δ -tocoferol (Calbiochem, pureza > 95 %) y un estándar conteniendo una mezcla de orizanoles (suministrados por el Dr. Haiko Hense, de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil). Los cuatro tocoferoles se agregaron a una concentración de aproximada de 20 ppm cada uno y los orizanoles a 500 ppm. Se realizaron en forma independiente las incubaciones conteniendo tocoferoles de aquellas conteniendo los orizanoles, a su vez se realizó una tercera incubación sin la adición de ningún antioxidante, a los efectos de utilizarla como blanco.

A diferentes períodos de incubación se tomaron muestras de producto a las que se les determinó la composición de los triacilgliceroles, para seguir el avance de la reacción, y la concentración del antioxidante correspondiente.

6.2.3.- Eliminación de antioxidantes nativos

A los efectos de realizar los estudios de estabilidad sobre los TAG puros de las muestras de interés, en ausencia de los antioxidantes naturales nativos en los aceites, se realizó la purificación de las mismas mediante su pasaje a través de una columna de alúmina activada. Además de los antioxidantes naturales presentes en las

muestras, este método elimina otros componentes minoritarios como glicéridos parciales, ácidos grasos libres, pigmentos, etc. (Yoshida *et al.* 1991, Morales *et al.* 2010). Básicamente el método consiste en el pasaje del material graso a través de una columna cromatográfica empacada con alúmina básica activada (Sigma-Aldrich, Aluminum oxide activated, Basic, Brockmann I). La relación aceite/alúmina utilizada fue 1:1 y se aplicó vacío a la descarga de la columna a los efectos de favorecer el flujo de aceite. En el caso del sebo vacuno se dispuso todo el sistema en un horno termostatzado a 60 °C, por encima de la temperatura de fusión del mismo.

6.2.4.- Adición de antioxidantes

Se estudió el efecto de la adición de diferentes antioxidantes sintéticos sobre la estabilidad oxidativa de los productos de interesterificación (BHT, BHA, TBHQ y Ác. Cítrico). Para una eficiente dispersión, se prepararon soluciones en isopropanol de cada antioxidante (de entre 5 y 10 mg/mL). Luego se agregó el volumen de solución de antioxidante necesario (no más de 60 µL) sobre la muestra a estudiar ya colocada en el tubo de reacción del Rancimat. Los tubos se colocaron en ultrasonido durante 10 min a los efectos de homogeneizar la muestra y favorecer la dispersión del antioxidante. La muestra aditivada con el antioxidante a estudiar fue analizada en el equipo Rancimat, como se describió anteriormente. Dado el pequeño volumen de solución agregado no fue necesario remover el isopropanol antes del análisis, lo que se verificó que no afectó los resultados. Estos análisis se realizaron por triplicado y se informó el promedio con la desviación estándar correspondiente.

6.3.- Resultados y Discusión

6.3.1- Estabilidad oxidativa de las materias primas, sus mezclas y los productos de interesterificación

Debe considerarse que la estabilidad oxidativa, determinada mediante métodos de enranciamiento acelerado (como el Rancimat), si bien no arroja resultados extrapolables directamente a la vida útil de una grasa o aceite almacenado a temperatura ambiente, permite realizar un estudio comparativo de la estabilidad de distintos materiales y del efecto sobre la misma de aditivos de diferente naturaleza.

Se realizó la medida del período de inducción de los materiales de partida, las mezclas iniciales y los productos correspondientes a la interesterificación de las mezclas con BT conteniendo un 50 % de aceite. Se estudió sólo esta proporción (la de mayor contenido de aceite) dado que, en caso de haber diferencias de estabilidad, es esperable que sean éstas mezclas las que las presenten en mayor grado.

En la **Tabla 6.3** se muestra el contenido de antioxidantes naturales (tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles), la oxidabilidad (Ox) determinada a partir de la composición en ácidos grasos y el período de inducción obtenido mediante el análisis en Rancimat a 110 °C ($PI_{110^{\circ}C}$) para las tres meterías primas de interés. Se observa que el HOSFO fue el que mostró el mayor $PI_{110^{\circ}C}$, seguido por el RBO y por último la BT. Este orden de los valores de $PI_{110^{\circ}C}$ no coincide con lo esperado en función del grado de insaturación de cada material y lo que indica, en este sentido, los valores de Ox de cada uno. Dichos valores (**Tabla 6.3**) indican que, sólo en función de la composición en ácidos graso, el más estable debería ser la BT (Ox = 0,030), seguido por el HOSFO (Ox = 0,064) y finalmente el RBO (Ox = 0,370). Si bien a la BT le corresponde una oxidabilidad levemente inferior a la del HOSFO, éste último resultó mucho más resistente al ensayo de enranciamiento acelerado, presentando un $PI_{110^{\circ}C}$ 2,6 veces superior que le de la BT. En el caso del RBO, cuya oxidabilidad es un orden superior a la de la BT, ambos presentaron valores de $PI_{110^{\circ}C}$ prácticamente coincidentes, considerando la desviación estándar en dichas medidas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el contenido de antioxidantes naturales es determinante sobre la estabilidad oxidativa, confiriéndoles a ambos aceites una resistencia a la oxidación muy superior a la que se esperaría en función de su composición, efecto que no se observa en el caso de la BT que no contiene antioxidantes naturales.

Tabla 6.3.- Contenido de antioxidantes naturales, oxidabilidad (Ox) y período de inducción a 110 °C ($PI_{110^{\circ}C}$) de las diferentes materiales grasos utilizados.

Muestra	Concentración (ppm)			Ox ⁽¹⁾	$PI_{110^{\circ}C}$ (h)
	Tocoferoles	Tocotrienoles	Orizanoles		
BT	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,030	7,5 ± 0,7
HOSFO	920	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,064	19,3 ± 0,1
RBO	376	668	70	0,370	7,7 ± 0,1

(1): de la Tabla 6.2; *nd*: no detectado

Sin embargo, si se compara la estabilidad oxidativa relativa entre el HOSFO y el RBO, ambos con una carga de antioxidante “similar” (si bien de distinta naturaleza) el más saturado (HOSFO) fue el que efectivamente presentó la mayor estabilidad oxidativa.

En la **Tabla 6.4** se muestran los valores de $PI_{110^{\circ}C}$ obtenidos para las mezclas 50 % de cada aceite con la BT y los correspondientes a los productos de interesterificación enzimática (Lipozyme TLIM, 24 h de reacción). Se observa que la mezcla con HOSFO presentó un valor de $PI_{110^{\circ}C}$ (15,0 h) superior al de la mezcla con RBO (13,3 h) lo que, en principio, estaría de acuerdo con el mayor valor de Ox de ésta última (**Tabla 6.4**). Parece razonable suponer que la estabilidad oxidativa de una mezcla es resultado de

la estabilidad oxidativa que le aporta cada uno de sus componentes, por lo que resulta interesante comparar el $PI_{110^{\circ}C}$ de cada mezclas con el valor medio entre los $PI_{110^{\circ}C}$ de sus componentes puros ponderando en función de la proporción de cada uno en la misma (en este caso el promedio). A estos efectos la **Tabla 6.4** muestra los valores de $PI_{110^{\circ}C}$ correspondientes al promedio entre los de los componentes puros. Se observa que en ambos casos las mezclas presentaron $PI_{110^{\circ}C}$ claramente superiores a los promedios respectivos, lo que estaría indicando que la estabilidad oxidativa, determinada mediante este método de enranciamiento acelerado, no es un parámetro “promediable”.

Tabla 6.4.- Oxidabilidad (Ox) correspondiente a las mezclas (o productos) de BT con 50 % de HOSFO o RBO y períodos de inducción a 110 °C ($PI_{110^{\circ}C}$) de las mezclas y sus respectivos productos de interesterificación (24 h de incubación).

Muestra	Ox ⁽¹⁾	$PI_{110^{\circ}C}$ (h)		
		Mezcla	Promedio ⁽²⁾	Producto
50% HOSFO	0,047	15,0 ± 0,4	11,5	2,3 ± 0,2
50% RBO	0,200	13,3 ± 0,1	7,6	11,6 ± 1,8

(1): calculado por la ecuación en **Tabla 6.2** en función de la composición en ácidos grasos se la mezcla estimada por cálculo a partir de la composición de las materias primas correspondientes; (2) Promedio de los $PI_{110^{\circ}C}$ de las materias primas correspondiente a la mezcla (**Tabla 6.3**)

Si bien el $PI_{110^{\circ}C}$ de la mezcla con HOSFO supera al promedio de los $PI_{110^{\circ}C}$ de sus componentes puros, su valor es intermedio al de cada uno por separado, superando al de la BT pura pero no al del HOSFO. Sin embargo, para la mezcla con RBO se observa algo muy llamativo, su $PI_{110^{\circ}C}$ (13,3 h) superó ampliamente a los $PI_{110^{\circ}C}$ de cada componente puro (7,5 y 7,7 h para BT y RBO, respectivamente). Este resultado, además de confirmar que el promedio no es representativo de lo que ocurre en la mezcla, sugiere que el aporte de antioxidantes del RBO y el aporte de “saturación” de la BT a la mezcla se potenciarían repercutiendo favorablemente sobre la estabilidad de la misma.

Esto, además, deja de manifiesto la relativa validez de un parámetro como la oxidabilidad (lineal con la concentración), lo que no es de extrañar dado que la autooxidación lipídica es un proceso en extremo complejo, donde la composición de la matriz es tan determinante como la presencia de compuestos minoritarios, tanto por como antioxidantes, cuyo efecto no es necesariamente lineal con su concentración.

La **Figura 6.2** muestra gráficamente todos los valores de interés para analizar el efecto de la interesterificación sobre los mismos. Se observa que los productos de interesterificación de ambas mezclas sufrieron algún deterioro en sus estabildades oxidativas luego del proceso de interesterificación, el cual fue muy importante para la mezcla con HOSFO y relativamente leve para aquella conteniendo RBO.

La causa de este descenso en las estabilidades no puede vincularse a la composición en ácidos grasos de las muestras ya que la interesterificación no involucra ninguna modificación en la estructura de los mismos (mismo valor de oxidabilidad para una mezcla y su producto).

