

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Desenvolvimento de *spread* de avelã e
chocolate contendo probióticos e triglicerídeos
dietéticos**

Izabela de Souza Correia Cozentino

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Daniela
Cardoso Umbelino Cavallini

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela
Veloso de Paula

Araraquara
2020

Desenvolvimento de *spread* de avelã e chocolate contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos

Izabela de Souza Correia Cozentino

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara
2020

M882d

Cozentino, Izabela de Souza Correia.

Desenvolvimento de *spread* de avelã e chocolate contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos / Izabela de Souza Correia Cozentino. – Araraquara: [S.n.], 2020.

145 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.

1. Triglicerídeos modificados. 2. Reator de leito fixo. 3. Óleo de semente de uva. 4. Probiótico. 5. *Spread* de chocolate. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de spread de chocolate e avelã contendo triglicerídeos dietéticos e probióticos

AUTORA: IZABELA DE SOUZA CORREIA COZENTINO

ORIENTADORA: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP-
Araraquara

Profa. Dra. GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Prof. Dra. CAROLINE MARIA CALLIARI (Participação Virtual)
Departamento Acadêmico de Alimentos / Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. RENATA TIEKO NASSU (Participação Virtual)
Embrapa Pecuária Sudeste / EMBRAPA São Carlos, SP

Araraquara, 27 de outubro de 2020

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

A Prof^a. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pelo apoio, paciência e orientação durante todo o projeto, pela amizade e por todo conhecimento compartilhado durante todos esses anos.

A Prof^a. Dra. Ariela Veloso de Paula, pela coorientação, por todos os ensinamentos, auxílio, paciência, amizade e apoio científico durante a realização dos experimentos.

Ao Pesquisador Dr. Valdecir Luccas e a técnica Maria Angélica Razzé pelo suporte na produção e disponibilização da planta piloto do Cereal Chocotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL/Campinas.

Ao Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri e aos técnicos Ana Lúcia Martiniano Nasser e Adriana Moura pelo auxílio nas análises no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. À aluna Marina de Freitas Rodrigues pela colaboração com a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro e ao aluno Jovan Duran Alonso por toda ajuda no Laboratório de Análises Térmicas do IQ – Unesp.

Agradecimentos pessoais

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as fases da minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório Virgínia, Juliana, Ana, Giovana, Vinícius, Letícia, Camila, pelo companheirismo e ajuda no dia a dia de trabalho.

Aos técnicos, do Laboratório de Probióticos, Roseli, Josiane e Adriano, pelos ensinamentos, pela ajuda e por todas as contribuições durante estes anos de trabalho e também pelos conselhos profissionais e pessoais.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A modificação controlada de triglicerídeos (TAGs) pode promover uma melhor absorção de ácidos graxos, atuar no controle da obesidade, má absorção de gorduras e interferir na composição da microbiota intestinal. A ingestão diária de microrganismos probióticos pode resultar em modulação positiva da microbiota intestinal e do sistema imunológico, auxiliando na redução de eventuais doenças. Entretanto, a inclusão de TAGs modificados pode alterar as propriedades físico-químicas e reológicas de alimentos e precisa ser investigada. **Objetivo:** este estudo teve o objetivo de desenvolver um *spread* à base de avelã e chocolate potencialmente funcional contendo a cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 e triglicerídeos modificados do tipo MLM (ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2). **Métodos:** Inicialmente, foi realizada a síntese enzimática dos triglicerídeos dietéticos do tipo MLM por acidólise de óleo de semente de uva com ácido graxo de cadeia média (C:10:0), em um reator de leito fixo operado em modo contínuo durante 120h a 45°C. A reação foi catalisada pela lipase comercialmente imobilizada Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*). A caracterização da matéria-prima foi realizada através dos índices de acidez, peróxido e composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa e a caracterização hidrodinâmica do reator foi realizada pela distribuição de tempo-residência (DTR) dos reagentes. Posteriormente, os TAGs foram utilizados na elaboração de *spreads* probióticos, em substituição parcial da gordura vegetal convencional nos níveis de 25g/100g, 50g/100g e 75g/100g. Outras duas formulações foram utilizadas como controle (sem adição de TAGs modificados e sem probióticos) e (sem adição de TAGs modificados e com probióticos). A qualidade dos *spreads* foi avaliada através de análises físico-químicas (composição proximal, atividade de água (A_w), cor, reologia e composição de ácidos graxos), propriedades térmicas e análises microbiológicas (segurança microbiológica e viabilidade da cepa probiótica, durante o período de armazenamento de 180 dias, à temperatura de 20°C). **Resultados:** O perfil médio da concentração de ácidos graxos do óleo de semente de uva mostrou quantidades abundantes dos ácidos graxos mono e poliinsaturados, com maior porcentagem do ácido linoléico (C18:2; 49,44±0,27%). A DTR indicou uma boa qualidade do empacotamento do leito. O progresso da reação foi monitorado pela composição de TAGs e o grau de incorporação (GI) do ácido cáprico alcançou 39,91±2,77% no estado estacionário (a partir de 48h) e um valor máximo de 43,00±5,87% em 54 horas de reação. Após 180 dias de armazenamento à 20°C, a cepa probiótica apresentou viabilidade superior a 8 log UFC/g em todas as formulações avaliadas, evidenciando a compatibilidade dos ingredientes utilizados. Os *spreads* apresentaram-se termicamente estáveis, com teores de proteínas, lipídeos e carboidratos próximos aos verificados para produtos comerciais, sem diferirem significativamente entre si e A_w abaixo de 0,5. Os resultados indicaram que a diminuição da proporção de gordura teve um efeito significativo nas propriedades reológicas dos *spreads* investigados e a

adição de 75 g/100g de TAG modificado em substituição à gordura interferiu na espalhabilidade do produto. Como esperado, a adição de TAG do tipo MLM resultou em aumento no teor de ácido graxo de cadeia média, especificamente de ácido cáprico, e de ácidos graxos insaturados. **Conclusão:** Foi possível obter *spread* à base de avelã e chocolate potencialmente funcional contendo probióticos e TAGs modificados dentro das normas microbiológicas, físico-químicas e com melhor qualidade nutricional. Os resultados indicam que a substituição de gordura por triglicerídeos modificados confere o diferencial de qualidade ao produto, pois tais lipídeos apresentam potencial para promover benefícios à saúde sem modificar a qualidade do produto.

Palavras-chave: Triglicerídeos modificados; Reator de leite fixo; Óleo de semente de uva; Probiótico; *Spread* de chocolate.

Abstract

Controlled modification of triglycerides (TAGs) can promote better fatty acid absorption, act in the control of obesity, fat malabsorption and can interfere in the composition of the intestinal microbiota. Daily ingestion of probiotic microorganisms can results in positive modulation of the intestinal microbiota and the immune system, helping to reduce eventual diseases. However, the inclusion of modified TAGs can alter the physical, chemical and rheological properties of foods and needs to be investigated. **Objective:** this study aimed to develop a potentially functional hazelnut and chocolate based spread containing the probiotic strain *Enterococcus faecium* CRL 183 and modified MLM triglycerides (medium-chain fatty acids at positions *sn*-1,3 and long-chain fatty acids at position *sn*-2). **Methods:** Initially, enzymatic synthesis of MLM-type dietary triglycerides was conducted by acidolysis of grape seed oil with medium-chain fatty acid (C:10:0) in a continuous packed bed reactor for 120h at 45°C. The reaction was catalyzed by the commercially immobilized lipase Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*). The characterization of the raw material was conducted through the acidity, peroxide and fatty acid composition by gas chromatography. The hydrodynamic characterization of the reactor was conducted by the distribution of time-residence (DTR) of the reagents. Subsequently, TAGs were used in the preparation of probiotic spreads, in partial replacement of conventional vegetable fat at the levels of 25g / 100g, 50g / 100g and 75g / 100g. Two other formulations were used as controls: without the addition of modified TAGs and probiotics; and without the addition of modified TAGs and with probiotics. The quality of the spreads was assessed through physical-chemical analyzes (proximal composition, water activity (A_w), color, rheology and fatty acid composition), thermal properties and microbiological analyzes (microbiological safety and viability of the probiotic strain, during the 180 day storage period, at a temperature of 20°C). **Results:** The average fatty acid concentration profile of grape seed oil showed abundant amounts of mono and polyunsaturated fatty acids, with a higher percentage of linoleic acid (C18:2; 49.44±0.27%). The DTR indicated a good quality of bed packing. The reaction progress was monitored by the composition of TAGs and the degree of incorporation (ID) of capric acid at the steady state (after 48 h of reaction) achieved a value of 39.91±2.77% and a maximum value of 43.00±5.87% in 54 hours of reaction. After 180 days of storage at 20°C, the probiotic strain showed viability greater than 8 log CFU/g in all the formulations evaluated, showing the compatibility of the ingredients used. The spreads were thermally stable, with levels of proteins, lipids and carbohydrates close to those verified for commercial products, without differing significantly between themselves and with A_w below 0.5. Results indicated that the decrease in the proportion of fat has a significant effect on the rheological properties of the investigated spreads and the addition of 75 g/ 100g of modified TAG to replace the fat interfered with the spreadability of the product. As expected, the addition of MLM-type TAG resulted in an increase in the content of medium chain fatty acid, specifically capric acid, and unsaturated fatty acids. **Conclusion:** This study showed the possibility to obtain a spread based on hazelnut and potentially functional

chocolate containing probiotics and modified TAGs within microbiological, physical-chemical standards and with better nutritional quality. Results indicate that the substitution of fat for modified triglycerides gives the product a quality differential, as these lipids have the potential to promote health benefits without changing the quality of the product.

Keywords: Modified triglycerides; Packed bed reactor; Grape seed oil; Probiotic; Chocolate spread.

SUMÁRIO

Introdução	11
Capítulo 1.....	26
Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (<i>Vitis vinifera</i> L.) oil in associated packed bed reactors.....	27
Abstract.....	27
Introduction	29
Material and methods.....	31
Results and Discussion.....	36
Conclusions.....	42
References.....	43
Capítulo 2.....	61
Desenvolvimento de <i>spread</i> de chocolate potencialmente funcional contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos	61
Resumo.....	62
Introdução	64
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão.....	73
Conclusão	82
Referências.....	83
Considerações finais.....	106
Referências.....	107
Apêndices	128

Introdução

O chocolate é um dos alimentos mais populares e amplamente consumidos no mundo por todas as gerações, por criar uma série de estímulos que ativam os centros de prazer no cérebro humano (1,2). Apesar de possuir alto conteúdo calórico, principalmente formado pelas gorduras e açúcares, apresenta em sua composição substâncias antioxidantes como os polifenóis, em especial os flavonóides (epicatequinas, catequinas e procianidinas) e alguns minerais (potássio, fósforo, cobre, ferro, zinco e magnésio) (3).

Os *spreads* à base de cacau, são produtos nos quais o cacau é misturado com outros ingredientes geralmente à base de gordura sólida (gorduras hidrogenadas ou com altos teores de ácidos graxos saturados) para preparar uma pasta espalhável muito utilizada por profissionais da confeitaria em recheios e coberturas de bolos ou até mesmo em pães e torradas, podendo ser adicionados de pastas de nozes, macadâmia, castanha de caju ou avelã (4–6). A legislação brasileira define “Massa (ou pasta ou liquor) de cacau como o produto obtido das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) por processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos” (7).

Os *spreads* de gorduras possuem propriedades de emulsões plásticas ou fluídas compostas principalmente de água, óleos e gorduras com a capacidade de ser espalhável à temperatura ambiente (4,8). No entanto, como a estrutura dos *spreads* está fortemente relacionada ao desempenho

da concentração lipídica, o grande desafio tecnológico está em desenvolver tais produtos com baixos teores de gorduras saturadas e hidrogenadas que mantenham as mesmas características de sabor, textura e espalhabilidade que os produtos originais (1,4,5,9).

As gorduras são componentes importantes de uma grande variedade de alimentos e seu consumo excessivo na dieta têm sido associado ao surgimento de doenças crônicas, tais como: obesidade, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (10). Entretanto, tem sido verificado que o consumo de determinados óleos e gorduras causa efeito positivo à saúde, por conterem além de ácidos graxos insaturados, ácidos graxos essenciais importantes na redução de biomarcadores lipídicos (11–13), serem associados a menor ganho de peso devido à diminuição da deposição de gordura e aumento da saciedade (12,14,15), e diminuição de citocinas inflamatórias (16). Uma forma de melhorar o perfil nutricional e o desempenho de alimentos inclui a busca por novos processos de produção, que sejam capazes de conferir características específicas ao produto final. Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos no metabolismo, há crescente interesse em utilizar óleos e gorduras modificados, na redução do risco de doenças e promoção da saúde (17).

Neste contexto, a modificação de óleos vegetais visando à síntese de lipídeos estruturados, especificamente os triglicerídeos dietéticos, tem sido bastante estudada, pois permite a substituição de ácidos graxos na molécula do TAG (17–22), e, conseqüentemente, possuindo potencial para auxiliar no controle da obesidade, insuficiência pancreática, má absorção de gorduras e

outras doenças metabólicas, constituindo um meio efetivo de fornecimento de ácidos graxos desejados para fins terapêuticos ou nutricionais (21). O TAG modificado possui novas propriedades sensoriais, físicas (ponto de fusão, viscosidade, consistência), químicas (estabilidade oxidativa), bem como propriedades nutricionais (presença ou ausência de ácidos graxos saturados ou insaturados específicos) (23).

Estes são atualmente muito utilizados em aplicações médicas e na indústria alimentar em produtos de confeitaria e chocolates (24–26). Alguns exemplos de lipídeos estruturados, obtidos por modificação enzimática de óleos e gorduras, incluem os substitutos da manteiga de cacau, os substitutos da gordura de leite humano, os triglicerídeos ricos em ácidos graxos essenciais (ômega-3 e ômega-6) e os triglicerídeos de baixa caloria, chamados dietéticos (24).

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) referem-se a triacilgliceróis mistos de ácidos graxos saturados com um comprimento de cadeia de 6-12 átomos de carbono, isto é, ácido hexanóico (C6:0, ácido capróico), ácido octanóico (C8:0, ácido caprílico), ácido decanóico (C10:0, ácido cáprico) e ácido dodecanóico (C12:00, ácido láurico) (27,28). Tais TAGs são sintetizados com o objetivo de aplicações nutricionais clínicas como nos casos de insuficiência pancreática, má absorção de gordura, transporte deficiente de quilomícron via sistema linfático, hipertrigliceridemia grave, nutrição parenteral total e em fórmulas para prematuros (29).

Os triglicerídeos podem variar de acordo com sua composição em ácidos graxos saturados e insaturados; com comprimento da cadeia de ácidos

graxos e na distribuição de diferentes ácidos graxos na molécula de TAG nas posições *sn*-1, *sn*-3 ou *sn*-2 (21,30). Esta posição dos ácidos graxos nas moléculas do TAG (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) podem ter um impacto significativo no metabolismo humano (31). Os tipos mais comuns de TAG dietéticos são: (i) SLS (um TAG com ácidos graxos de cadeia curta, nas posições *sn*- 1 e *sn*-3, e de cadeia longa, na posição interna); (ii) MLM (um TAG com ácidos graxos de cadeia média, nas posições *sn*- 1 e *sn*- 3, e de cadeia longa, na posição interna); e (iii) MMM (um TAG com ácidos graxos de cadeia média, em todas as posições da cadeia de TAG) (Figura 1) (21,30,31).