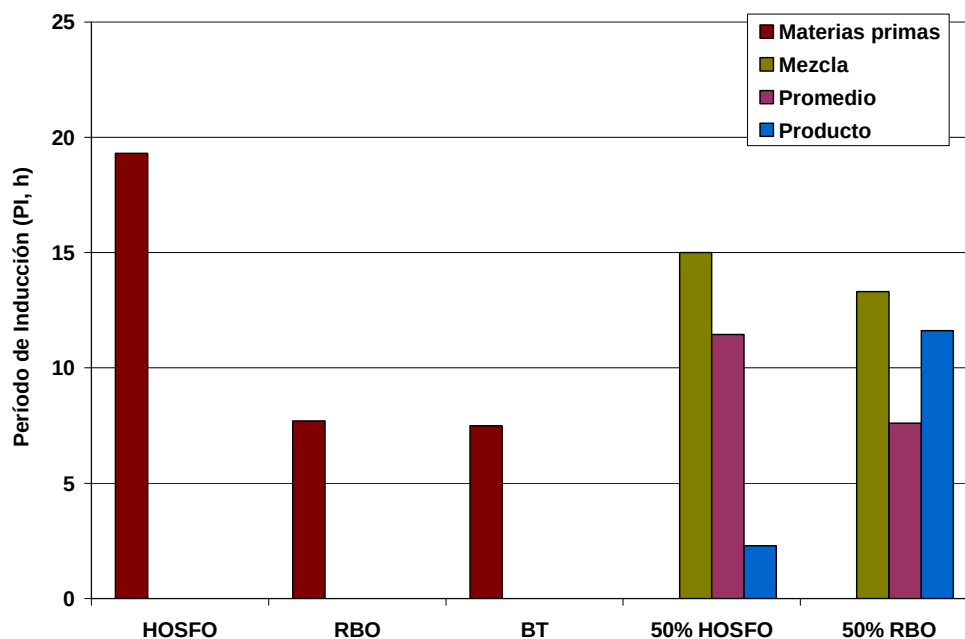


Figura 6.2.- Período de inducción de materiales de partida, sus promedios, las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o RBO y sus respectivos productos de interesterificación (24h de incubación).

Para el caso del producto conteniendo RBO, si bien el $PI_{110^{\circ}C}$ (11,6 h) disminuyó con respecto al de la mezcla de partida, aún se mantuvo por encima del RBO y la BT puros. Por lo tanto, se puede considerar que el proceso global (mezclado + interesterificación) produjo un efecto beneficioso desde el punto de vista de la estabilidad oxidativa del material de interés.

La situación es muy diferente para el caso del producto conteniendo HOSFO, ya que se observa que la interesterificación repercutió muy negativamente sobre la estabilidad oxidativa. El producto de interesterificación presentó un $PI_{110^{\circ}C}$ de 2,3 h, muy inferior al de la mezcla inicial y también al de ambos componentes.

Si bien es escasa la bibliografía donde se reporta este deterioro de la estabilidad oxidativa como consecuencia de la interesterificación, el fenómeno se puede atribuir a diferentes causas.

En trabajos previos relacionados con la modificación enzimática de lípidos se ha atribuido la pérdida de estabilidad oxidativa luego del proceso a la pérdida de actividad de los antioxidantes naturales (tocoferoles) por esterificación de los mismos con ácidos grasos del aceite. Debido a esta esterificación los tocoferoles pierden su grupo hidroxilo libre, responsable de su poder antioxidante. Hamam y Shahidi (2006)

observaron la formación de esteres entre los tocoferoles y ácidos grasos libres durante procesos de acidólisis enzimática, fenómeno al que atribuyeron la disminución de la estabilidad oxidativa observada en los lípidos luego del proceso.

Otros trabajos mencionan que esta pérdida de estabilidad puede explicarse por la pérdida de antioxidantes durante procesos de purificación posteriores a la interesterificación (Lee *et al.* 2008, Adhikari *et al.* 2011). Dado que en el presente trabajo no se realizaron etapas de purificación esta causa no sería aplicable a este caso.

Este fenómeno también se ha vinculado con la regiodistribución de los ácidos grasos en la molécula de los triacilglicerolos, dado que la ubicación de un ácido graso en las posiciones *sn*-1 o *sn*-3 presentaría una mayor vulnerabilidad a sufrir oxidación que ese mismo ácidos grasos en posición *sn*-2. Raghuvver y Hammond (1967) desarrollaron una teoría basada en el empaquetamiento hexagonal de las moléculas de TAG en la grasas en estado fundido, según esta los ácidos grasos en la posición *sn*-2 están más protegidos de la autooxidación por la posición en que se encuentran en dicho empaquetamiento, la teoría fue confirmada por experimentos con grasas naturales.

Debe tenerse en cuenta que, si bien la interesterificación involucra condiciones de proceso moderadas, el material graso es expuesto durante un período de tiempo relativamente prolongado (24 h), a una temperatura de 60 °C manteniendo la mezcla agitada durante todo el período. Si bien los tubos donde se realizaron las incubaciones fueron cerrados herméticamente, la ocurrencia de difusión de oxígeno a muy pequeña velocidad siempre es posible, lo que sumado al largo período de incubación puede conducir a que se desencadenen proceso de deterioro oxidativo en la muestra. Esto obviamente va a repercutir negativamente sobre la estabilidad oxidativa de los lípidos de interés y contribuir al descenso en los valores de $PI_{110^{\circ}C}$ obtenidos.

Para estudiar si la simple manipulación de las materias primas (agitación por períodos prolongados, a una temperatura de 60 °C, etc) pudo contribuir o no en el descenso de la estabilidad oxidativa, se realizaron incubaciones durante 24 horas de las mezclas en ausencia de enzima y se determinó el período de inducción de las mismas antes y después del proceso. De esta manera se aísla lo vinculado a la exposición de las mezclas de materiales grasos a las condiciones del proceso sin que ocurra modificación en la estructura de los TAG constituyentes de los mismos o de los antioxidantes presentes en las mezclas.

Los resultados (**Tabla 6.5**) mostraron un descenso en los $PI_{110^{\circ}C}$ como consecuencia de la incubación, de 15,0 a 10,7 y de 13,3 a 10,5 h para las mezclas de BT en un 50 % con HOSFO y RBO, respectivamente. Esto demuestra que las condiciones del proceso afectan significativamente a la estabilidad oxidativa de las mezclas. El $PI_{110^{\circ}C}$ de la mezcla con RBO luego de la incubación sin enzima es del orden del observado para el producto de interesterificación (**Tabla 6.4**), por lo que la

sola exposición de la mezcla a las condiciones del proceso podría explicar el descenso en la estabilidad oxidativa observado para esta mezcla luego de la interesterificación.

Tabla 6.5.- Período de inducción de mezclas iniciales antes y después de 24 horas de incubación sin enzima.

Muestra	PI _{110°C} (h)	
	Pre-incubación	Post-incubación
50 % HOSFO	15,0 ± 0,4	10,7 ± 0,1
50 % RBO	13,3 ± 0,1	10,5 ± 0,1

Sin embargo, en el caso de la mezcla con HOSFO el descenso de la estabilidad oxidativa luego de la interesterificación enzimática es muy superior al obtenido en la incubación sin catalizador, por lo que, si bien la exposición a las condiciones del proceso pueden haber contribuido a este fenómeno, no puede ser la única causa del descenso de la estabilidad.

Para determinar si existieron fenómenos de deterioro oxidativo durante la incubación resulta útil analizar el contenido de peróxidos en los productos y compararlo con el correspondiente a los materiales de partida y sus mezclas. A continuación se describen los resultados obtenidos.

6.3.2.- Análisis de peróxidos

El valor de peróxidos es una medida del deterioro oxidativo de la materia grasa, el mismo mide la concentración de hidroperóxidos (u oxígeno activo, expresado en meq de O₂ por kilogramo) en la muestra y su valor se vincula con el avance de la oxidación en sus primeras etapas, o lo que se conoce como “oxidación primaria”.

La **Tabla 6.6** muestra los niveles de VP correspondientes a las materias primas. Se puede observar que son valores relativamente bajos y que todos caen dentro del rango admitido por la reglamentación vigente para un material graso destinado a consumo humano (para aceites refinados un máximo de 10 meq O₂/Kg y para aceites vírgenes un máximo de 20 meq O₂/Kg, Reglamento Bromatológico Nacional, 1994).

Tabla 6.6.- Valor de peróxido de las materias primas utilizadas.

	VP (meq O ₂ /Kg)
HOSFO	3,3 ± 0,2
RBO	1,8 ± 0,1
BT	11,3 ± 0,1

Se observó que los VP de los aceites (3,3 y 1,8 meq O₂/Kg para HOSFO y RBO respectivamente) son sensiblemente menores que el correspondiente a la BT (11,3 meq O₂/Kg). Esto puede explicarse por el proceso de refinación de estos aceites vegetales, el cual incluye una etapa final de desodorización que reduce el contenido de hidroperóxidos, en cambio la grasa vacuna utilizada (primer jugo) no fue sometida a ningún proceso de refinación y por tanto el deterioro oxidativo de la materia prima se manifiesta en el contenido de hidroperóxidos del producto. En forma adicional y como ya se mencionó, a diferencia de la BT, los aceites vegetales contienen antioxidantes naturales que los protegen durante el tiempo transcurrido desde su obtención.

La **Tabla 6.7** muestra los niveles de VP correspondientes a las mezclas de BT con cada uno de los aceites materias primas y los productos correspondientes. Se puede observar que las mezclas presentaron VP intermedios al de los materiales constituyentes de cada mezcla puros, lo que era de esperarse.

Tabla 6.7.- Valor de peróxido de las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o RBO y los productos de interesterificación correspondientes.

	VP (meq O ₂ /Kg)	
	mezcla	producto
50 % HOSFO	8,9 ± 0,4	5,7 ± 0,3
50 % RBO	9,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2

En relación a los productos se observa que los VP fueron inferiores al de las mezclas sin incubar, lo que en principio resultó inesperado ya que, como se discutió previamente, el proceso de interesterificación involucra la exposición de los lípidos a condiciones que pueden favorecer la ocurrencia de procesos de oxidación.

Dado que los ensayos sin enzima mostraron que la mezcla reduce su estabilidad oxidativa luego de la simple manipulación en las condiciones de reacción, la explicación de la disminución en los valores de VP de los productos con respecto a la mezcla de partida puede relacionarse con algún efecto de la enzima en el medio de reacción. Una posibilidad podría ser la adsorción de los hidroperóxidos por el soporte

de sílice de la enzima, dado que es conocido que la sílice es capaz de interactuar con compuestos oxigenados como los hidroperóxidos. Para verificar esta posibilidad se realizó una incubación en idénticas condiciones pero sustituyendo la enzima por sílice (Silicagel 60 Merck, 70-230 mesh, 0,063-0,200 mm) en idéntica proporción. No se observó ningún cambio en los valores de VP luego de este tratamiento, por lo que se descartó el que la sílice participara en el fenómeno de la disminución del VP.

Otra posibilidad que puede explicar la reducción en el VP luego del contacto con la enzima puede ser la acción de los hidroperóxidos sobre funciones reductoras en la propia estructura de la enzima. Por ejemplo, es conocido el carácter reductor del grupo -SH de los residuos de cisteína, capaz de proteger a las células de los efectos destructivos de la oxidación, al reaccionar *in vivo* con sustancias como los peróxidos. No sería extraño que esta capacidad reductora de las proteínas que contienen estos residuos pueda manifestarse al entrar la misma en contacto, *in vitro*, con lípidos conteniendo hidroperóxidos. Esto también es coherente con la recomendación del fabricante del catalizador (Novozymes) en relación a que al material a procesarse debe contener el mínimo de peróxidos posible y nunca más de 2 mEq/Kg, a los efectos de preservar la actividad enzimática (Novozymes, 2002).

Esta hipótesis no pudo comprobarse ya que para ello habría que haber contado con la misma enzima en su forma soluble, sin inmovilizar, la cual no está disponible en el mercado.

6.3.3.- Efecto de la interesterificación enzimática sobre el contenido de antioxidantes naturales

Como se mencionó anteriormente, la pérdida de estabilidad oxidativa producida por procesos de interesterificación se ha atribuido también a la esterificación del grupo fenol de los tocoferoles presentes en los aceites con ácidos grasos libres. La pérdida del alcohol fenólico libre conlleva la pérdida de la actividad antioxidante de estos compuestos, repercutiendo negativamente en la estabilidad oxidativa de la mezcla.

6.3.3.1.- Análisis de mezclas y productos

Se estudió el contenido de antioxidantes naturales antes y después del proceso de interesterificación de las mezclas de interés. Para esto se interesterificó las mezclas de BT con 50 % de HOSFO y 50 % de RBO con la enzima Lipozyme TL IM según el método descrito en **2.2.1**.

Los resultados mostraron que la concentración de los antioxidantes no varió por efecto del proceso en ninguno de los casos y que por lo tanto la pérdida de estabilidad

oxidativa no puede asociarse a ningún fenómeno vinculado a la modificación de la estructura de los antioxidantes durante la interesterificación enzimática (**Tabla 6.8**).

Tabla 6.8.- Concentración de los antioxidantes naturales presentes en las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o RBO y en sus productos de interesterificación (catálisis con Lipozyme TL IM durante 24 h)

Muestra		Tocoferoles (ppm)	Tocotrienoles (ppm)	Orizanoles (ppm)
HOSFO		920	nd	nd
50 % HOSFO	Mezcla	454	nd	nd
	Producto	418	nd	nd
RBO		376	668	70
50 % RBO	Mezcla	182	306	33
	Producto	200	335	37

nd.- no detectado

Dado que varios autores han reportado la ocurrencia de fenómenos de modificación de la estructura de los antioxidante en mezclas interesterificadas, tanto por catálisis química como enzimática, se decidió realizar un estudio más exhaustivo de este sistema mediante la incubación de mezclas “modelo”, cuyo análisis resultara más simplificado, como se describe a continuación.

6.3.3.2.- Estudio de un sistema “modelo” simplificado

A los efectos de estudiar la posibilidad de esterificación de los antioxidantes como consecuencia del proceso de interesterificación enzimática se trabajó con un sistema simplificado, constituido por mezclas de dos TAG homogéneos en igual concentración, SSS (tristearina) y PPP (tripalmitina), a las que se les agregó los antioxidantes naturales de interés (tocoferoles u orizanoles). Posteriormente las mezclas fueron incubadas por diferente períodos en presencia de diferentes catalizadores enzimáticos: Lipozyme RM IM (de *Rhizomucor miehei*), Lipozyme TL IM (de *Thermomyces lanuginosus*), ambas reportadas como *sn*-1,3-específicas y Novozym 435 (de *Candida antarctica B*), reportada no-específica.

Durante la incubación se realizaron tomas a diferentes tiempos de la mezcla, las que se destinaron los análisis de composición en TAG y de contenido de antioxidantes, a los efectos de verificar, respectivamente, el progreso de la interesterificación y el efecto sobre la concentración de los antioxidantes. En forma

paralela se puso a incubar una fracción de la misma mezcla de TAG pero sin el agregado de enzima, a los efectos de verificar si las condiciones de reacción ejercen algún efecto sobre el contenido de antioxidantes.

Como parámetros indicativos del grado de avance de la interesterificación se determinó la variación con el tiempo de la relación entre dos TAG producidos en el medio de reacción (SSP y SPP) con respecto a los TAG de los cuales se formaron (SSS y PPP respectivamente). Dichas relaciones (SSP/SSS y SPP/PPP) contienen a un TAG de la mezcla de partida en el denominador y a un TAG producido durante la incubación como resultado de sustituir en aquel a un sólo ácido graso, por lo que es de esperar que en los casos en que la interesterificación ocurra, ambos cocientes se incrementen con el avance de la reacción.

Las **Figuras 6.3 y 6.4** muestran claramente que si bien los dos cocientes elegidos resultan útiles para realizar el seguimiento del proceso de interesterificación el más sensible es el cociente SSP/SSS, ya que presentó el mayor grado de variación. También es claro que las enzimas más activas para la catálisis de este proceso fueron la Lipozyme TL IM y la Lipozyme RM IM, ya que permitieron que el proceso transcurriera con una velocidad de reacción muy superior que la enzima Novozym 435, debido a lo cual incubaciones catalizadas por la enzima Novozym 435 debieron prolongarse por un período mayor.

Se observó también que los parámetros elegidos para seguir el avance del proceso aumentaron a una velocidad importante hasta las 4,5 horas de reacción aproximadamente cuando se usaron las enzimas Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM, tiempo. A partir de ese momento se podría considerar que la reacción alcanzó un estado de equilibrio, ya que el aumento no se observa ningún avance posterior significativo. En el caso de la reacción catalizada por la enzima Novozym 435, no se observó ninguna situación de equilibrio aún después de 70 horas de reacción (**Figura 6.4**), motivo por el cual esta enzima no resulta la más adecuada para la catálisis de este tipo de reacción.

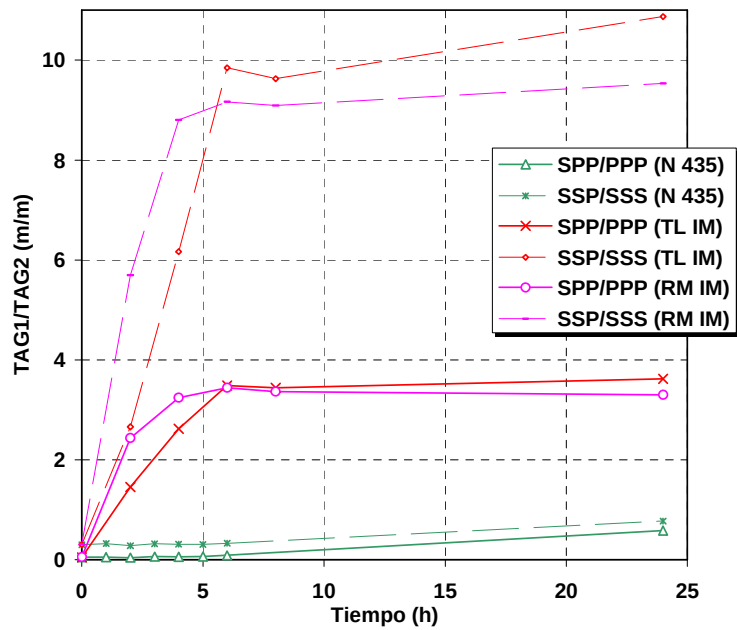


Figura 6.3.- Variación de las relaciones PPS/PPP y SSP/SSS durante la incubación de la mezcla PPP/SSS 50:50 catalizada por las lipasas Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM y Novozym 435.

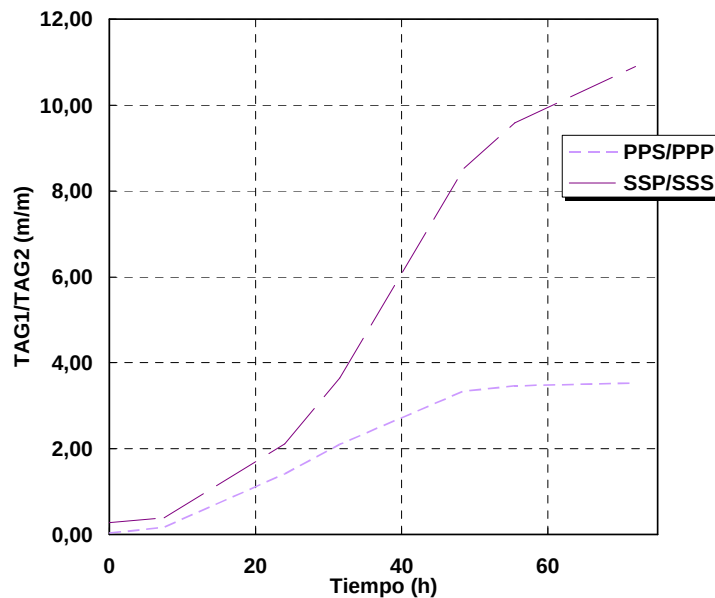


Figura 6.4.- Variación de las relaciones PPS/PPP y SSP/SSS durante la incubación de la mezcla PPP/SSS 50:50 catalizada por la lipasa Novozyme 435.

Las **Figuras 6.5 y 6.6** muestran la variación de la concentración de tocoferoles totales con el tiempo de incubación para las reacciones catalizadas por las tres

enzimas de interés. Las figuras muestran que no ocurrió una disminución significativa en la concentración de tocoferoles en ninguno de los casos.