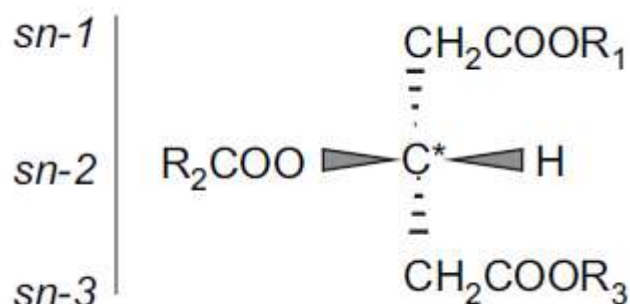


Figura 1. Representação da distribuição de ácido graxo (R1, R2, R3) na estrutura de uma molécula de um TAG. Fonte: Bourlieu et al. (32).

A absorção dos ácidos graxos de cadeia média é mais rápida e mais eficiente do que a dos ácidos graxos de cadeia longa, devido o seu tamanho reduzido e maior solubilidade (26,27). Ademais, os ácidos graxos de cadeia média atravessam facilmente a membrana mitocondrial e são transportados diretamente para o fígado, através da circulação portal, proporcionando uma

rápida oxidação (28,33). Estudos em modelo animal e humano mostram que os TCMs resultam em menor ganho de peso, associado com uma diminuição da deposição de gordura, aumento da taxa metabólica de repouso e do gasto energético pós-prandial, pois tais substâncias ajudam a reduzir a ingestão de alimentos por aumentar a saciedade, alterando assim o consumo de energia (14,34).

Os TCMs também são associados à modulação do perfil lipídico e consequente redução do risco de desenvolvimento de aterosclerose (35). Sengupta e Ghosh (36) utilizaram um óleo de mostarda enriquecido com TCM e obtiveram como resultado a diminuição dos níveis de colesterol no plasma. No fígado, os ácidos graxos de cadeia média contido no TCM são prontamente β -oxidados para formar acetil-CoA, que é a molécula de partida para a biossíntese do colesterol. O número de moléculas de acetil-CoA produzidas pelos ácidos graxos de cadeia média é muito menor em comparação com o ácido graxo de cadeia longa levando à sequência, uma diminuição da síntese do colesterol (37).

A mucosa intestinal impede a invasão de microrganismos patogênicos, fortalecendo a barreira intestinal através da secreção de proteínas antimicrobianas, muco e imunoglobulina A (IgA), que dificultam a multiplicação excessiva de bactérias indesejáveis no trato gastrointestinal (38,39). O sistema imunológico associado à mucosa intestinal, tem se desenvolvido de maneira eficiente para controlar a população destes microrganismos, protegendo o hospedeiro contra invasões microbianas e reações indesejadas contra antígenos alimentares (39,40). Sendo assim, a

composição da alimentação é considerada um dos principais fatores que contribuem para a diversidade da microbiota intestinal no homem, podendo afetar a resposta imunológica local (40).

Os TCMs também têm sido associados a melhora da saúde do intestino sob condições inflamatórias, modulando o número de linfócitos intra-epiteliais e a expressão de citocinas no intestino delgado (19). Estudo conduzido por Kono et al. (41) concluiu que a ingestão regular de TCM protege o intestino de ratos induzidos à colite por meio da modulação da resposta imune a lipopolissacarídeos e o aumento da expressão de IgA.

Os lipídeos modificados podem ser produzidos através de reações de ácidos graxos de cadeia média de gorduras vegetais ou animais. e os processos são conhecidos como interesterificação, alcoólise ou acidólise e têm sido utilizados em pequena e grande escala na produção dos TAGs (42–44).

A reação de acidólise é um processo reversível que envolve duas etapas de hidrólise e esterificação com uma nova ligação éster e liberação de um novo ácido graxo livre (Figura 2) (23,45). A acidólise enzimática de lipídeos estruturados, catalisada por lipases, apresenta diversas vantagens em relação aos métodos químicos como controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, separação e purificação dos produtos (43,45,46). Além disso, requer condições mais brandas de temperatura com menor consumo de energia, bem como pouca e/ou nenhuma formação de subprodutos (21,23,27,43,45,47–49). O controle das condições de reação como, carga enzimática, tempo e temperatura de reação e relação de

substrato, são extremamente importantes para minimizar a formação de produtos indesejáveis (45).

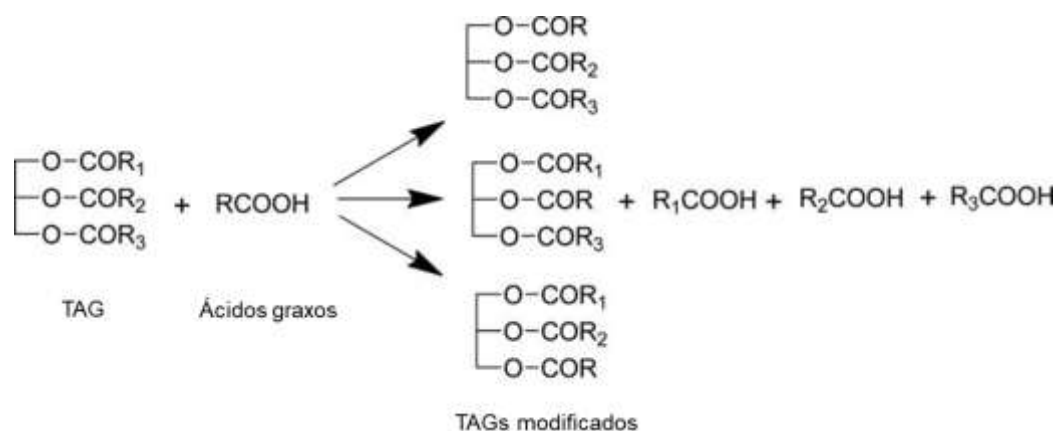


Figura 2. Esquema representativo de uma reação de acidólise. Fonte: Kadhum e Shamma (50).

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são biocatalisadores que hidrolisam total ou parcialmente a molécula do triacilglicerol podendo ser inespecíficas (atuam igualmente nos três ácidos graxos dos triacilgliceróis), ou regioespecíficas (vão atuar especificamente sobre os ácidos graxos em certas posições da molécula do glicerol) (46,51). As lipases *sn*-1,3 específicas são mais promissoras e constituem os biocatalisadores mais eficientes em sintetizar os TAGs devido à sua quimio e estereo-seletividade, versatilidade e elevada regioespecificidade em produzir produtos finais específicos (23,51,52). Um exemplo, é a Lipozyme RM IM, lipase microbiana imobilizada do fungo *Rhizomucor miehei*, amplamente utilizada nestas reações (45). Apesar do alto custo comercial, a utilização de lipases imobilizadas pode ser considerada viável devido à possibilidade de recuperação e reutilização e consequentemente redução do custo

operacional (43,46,51,53). As vantagens de se empregar um biocatalisador imobilizado tornam-se ainda mais evidentes quando há o desenvolvimento de processos em reatores operando em modo contínuo (54).

Com base nessa perspectiva, muita atenção tem sido direcionada para as diferentes configurações dos reatores, que oferecem melhores rendimentos em um menor intervalo de tempo e melhor controle do processo (49).

As configurações de reatores enzimáticos mais utilizados são: reatores de tanque agitado, reatores de coluna de leito fluidizado e reatores de coluna de leito fixo, que podem operar em modo batelada ou contínuo (Figura 3) (54). A seleção do tipo de reator mais apropriado nas reações enzimáticas depende de algumas condições do biocatalisador, da hidrodinâmica do sistema e da cinética das reações (51).

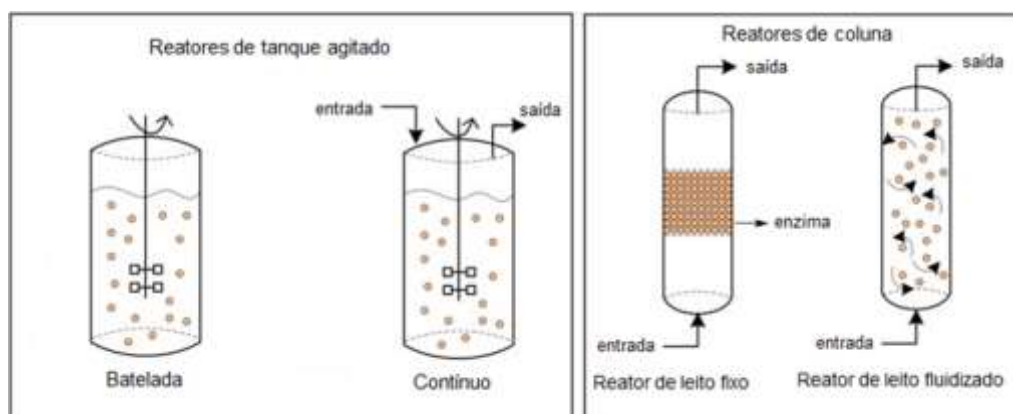


Figura 3. Representação das configurações dos principais tipos de reatores.

Fonte: Poppe et al. (54).

Os reatores de tanque agitado são os mais simples, de fácil manuseio, controle da reação e alto grau de dispersão do substrato. Nestes reatores quando operados em regime de batelada, o biocatalisador é colocado com o substrato sob agitação, e controle de tempo e temperatura. Para recuperar e separar o biocatalisador do produto normalmente é realizada a centrifugação, filtração ou decantação (54). Esse processo apresenta algumas desvantagens como baixo rendimento para o uso em escala industrial, baixa taxa de conversão do substrato em produto e possível estresse de cisalhamento do suporte devido à agitação mecânica durante o processo (46,54). Para minimizar estes problemas, reatores de tanque agitado operando de forma contínua têm sido utilizados devido à possibilidade de separação do biocatalisador através de membranas na saída do reator (54).

Nos reatores de leito fluidizado, o biocatalisador e o substrato da reação fluem através de um reator de coluna, determinados por um fluxo ascendente e pelo volume do reator (51,54). Uma das grandes vantagens é a possibilidade de se utilizar partículas menores sem interferir na pressão do meio, consequentemente evitando a formação de caminhos preferenciais (55). No entanto, o tempo de residência necessário para fluidizar o meio, mediado pela alta vazão do sistema, pode ocasionar menores rendimentos e dificuldades de aplicação em grande escala (54).

Dentre os reatores operados no modo contínuo, reatores de leito fixo são os mais utilizados para processos enzimáticos devido à aplicação de reações de grande escala, facilidade de operação, remoção contínua do

produto com menor estresse de cisalhamento do suporte, resultando em alta eficiência da reação (17,49,52,53,56,57). Nestes reatores, o biocatalisador é fixo dentro da coluna, enquanto o substrato da reação é bombeado por meio de um fluxo específico caracterizando o tempo de residência de acordo com o volume do reator (46,51,53,54). Os produtos podem ser recirculados para a mesma coluna ou coletados em recipientes próprios (46). Algumas desvantagens das reações de leito fixo incluem a facilidade de obstrução do leito e conseqüentemente, redução da eficiência catalítica e a formação de caminhos preferenciais (51,53).

Na grande maioria dos estudos, a síntese dos TAGs dietéticos do tipo MLM é realizada em reatores de tanque agitado operados em batelada, indicando a necessidade de estudos que visem à possibilidade de aplicação desses biocatalisadores em outra configuração de reator (10,21,23,58–61). Este fato destaca a importância de se explorar a capacidade de novos reatores operados no modo contínuo para aumentar a eficiência das reações de TAGs.

Além da configuração do biorreator utilizado para a produção dos TAGs, a escolha dos óleos vegetais é outro ponto importante a ser considerado nos processos enzimáticos. Os óleos vegetais extraídos das sementes de plantas são conhecidos por serem uma boa fonte nutricional, de importância industrial e farmacêutica (62). As propriedades dos óleos vegetais utilizados nas reações variam em função da região geográfica, variedade, condições de cultivo e disponibilidade das plantas (51).

As sementes de uva (*Vitis vinifera* L.), resíduo agrícola da indústria do vinho, são fontes de antioxidantes naturais, como vitamina E, polifenóis e flavonóides, importantes para a saúde humana e a sua utilização para a produção em TAGs agregaria valor econômico para a indústria do vinho (58,63–65). Nos últimos anos, as indústrias de alimentos buscaram por antioxidantes naturais de origem vegetal. Os extratos de semente de uva além da atividade antioxidante possuem também atividade antimicrobiana, capacidade de inibir a oxidação lipídica e prolongar a vida útil dos produtos (66,67).

O óleo de semente de uva contém alto teor de ácidos graxos insaturados, que representam mais de 89% da composição total do óleo, principalmente o ácido linoléico (58-78%) (68–71). A semente de uva tem despertado o interesse dos setores alimentício e farmacêutico, em função de seus potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, atuando na redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, colesterol (69,72,73).

A conscientização e interesse dos consumidores em relação a uma alimentação mais saudável têm impulsionado o desenvolvimento de alimentos funcionais que promovam benefícios à saúde e redução do risco de doenças (22). Neste contexto, os probióticos têm despertado o interesse do setor alimentício na promoção da saúde.

Uma das primeiras definições de probióticos foi proposta por Fuller (74). Segundo esse pesquisador, são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que agem no trato gastrointestinal, mantendo ou melhorando o equilíbrio da microbiota. Estes microrganismos precisam

ser administrados em uma quantidade adequada para conferir benefícios à saúde. Internacionalmente, probióticos são definidos como: “microrganismos vivos que, quando administrados em doses apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (75,76). Para que o microrganismo probiótico exerça seus efeitos sistêmicos, este deve sobreviver às diferentes etapas de processamento, às condições de armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo capaz de colonizar, mesmo que temporariamente o intestino (77,78).

Em 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) anunciou os novos requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, que deve ser demonstrada através de documentos técnicos ou de estudos científicos que assegurem o histórico de uso seguro, ausência de registros de eventos adversos, ausência de fatores de virulência e patogenicidade, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana, ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (79).

Inúmeros são os benefícios que os probióticos podem proporcionar à saúde, como: aumento da resistência contra patógenos, por efeitos antagônicos contra grupos específicos de organismos e competição por nutrientes (80,81); modulação do sistema imune e do perfil lipídico (74,78,82–85), redução do desenvolvimento de câncer e alívio dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais e de diarreias (86–90).

Considerando que os seus efeitos são cepa-dependentes, como já documentado em diferentes estudos (91), a seleção de cepas probióticas é um passo decisivo para que os efeitos benéficos à saúde sejam observados e deve atender às necessidades da população alvo do produto (78).

Enterococcus spp. é um gênero de bactérias Gram-positivas, composto por 16 espécies que se multiplicam e sobrevivem em condições adversas. Cepas específicas de *Enterococcus* spp. principalmente as pertencentes a espécie *Enterococcus faecium*, são consideradas probióticas por melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrointestinal e exercerem outros efeitos benéficos à saúde (82,92). Estudos anteriores realizados no grupo de pesquisa mostraram que a cepa *E. faecium* CRL 183 apresenta efeitos benéficos à saúde, comprovados em estudos *in vitro*, em animais e em humanos (82,93–98). Os resultados obtidos indicam que a cepa de *E. faecium* CRL 183 apresenta capacidade de modulação do perfil lipídico e da microbiota intestinal (82,93), redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (97) e mama (98) e melhora nos sintomas de doenças inflamatórias intestinais (86,96).