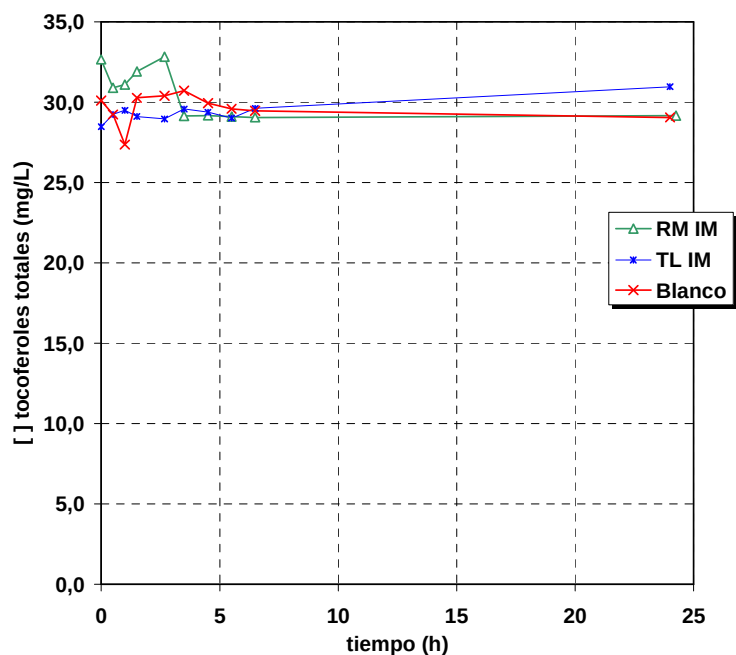


Figura 6.5.- Concentración de tocoferoles durante la interesterificación de la mezcla PPP/SSS 50:50 catalizada por las lipasas Lipozyme RM-IM, Lipozyme TL IM (blanco sin catalizador).

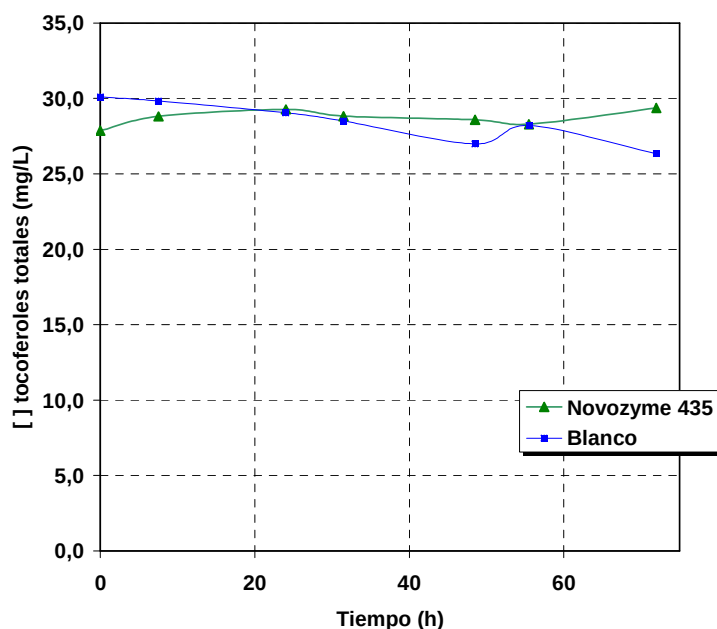


Figura 6.6.- Concentración de tocoferoles durante la interesterificación de la mezcla PPP/SSS 50:50 catalizada por la lipasa Novozyme 435 (blanco sin catalizador).

En el caso de las incubaciones de la mezcla PPP/SSS aditivada sólo con orizanoles se obtuvo un resultado similar, ya que la concentración de orizanoles no varió apreciablemente con el transcurso del tiempo de incubación (**Tabla 6.9**). En ese caso tampoco la incubación del blanco sin catalizador mostró un descenso en la concentración de antioxidante.

Tabla 6.9.- Concentración de orizanoles totales durante la interesterificación de la mezcla PPP/SSS 50:50 catalizada por las lipasas Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM y Novozym 435 (blanco sin catalizador).

	Tiempo de incubación (h)	Orizanoles totales (ppm)
Lipozyme TL IM	0,0	2800
	5,5	3900
	24,0	3900
Lipozyme RM IM	0,0	3600
	5,5	3700
	24,0	3800
Novozyme 435	0,0	3700
	31,0	3700
	72,0	3300
Blanco	0,0	2700
	5,5	3000
	24,0	3600
	31,0	3200
	72,0	3300

Estos resultados demuestran que la interesterificación enzimática en las condiciones estudiadas no produce ningún efecto sobre los antioxidantes naturales de interés (tocoferoles y orizanoles). Por lo tanto se descartó la posibilidad de la disminución en la estabilidad oxidativa debida al proceso de interesterificación pueda relacionarse con la modificación de estos antioxidantes como resultado del proceso enzimático en este tipo de sistema.

6.3.4.- Efecto del reordenamiento de los ácidos grasos en la molécula de glicerol

Como se mencionó anteriormente otra posible explicación a la disminución de la estabilidad oxidativa luego del proceso de interesterificación es el efecto sobre dicha propiedad del reordenamiento de los ácidos grasos en la molécula de glicerol.

Como se vio en el punto **3.3.1.3**, el proceso de interesterificación produjo un efecto neto de "migración" de los ácidos grasos insaturados desde la posición *sn*-2 a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula de glicerol, alcanzándose una composición final similar a la correspondiente al producto randomizado. Esto ocasiona el aumento de la proporción de dichos ácidos grasos (más susceptibles a la oxidación) en las dos posiciones más expuestas del glicerol (*sn*-1 y *sn*-3). Este efecto puede conducir a que el producto sea más susceptible a la oxidación que la mezcla de partida, como se ha reportado para las mezclas de TAG homogéneos triestearina y trioleína, triestearina y trilinoleína y tripalmitina y trilinoleína las cuales fueron randomizadas químicamente, luego se comparó su velocidad de oxidación donde se encontró que los TAG con la misma composición en ácidos grasos dispuestos en distinta posición (PPL/PLP; SSO/SOS; SSL/SLS) presentan una mayor velocidad de oxidación cuando el ácido graso insaturado está en posición *sn*-1 o *sn*-3 (Wada y Koizumi 1983).

A los efectos de estudiar si el simple reordenamiento de los ácidos grasos como consecuencia de la interesterificación afecta a la estabilidad oxidativa, se procedió a determinar los períodos de inducción mediante el método Rancimat de las mezclas de BT con 50% de HOSFO y con 50 % de RBO y sus respectivos productos de interesterificación (según el método **2.2.1**). Pero, a diferencia de los análisis realizados previamente (**Tabla 6.4**), en este caso se eliminaron completamente los antioxidantes naturales de las muestras y los productos mediante su purificación en columna de alúmina activada (método **6.2.3**) antes de someterlos al estudio de enranciamiento acelerado. Esto se realizó debido a que los antioxidantes naturales provenientes de los aceites afectan fuertemente la estabilidad oxidativa de las mezclas y sus productos, por lo que su presencia puede interferir enmascarando el eventual efecto que produzca el reordenamiento de los ácidos grasos, que es el objeto de interés.

En la **Figura 6.7** se observan los valores de $PI_{110^{\circ}C}$ obtenidos para las mezclas antes y luego de la purificación con alúmina activada. Como era de esperar, la remoción de los antioxidantes produjo un descenso notorio en los $PI_{110^{\circ}C}$, confirmando el efecto significativo de los mismos sobre la estabilidad oxidativa de las mezclas.

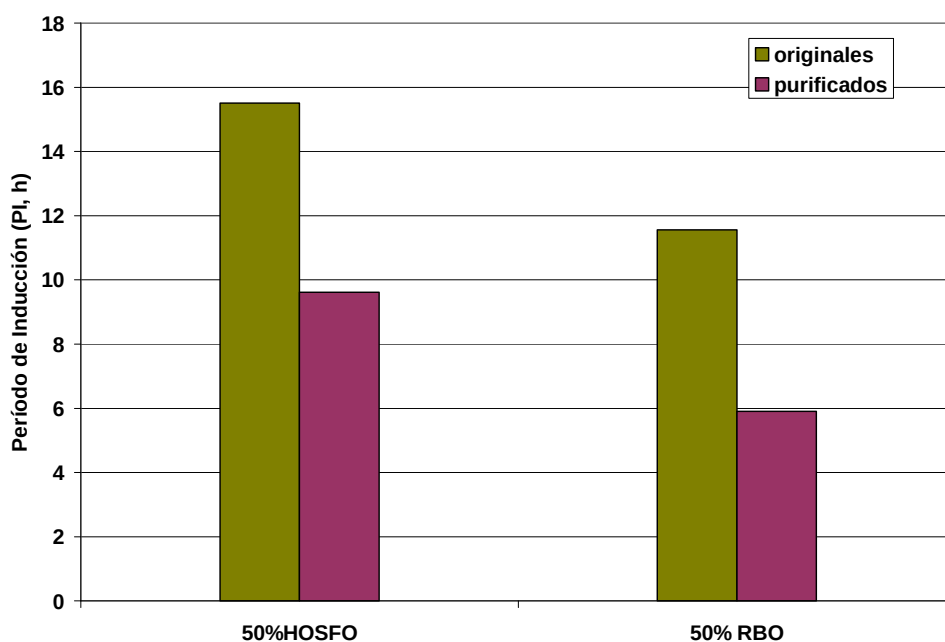


Figura 6.7.- $PI_{110^{\circ}C}$ de las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o RBO, antes (originales) y luego (purificados) de la purificación con alúmina.

El efecto de la purificación sobre la estabilidad oxidativa del producto de la mezcla BT/RBO se muestra en la **Figura 6.8**. Es claro también en este caso que la eliminación de los antioxidantes produce una disminución en la estabilidad oxidativa, al igual que se observó en las mezclas.

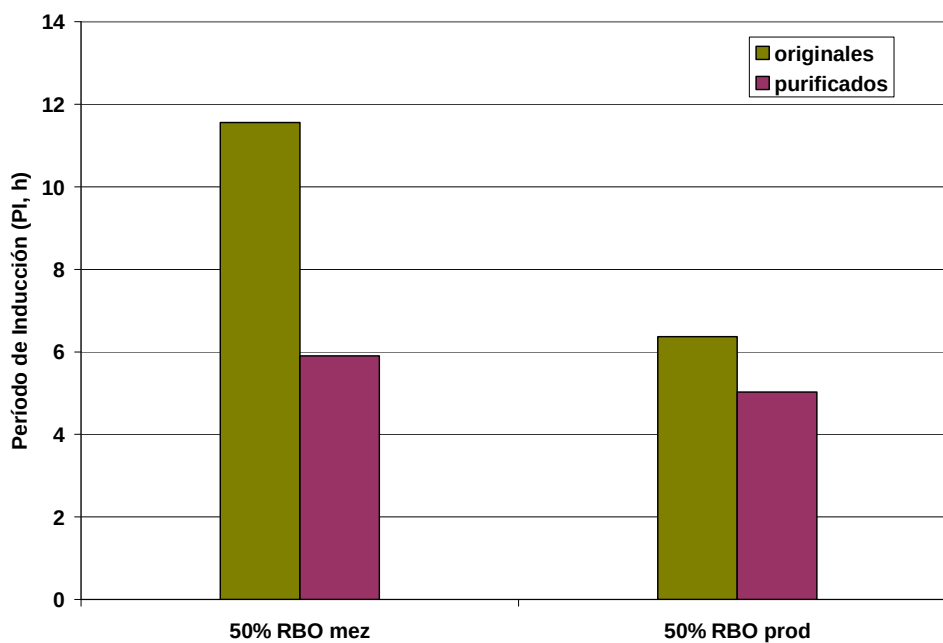


Figura 6.8.- $PI_{110^{\circ}C}$ de la mezcla de BT con 50 % de RBO y su producto de interesterificación (24 horas de incubación), antes (originales) y luego (purificados) de su purificación con alúmina.

Al comparar la mezcla 50 % BT/RBO purificada y su correspondiente producto purificado, se observó que el $PI_{110^{\circ}C}$ es levemente menor para este último, lo que sugiere que efectivamente el proceso de interesterificación repercute de forma negativa en la estabilidad oxidativa del material graso. Dado que los ensayos se realizaron sobre los TAG purificados (sin ningún antioxidante y sin glicéridos parciales ni FFA), se puede inferir que el rearrreglo de los ácidos grasos en la molécula de glicerol genera una disminución en la estabilidad oxidativa del material al incrementarse la proporción de ácidos grasos insaturados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol en los productos, quedando más expuestos á la oxidación, tal cual lo demostraron los resultados del **Capítulo 3**.

Sorprendentemente, para el caso del HOSFO se observa que la eliminación de los antioxidantes en el producto genera un importante aumento en el $PI_{110^{\circ}C}$, al contrario de lo observado para la mezcla (**Figura 6.9**). Este resultado claramente inesperado podría estar indicando que, además de los antioxidantes, el proceso de purificación con alúmina activada eliminó algún agente de efecto pro-oxidante presente en el producto.

Se ha reportado la generación de eventuales compuestos pro-oxidantes durante la randomización química del aceite de maíz, los que repercuten negativamente sobre la estabilidad oxidativa de los productos (Wang *et al.*, 2005). En dicho trabajo se afirma que dichos pro-oxidantes actuarían potenciando (“sensibilizando”) la catálisis de la oxidación por parte de trazas metálicas en el material graso. Lamentablemente los autores no identifican los compuestos responsables de este efecto.

Al comparar la mezcla BT/HOSFO 50 % purificada y su producto purificado (**Figura 6.9**), se vio un aumento en la estabilidad oxidativa como efecto de la interesterificación. Esto podría deberse a la variación en la población de TAG luego del proceso, principalmente a la reducción de los TAG triinsaturados (UUU) comentado en el **Capítulo 3**.

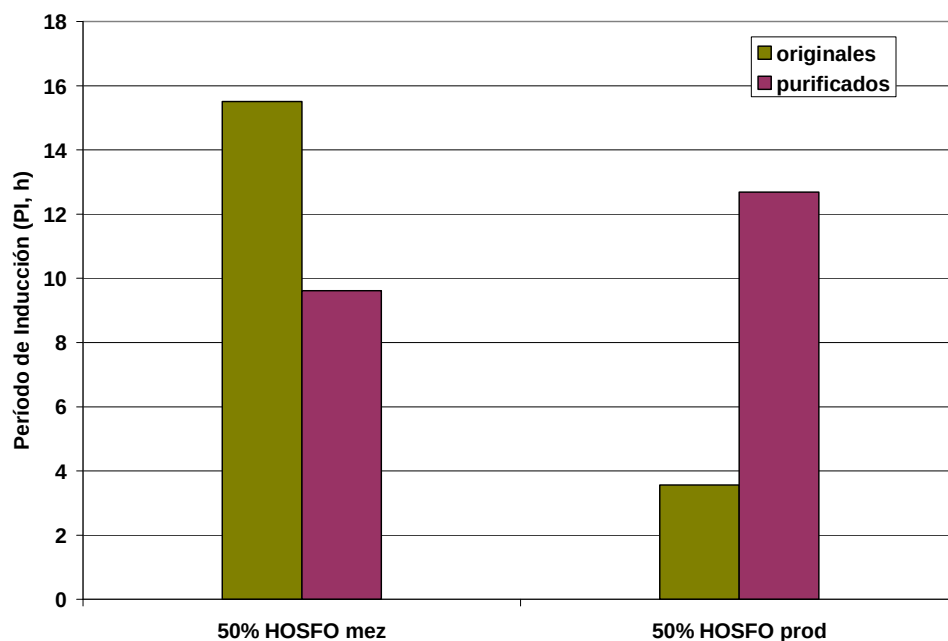


Figura 6.9.- $PI_{110^{\circ}C}$ de la mezcla de BT con 50 % de HOSFO y su producto de interesterificación (24 horas de incubación), antes (originales) y luego (purificados) de su purificación con alúmina.

Estos resultados sugieren que sólo por efecto del rearreglo de los ácidos grasos en la molécula del glicerol puede afectar la estabilidad oxidativa de los lípidos involucrados en la interesterificación de las mezclas BT/aceite. Este efecto puede favorecer o perjudicar la estabilidad oxidativa, según las características del aceite utilizado en la mezcla inicial.

6.3.5.- Efecto de la adición de antioxidantes sintéticos sobre la estabilidad oxidativa de los productos

El destino de materiales grasos a la industria alimentaria exige que los mismos presenten una estabilidad oxidativa adecuada. Si bien no existe ningún requerimiento o normativa específicos en este sentido, es necesario explorar alguna medida que permita compensar, al menos parcialmente, la pérdida de estabilidad oxidativa producida por la interesterificación. La alternativa más común para corregir y mejorar la estabilidad oxidativa de grasas y aceites destinados a alimentos es la adición de alguno de los antioxidantes sintéticos permitidos en el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/1994, RBN).

Para determinar el efecto sobre la estabilidad oxidativa de los productos de interés de la adición de diferentes antioxidantes sintéticos comunes, se determinó el efecto de la adición de BHA, BHT, TBHQ y ácido cítrico sobre el $PI_{110^{\circ}C}$ de los mismos. Se

consideraron las concentraciones máximas permitidas por el RBN: 100 ppm para BHA y 200 ppm para BHT y TBHQ.

La **Tabla 6.10** muestra los resultados obtenidos, donde se indica por “lote 1” y “lote 2” que tanto el HOSFO como el RBO correspondieron a diferentes partidas, obtenidas en comercios locales en diferentes épocas del año. Esto debe considerarse ya que dado la variedad de factores que afectan la estabilidad oxidativa de un aceite, variaciones en el origen de la materia prima y en el proceso de refinación o en el tiempo de almacenamiento, pueden conducir a diferencias significativas en los resultados de estudios de estabilidad. Como se indica en la **Tabla 6.10**, con las muestras conteniendo aceites del “lote 1” se estudiaron los tres antioxidantes fenólicos (BHT, BHA y TBHQ), mientras que con aquellas con aceites del “lote 2” se realizaron los trabajos con ácido cítrico.

Tabla 6.10.- $PI_{110^{\circ}C}$, para los productos de interesterificación de las mezclas de BT con 50 % de HOSFO o RBO con diferente concentración de aditivos.

	lote 1				lote 2	
		BHA	BHT	TBHQ		ác. Cítrico
	0 ppm	100 ppm	200 ppm	200 ppm	0 ppm	200 ppm
50 % HOSFO	2,3± 0,2	4,3± 0,5	3,3± 0,5	3,5± 0,1	3,6± 1,0	13,1± 1,5
50 % RBO	11,6± 1,8	9,6± 0,3	7,2± 0,4	7,2± 0,4	6,7± 0,8	18,6± 1,4

Dado el diferente comportamiento de los productos provenientes de mezclas preparadas con diferentes lotes (ver estabilidades de ambos lotes sin aditivar, a 0ppm) se optó por analizar los resultados en base al período de inducción relativo ($PIR_{110^{\circ}C} = PI_{110^{\circ}C}$ con antioxidante / $PI_{110^{\circ}C}$ sin antioxidante), parámetro que resultará más ilustrativo que los valores absolutos. Un valor de $PIR_{110^{\circ}C}$ menor, igual o superior a “1” indicará que el aditivo presentó un efecto antioxidante negativo, neutro o positivo, respectivamente.

En la **Figura 6.10** se muestra el efecto del agregado de los distintos antioxidantes estudiados al producto proveniente de la mezcla con HOSFO. Se puede apreciar que los tres antioxidantes sintéticos (BHA, BHT y TBHQ), si bien afectaron favorablemente a la estabilidad oxidativa del producto, este efecto fue relativamente leve, por lo que no permitió recuperar los niveles de estabilidad correspondientes a la mezcla de partida ($PI_{110^{\circ}C}$ de 15,0 h) y a los de los materiales grasos originales también ($PI_{110^{\circ}C}$ de 7,5 h para el BT y de 15,4 h para el HOSFO). Por tanto, adicionados a estas concentraciones, estos antioxidantes no logran revertir el efecto negativo del proceso de interesterificación sobre la estabilidad oxidativa de este producto.