Os microrganismos probióticos podem ser incorporados em produtos lácteos como iogurtes, leites fermentados, sobremesas à base de leite e queijos e também em produtos não lácteos como cereais, néctar de frutas, salames, gomas de mascar e sucos (99).

A crescente demanda do mercado consumidor por novos produtos, que apresentem características sensoriais adequadas, maior vida útil e maior

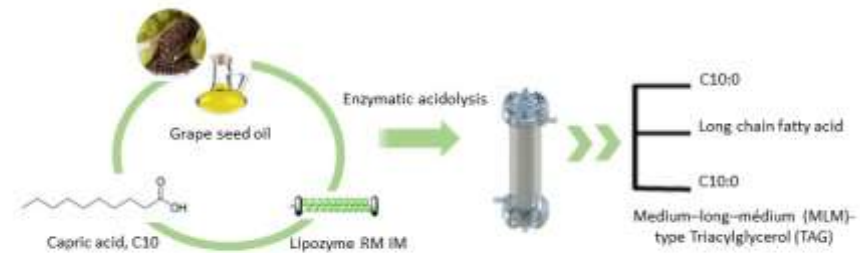
valor nutricional, justifica o investimento para diversificação de alimentos contendo cepas probióticas (100,101).

Os produtos à base de chocolate são considerados veículos adequados para probióticos pelo efeito protetor conferido pelo lipídeo, além de possuírem propriedades benéficas à saúde e características sensoriais que atraem o consumidor. Tais produtos também passaram por mudanças nos últimos anos, em resposta à busca do consumidor por produtos mais saudáveis, resultando em formulações com redução nos teores de açúcares e gordura (99).

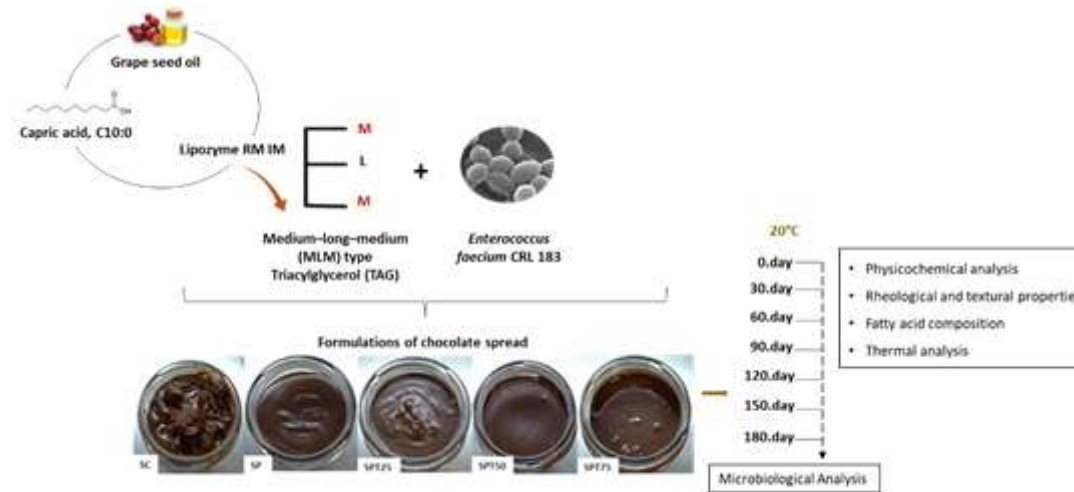
Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi obter um *spread* de chocolate e avelã potencialmente funcional contendo a cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 e triglicerídeos modificados do tipo MLM.

Graphical Abstract

Chapter 1.



Chapter 2.



Capítulo 1.

Síntese enzimática de lipídeos estruturados a partir de óleo de semente de uva (*Vitis vinífera* L.) em reatores de leito fixo associados

Artigo enviado para a publicação em setembro de 2020 para a Revista Biotechnology and Applied Biochemistry

Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil in associated packed bed reactors

**Izabela de Souza Correia Cozentino ^a, Marina de Freitas Rodrigues ^b,
Vitor Teixeira Mazziero ^b, Marcel Otávio Cerri ^b, Daniela Cardoso
Umbelino Cavallini ^{a,*}, Ariela Veloso de Paula ^{b,*}**

^aDepartment Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara, Sao Paulo, Brazil

^bDepartment of Engineering Bioprocesses and Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara, Sao Paulo, Brazil

* Corresponding author.

E-mail address: ariela.veloso@unesp.br

Abstract

Triacylglycerols (TAGs) can be modified to increase the absorption of fatty acids, prevent obesity, and treat fat malabsorption disorders and metabolic diseases. Medium–long–medium (MLM)-type TAGs, which contain medium-chain fatty acids in the *sn*-1 and *sn*-3 positions of the glycerol backbone and a long-chain fatty acid in the *sn*-2 position, show particularly interesting nutritional characteristics. This study aimed to synthesize MLM-type TAGs by enzymatic acidolysis of grape seed oil with medium-chain capric acid (C10:0) in associated packed bed reactors. The reaction was carried out during 120 h, at 45°C, using lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® RM IM). The residence time distribution of reagents in the reactor was quantified to evaluate the reactor behavior and to diagnose the existence of preferential paths, indicating a good quality of bed packaging. The reaction progress was monitored by analyzing TAG composition and the incorporation degree of

capric acid. At the steady state (after 48 h of reaction), the incorporation degree achieved a value of $39.91 \pm 2.77\%$. To enhance the capric acid incorporation, an acidolysis reaction in a packed bed reactor in series was performed. In literature, associated reactors were not employed for this synthesis, and this is an innovation for acidolysis research. The results showed a good operational stability of the biocatalyst, revealing values of half-life 209.64 h, 235.63 h of packed bed and packed bed reactor in series, respectively, and a deactivation coefficient 0.0061 h^{-1} . TAG production from grape oil can add value to this antioxidant-rich by-product of the wine industry.

Keywords: Structured lipids; Acidolysis; Associated packed bed reactor; Grape seed oil.

1. Introduction

Fats are important components of a variety of foods and should be part of a healthy diet. However, excessive fat intake is a risk factor for the development of chronic diseases, including obesity, diabetes, cancer, and cardiovascular diseases (1). Recent studies have shown that certain oils and fats have positive health effects since contain unsaturated fatty acids or essential fatty acids that may help reduce lipid biomarkers (2–6), prevent overweight, decrease fat deposition, increase satiety (4,6–8), and modulate the production of inflammatory cytokines (6). This increased knowledge about the health effects of fatty acids motivates the interest in using modified oils and fats for disease treatment and prevention (9).

Modification of vegetable oils by altering the positional distribution or composition of fatty acids in triacylglycerol (TAG) has been extensively studied (10–12) for therapeutic or nutritional purposes, such as the control of obesity, pancreatic insufficiency, fat malabsorption, and metabolic diseases (13). Medium–long–medium (MLM)-type TAGs show particularly interesting nutritional characteristics. These molecules contain medium-chain fatty acids of 8 to 12 carbon atoms in the *sn*-1 and *sn*-3 positions of the glycerol backbone and a long-chain fatty acid in the *sn*-2 position and the most used medium chain fatty acid are caprylic (C8:0) and capric acid (C10:0) (14,15). MLM-type TAGs can be produced by chemical or enzymatic methods (13,16,17).

Enzymatic acidolysis of structured lipids by lipases (EC 3.1.1.3) has several advantages over chemical methods, including little or no formation of undesirable by-products and the possibility of controlling the positional distribution of fatty acids in the final product by using selective and regiospecific enzymes (14,18–21). For this work, commercial lipase Lipozyme RM IM, from the fungus *Rhizomucor miehei*, was select as biocatalyst once are highly efficient for TAG synthesis due to their ability to produce specific end-products and higher activity toward medium-chain and long-chain fatty acids (13,16,22).

In the majority of published studies, synthesis of MLM-type TAGs is carried out in batch reactors (1,2,13,18,23–25). Batch operation has low yield for use on an industrial scale, low rate of conversion of the substrate into product and possible shear stress of the support due to mechanical agitation during the process (26,27).

Studies are needed on the synthesis of these structured lipids in other reactor configurations, which can offer greater selectivity, better yields in shorter times, and better process control (21). This fact highlights the importance of exploring the capacity of new continuous reactors to increase the efficiency of TAGs reactions.

Among continuous reactors, packed bed reactors are used for enzymatic processes due to large-scale application, ease of operation, and continuous production, resulting in high efficiency (9,21,22,28,29). It is a promising system for industrial processes and yields a product with nutritional and functional value. In addition, packed bed reactors allow easy separation of products and the reuse of immobilized biocatalysts, consequently lowering process costs (21,30).

The choice of vegetable oils is another important point to be considered for the quality of enzymatic processes. Vegetable oils extracted from plant seeds are known to be a good source of nutritional, industrial and pharmaceutical importance (31). Grape seeds are agricultural residues rich in antioxidants, such as vitamin E, polyphenols, and flavonoids. Their use for the production of TAGs is a value-adding strategy for the wine industry (2,32,33).

The food industry has recently turned its attention to antioxidants of plant origin. Grape seed extract, in addition to having antioxidant effects, shows antimicrobial activity, which enables it to inhibit lipid oxidation and prolong the shelf life of food products (34,35). Grape seed oil contains a high content of polyunsaturated long chain fatty acids at position *sn*-2 in TAGs, which represent more than 89% of the total oil composition, mainly linoleic acid (58-78%) (36–38).

In this context, the purpose of this study was to synthesize and characterize a MLM-type TAGs obtained by enzymatic acidolysis of grape seed oil with medium-chain capric acid (C10:0) in packed bed reactors, using Lipozyme[®] RM IM. Moreover, in literature, associated reactors were not employed for this synthesis, and this is an innovation and a differential for this paper.

2. Material and methods

2.1. Material

Grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil was obtained from Distriol (Sao Paulo, Brazil), and capric acid (C10:0; ≥98%) was acquired from Sigma–Aldrich (Sao Paulo, Brazil). Immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®] RM IM) was kindly provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

2.2. Methods

2.2.1. Characterization of grape seed oil

For the characterization of grape seed oil, acidity (Ca 5a-40), peroxide value (Cd 8b-90), and fatty acid composition (Ce 2-66) were determined according to standard methods of the American Oil Chemists' Society (39).

2.2.2. Determination of hydrolytic activity

The hydrolytic activity of immobilized lipase was determined by the titration method using an olive oil emulsion (40).

2.2.3. Hydrodynamic characterization of the packed bed reactor

Pulse tracer experiments were conducted to characterize the hydrodynamics of the reactor, manufactured in the Federal University of Sao Carlos (Sao Carlos, Brazil). The residence time distribution was determined experimentally by injecting a Verde Mix® dye solution (Sao Paulo, Brazil, purchased in a local market) into the reactor and measuring spectrophotometrically (650 nm, GENESYS 10S UV-Vis; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) the concentration of the tracer at the outlet as a function of time. The residence time distribution function, $E(t)$, was calculated using Eq. (1) (41):

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (1)$$

where: $C(t)$ is the tracer concentration at time (t) .

Based on the residence time distribution function, $E(t)$, the mean residence time (t_m) was calculated according to Eq. 2 (41):

$$t_m = \int_0^{\infty} t \times E(t)dt \quad (2)$$

The integration in equation (2) was calculated using the ORIGIN 8.0 software (Origin Lab Corporation, Washington, United States).

2.2.4. Acidolysis of grape seed oil in packed bed reactors

MLM-type TAGs were synthesized by Lipozyme RM IM-catalyzed acidolysis of grape seed oil with capric acid at a ratio of 1:3 in a packed bed column reactor (18.00 cm height and 2.00 cm diameter), corresponding to a space time of 6 h, as calculated by Eq. 3 (Fig. 1). The reactor was packed with about 16 g of catalyst, and substrates were pumped at a flow rate of 6 mL/h; the reactor was operated in continuous mode. A water bath was connected to the feed recirculation system to maintain the reaction mixture at

45 °C (Fig. 2). In previous work Bassan et al. (23), has selected the optimal conditions (molar ratio and temperature) for this synthesis, in batch reactors, and this paper is a continuation of this research.

$$\tau = \frac{V_u}{Q_{vol}} \quad (3)$$

where Q_{vol} is the flow rate of the tracer, V_u is the working volume of the reactor, and τ is the space time.

Insert Fig. 1.

Insert Fig. 2.

Samples were collected at different times (24, 30, 48, 54, 72, 96, and 120 h) for fatty acid composition analysis and determination of the incorporation degree. Reactions were performed in duplicate, and results are presented as mean values $\pm$ standard deviation.

2.2.5. Acidolysis of grape seed oil in associated packed bed reactors

MLM-type TAGs were also synthesized by Lipozyme RM IM-catalyzed acidolysis of grape seed oil with capric acid at the same ratio of 1:3 in two associated packed bed column reactor (in series; 18.00 cm height and 2.00 cm diameter) operated in continuous mode, corresponding to a space time of 6 h, as calculated by Eq. 3 (Fig. 3). The reactor was packed with about 32 g of catalyst, and substrates were pumped at a flow rate of 6 mL/h. Samples were collected at 24, 30, 48, 54, 72, 96, and 120 h for fatty acid composition analysis and determination of the degree of capric acid incorporation. Reactions were performed in duplicate, and results are presented as mean values $\pm$ standard deviation.

Insert Fig. 3.

2.2.6. TAG purification

Reaction samples (1.5 g) were mixed with 30 mL of hexane and 10 mL of 0.8 mol/L hydroalcoholic potassium hydroxide (30% ethanol). The mixture was homogenized at 500 rpm and then left at rest until phase separation. The organic (upper) phase was collected, and the lower phase was subjected to further extraction with 10 mL of hexane. Organic phases were combined and rotary evaporated at 40 °C to yield purified TAGs, which were stored at 6 °C until analysis (17).

2.2.7. Methylation of purified TAGs and determination of fatty acid composition

Methylation was performed according to ISO 12966-2 (2017). Fatty acid composition was determined by gas chromatography according to the American Oil Chemists' Society method Ce2-66 (39).

2.2.8. Determination of the degree of capric acid incorporation

The incorporation degree (ID) was calculated according to the following equation (4) (43):

$$ID(\%) = \frac{MFA}{MT} \times 100 \quad (4)$$

where MFA is the number of moles of medium-chain fatty acids (C10:0) in TAG and MT is the total number of moles of fatty acids in TAG.

2.2.9. Oxidative stability

An accelerated oxidation test was performed to investigate the oxidative stability of crude grape seed oil and modified grape seed oil. Briefly, oxidation

induction times were measured using 3 g of sample (crude or modified oil) heated to 100 °C under a purified air flow of 10 L/h in a Rancimat 743 (Metrohm, Switzerland), according to ISO 6886 (2016). Assays were performed in triplicate, and results are presented as mean values $\pm$ standard deviation.

2.2.10. Operational Stability

Considering a first-order deactivation, the Eq. (5) was used to describe the decrease in ID after the steady state. The incorporation degree values, which were obtained from the start of the activity decrease, were linearised according to Eq. (6). Half-life of the biocatalyst ($t_{1/2}$) was estimated by Eq. (7).

$$\ln ID = \ln ID_0 - K_d * t \quad (5)$$

$$\ln\left(\frac{IDt}{ID_0}\right) = -K_d * t \quad (6)$$

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (7)$$

Where:

K_d = thermal deactivation kinetic constant (h^{-1});

ID_0 = maximum incorporation degree (%);

ID = incorporation degree (%);

$t_{1/2}$ = half-life of the biocatalyst (h).

2.2.11. Statistical Analysis

The data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test. All analyzes were performed using the Minitab Statistical Analysis program (Statistic Analysis Software, Pennsylvania, USA). Statistical significance was declared when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of grape seed oil

Acidity and peroxide value are important indicators of the quality and storage stability of vegetable oils (31,32). Crude grape seed oil had an acid index of 0.16 ± 0.02 mg KOH/g and a peroxide value of 0.60 ± 0.05 mEq O₂/kg, which is in agreement with international standards for oils and fats (45).

Table 1 shows the fatty acid profile of grape seed oil. High amounts of mono- and polyunsaturated fatty acids were observed, with the major fatty acids being linoleic acid (C18:2, $49.44 \pm 0.27\%$) and oleic acid (C18:1, $27.34 \pm 1.09\%$). Saturated fatty acids included palmitic acid (C16:0, $11.51 \pm 0.58\%$) and stearic acid (C18:0, $5.70 \pm 1.44\%$). The levels of saturated fatty acids, monounsaturated, and polyunsaturated were within the ranges established by the Codex Alimentarius (45). Similar fatty acid profiles were reported by other authors (2,23,46,47), demonstrating that the oil has high nutritional quality and is an important source of essential polyunsaturated fatty acids, especially linoleic and α -linolenic acids, which are important in the prevention of cardiovascular diseases, atherosclerosis, and diabetes (2,48,49). The intake of oleic acid is associated with the improvement of cardiovascular and bowel health and reduction of LDL cholesterol (1,11,48,49). The antioxidant properties of unsaturated fatty acids have been explored by the food and cosmetic industries; and are used as nutraceutical ingredients in product formulations (46).

Insert Table 1.

3.2. Hydrodynamic characterization of the packed bed reactor

The mean residence time of reagents in the reactor was determined experimentally by using Verde Mix[®] dye as a tracer. A calibration curve was

constructed by using the formula $\text{absorbance} = 415 \times C$, where C is the tracer concentration in the medium. The coefficient of determination ($R^2 = 0.988$) indicated good fit of the model to experimental data.

Results were used to construct the residence time distribution (E) curve as a function of time (t), according to Eq. (2) (Fig. 4).

Insert Fig. 4.

For a biocatalyst volume of 8.68 mL, a working volume of 41.55 mL, and a flow rate of 6 mL/h, the reaction time was 415.58 min, according to Eq. (3). The mean experimental residence time, as calculated by Eq. (2), is 335.17 min. The error between theoretical and experimental values was 19.35%. These results suggest the existence of preferred paths in the reactor. Nevertheless, the difference between theoretical and experimental values can be considered low, which allows us to assume that there were no significant deviations in the flow and that biocatalyst particles were well distributed (41).

Residence time distribution is very important to study fluid velocity patterns and determine the best flow rate for continuous reactors (27,41,50). A research conducted at the same Laboratory of the present study (50) evaluated the performance of a packed bed reactor in the enzymatic interesterification of milk fat with soybean oil for the production of structured lipids and observed a difference of less than 20% between theoretical and experimental results.

3.3. Acidolysis reaction for MLM-type TAG synthesis in packed bed reactor

The hydrolytic activity of Lipozyme RM IM was quantified and a value of 294.04 ± 29.67 U/g biocatalyst (moisture content of 3.85%) was obtained.

As expected, the fatty acid profile of the modified oil differed from that of crude grape seed oil. The percentages of palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids were lower in the modified oil as result of the incorporation of the

medium-chain fatty acid capric acid, which was not detected in crude grape seed oil (Table 2).

The quality of the modified oil was similar to that of crude oil and the peroxide value was 2.94 ± 0.01 mEq O₂/kg.

Insert Table 2

Enzymatic acidolysis has been widely used for the production of structured lipids. This reversible reaction catalyzed by *sn*-1,3-regiospecific lipases occurs in two steps, hydrolysis and esterification. Long-chain fatty acids at the *sn*-1,3 positions of TAG are released into the reaction medium, and new fatty acids (C8:0 or C10:0) are esterified to form acylglycerols with a new configuration (2,16). The maximum theoretical value of incorporation of fatty acids are 66.70% for a theoretical yield of 100% (2,51,52).

Acidolysis of grape seed oil was performed in a packed bed reactor at 45 °C for 120 h. Reaction progress was monitored by analyzing TAG composition at pre-determined intervals. Fig. 5 shows the incorporation of capric acid into grape seed oil. The steady state was reached in 48 h, when the ID was $39.91 \pm 2.77\%$. The ID showed a marked increase in the first 24 h of reaction, and the maximum ID was $43.00 \pm 5.87\%$ (at 54 h), showing excellent performance. After 54 h, the ID remained constant ($p > 0.05$).

Insert Fig. 5.

Similar results were obtained by Wang et al. (17), who synthesized MLM-type TAGs using canola oil and Lipozyme RM IM as catalyst. After 15 h of reaction, the incorporation of caprylic acid reached 45.40%. Abed et al. (13) used commercial immobilized lipases (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Novozym 435, and Lipozyme 435) for the acidolysis of microbial oil with caprylic acid. Under optimized conditions (substrate molar ratio of 1:3, enzyme loading of 6%, 60°C, and 6 h), Lipozyme RM IM resulted in the highest incorporation degree (20.14%) of caprylic acid.

A research was recently reported by our group, with the grape seed oil for producing MLM-type TAGs by acidolysis and Lipozyme RM IM in a batch reactor. In this case, an ID of 34.53% for capric acid was achieved (23).

It should be noted that in most of the studies mentioned here, reactions were carried out in batch reactors (13,17,23). The yield and quality of the product depend on numerous factors, such as reagent molar ratio, substrate composition, and operating parameters (17,28). The method proposed in this study for obtaining MLM-type TAGs in a packed bed reactor was highly efficient. It is a promising system for industrial processes and yields a product with nutritional and functional value. Absorption of medium-chain fatty acids in the human body is faster and more efficient than that of long-chain fatty acids because of their reduced size and greater solubility (13). In addition, medium-chain fatty acids can easily cross the mitochondrial membrane and be transported directly to the liver, leading to rapid oxidation (13,53).

After the acidolysis reaction, the hydrolytic activity of the biocatalyst was 182.24 ± 13.21 U/g with a moisture content of 5.71%. Thus, the catalytic power of the enzyme remained constant over the 5 days of reaction (120 h), as confirmed by the fact that ID remained constant until the end of the reaction (Fig. 5). This was expected, as the biocatalyst has been shown to have good stability and catalytic power in acidolysis reactions (13,23).

3.4. Acidolysis of grape seed oil in associated packed bed reactors

The use of two associated packed bed reactors allows the use of a larger amount of enzyme, making it possible to observe with these modifications, if an increase in the ID of the fatty acid of interest would occur.

As expected, the fatty acid profile of grape oil was significantly changed after the acidolysis reaction. Results showed that after the modification, the capric acid was incorporated into the grape oil and the main fatty acids found in the modified grape oil were linoleic acid, followed by oleic and palmitic acid (Table 3).

After acidolysis, the quality of the modified oil was similar to that of crude oil and within the specified standards FAO (45) with 4.14 ± 0.11 mEq O₂/kg of oil for the peroxide value.

As can be seen in Fig. 6, the incorporation of capric acid in grape seed oil increased significantly after 48 h from $3.23 \pm 0.07\%$ to $12.56 \pm 0.04\%$. The ID increased during the acidolysis reaction and the maximum incorporation degree of the capric acid ($27.08 \pm 0.03\%$) was found at the end of 96 h of reaction, after this period, there is a decrease in the effectiveness of the reaction ($24.16 \pm 0.01\%$).

Lipases are enzymes that catalyze TAG hydrolysis and esterification reactions (51,54). Thus, the results of the present study suggested that the product of the first reactor underwent hydrolysis by the biocatalyst contained in the second reactor, leading to an apparent decrease in the incorporation of capric acid.

The use of reactors in series has been studied mainly with the objective of optimize conversion yields (27). Wang et al. (55) evaluated continuous methanolysis using a packed bed reactor with immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* and compared it to a reaction using a battery of four-packed bed reactors in series. Compared with the single-packed bed reactor, the four-packed bed achieved a high conversion rate of biodiesel maintained over 88% for 192 h and, after 240 h of reaction, the conversion rate slightly dropped to approximately 75%, maintaining good stability.

Unlike these studies, the present research report that the maximum incorporation of capric acid was lower compared to the reaction in a single packed bed reactor in the same reaction time. However, this maximum incorporation is not low, since the content of capric acid varied between $24.16 \pm 0.01\%$ and $27.08 \pm 0.03\%$, obtaining a yield of 40% (Figure 6). The hydrolytic activity of the biocatalyst are presented in Table 4 and confirming the catalytic power of the enzyme during the 120 h of reaction.

Insert Table 3.

Insert Fig.6.

3.5. Oxidative stability of modified grape seed oil

Oxidative stability depends on the fatty acid composition and concentration of antioxidants in the oil as well as processing and storage conditions, especially temperature, light, and oxygen levels (49). The oxidative stability of oils is an important quality parameter that can determine the shelf life and taste of food products (32,47).

No differences were observed between the oxidation induction time of crude (23.45 ± 0.01 h) and modified (24.48 ± 0.01 h) grape seed oils, indicating good stability.

3.6. Operational stability of Lipozyme RM IM

Operational stabilities of the immobilized enzymes are an important parameter to be considered in the development of a continuous reaction, especially in industrial processes as it affects the total cost of the process and depends on several factors, such as linkage of the enzyme from the support, obstruction of the pores by sludge, support loss due to friction and obstruction of the packed bed (40,56).

The experimental results displayed in Fig. 5 and Fig. 6 were normalized following Eq. 6 and fitted to a deactivation model of first order. In this work, from the angular coefficient of the straight line ($y = -0.0061x + 4.1722$), the K_d value (0.0061 h^{-1}) and half-life of 8.73 days, using the linear regression model of the values calculated by the ID after the steady state after 72 hours of reaction (Table 4).

In associated packed bed reactors, the enzyme was even more stable in catalyzing the acidolysis reaction, providing from the angular coefficient of the straight line ($y = -0.0061x + 4.0446$), the K_d value (0.0061 h^{-1}) and half-life of 9.82 days from 122 hours of reaction (Table 4).

The lipase's hydrolytic activity showed a drop about 38% compared to an initial activity for the fixed bed reactor and a 36% drop for the associated fixed bed reactor. This partial inactivation of the biocatalyst may be due to a washing with hexane. This washed is not always enough to avoid the concentration of substrates or products that were not converted during the reaction cycles (57).

The values of the coefficient of determination (R^2) obtained from the reactions of packed bed and associated packed bed reactors ranged from 0.992 to 0.999, respectively, indicating a good fit of the model to the experimental data and confirming the good operational stability of the biocatalyst in the reactions acidolysis.

Insert Table 4.

4. Conclusions

MLM-type TAGs were successfully produced by enzymatic acidolysis of grape seed oil in packed bed reactors. Lipozyme RM IM remained stable with incorporation of capric acid throughout the reaction period (120 h) in packed bed reactors operated continuously. The residence time distribution of reagents in the reactor revealed good quality of experimental data. The high ID values (maximum of 43% in 54 h) showed that this system is promising for industrial applications. Nevertheless, the results obtained from the associated packed bed reactors indicate that it is not possible to increase the degree of incorporation of capric acid in grape oil because the effectiveness of the reaction decreases and reached a maximum degree of 27% in 96 h.

The quality of the modified oil in the reactions was evaluated and the results for peroxide were 2.94 ± 0.01 in the packed bed reaction and 4.14 ± 0.11 in associated packed bed reactors.

Results showed a good operational stability of the Lipozyme RM IM in the acidolysis of grape seed oil: the biocatalyst half-life was 209.64 h and 235.63 h of packed bed and associated packed bed reactors, respectively.

Overall, results obtained in this study pointed to an industrial application of MLM-type TAGs, produced from grape seed oil, since its incorporation can enhance the nutritional value besides to confer functional properties to foods.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (Process 2017/11482-7), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (process 446371/2014-9). The authors also thank Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark) for kindly donating the lipase.

5. References

- [1]. Zhao X, Wang X-D, Liu X, Zhu W, Mei Y, Li W, et al. Structured lipids enriched with unsaturated fatty acids produced by enzymatic acidolysis of silkworm pupae oil using oleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2015 Jun;117(6):879–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400438>

- [2]. Costa CM, Osório NM, Canet A, Rivera I, Sandoval G, Valero F, et al. Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2018 Jan;120(1):1700320. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201700320>

- [3]. Reena MB, Gowda LR, Lokesh BR. Enhanced Hypocholesterolemic Effects of Interesterified Oils Are Mediated by Upregulating LDL Receptor and Cholesterol 7- α - Hydroxylase Gene Expression in Rats. *J Nutr* [Internet].