En el trabajo de Wang *et al.* (2005) ya mencionado, se reportó que la estabilidad de los productos de interesterificación de aceite de maíz pudo mejorarse eficientemente mediante el agregado de un agente complejante (100 ppm de EDTA + 100 ppm de ácido cítrico) consiguiendo incrementar la estabilidad del producto a valores próximos a la del material antes de la interesterificación. Estos aditivos no tienen actividad antioxidante sino que actúan como complejantes de los iones metálicos presentes en el sistema. Dado que las trazas metálicas actúan como potentes catalizadores de la oxidación lipídica (p.ej. Cu y Fe, el primero mucho más activo que el segundo) su complejación elimina su poder catalítico, por lo cual el ácido cítrico es utilizado frecuentemente en la industria aceitera (con la ventaja de que no existe un máximo recomendado por el RBN, que lo considera inocuo). Si bien la manipulación de los materiales grasos realizada en esta tesis no involucró el contacto con elementos metálicos, basado en estos antecedentes y en el pobre efecto mostrado por los antioxidantes fenólicos ensayados, se decidió estudiar el efecto del agregado de 200 ppm de ácido cítrico a los productos de interés.

Los resultados muestran que dicho aditivo fue altamente eficiente en la estabilización del material graso (**Tabla 6.10, Figura 6.10**) consiguiéndose niveles de estabilidad ($PIR_{110^{\circ}C} = 3,6$) muy superiores a los alcanzados con los antioxidantes fenólicos ($PIR_{110^{\circ}C}$ de 1,5 a 1,9).

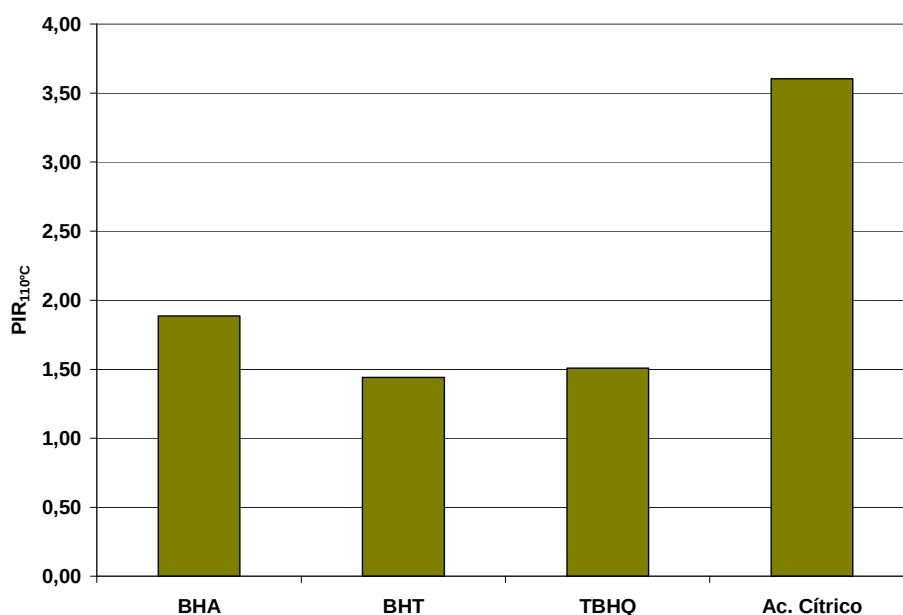


Figura 6.10.- Períodos de inducción relativos a 110 °C ($PIR_{110^{\circ}C}$) del producto de interesterificación de la mezcla de BT con 50 % de HOSFO, aditivado con BHA (100 ppm), BHT (200 ppm), TBHQ (200 ppm) y ácido cítrico (200 ppm).

La **Figura 6.11** muestra los valores de $PIR_{110^{\circ}C}$ correspondientes a los diferentes antioxidantes adicionados al producto proveniente de la mezcla con RBO. Resulta

llamativo que los $PIR_{110^{\circ}C}$ de los tres antioxidantes sintéticos estudiados, todos ellos de uso común en la industria alimentaria, son inferiores a la unidad, lo que indica que a las concentraciones utilizadas no resultaron beneficiosos para la estabilidad oxidativa del producto sino que, por el contrario, su adición favoreció la ocurrencia de procesos de deterioro.

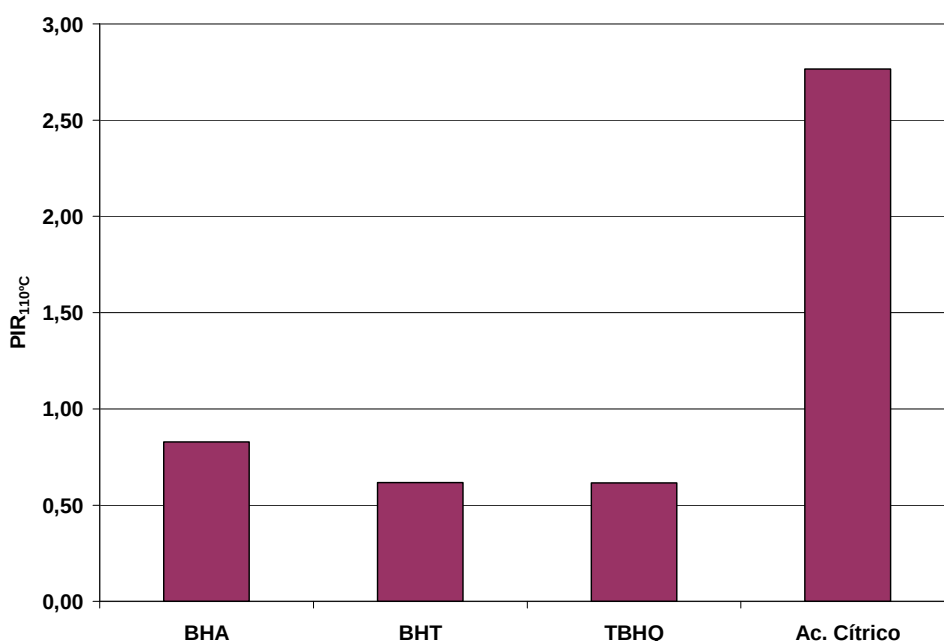


Figura 6.11.- Períodos de inducción relativos a $110^{\circ}C$ ($PIR_{110^{\circ}C}$) del producto de interesterificación de la mezcla de BT con 50 % de RBO, aditivado con BHA (100 ppm), BHT (200 ppm), TBHQ (200 ppm) y ácido cítrico (200 ppm).

No se encontró una explicación para estos resultados, un antioxidante puede ser efectivo o no adicionado a niveles moderados sobre un lípido, pero un efecto pro-oxidante en estas condiciones resultó llamativo. Sí se encontró un antecedente de un resultado similar, donde se menciona que el agregado de 200 ppm de BHT al producto de interesterificación enzimática de una mezcla aceite de soya totalmente hidrogenado y aceite de salvado de arroz, produce un deterioro de su estabilidad oxidativa, debiéndose alcanzar concentraciones superiores de antioxidante para lograr un efecto positivo sobre la estabilidad oxidativa del producto (Adhikari *et al.* 2011). Sin embargo estos autores tampoco identifican la naturaleza del efecto negativo del BHT sobre la estabilidad de los productos. En esta tesis no se exploraron concentraciones superiores de antioxidantes fenólicos dado que se trabajó en los límites máximos establecidos por la normativa bromatológica nacional (RBN 1994).

Como puede apreciarse en la **Figura 6.11**, también en este caso el agregado del ácido cítrico aumenta en aproximadamente 3 veces el valor del período de inducción del producto. Como se mencionó anteriormente no existe ninguna etapa del proceso donde se pudieran estar aportando iones metálicos que puedan ser responsables de la

pérdida de estabilidad observada, por lo que, si bien los resultados en cuanto al efecto del ácido cítrico son contundentes, la forma en que el mismo actúa no es clara. Wang *et al.* (2005) mencionan una posible explicación para este fenómeno, atribuyéndolo, como se mencionó anteriormente, a la formación de algún compuesto que, sin tener actividad pro-oxidante por sí solo, actuaría potenciando la actividad catalítica de los iones metálicos en el sistema. De esta manera, la complejación de los metales existentes, en igual concentración en la mezcla y los productos, repercutiría más notoriamente sobre la estabilidad de éstos últimos. Si bien la explicación es funcional para explicar los resultados obtenidos, debe tomarse con cierta cautela ya que no se informa o sugiere ningún tipo de compuesto capaz de desarrollar este efecto.

6.4.- Conclusión

Los resultados obtenidos demostraron que el proceso de interesterificación enzimática afecta negativamente la estabilidad oxidativa de los materiales grasos, obteniéndose en ambos sistemas (BT/HOSFO y BT/RBO) productos con períodos de inducción inferiores a los de las mezclas de partida.

A los efectos de identificar la causa de este fenómeno se estudiaron diversos factores que pudieron ser determinantes sobre la estabilidad de estos materiales lipídicos durante el proceso enzimático (como la exposición a la temperatura de reacción, la existencia de pérdida de antioxidantes, el efecto del reordenamiento de los ácidos grasos en la molécula de glicerol).

Si bien se encontró algún efecto negativo sobre la estabilidad de la sola exposición de las mezclas a las condiciones de proceso, las mismas mostraron una reducción en el valor de peróxidos luego de la incubación, lo que fue atribuido a la posible interacción entre los hidroperóxidos y residuos aminoácidos con carácter reductor en la propia enzima.

Dada la existencia de antecedentes vinculados a la pérdida de antioxidantes en procesos enzimáticos se realizó un estudio exhaustivo de la posibilidad de que ocurriera este fenómeno. Para ello se estudió el efecto del proceso sobre los antioxidantes en las mezclas de interés (orizanoles y tocoferoles) y sobre mezclas de estándares de TAG aditivadas con dichos antioxidantes con las que se utilizó diferentes catalizadores enzimáticos. Se constató que en ninguno de los casos ocurrió efecto alguno sobre la concentración de estos antioxidantes naturales por lo que se descartó que la pérdida de estabilidad oxidativa luego del proceso de interesterificación estuviera causada por la disminución en la concentración de los mismos.

Se observó que el rearrreglo de los ácidos grasos influye en la estabilidad de los productos. Para la mezcla con RBO, se observó un leve efecto negativo del rearrreglo de los ácidos grasos. Para el caso de la mezcla con HOSFO se vio un efecto favorable

del rearrreglo de los ácidos grasos. Por lo tanto dependiendo de las características de composición de TAG del material de partida el proceso de interesterificación puede ser beneficioso o perjudicial para la estabilidad oxidativa del producto.