2011 Jan 1;141(1):24–30. Available from:
<http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.127027>

[4]. Sengupta A, Roy S, Mukherjee S, Ghosh M. Production of Medium Chain Fatty Acid Rich Mustard Oil Using Packed Bed Bioreactor. *J Oleo Sci* [Internet]. 2015;64(2):153–9. Available from:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/64/2/64_ess14184/_article

[5]. Vafeiadou K, Weech M, Altowaijri H, Todd S, Yaqoob P, Jackson KG, et al. Replacement of saturated with unsaturated fats had no impact on vascular function but beneficial effects on lipid biomarkers, E-selectin, and blood pressure: results from the randomized, controlled Dietary Intervention and VAScular function (DIVAS) study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2015 Jul 1;102(1):40–8. Available from:
<https://academic.oup.com/ajcn/article/102/1/40/4564241>

[6]. Wolfer TL, Acevedo NC, Prusa KJ, Sebranek JG, Tarté R. Replacement of pork fat in frankfurter-type sausages by soybean oil oleogels structured with rice bran wax. *Meat Sci* [Internet]. 2018 Nov;145(July):352–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.012>

[7]. Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J* [Internet]. 2006 Nov;16(11):1374–82. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606001609>

[8]. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr*

[Internet]. 2009 Apr 1;89(4):1019–24. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/4/1019/4596700>

[9]. Xie W, Zhang C. Propylsulfonic and arenesulfonic functionalized SBA-15 silica as an efficient and reusable catalyst for the acidolysis of soybean oil with medium-chain fatty acids. Food Chem [Internet]. 2016 Nov;211:74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.025>

[10]. Cao Y, Qi S, Zhang Y, Wang X, Yang B, Wang Y. Synthesis of Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification of Triacetin with Camellia Oil Methyl Esters and Preliminary Evaluation of their Plasma Lipid-Lowering Effect in Mice. Molecules [Internet]. 2013 Mar 25;18(4):3733–44. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/3733>

[11]. Liu Y. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. J Anim Sci Biotechnol [Internet]. 2015 Dec 9;6(1):41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40104-015-0040-1>

[12]. Xie W, Hu P. Production of Structured Lipids Containing Medium-Chain Fatty Acids by Soybean Oil Acidolysis Using SBA-15-pr-NH₂-HPW Catalyst in a Heterogeneous Manner. Org Process Res Dev [Internet]. 2016 Mar 18;20(3):637–45. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.oprd.5b00381>

[13]. Abed SM, Wei W, Ali AH, Korma SA, Mousa AH, Hassan HM, et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei*

lipase. LWT [Internet]. 2018 Jul;93(March):306–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.057>

[14]. Chnadhapuram M, Sunkireddy YR. Preparation of palm olein enriched with medium chain fatty acids by lipase acidolysis. Food Chem [Internet]. 2012 May;132(1):216–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.059>

[15]. Hamam F, Budge SM. Structured and Specialty Lipids in Continuous Packed Column Reactors: Comparison of Production Using One and Two Enzyme Beds. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2010 Apr 1;87(4):385–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-009-1515-z>

[16]. Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. Food Chem [Internet]. 2011 Aug;127(3):993–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>

[17]. Wang Y, Xia L, Xu X, Xie L, Duan Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. Food Bioprod Process [Internet]. 2012 Oct;90(4):707–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.02.003>

[18]. Kavadia MR, Yadav MG, Odaneth AA, Lali AM. Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. Biotechnol Reports [Internet]. 2018 Jun;18:e00246. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00246>

- [19]. Lu J, Jin Q, Wang X, Wang X. Preparation of medium and long chain triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a solvent-free system. *Process Biochem* [Internet]. 2017 Mar;54:89–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.015>
- [20]. Moreira DKT, Santos PS, Gambero A, Macedo GA. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity. *Food Res Int* [Internet]. 2017 May;95:52–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.005>
- [21]. Salvi HM, Kamble MP, Yadav GD. Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase: Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 23;184(2):630–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-017-2572-7>
- [22]. Wang J, Liu X, Wang X, Dong T, Zhao X, Zhu D, et al. Selective synthesis of human milk fat-style structured triglycerides from microalgal oil in a microfluidic reactor packed with immobilized lipase. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016 Nov;220:132–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.023>
- [23]. Bassan N, Rodrigues RH, Monti R, Tecelão C, Ferreira-Dias S, Paula A V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. *LWT* [Internet]. 2019 Jan;99(May):600–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.013>

- [24]. Ifeduba EA, Akoh CC. Modification of Stearidonic Acid Soybean Oil by Immobilized *Rhizomucor miehei* Lipase to Incorporate Caprylic Acid. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2014 Jun 22;91(6):953–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2433-2>
- [25]. Silroy S, Sengupta A, Bhattacharyya DK, Ghosh M. Optimization of reaction parameters of acidolysis reaction between mustard oil and capric acid by using *Thermomyces lanuginosus* lipase. J Food Sci Technol [Internet]. 2014 Apr 11;51(4):715–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0543-5>
- [26]. Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. Renew Sustain Energy Rev [Internet]. 2015 Jan;41:1447–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114008089>
- [27]. Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. Biotechnol Adv [Internet]. 2015 Sep;33(5):511–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>
- [28]. Ganguly S, Nandi S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. Biochem Eng J [Internet]. 2015 Oct;102:2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.020>
- [29]. Ma B, Yu H, Pan J, Xu J. High-yield production of enantiopure 2-hydroxy-2-(2'-chlorophenyl) acetic acid by long-term operation of a

continuous packed bed reactor. *Biochem Eng J* [Internet]. 2016 Mar;107:45–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.002>

[30]. Choi N, Kim H, Kim BH, Lee J, Kim I. Production of Phytosteryl Ester from Echium Oil in a Recirculating Packed Bed Reactor Using an Immobilized Lipase. *J Oleo Sci* [Internet]. 2017;66(12):1329–35. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/66/12/66_ess17070/_article

[31]. Amri Z, Lazreg-Aref H, Mekni M, El-Gharbi S, Dabbaghi O, Mechri B, et al. Oil Characterization and Lipids Class Composition of Pomegranate Seeds. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2037341/>

[32]. Maszewska M, Florowska A, Dłużewska E, Wroniak M, Marciniak-Lukasiak K, Żbikowska A. Oxidative Stability of Selected Edible Oils. *Molecules* [Internet]. 2018 Jul 17;23(7):1746. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1746>

[33]. Sabir A, Unver A, Kara Z. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agric* [Internet]. 2012 Jul;92(9):1982–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5571>

[34]. Ma Z, Zhang H. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants* [Internet]. 2017 Sep 15;6(3):71. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/3/71>

- [35]. Taghvaei M, Jafari SM. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. J Food Sci Technol [Internet]. 2015 Mar 6;52(3):1272–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1080-1>
- [36]. CODEX. Section 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources. FAO. 2017.
- [37]. Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. Food Chem [Internet]. 2015 Jan;167:205–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614009807>
- [38]. Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade LM, Kefalas P, et al. Content of Antioxidants, Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Grape Seed Oil Obtained by Ultra Sound Assisted Extraction. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2014 Jun 28;91(6):989–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2441-2>
- [39]. American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. American Oil Chemists' Society. 2017.
- [40]. Paula A V, Nunes GFM, Santos JC, de Castro HF. Interesterification of milkfat with soybean oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilised on SiO₂-PVA on packed bed reactor. Int J Food Sci Technol [Internet]. 2011 Oct;46(10):2124–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2011.02726.x>

- [41]. Scott Fogler H. Elements of chemical reaction engineering. Chem Eng Sci [Internet]. 1987;42(10):2493. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009250987801306>
- [42]. ISO. ISO 12966-2:2017 - Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. International Organization for Standardization . 2017.
- [43]. Casas-Godoy L, Marty A, Sandoval G, Ferreira-Dias S. Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. Biochem Eng J [Internet]. 2013 Aug;77:20–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.05.001>
- [44]. ISO 6886:2016 Animal and vegetable fats and oils -- Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test). 2016;
- [45]. FAO. Standard for Named Vegetable Oils Codex Stan 210-1999. Codex Aliment. 1999;
- [46]. Durante M, Montefusco A, Marrese PP, Soccio M, Pastore D, Piro G, et al. Seeds of pomegranate, tomato and grapes: An underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products. J Food Compos Anal [Internet]. 2017 Oct;63(January):65–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.026>
- [47]. Kochhar SP, Henry CJK. Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. Int J Food Sci Nutr [Internet]. 2009 Jan

21;60(sup7):289–96. Available from:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637480903103774>

[48]. Saini RK, Keum Y. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci* [Internet]. 2018 Jun;203(January):255–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320518302303>

[49]. Torri L, Bondioli P, Folegatti L, Rovellini P, Piochi M, Morini G. Development of Perilla seed oil and extra virgin olive oil blends for nutritional, oxidative stability and consumer acceptance improvements. *Food Chem* [Internet]. 2019 Jul;286(October 2018):584–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.063>

[50]. de Paula A V., Nunes GFM, de Castro HF, dos Santos JC. Performance of packed bed reactor on the enzymatic interesterification of milk fat with soybean oil to yield structure lipids. *Int Dairy J* [Internet]. 2018 Nov;86:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.014>

[51]. Xu X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2003 Jun;105(6):289–304. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200390059>

[52]. Caballero E, Soto C, Olivares A, Altamirano C. Potential Use of Avocado Oil on Structured Lipids MLM-Type Production Catalysed by Commercial Immobilised Lipases. Zhang Y, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014

Sep 23;9(9):e107749. Available from:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0107749>

[53]. Lee Y, Tang T, Lai O. Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *J Food Sci* [Internet]. 2012 Aug;77(8):R137–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02793.x>

[54]. Kadhum AAH, Shamma MN. Edible lipids modification processes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017 Jan 2;57(1):48–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2013.848834>

[55]. Wang X, Liu X, Zhao C, Ding Y, Xu P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. *Bioresour Technol* [Internet]. 2011 May;102(10):6352–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411003233>

[56]. Poppe JK, Matte CR, de Freitas VO, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Záchia Ayub MA. Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2018 Jul;34(4):952–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2650>

[57]. Okura NS, Sabi GJ, Crivellenti MC, Gomes RAB, Fernandez-Lafuente R, Mendes AA. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020

Nov;163:550–61.

Available

from:

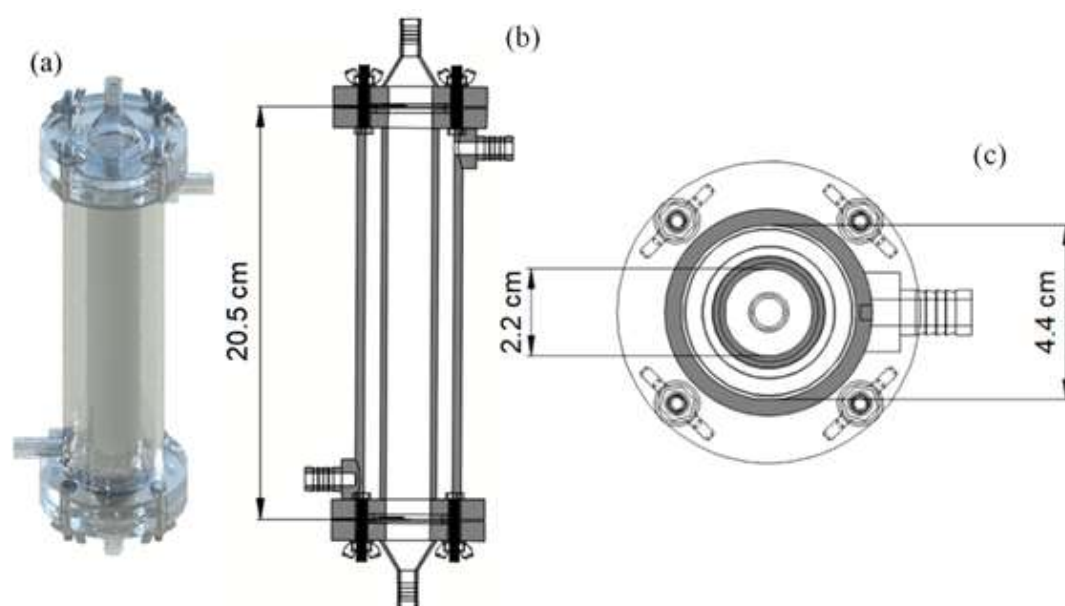
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020337661>**Figure Captions**

Fig. 1. Packed bed reactor shown in (a) isometric view, rendered using Autodesk® AutoCAD software; (b) frontal view, showing reactor height; and (c) upper view, showing jacket and inner tube diameter.

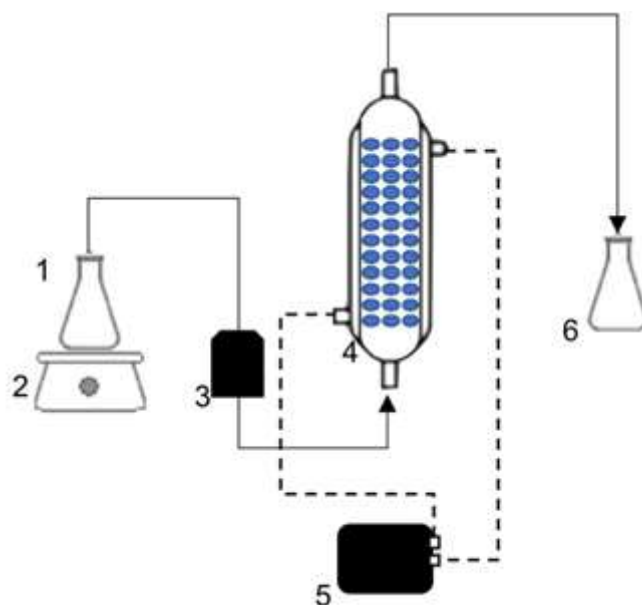


Fig. 2. Schematic of the experimental setup. (1) Substrate reservoir, (2) magnetic stirrer, (3) peristaltic pump, (4) packed bed reactor, (5) water bath, and (6) product reservoir.

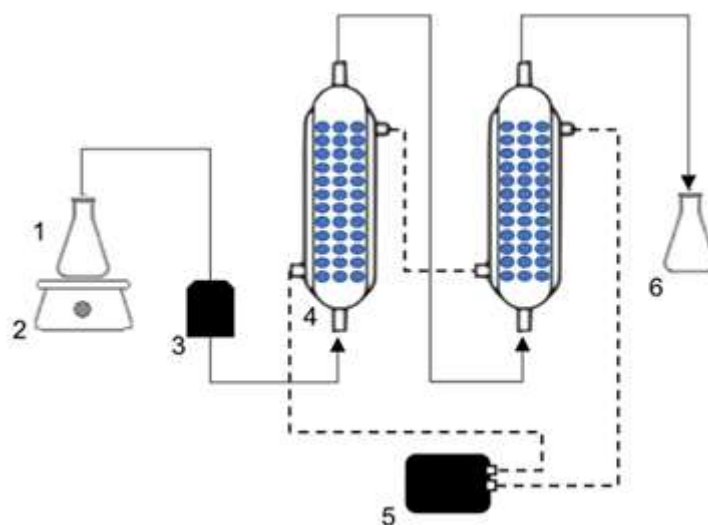


Fig. 3. Schematic of the experimental setup. (1) Substrate reservoir, (2) magnetic stirrer, (3) peristaltic pump, (4) packed bed reactors, (5) water bath, and (6) product reservoir.

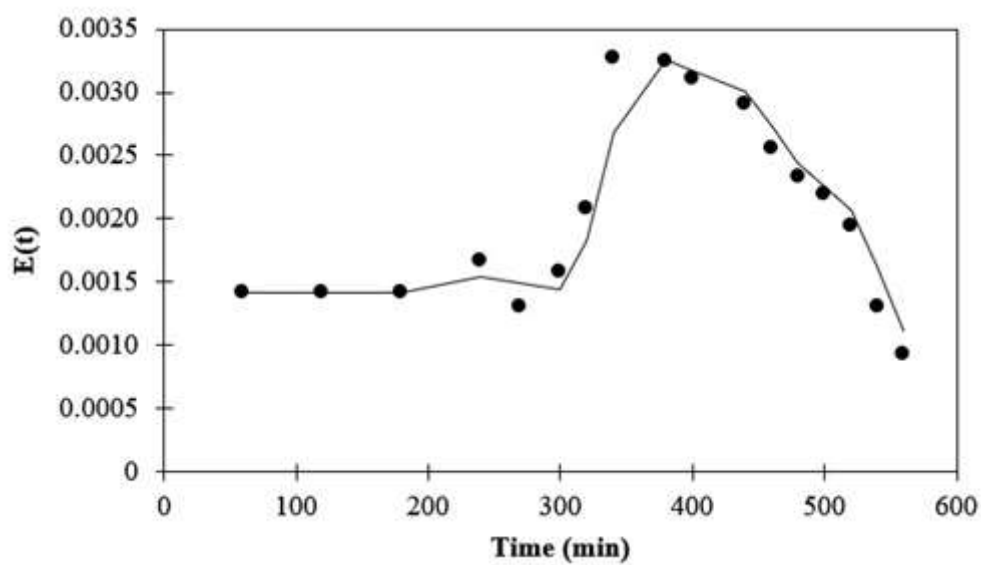


Fig. 4. Residence time distribution curve (E) as a function of reaction time (min).

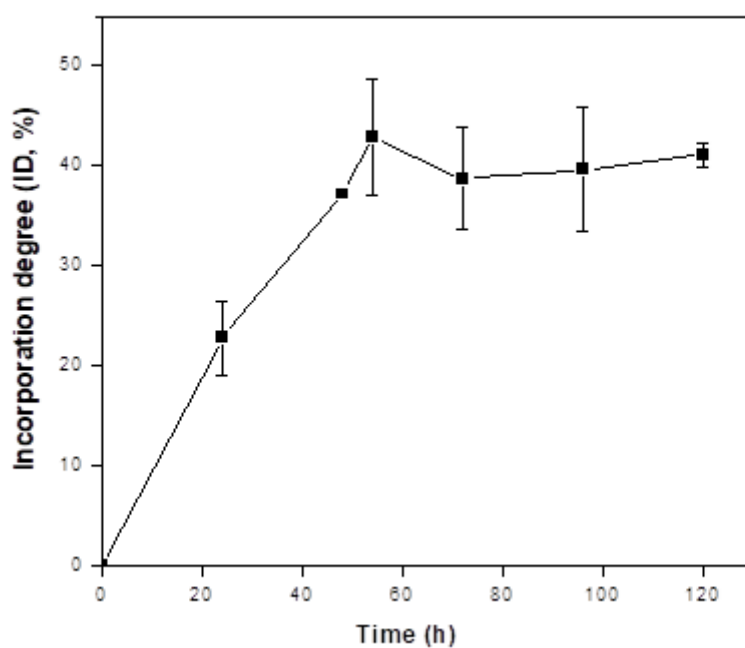


Fig. 5. Incorporation degree (%) of the medium-chain fatty acid capric acid in grape seed oil after 120 h of reaction in a packed bed reactor.

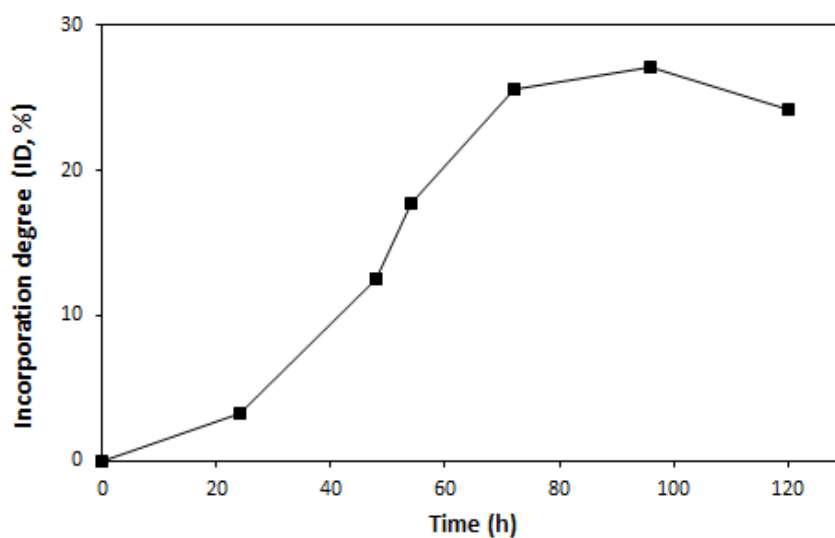


Fig. 6. Incorporation degree (%) of the medium-chain fatty acid capric acid in grape seed oil after 120 h of reaction in associated packed bed reactor.

Tables

Table 1. Fatty acid composition (%) of grape seed oil*

Fatty acid	(%)
C16:0 (Palmitic)	11.51 ± 0.58
C18:0 (Stearic)	5.70 ± 1.44
C18:1n9 (Oleic)	27.34 ± 1.09
C18:2n6 (Linoleic)	49.44 ± 0.27
C18:3n3 (Linolenic)	5.31 ± 0.37
C 20:3 (Dihomo-γ-linolenic)	0.71 ± 0.12

*Means (± standard deviation)

Table 2. Fatty acid composition (%) of modified grape seed TAGs with capric acid (C10:0), by acidolysis catalyzed by Lipozyme RM IM in packed bed reactor*

Fatty acid (%)	24h	48h	54h	72h	96h	120h
C10:0 (Capric)	15.49±2.73 ^b	26.69±0.36 ^{a,b}	31.97±5.50 ^a	28.18±4.28 ^{a,b}	28.81±5.87 ^{a,b}	28.75±3.23 ^{a,b}
C16:0 (Palmitic)	8.85±0.58 ^a	7.45±0.48 ^{a,b}	6.80±0.70 ^b	7.32±0.55 ^{a,b}	7.17±0.01 ^{a,b}	6.91±0.13 ^b
C18:0 (Stearic)	3.31±0.02 ^a	2.53±0.13 ^{b,c}	2.37±0.03 ^c	2.61±0.02 ^{b,c}	2.55±0.00 ^{b,c}	2.66±0.07 ^b
C18:1n9 (Oleic)	23.29±1.71 ^a	19.94±1.02 ^a	18.68±1.90 ^a	20.08±1.57 ^a	19.53±2.50 ^a	19.93±2.10 ^a
C18:2n6 (Linoleic)	45.27±0.98 ^a	40.10±0.39 ^a	37.53±2.74 ^a	38.81±2.47 ^a	38.92±3.58 ^a	38.63±1.47 ^a
C18:3n3 (Linolenic)	3.78±0.57 ^a	3.29±0.64 ^a	2.66±0.14 ^a	2.99±0.29 ^a	3.03±0.20 ^a	3.13±0.40 ^a

*Means (± standard deviation) followed by different lower case letters on the same line differ statistically (p< 0.05)

Table 3. Fatty acid composition (%) of modified grape seed TAGs with capric acid (C10:0), by acidolysis catalyzed by Lipozyme RM IM in packed bed reactors in series*

Fatty acid (%)	24h	48h	54h	72h	96h	120h
C10:0 (Capric)	2.04 ± 0.05 ^f	8.17 ± 0.03 ^e	11.81 ± 0.23 ^d	17.56 ± 0.08 ^b	18.67 ± 0.03 ^a	16.45 ± 0.01 ^c
C16:0 (Palmitic)	10.69 ± 0.17 ^a	9.40 ± 0.01 ^b	8.19 ± 0.04 ^c	7.54 ± 0.01 ^d	7.36 ± 0.00 ^d	7.50 ± 0.00 ^d
C18:0 (Stearic)	3.58 ± 0.02 ^a	3.20 ± 0.00 ^b	2.80 ± 0.02 ^c	2.54 ± 0.01 ^d	2.43 ± 0.00 ^e	2.51 ± 0.01 ^d
C18:1n9 (Oleic)	28.19 ± 0.08 ^a	26.64 ± 0.02 ^b	25.50 ± 0.09 ^c	23.77 ± 0.03 ^e	23.22 ± 0.01 ^f	24.05 ± 0.00 ^d
C18:2n6 (Linoleic)	51.32 ± 0.11 ^a	48.81 ± 0.02 ^b	48.08 ± 0.16 ^c	45.18 ± 0.04 ^e	44.90 ± 0.02 ^e	46.03 ± 0.00 ^d
C18:3n3 (Linolenic)	4.18 ± 0.01 ^a	3.77 ± 0.00 ^b	3.62 ± 0.01 ^c	3.40 ± 0.01 ^e	3.42 ± 0.00 ^e	3.45 ± 0.00 ^d

*Means (± standard deviation) followed by different lower case letters on the same line differ statistically (p < 0.05).

Table 4. Hydrolytic activities, moisture content, thermal deactivation constant, half-life of Lipozyme RM IM[®] and modified grape oil peroxide value.

Parameter	Packed bed	Packed bed in series
Hydrolytic Activity (U/g) ^a	294.04 ± 29.67	380.59 ± 61.69
Recovered Hydrolytic Activity (U/g) ^a	182.24 ± 13.21	240.91 ± 32.65
Moisture (% d.w)	5.71	5.70
K_d	0.0061 h ⁻¹	0.0061 h ⁻¹
$T_{1/2}$	209.64h	235.63h
Value peroxide (mEq O ₂ /kg) ^a	2.94 ± 0.01	4.14 ± 0.11

^a Mean ± standard deviation.

Capítulo 2.

**Desenvolvimento de *spread* de chocolate potencialmente funcional
contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos**

Artigo preparado para ser submetido para a Revista Innovative Food Science
& Emerging Technologies

**Desenvolvimento de *spread* de chocolate potencialmente funcional
contendo probióticos e triglicerídeos dietéticos**

Izabela de Souza Correia Cozentino^a, Ariela Veloso de Paula^b, Clovis Augusto Ribeiro^c, Jovan Duran Alonso^c, Renato Grimaldi^d, Valdecir Luccas^e, Daniela Cardoso Umbelino Cavallini^{a*}

^a *Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil*

^b *Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil*

^c *Departamento de Química Analítica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil*

^d *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil*

^e *Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate (CEREAL CHOCOTEC), Campinas, São Paulo, Brasil*

Autor correspondente

Endereço de email: d.cavallini@unesp.br

Resumo

Novos *spreads* funcionais à base de avelã e chocolate, contendo a cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 e diferentes concentrações de triglicerídeos modificados (TAG) do tipo MLM (25, 50 e 75 g/100g) foram desenvolvidos. As diferentes concentrações de lipídeos modificados utilizadas não interferiu na viabilidade da cepa probiótica, durante 180 dias

de armazenamento à 20 °C. As formulações apresentaram teores de proteínas, lipídeos e carboidratos semelhantes, atividade de água abaixo de 0,5 e boa estabilidade térmica e microbiológica. A diminuição da proporção de gordura teve um efeito significativo nas propriedades reológicas dos *spreads*, sendo que adição de 75 g/100g de TAG modificado interferiu na espalhabilidade do produto. A adição de 25 e 50 g/100g de TAG do tipo MLM resultou em aumento nos teores de ácidos graxos de cadeia média e insaturados, conferindo, juntamente com a cepa probiótica, propriedades funcionais aos *spreads*.

Relevância industrial: Os *spreads* à base de avelã e chocolate contendo probióticos e triglicerídeos modificados desenvolvidos, constituem uma estratégia promissora para melhorar o perfil nutricional de produtos de confeitaria e diversificar o mercado de alimentos funcionais. A substituição de gordura por triglicerídeos modificados confere um diferencial de qualidade ao produto, pois tais lipídeos apresentam potencial para promover benefícios à saúde sem modificar a qualidade do produto.

Palavras-chave: *Spread* de chocolate; Probiótico; Alimento funcional; Triglicerídeos estruturados.

1. Introdução

A conscientização e interesse dos consumidores em relação a uma alimentação mais saudável têm impulsionado o desenvolvimento de alimentos funcionais que promovam benefícios à saúde e redução do risco de doenças (Prasanth Kumar, Jeyarani, & Gopala Krishna, 2016; Yüksel-Bilsel & Şahin-Yeşilçubuk, 2019). Neste contexto, o desenvolvimento de alimentos diferenciados tem despertado o interesse do setor alimentício.

Os probióticos são conhecidos internacionalmente, como: “microrganismos vivos que, quando administrados em doses apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO / WHO, 2001; Hill et al., 2014). Para que exerça seus efeitos sistêmicos, precisam sobreviver às diferentes etapas de processamento, às condições de armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo capaz de colonizar, mesmo que temporariamente o intestino (Markowiak & Ślizewska, 2017; Monteagudo-Mera, Rastall, Gibson, Charalampopoulos, & Chatzifragkou, 2019).

A cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183, isolada do queijo Tafí (Tucumán, Argentina), apresenta efeitos benéficos à saúde como modulação do perfil lipídico e da microbiota intestinal (Bedani et al., 2011; Cavallini et al., 2011), redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (Sivieri et al., 2008) e mama (Kinouchi et al., 2012) e atenuação nos sintomas de doenças inflamatórias intestinais (Celiberto et al., 2017; Celiberto, Bedani, Rossi, & Cavallini, 2015).

Os microrganismos probióticos podem ser incorporados em diversos alimentos sendo que, os produtos à base de chocolate são considerados veículos adequados para probióticos (Coman et al., 2012; Possemiers, Marzorati, Verstraete, & Van de Wiele, 2010), além de possuírem propriedades benéficas à saúde e características sensoriais que atraem o consumidor (El-kalyoubi, Khallaf, Abdelrashid, & Mostafa, 2011). Tais produtos também passaram por mudanças nos últimos anos, em resposta à busca do consumidor por produtos mais saudáveis, resultando em

formulações com redução nos teores de açúcares e gordura (Konar, Toker, Oba, & Sagdic, 2016).

Spreads de chocolate são produtos, amplamente consumidos, nos quais o cacau é misturado com outros ingredientes, geralmente à base de gordura sólida (gorduras hidrogenadas ou com altos teores de ácidos graxos saturados) para preparar uma pasta espalhável mais comumente usada por profissionais da confeitaria em recheios e coberturas de bolos ou até mesmo em pães e torradas, podendo ser adicionados de pastas de nozes, macadâmia, castanha de caju ou avelã (Codex Alimentarius Commission, 2015; Jeyarani, Banerjee, Ravi, & Krishna, 2015).

Os *spreads* à base de gorduras possuem propriedades de emulsões plásticas ou fluídas compostas principalmente de água, óleos e gorduras com a capacidade de ser espalhável à temperatura ambiente (Codex Alimentarius Commission, 2007; Patel et al., 2014). Esta propriedade é alcançada por uma quantidade normalmente superior a 40% de gorduras adicionadas aos ingredientes secos (Manzocco, Calligaris, Camerin, Pizzale, & Nicoli, 2014), que confere ao produto características nutricionais indesejáveis.

Para atender um mercado consumidor exigente e preocupado com a manutenção da saúde, o desenvolvimento de produtos com perfil lipídico mais equilibrado se faz necessário (Bouaziz et al., 2017; Manzocco et al., 2014). No entanto, o grande desafio tecnológico está em desenvolver estes *spreads* com baixos teores de gorduras saturadas que mantenham as mesmas características de sabor, textura e espalhabilidade que os produtos originais, já que sua estrutura está fortemente relacionada à concentração e fonte lipídica utilizada (Bouaziz et al., 2017; El-Hadad, Youssef, Abd El-Aal, & Abou-Gharbia, 2011; Jeyarani et al., 2015; Manzocco et al., 2014; Patel et al., 2014).

A modificação enzimática de óleos vegetais visando à síntese de lipídeos estruturados, especificamente os triglicerídeos dietéticos, tem sido amplamente estudada, pois permite a substituição de ácidos graxos na molécula do triglicerídeo (TAG) (Abed et al., 2018; Kadivar, De Clercq,

Mokbul, & Dewettinck, 2016; Xie & Hu, 2016; Yüksel-Bilsel & Şahin-Yeşilçubuk, 2019; Zhao et al., 2015), conferindo benefícios ao produto, como controle da obesidade (Hu, Shen, Xiong, Zhu, & Deng, 2018; Marten, Pfeuffer, & Schrezenmeir, 2006), da insuficiência pancreática (Lemarié, Beauchamp, Legrand, & Rioux, 2016), da má absorção de gorduras (Esperón-Rojas, Baeza-Jiménez, Cano-Sarmiento, & García, 2017) e outras doenças metabólicas (Kono, Fujii, Ishii, Hosomura, & Ogiku, 2010; Liu, 2015; Van Schalkwijk et al., 2014), constituindo um meio efetivo de fornecimento de ácidos graxos desejados para fins terapêuticos ou nutricionais (Abed et al., 2018; Kadivar et al., 2016).