En cuanto a la aplicación de medidas correctivas sobre este parámetro que involucre la utilización de aditivos, se encontró que los antioxidantes sintéticos BHA, BHT y TBHQ, de uso habitual en la industria alimentaria, utilizados en las concentraciones permitidas por la reglamentación bromatológica vigente, no resultaron efectivos. En cambio, el agregado de ácido cítrico mejoró de forma considerable la estabilidad oxidativa de los productos de interesterificación, sugiriendo que la presencia de iones metálicos está participando en el deterioro de la estabilidad observado. Dado que no existió ninguna etapa donde se pudiera aportar iones metálicos a las mezclas, no se dispone de una explicación que exponga claramente los resultados obtenidos. Otros autores han sugerido para situaciones similares la generación durante el proceso de algún tipo de compuesto capaz de potenciar la actividad catalítica de los metales, pero es un punto no del todo dilucidado por lo que requiere de mayor estudio.

6.5.- Bibliografía

Adhikari P, Shin J-A, Lee J-H, Kim H-R, Kim I-H, Hong S-T, Lee K-T. 2011. Crystallization, physicochemical properties, and oxidative stability of the interesterified hard fat from rice bran oil, fully hydrogenated soybean oil, and coconut oil through lipase-catalyzed reaction. *Food Bioprocess Technol* 5: 2474-2487

AOCS. 1996. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign.

Bockisch M. 1993. Fats and oils handbook. AOCS PRESS: Champaign, Illinois.

Criado M, Hernández-Martín E, López-Hernández A, Otero C. 2007. Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat: Characterization of the reaction and its products. *J Am Oil Chem Soc* 84: 717-726.

Cosgrove J P, Church D F, Pryor W A. 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22: 299-304
Hamam F, Shahidi F. 2006. Acidolysis reactions lead to esterification of endogenous tocopherols and compromised oxidative stability of modified oils. *J Agric Food Chem* 54: 7319-7323.

Frankel E N. 2005. Lipid Oxidation, 2nd ed.; The Oily Press, Bridgwater, U.K..

Gunstone F D, Harwood J L, Dijkstra A J. 2007 The Lipid Handbook, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL.

Knothe G. 2002. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? *J Am Oil Chem Soc*, 79: 847-854.

Kowalski B, Tarnowska K, Gruczynska E. 2005. The properties of the mixture of beef tallow and rapeseed oil with a high content of tallow after chemical and enzymatic interesterification. *Grasas y Aceites* 56: 267-275.

Lee J H, Akoh C C, Lee K-T. 2008. Physical properties of trans-free bakery shortening produced by lipase-catalyzed interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 85: 1-11.

Morales A, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G, Velasco J. 2010. Quantitation of Hydroperoxy-, Keto- and Hydroxy-Dienes During Oxidation of FAMES from High-Linoleic and High-Oleic Sunflower Oils. *J Am Oil Chem Soc* 87:1271-1279.

Novozymes. 2002. Enzymatic interesterification in fat modification. *Intesterification Manual Novozymes*.

Raghuveer K G, Hammond E G. 1967. The influence of glyceride structure on the rate of autoxidation. *J Am Oil Chem Soc* 44: 239-243.

RBN. 1994. Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994. IMPO: Montevideo, Uruguay.

Smouse T H. 1996. Significance of lipid oxidation to food processors. In: McDonald R E, Min D B, editors. Food lipids and health. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 269-286.

Wada S, Koizumi C. 1983. Influence of the position of unsaturated fatty acid esterified glycerol on the oxidation rate of triglyceride. J Am Oil Chem Soc 60: 1105-1109.

Wang T, Jiang Y, Hammond E G. 2005. Effect of randomization on the oxidative stability of corn oil. J Am Oil Chem Soc 82: 111-117.

Yoshida H, Tatsumi M, Kajimoto G. 1991. Relationship between oxidative stability of vitamin E and production of fatty acids in oils during microwave heating. J Am Oil Chem Soc 68: 566-570.

Capítulo 7

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos demuestran que el proceso estudiado resultó eficiente en la modificación de las propiedades de la grasa vacuna y de sus mezclas con los dos aceites seleccionados para este estudio. El proceso global debe ser entendido como la combinación de dos etapas, el simple mezclado de los dos materiales grasos y su interesterificación posterior, ya que ambos introducen modificaciones importantes en las propiedades de interés.

Como consecuencia del mezclado de la grasa vacuna (BT) con los aceites utilizados (aceite de girasol de alto oleico, HOSFO y aceite de salvado de arroz, RBO) se observó la dilución de los SFA de la misma, a la vez que al aumentar la cantidad de aceite utilizado en la mezcla la misma se enriqueció en ácidos grasos insaturados, mejorando sus propiedades nutricionales en relación a la BT original.

También por efecto del mezclado de la BT con el HOSFO se constató el aumento de la proporción de los TAG del tipo UUU, proveniente del aceite y una disminución en la cantidad de los otros tipos de TAG. En el caso de las mezclas conteniendo RBO también se incrementó la proporción de los TAG del tipo UUU, disminuyó la de los TAG tipo SSS y SSU, mientras que los tipo SUU no presentaron variaciones importantes, dado que tanto la BT como el RBO contienen TAG de este tipo en cantidad importante.

La interesterificación produjo cambios importantes en la composición de los TAG de las mezclas, indicando que el proceso ocurrió eficientemente. En el caso de los productos de las mezclas BT/HOSFO la proporción de los TAG del tipo SUU se incrementó, efecto que se acentuó con el aumento de la proporción de aceite en la mezcla inicial, mientras que el resto de los tipos de TAG disminuyeron luego del proceso. En el caso de las mezclas BT/RBO también se constató el aumento en la proporción de los TAG tipo SUU por efecto de la interesterificación, así como la disminución de la de los TAG del tipo SSS, efectos también más importantes al aumentar la proporción de aceite. Mientras que la proporción de los otros tipos de TAG mostraron aumento o disminución, dependiendo de la proporción de aceite en la mezcla.

Del estudio de la regiodistribución de los ácidos grasos en los productos se desprende que la enzima no presentó ninguna especificidad significativa, ya que los productos presentaron una composición muy próxima a la correspondiente a la randomizada. Esto se confirmó por la similitud en la población de TAG de estos productos con los obtenidos por interesterificación química (no específica) de las mismas mezclas.

En cuanto al efecto del mezclado sobre los perfiles térmicos obtenidos por DSC, se observó que la mezcla de la BT con cada aceite produjo modificaciones importantes en el rango plástico, el cual se amplió y se desplazó hacia temperaturas más bajas. También se observó la reducción en el punto de fusión conforme se incremento la proporción de aceite en las mezclas, lo que resulto coherente con el aumento en el grado de insaturación del material. La interesterificación produjo modificaciones

importantes en los perfiles de fusión, constatándose la reducción en el contenido de sólidos y la desaparición del pico exotérmico atribuido a una transición polimórfica en la BT y sus mezclas, sugiriendo una mayor tendencia a la cristalización β' en los productos. También los cambios en la composición de los TAG producidos por la interesterificación condujeron a que los rangos plásticos se desplazaron en todos los casos hacia valores de temperatura más bajos que las mezclas de partida, efecto que se acentuó con el incremento de la proporción de aceite en la mezcla inicial.

En cuanto al efecto del mezclado sobre las características de cristalización se observó que, si bien la incorporación de cualquiera de los aceites a la BT produjo que la cristalización generara cristales de menor tamaño que en caso de la BT pura, no se produjeron cambios importantes de morfología, en cambio los análisis por XRD mostraron que sí incrementó la tendencia a cristalizar bajo la forma polimórfica β . Luego del proceso de interesterificación tanto la grasa vacuna como las mezclas con ambos aceites produjeron cristales más homogéneos en forma y tamaño, apreciándose también una reducción de sus diámetros máximos. A diferencia de lo observado en las mezclas, la forma polimórfica predominante en los productos de interesterificación fue la β' , lo que resulta altamente beneficioso en el caso de grasas destinadas a la elaboración de alimentos.

Si bien el proceso de interesterificación enzimática repercutió negativamente sobre la estabilidad oxidativa de las mezclas de la grasa vacuna con ambos aceites, lo que también ha sido reportado por otros autores y atribuido a diferentes fenómenos (exposición a la temperatura de reacción, pérdida de antioxidantes, regiodistribución de los ácidos grasos), fue posible mediante la adición de ácido cítrico a 200 ppm corregir este parámetro y recuperar en gran parte la estabilidad oxidativa de los materiales de partida. En relación a este fenómeno fue llamativo comprobar que ninguno de los antioxidantes sintéticos de uso común en la industria alimentaria (BHA, BHT y TBHQ) resultaron efectivos cuando se los utilizó en las concentraciones permitidas por la reglamentación bromatológica vigente. Estos resultados sugieren que la pérdida de estabilidad por el proceso debe estar necesariamente vinculada a la presencia de trazas de iones metálicos en los productos.

En suma, el proceso estudiado generó nuevos materiales grasos cuya composición fue función de la proporción de cada materia prima en la mezcla. Si bien mediante la interesterificación no se modificó la composición en ácidos grasos de las mezclas iniciales, la misma produjo modificaciones en las composiciones en TAG que afectaron significativamente las propiedades fisicoquímicas de las mezclas. Todos estos cambios significaron un mejoramiento de los productos con respecto a las mezclas de la BT con cada aceite los que, obviamente, fueron aún más importantes si se los compara con la BT original.

El proceso además de muy eficiente resulta muy versátil, ya que la selección de la proporción entre los componentes de la mezcla de partida permitió obtener productos con propiedades fisicoquímicas diversas, lo que permitiría la aplicación de los mismos

a diferentes usos en el área de las margarinas y los shortenings, según dicha proporción.

La introducción de metodologías novedosas en nuestro medio aplicadas al estudio de las propiedades de las grasas y los aceites comestibles (como los métodos XRD y PLM) resultan herramientas muy valiosas para el diseño de fases grasas con bajo contenido de *trans*, atractivas para la industria alimentaria y alternativas para la sustitución de productos tradicionales ricos en *trans*.

ANEXOS

A.1.- Tiempo de incubación 2

A.2.- Publicaciones..... 4

 A.2.1.- Trabajos presentados en congresos 4

 A.2.2.- Trabajos publicados en revistas..... 5

A.3.- Becas obtenidas 6

A.1.- Tiempo de incubación

Con los materiales grasos y el catalizador seleccionados se realizó un seguimiento del proceso de interesterificación para determinar el tiempo de incubación más conveniente para el trabajo.

Con este fin, se incubaron mezclas BT/HOSFO conteniendo 30, 40 y 50 % de aceite y mezclas BT/RBO conteniendo 20, 30, 40 y 50 % de aceite. Las incubaciones se prolongaron durante 24 h y periódicamente se tomaron muestras de cada mezcla, las que se destinaron al análisis de su composición en TAG como se describió en 2.2.4.

La variación de la composición en TAG se tomó como indicador del grado de avance de la reacción. En particular se eligieron los porcentajes de dos TAG específicos para las mezclas con cada aceite (TAG_1 y TAG_2), ambos presentes en cantidad significativa en cada mezcla y siendo el primero uno cuya concentración se incrementara gradualmente durante el proceso y el segundo uno cuya concentración disminuyera progresivamente. Luego, como parámetro indicador del grado de avance se determinó el cociente entre los porcentajes de ambos TAG $(\% \text{TAG}_1)/(\% \text{TAG}_2)$. Para el caso de las mezclas BT/HOSFO se escogió al POO como TAG_1 , mientras que para las mezclas BT/RBO se encontró más conveniente la utilización del PPO como TAG_1 , siendo la trioleína (OOO) el TAG_2 en ambos casos.

En la **Figura A.1**, se muestran las variaciones del cociente de TAG de las distintas mezclas BT/HOSFO. En un primer tramo de las curvas se observa un aumento sostenido de la relación, lo que indica la formación de POO sumado al consumo de OOO. Luego de un tiempo de aproximadamente 4,5 horas se observa un estancamiento de las mismas, lo que estaría indicando una igualación en las velocidades de consumo de OOO y formación de POO. Se observa entonces una meseta en las curvas que se prolonga hasta el final de las mismas (24 horas).

Como se muestra en la **Figura A.2**, el comportamiento para este aceite es similar al anterior. Se observa un aumento en la relación al comienzo que llega a una meseta luego de las 4,5 horas aprox.

Dados los aumentos observados en las curvas de ambos aceites, lo adecuado es trabajar con tiempos de incubación mayores a 4,5 horas para lograr una Interesterificación completa. Teniendo en cuenta trabajos anteriores y considerando los datos obtenidos se decidió realizar las incubaciones por períodos de 24 horas. De esta forma es posible asegurar que el proceso será completo.

En suma, para el proceso de interesterificación se utilizaron las mezclas de BT con HOSFO y con RBO respectivamente. Las mismas fueron de 0 a 50 % (m/m) de aceite en BT. Se usó un 10 % (m/m) de enzima inmovilizada Lypozime TL IM (*Thermomices lanuginosa*).

Las incubaciones se realizaron en un agitador orbital a 60 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm por un período de 24 horas. Los productos obtenidos se separaron por decantación de la enzima y se preservaron para su posterior análisis.

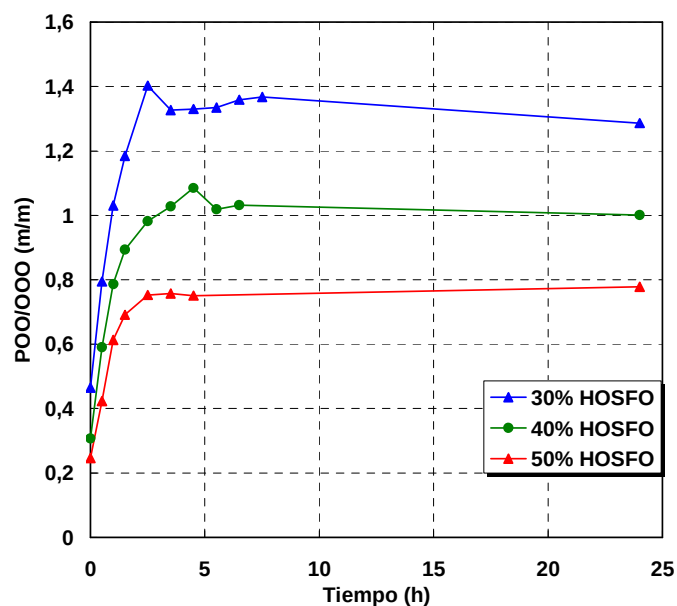


Figura A.1.- Variación de la relación másica POO/OOO durante el avance de la interesterificación de mezclas BT/HOSFO en distintas proporciones.

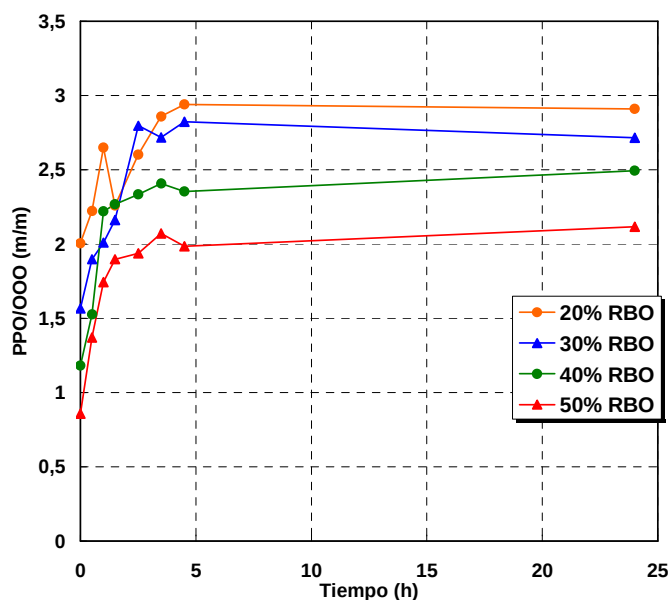


Figura A.2.- Variación de la relación másica PPO/OOO durante el avance de la interesterificación de mezclas BT/RBO en distintas proporciones.

A.2.- Publicaciones

A.2.1.- Trabajos presentados en congresos

2012 *“Interesterificación enzimática de grasa vacuna con aceite de salvado de arroz”* Nadia Segura, Leopoldo Suescun, Roberta Claro da Silva, Fabiana A Schäfer de M. Soares, Luiz Antonio Gioielli, Iván Jachmanián. (Presentación oral por la Ing. Alim Nadia Segura). En 1er Congreso Iberoamericano de Ingenieros Alimentarios, Montevideo, Uruguay.

“Efecto en la estabilidad oxidativa de la interesterificación enzimática de mezclas de grasa vacuna con aceites vegetales” Nadia Segura, Iván Jachmanián. (Póster). En 1er Congreso Iberoamericano de Ingenieros Alimentarios, Montevideo, Uruguay.

2011 *“Efecto en la estabilidad oxidativa de la interesterificación enzimática de mezclas de grasa vacuna con aceites vegetales”* Nadia Segura, Iván Jachmanián. (Presentación oral por la Ing. Alim Nadia Segura) En Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, Montevideo, Uruguay.

“Grasas con bajo contenido de trans a partir de mezclas sebo vacuno/aceites vegetales interesterificadas mediante catálisis enzimática” Nadia Segura, Leopoldo Suescun, Roberta Claro da Silva, Fabiana A Schäfer de M. Soares, Luiz Antonio Gioielli, Iván Jachmanián. (Póster). XIV Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Cartagena de Indias, Colombia.

“Efecto de la interesterificación sobre la estabilidad oxidativa de mezclas de sebo vacuno con aceites vegetales” Nadia Segura, Iván Jachmanián. (Póster). XIV Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Cartagena de Indias, Colombia.

“Crystal Behavior of Beef Tallow Modified by Interesterification with Vegetable Oils” Nadia Segura, Leopoldo Suescun, Roberta Claro da Silva, Fabiana A. Schäfer de M. Soares, Luiz Antonio Gioielli, Iván Jachmanián. (Póster). 9th Euro Fed Lipid Congress, Oil, Fats and Lipids: For a Health and Sustainable World, Rotterdam, Holanda.

"Lipase-Catalyzed Interesterification of Beef Tallow with High Oleic Sunflower Oil and Rice Bran Oil". Nadia Segura, María José Pardo, Iván Jachmanián. (Presentación oral por Dr. I. Jachmanián). 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, Cincinnati, EUA.

2010 *"La biocatálisis aplicada al diseño de grasas comestibles: interesterificación de grasa vacuna con aceite de girasol de alto oleico"* Nadia Segura, Iván Jachmanián. (Póster). IV Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, Montevideo, Uruguay.

"Interesterificación enzimática de sebo vacuno con aceite de salvado de arroz" Nadia Segura, María José Pardo, Iván Jachmanián. (Póster). V Simposio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, Campinas, Brasil.

2009 *"Interesterificación enzimática de mezclas de grasa vacuna/aceite de girasol de alto oleico."* Nadia Segura, Maria A. Grompone, Iván Jachmanián. (Presentación oral por la Ing. Alim Nadia Segura). En XIII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Rosario, Santa Fe, Argentina.

A.2.2.- Trabajos publicados en revistas

2011 *"Valorization of Beef Tallow by Lipase-Catalyzed Interesterification with High Oleic Sunflower Oil"*. Nadia Segura, Roberta Claro da Silva, Fabiana A. Schäfer de M. Soares, Luiz Antonio Gioielli, Iván Jachmanián. J. Am. Oil Chem. Soc 88 (12), 1945-1954.

2010 *"Valorización del sebo vacuno mediante su interesterificación enzimática con aceite de girasol de alto oleico"*. Nadia Segura, María A. Grompone, Iván Jachmanián. Aceites y Grasas 81 (4), 624-627.

A.3.- Becas obtenidas

- nov'08 a oct'10 Beca de apoyo a posgrados para docentes, Comisión Académica de Posgrado, UDELAR.
- nov'09 Beca para la realización de pasantía en el exterior, Comisión Sectorial de Investigación Científica, UDELAR.
- mar'11 a ene'13 Beca a Posgrados Nacionales, Agencia Nacional de Investigación e Innovación.