O TAG modificado possui novas propriedades funcionais e nutricionais que dependem da composição de ácidos graxos e da distribuição dos mesmos na molécula do glicerol (Kadivar et al., 2016; Kavadia, Yadav, Odaneth, & Lali, 2018; Wang, Xia, Xu, Xie, & Duan, 2012) e a posição dos ácidos graxos nas moléculas do TAG (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) pode ter um impacto significativo no metabolismo humano (Nunes, Pires-Cabral, & Ferreira-Dias, 2011). O TAG com ácidos graxos de cadeia média, nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa, na posição interna (MLM), oferece benefícios durante a digestão, pois os ácidos graxos de cadeia média são hidrolisados mais rapidamente pela ação da lipase pancreática *sn*-1,3 regioesletiva, e são transportados diretamente para o fígado, através da circulação portal (Kim & Akoh, 2015; Lee, Tang, & Lai, 2012; Willett, Martini, & Akoh, 2019). Além disso, também podem estar associados à modulação do sistema imune (Kono et al., 2010) e do perfil lipídico (Sengupta & Ghosh, 2011) e redução do risco de desenvolvimento de aterosclerose (Korrapati et al., 2018).

O óleo de semente de uva é conhecido pelo seu alto valor nutricional, rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), principalmente o ácido linoléico (58-78%) (Chambre, Tociu, Stanescu, & Popescu, 2019; CODEX, 2017; Da Porto & Natolino, 2017; Davidov-Pardo & McClements, 2015; Malićanin et al., 2014). Esse tipo de óleo é fonte promissora para produzir lipídeos estruturados por meio da acidólise enzimática catalisada por enzima

específica 1,3, uma vez que possuem ácido linoléico na posição *sn*-2 da sua molécula (Costa et al., 2018).

Visando a diversificação do mercado de alimentos funcionais, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar *spreads* de chocolate e avelã, adicionados da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 e com diferentes concentrações de TAGs modificados do tipo MLM em substituição à gordura vegetal.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Como microrganismo probiótico foi avaliada a cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 (Centro de Referência para Lactobacilos-CERELA, Argentina), na forma liofilizada. Para a obtenção do lipídio modificado do tipo MLM foi utilizado óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L.) obtido da Distriol (São Paulo, Brasil) e ácido cáprico (Sigma Aldrich- São Paulo, Brasil). A lipase comercialmente imobilizada Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*) foi gentilmente cedida pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Para a preparação dos *spreads* a base de avelã e chocolate, foram utilizados os seguintes materiais: açúcar cristal (União, Brasil), cacau em pó (Barry Callebaut, Brasil), óleo de semente de uva (Distriol, Brasil), pasta de avelã (Carino, Brasil), gordura vegetal (AAK Chocofill TC 50, Brasil), leite desnatado em pó (Itambé, Brasil), lecitina de soja (Solae, Brasil) e polricinoleato de poliglicerol (PGPR, Danisco, Brasil).

2.2. TAGs modificados do tipo MLM

A síntese enzimática do TAG do tipo MLM foi realizada por acidólise de óleo de semente de uva com ácido cáprico (C10:0), utilizando Lipozyme RM IM, relação 1:3 (óleo de uva:ácido cáprico), em reator de coluna de leito fixo, operando em modo contínuo, durante 120h a 45°C, com temperatura

controlada por um banho-maria (Solab SL-152, Piracicaba, Brasil) conectado ao sistema de recirculação de alimentação para manter a mistura de reação. O reator foi empacotado com cerca de 16 g de enzima e os substratos foram bombeados a uma taxa de fluxo de 6 mL/h.

2.3. Preparação e avaliação da cultura probiótica

A cepa pura de *E. faecium* CRL 183 foi mantida congelada (-80°C) em um meio composto por leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v), suplementado com 1,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 1,0% de glicerol. Os inóculos foram preparados pela transferência de 10% da cultura de manutenção de *E. faecium* CRL 183 ativada, para meio M17 (Himedia®, Índia), seguido de incubação a 37 °C por 14 -16 horas.

2.4. *Spreads* de chocolate e avelã

Os *spreads* foram preparados na planta piloto do Cereal Chocotec (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil) utilizando como ingredientes: 35,42% de açúcar cristal, 11,94% de cacau em pó, 14,93% de pasta de avelã, 18,84% de óleo de semente de uva, 9,91% de gordura vegetal, 8,46% de leite desnatado em pó, 0,30% de lecitina de soja e 0,20% de PGPR. Os *spreads* foram processados em moinho de esferas (Caotech modelo CAO- B5, Holanda) por 1 hora a 50°C, sendo que a gordura, lecitina de soja e o PGPR foram adicionados 10 minutos antes de finalizar esta etapa. Os probióticos foram liofilizados e, ao final desta etapa, foram adicionados aos *spreads* em quantidade suficiente para atingir 8 log UFC/g, no produto final. Durante o processo foi realizado o monitoramento da granulometria para avaliar o tamanho máximo de partícula (mm) (Beckett, 2008).

Foram desenvolvidas cinco formulações, sendo que duas foram utilizadas como controle: SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos e SP – sem adição de TAGs modificados e com probióticos. As outras formulações

foram preparadas com substituição parcial da gordura vegetal convencional por TAGs modificados e adição da cepa probiótica: SPT25 – 25 g/100g de TAGs modificados; SPT50 – 50 g/100g de TAGs modificados; SPT75 – 75 g/100g de TAGs modificados. Os produtos foram armazenados em frascos de vidro herméticos a temperatura de 20°C por 180 dias.

2.5. Composição proximal

As formulações foram caracterizadas quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença: carboidratos totais (%) = 100% - (% umidade + cinzas + proteínas + lipídeos). O valor calórico dos produtos foi calculado por meio da equação: VCT (valor calórico total – Kcal/100 g) = [proteínas (g) x 4] + [carboidratos (g) x 4] + [lipídeos (g) x 9] (Association of Official Analytical Chemists, 2005).

2.6. Atividade de água (A_w)

A A_w foi determinada por medida direta, utilizando-se o aparelho Aqua Lab ($A_w43^{\text{®}}$ – ETEC, São Paulo, Brasil), sendo utilizada uma quantidade de 3 gramas de cada amostra em triplicata.

2.7. Análise de cor

Determinada no colorímetro HunterLab[®] (Konica Minolta CR-410, Osaka, Japão), utilizando iluminante D65 e ângulo visual de 10°. Imagens coloridas foram convertidas no sistema CIELAB: valores L^* , foram determinados como indicadores de luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), a^* índice de cor verde a vermelha e b^* índice de cor azul a amarela com valores de -120 a +120. Calculou-se o ângulo hue (h°) = $\arctan(b^*/a^*)$; croma (C^*) = $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$. Foram calculados os valores médios de cinco medidas repetidas e os desvios padrão.

2.8. Propriedades reológicas

2.8.1 Viscosidade plástica de Casson (η_{ca}) e Limite de escoamento de Casson (τ_{ca})

As amostras de *spreads* foram fundidas a 45 °C para determinação das propriedades reológicas utilizando um Reômetro programável, (Brookfield RVDVIII, Stoughton, EUA), com adaptador para pequenas amostras e um banho termostático a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ com spindle do tipo cilíndrico (S15) (Chevalley, 1975). Após a coleta dos dados foram construídas curvas correlacionando os resultados experimentais de taxa de deformação e tensão de cisalhamento e calculados os parâmetros: viscosidade plástica de Casson e limite de escoamento de Casson. Os parâmetros de Casson foram determinados por regressão. As medidas foram avaliadas em triplicata.

2.8.2 Análise de textura

O perfil de textura foi avaliado usando um texturômetro TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). Foram caracterizados os parâmetros texturais como dureza, consistência e adesividade. Os *spreads* (12,50 g) foram transferidos para tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD®) e centrifugados por 5 minutos à 4000 rotações por minuto. As amostras foram posicionadas junto a sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, as configurações e operações instrumentais foram realizadas usando Software Exponent Lite®, e os parâmetros desejados foram adicionados, velocidade de compressão e retorno à superfície (0,5 mm/s) e profundidade de entrada da sonda (10 mm). Após a primeira entrada da sonda na amostra, depois de um período de repouso (5 segundos) realizou-se, nas mesmas condições, uma segunda compressão. As medidas foram avaliadas em temperatura ambiente (37°C) e em triplicata.

2.9. Composição de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, de acordo com o método Ce 2-66 da American Oil Chemist's Society (American Oil Chemists' Society, 2017). Para a metodologia de determinação de perfil de ácidos graxos foi utilizado um mix de padrões de esteres de ácidos graxos (mix de FAMES, C4 à C25). Os testes foram realizados em um cromatógrafo a gás (PerkinElmer) utilizando-se injetor Split, detector de ionização por chama (FID) e coluna Supelcowax (L × I.D. 30 m × 0,32 mm, df 0,50 µm). A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C, sendo o volume de injeção: 1,0 µL, modo de injeção split (1:10), utilizando-se nitrogênio na vazão de 0,5 mL/min., como gás de arraste. A rampa de aquecimento do forno foi: temperatura inicial de 60 °C até 210 °C (20 °C/min.); a temperatura de 210 °C foi mantida por 7 min., e uma taxa de aquecimento 20 °C/min., foi empregada para que fosse atingida a temperatura final de 250 °C, sendo esta mantida por 25 min. A composição qualitativa foi determinada pela comparação dos tempos de retenção com os padrões de ácidos graxos.

2.10. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os perfis de cristalização e fusão foram obtidos em um equipamento DSC 1 (Mettler Toledo, Gieben, Suíça). O instrumento foi calibrado com padrão Índio (99,999% de pureza). A análise foi realizada sob uma atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL min⁻¹). Cadinhos de alumínio (40 µL) foram usados como porta amostra e como referência. Aproximadamente 5,0 mg de amostra foram usados para análises. As curvas obtidas por DSC foram registradas à razão de resfriamento e posterior aquecimento a 10 °C min⁻¹ de ambiente até -80 °C e posteriormente de -80 a 150 °C.

2.11. Análise microbiológica

2.11.1 Determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico em *spreads*

Amostras de 25g de *spreads* de chocolate e avelã foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada e micro diluições seriais foram preparadas para a determinação da viabilidade da cepa probiótica e segurança microbiológica. As amostras foram avaliadas a cada 30 dias, durante um período de armazenamento de seis meses. A viabilidade da cepa *E. faecium* CRL 183 foi observada por plaqueamento em meio de cultura M17 (Himedia®, India) e a incubação realizada em aerobiose, a 37 °C por 48 horas. As colônias foram contadas e os resultados expressos como log UFC/g (unidades formadoras de colônias por grama) (Rossi et al., 2008).

2.11.2 Segurança Microbiológica

Para a determinação da segurança microbiológica foram avaliadas: bactérias do grupo Coliformes a 45 °C e análises de *Staphylococcus aureus* foram realizadas no Petrifilm™ (3M Microbiology, EUA); *Salmonella* spp. detecção em HE (Ágar Hektoen Enteric, Accumedia®, EUA) e XLD (Ágar Xylose Lysine Desoxycholate, Accumedia®, EUA), a 37 °C/24 – 48 h (Downes & Ito, 2001); a análise de leveduras e bolores foi realizada em PDA (Ágar Potato Dextrose, Himedia®, India) e incubada a 30 °C/120 h (Kornacki, Gurtler, & Stawick, 2015). Essas análises foram realizadas em triplicata no primeiro dia de armazenamento e ao final de 6 meses.

2.12. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa Minitab Statistical Analysis (Statistic Analysis Software, Pensilvânia, EUA), sendo adotado o nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os resultados de cor foram analisados pela ANOVA de Welch e pós-teste Games-Howell.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição nutricional

As diferentes formulações de *spreads* apresentaram valores calóricos entre 605,18 e 612,54 kcal/100g e teores de proteínas, lipídeos e carboidratos próximos aos comerciais e aos relatados na literatura para produtos convencionais e modificados, sem diferirem significativamente entre si ($p>0,05$) (Tabela 1) (Altan, Lavenson, McCarthy, & McCarthy, 2011; Amevor, Laryea, & Barimah, 2018; Food Standards Agency, 2014; TACO, 2011).

Os *spreads* de chocolate apresentaram valores de atividade de água que variaram de 0,37 a 0,40 e teores de umidade de 0,13 a 0,23%, sem diferirem estatisticamente entre si ($p>0,05$) (Tabela 1). Almeida, Lannes (2017) encontraram valores de A_w superiores (0,65 a 0,89) e concluíram que a substituição parcial da gordura por gelatina em *spreads* de chocolates, levou a um aumento na fase aquosa, e, como consequência, uma maior atividade da água nos produtos.

A literatura relata que valores de atividade de água $<0,70$ são considerados baixos (Gurtler, Doyle, & Kornacki, 2014; Jay, Loessner, & Golden, 2005) e em geral, para produtos de chocolates a baixa atividade de água (normalmente entre 0,40 e 0,50) se deve à sua composição (Konar, Özhan, Artık, & Poyrazoglu, 2014; Rossini, Noreña, & Brandelli, 2011). Além disso, a A_w é um dos principais fatores que contribuem para a conservação do produto e viabilidade de microrganismos liofilizados ao longo do período de armazenamento, e uma alta A_w pode reduzir a viabilidade da cultura probiótica (Vesterlund, Salminen, & Salminen, 2012). A substituição da gordura por TAG modificados não interferiu nesse parâmetro e todas as formulações podem ser classificadas como produtos com baixa atividade de água.

3.2 Análise de cor

Em geral os resultados mostraram baixos valores do parâmetro L^* que indicam amostras de coloração mais escura (Tabela 2). No entanto, a formulação controle (SC) foi considerada ligeiramente mais clara pois apresentou os maiores valores de L^* , diferindo estatisticamente das demais ($p < 0,05$). Esses resultados indicam a ocorrência de *fat bloom*, fenômeno físico que aparece durante o armazenamento de chocolates, resultado da formação de cristais de gordura na superfície dos produtos, conferindo uma aparência esbranquiçada com alterações de cor e o desenvolvimento de padrões de cores não uniformes (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Vieira, 2009; Briones & Aguilera, 2005).

No sistema de cores Cielab, baixos valores de L^* representam menor refletância da luz dos alimentos, e valores positivos para os parâmetros a^* e b^* revelam amostras de coloração marrom, característica de produtos elaborados com chocolate e seus derivados (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Vieira, 2008).

A formulação controle (SC) e a formulação com probiótico realizada com maior nível de substituição do óleo modificado (SPT75) apresentaram os maiores valores de a^* ($1,59 \pm 0,46$ e $0,72 \pm 0,08$, respectivamente) sem diferirem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), o que indica que estas amostras apresentam uma maior tendência à cor vermelha.

Os maiores valores de b^* também foram observados nas amostras SC e SPT75 ($1,54 \pm 0,26$ e $0,68 \pm 0,08$, respectivamente), no entanto, o efeito do *fat bloom* pode ter provocado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no valor b^* , o que significa que estas amostras apresentaram tonalidade amarela mais intensa.

Son et al. (2018) avaliaram chocolates contendo maltitol e tagatose como adoçantes alternativos em termos de suas propriedades físicas e sensoriais para determinar o progresso do *sugar bloom* de cada chocolate durante o período de armazenamento. Eles também observaram um aumento no valor

de a^* (vermelho) e b^* (amarelo) em todas as formulações à medida que o *blooming* prosseguia.

Os valores de croma C^* foram influenciados pela presença do probiótico e do óleo modificado nas amostras, causando redução na intensidade da cor, com exceção da amostra SPT75 que apresentou comportamento semelhante ao controle (SC), ($p > 0,05$).

Os valores do ângulo hue h° , variaram de $54,35 \pm 6,46$ a $41,40 \pm 1,48$ estando dentro do quadrante de vermelho a amarelo e as formulações SC, SP e SPT75 apresentaram os menores valores h° , sem diferirem estatisticamente entre si.

Em geral, por ser uma matriz complexa, os chocolates diferem nos arranjos estruturais e de distribuição do tamanho de partículas, influenciando nos coeficientes de dispersão da luz e na aparência (Afoakwa et al., 2008; Almeida & Lannes, 2017; Glicerina et al., 2014; Hadnađev et al., 2014). As amostras com 25 g/100g e 50 g/100g de TAG modificados exibiram melhor comportamento, indicando a não ocorrência de *fat bloom* nesses tratamentos. Em um meio densamente compactado, a rede cristalina da gordura de cacau dispersa a luz, reduzindo os índices de luminância e saturação em produtos com maior teor de gordura (Afoakwa et al., 2008).

3.3 Propriedades reológicas

O monitoramento dos parâmetros reológicos do chocolate é importante, pois são afetados pelo seu processamento (tempo de conchagem, refinamento, temperagem e temperatura) e composição (conteúdo de gordura e de ácidos graxos, tipo de emulsificante e distribuição do tamanho de partículas) e afetam as características sensoriais e aceitação do produto pelo consumidor (Glicerina et al., 2014; Konar et al., 2014; McGill & Hartel, 2018). Além disso, a adição de culturas probióticas também influencia a microestrutura do produto, já que é introduzida uma nova fase à suspensão de sólidos (Laličić-Petronijević et al., 2015).

A Tabela 3 mostra que a adição de probióticos e de TAGs modificados influenciou os parâmetros reológicos dos *spreads* de chocolate. O *spread* SPT75 com nível mais alto de TAGs modificados mostrou um comportamento quase fluido e por isso impossibilitou a análise instrumental dos parâmetros. Uma alternativa para as formulações que não apresentaram comportamento ideal para um *spread*, seria utilizar estes produtos em recheios de confeitaria.

Todas as formulações apresentaram uma viscosidade plástica de Casson significativamente menor do que o *spread* controle (SC) ($p < 0,05$). No entanto, a proporção de óleo modificado dos *spreads* não teve efeito significativo ($p > 0,05$) na viscosidade de Casson. Para Zyżelewicz et al. (2010) a viscosidade das massas de chocolate amargo destinados à fabricação de barras de chocolate deve ser em torno de 1,0 a 2,0 Pa.s, sendo assim, todas as formulações de *spreads* de chocolate estão de acordo com os relatados na literatura (Agibert & Lannes, 2018; Kadivar et al., 2016). Contudo, os chocolates tipo cobertura, assumem valores menores de viscosidade de Casson e limite de escoamento de Casson em relação a outros tipos de chocolates (Beckett, 2008; Chevalley, 1975).

Pode-se notar que os valores do parâmetro limite de escoamento de Casson, que representa a força mínima necessária para que o chocolate comece a escoar (Aidoo, Afoakwa, & Dewettinck, 2015), diminuiu progressivamente de acordo com a fluidez da matriz lipídica dos *spreads*, indicando que a estabilidade física dos *spreads* diminuiu com o aumento da fluidez dos lipídeos ($p < 0,05$). O valor do limite de escoamento de Casson foi, contudo, significativamente maior ($p < 0,05$) para o *spread* controle ($5,35 \pm 0,14$ Pa), e os demais *spreads* registraram médias entre $4,09 \pm 0,23$ Pa e $1,31 \pm 0,12$ Pa.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos variaram de 0,99 a 1,00, indicando bom ajuste do modelo aos dados experimentais e confirma o comportamento reológico adequado nos *spreads* de chocolates.

Para determinar a espalhabilidade das formulações foram avaliados os parâmetros de dureza, consistência e adesão (Tabela 3). A dureza é um

parâmetro físico muito importante para o chocolate pois está fortemente relacionada ao teor de gordura, as condições de produção e temperagem, afetando a qualidade final do produto (Toker et al., 2018).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, verificou-se que os *spreads* utilizados como controle (SC e SP) apresentaram para todos os parâmetros considerados (dureza, consistência e adesão), valores significativamente maiores em comparação às outras formulações. Esses resultados estão de acordo com os obtidos a partir da análise reológica, e confirmam que estas formulações são mais firmes e viscosas. À medida que a proporção de óleo aumentava, os *spreads* se tornaram mais espalháveis e com níveis mais baixos de dureza ($p < 0,05$) em relação aos controles, sem diferirem significativamente entre si. Além disso, a adição de probióticos não afetou a textura dos *spreads* de chocolate (SP), quando comparados ao controle (SC) ($p > 0,05$).

Da mesma forma, a adesão e a consistência diminuíram com a redução de gordura nas formulações (Tabela 3). Destaca-se que a formulação controle com probiótico (SP), teve um comportamento de consistência e viscosidade semelhante ao da formulação com 25 g/100g de TAGs modificados.

Mayfield et al. (2015) produziram pastas de chocolate com ácido linoléico conjugado e os resultados indicaram que as pastas de chocolate ricas em ácido linoléico conjugado tinham dureza significativamente menor que as amostras de chocolate controle (com maior teor de gordura sólida). No entanto, quando comparadas às amostras de óleo de soja foram significativamente mais firmes. Por outro lado, Kumar et al. (2016) mostraram um aumento da dureza com o aumento da incorporação de fitonutriente em oleína de palma em *spreads* de chocolates.

Algumas gorduras vegetais, semelhantes a manteiga de cacau na composição de triglicerídeos, podem ser adicionadas em qualquer quantidade ao chocolate sem causar um efeito significativo na textura (Afoakwa, Paterson, & Fowler, 2007). Porém, na produção de *spreads* de chocolates, ao se utilizar lipídeos com maior fluidez, sua estabilidade física

pode diminuir significativamente, levando até à liberação de óleo e uma tendência a separação de fases durante o armazenamento (Manzocco et al., 2014).

3.4 Composição de ácidos graxos

Os perfis de ácidos graxos dos *spreads* de chocolate são apresentados na Tabela 4. Os dados revelaram que a substituição da gordura vegetal por 50 g/100g e 75 g/100g de óleo de uva modificado resultou aumento de ácidos graxos poliinsaturados em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Como esperado, a adição de TAG do tipo MLM resultou em aumento no teor de ácido graxo de cadeia média, especificamente do ácido cáprico, como resultado da substituição parcial da gordura nos *spreads*. Os resultados mostraram níveis abundantes dos ácidos graxos mono e poli-insaturados, com maior quantidade média de ácido oléico (C18:1; 38,11%) e linoléico (C18:2; 37,00%), seguido pelos ácidos graxos saturados, ácido palmítico (C16:0), que variou de 11,76% a 14,58% e esteárico (C18:0; 5,47%).

3.5 Comportamento térmico dos *spreads* de chocolate e do óleo de uva

DSC é uma técnica importante amplamente utilizada para estudar o perfil térmico de óleos e gorduras, analisar a transição das formas de cristalização durante a fusão de gorduras e entender as alterações nas propriedades físicas dos triglicerídeos modificados (Kavadia et al., 2018). Os perfis de fusão obtidos por DSC do óleo de uva antes e após a reação de acidólise enzimática e das formulações dos *spreads* são mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

O perfil de fusão do óleo de uva mostrou três eventos, dois endotérmicos referentes a fusão, sendo possível notar a presença de um evento principal a partir de -27,41 °C (Figura 1). Como esperado, após a reação de acidólise, houve uma variação nos comportamentos de fusão em comparação ao

produto de partida devido principalmente à mudança na composição dos ácidos graxos e sua distribuição posicional no esqueleto da molécula do glicerol (Abed et al., 2018).

O TAG modificado mostrou apenas um pico de fusão a uma temperatura mais baixa $-40,37\text{ }^{\circ}\text{C}$ que pode ser atribuído a nova formação do triglicerídeo, constituído de ácidos graxos de cadeia média (ácido cáprico) que apresentam faixa de temperatura de fusão mais baixa devido ao menor número de átomos de carbono em comparação aos triglicerídeos contendo apenas ácidos graxos de cadeia longa (Abed et al., 2018; Álvarez & Akoh, 2016; Kavadia et al., 2018). Além disso, os primeiros eventos de fusão não foram observados na curva obtida por DSC do TAG modificado, confirmando que mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do óleo de uva foram observadas devido à composição alterada de triglicerídeos e ácidos graxos (Figura 1).

O fenômeno de fusão depende do rompimento das ligações não-covalentes da estrutura cristalina, principalmente de ligações hidrofóbicas, indicando um novo arranjo tridimensional após a modificação (Himawan, Starov, & Stapley, 2006). O óleo modificado, por apresentar cadeias menores, reduz o número de interações hidrofóbicas que o material pode fazer, levando a ter pontos de fusão menores que seu análogo (Tabela 5)

O DSC também foi utilizado para caracterizar mudanças nos perfis de fusão e cristalização dos *spreads* de chocolate adicionados de probióticos e TAGs modificados em diferentes proporções (Figura 2). Todas as formulações de *spreads* exibiram transições endotérmicas com um pico de fusão e duas faixas de temperaturas entre $-27,24$ e $34,02\text{ }^{\circ}\text{C}$, sugerindo que independentemente do teor de óleo modificado utilizado nas formulações, elas exibiram energia semelhante para completar a fusão com a mesma estabilidade térmica. A única exceção é da amostra SPT75, que apresentou apenas um pico de fusão mais amplo a uma temperatura mais baixa de $-27,75\text{ }^{\circ}\text{C}$, não sendo possível observar o segundo evento de fusão na curva obtida por DSC, já que toda gordura está incorporada no *spread*. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de óleo de uva modificado encontrada

nesta amostra, sugerindo que eles exigiram menos tempo para derreter do que os *spreads* similares com maior teor de gordura.

Os valores de entalpia do evento de fusão (demonstrado como (A) na Figura 2) demonstram que o calor liberado pelas amostras até 50g/100g de TAG modificado apresentam valores próximos, sugerindo que não houve grandes alterações na matriz do *spread* por conta do óleo modificado se incorporar bem na dispersão sólida. Na formulação SPT75 há um considerável aumento, a partir desse ponto, o óleo modificado passa a alterar as características da dispersão sólida do *spread*, que favorece a incorporação da gordura na fase dispersa.

Pode ser observado que o segundo evento térmico (demonstrado como (B) na Figura 2) tem sua entalpia reduzida com a adição do TAG modificado, sugerindo alteração nas características e propriedades físico-químicas do *spread* de chocolate (Tabela 6). Como visto na formulação SC, o evento (B) se deve ao conteúdo lipídico sólido, que está na forma cristalina e é capaz de se fundir. Com a adição do TAG modificado, há uma redução na taxa cristalina de gordura, sugerindo que ela foi incorporada na matriz do *spread* pela dispersão da gordura, sendo incorporada então na fase lipídica.

O chocolate é uma matriz complexa de suspensão semi-sólida de partículas de açúcar e de cacau cercados por manteiga de cacau, sendo que a gordura representa cerca de 70% do total e sua natureza determina significativamente as propriedades do produto final. Por isso, a fase lipídica é considerada a responsável pela estabilidade térmica, sensação arenosa na boca, liberação de sabor e satisfação geral do consumidor (Ostrowska-Ligeza et al., 2018). O seu perfil de fusão é conhecido por ter uma alta e estreita faixa de fusão, com rápido derretimento à temperatura corporal, o que provoca a liberação de sabor (Kadivar et al., 2016).

3.6 Análise microbiológica

3.6.1 Segurança microbiológica

Na indústria de alimentos, são comuns problemas relacionados à estabilidade do produto durante o período de armazenamento e o acompanhamento de parâmetros microbiológicos durante esse período é fundamental (Norhayati, Suzielawanis, & Khan, 2013).

De acordo com os resultados, as populações de coliformes e *Salmonella* spp. estavam ausentes em todas as formulações ao longo do período experimental, e bolores/leveduras e *Staphylococcus aureus* estavam abaixo do limite de detecção (<1,0 UFC/g). Estes resultados confirmam que os *spreads* de chocolates foram processados de forma adequada e permaneceram estáveis e seguros por, no mínimo, seis meses.

A segurança microbiológica dos *spreads* de chocolates deve-se principalmente às boas práticas de fabricação adotadas durante a sua obtenção e à baixa atividade de água encontrada nos produtos e à correta manutenção desse parâmetro durante todo o período de estocagem. A baixa atividade de água e as altas concentrações de açúcares e gorduras encontradas no chocolate diminuem o crescimento de fungos e bactérias (Żyżelewicz et al., 2010).

3.6.2 Determinação da viabilidade celular do microrganismo probiótico (*E. faecium* CRL 183) nos *spreads*.

Como mostra a Tabela 7, a cepa probiótica *E. faecium* permaneceu estável durante 180 dias de armazenamento a 20 °C, sem sofrer redução significativa de viabilidade ($p > 0,05$), com exceção do tratamento SPT75 que exibiu queda de 0,84 log UFC/g em relação a contagem inicial, sem comprometer a qualidade do produto, pois a contagem do probiótico continuou elevada (superior a 8 log UFC/g). Observa-se que, ao final de 180 dias de armazenamento, não foram encontradas diferenças significativas entre as formulações para esse parâmetro ($p > 0,05$).

Apesar de alguns estudos mostrarem redução na viabilidade de microrganismos probióticos em produtos à base de chocolate durante o armazenamento (Erdem et al., 2014; Foong, Lee, Ramli, Tan, & Ayob, 2013),

a maioria dos resultados disponíveis na literatura evidencia um efeito protetor dessa matriz (Aragon-Alegro, Alarcon Alegro, Roberta Cardarelli, Chih Chiu, & Isay Saad, 2007; Mandal, Hati, Puniya, Singh, & Singh, 2013; Mirković et al., 2018; Possemiers et al., 2010). Os resultados deste trabalho vêm corroborar com os dados da literatura que mostram que o chocolate é uma boa matriz para a incorporação de probióticos, em comparação a outros produtos. Nebesny et al. (2007) utilizaram cepas liofilizadas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* para produção de chocolate probiótico e o produto se manteve estável com viabilidade de 7,0 log UFC/g durante 12 meses de armazenamento a 4 °C e 18 °C, enquanto, Kobus-Cisowska et al. (2019) detectaram diminuição na contagem de células viáveis (8,0 log UFC/g a 7,0 log UFC/g) de uma nova cepa probiótica de *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 em chocolate ao leite nas mesmas temperaturas durante 24 meses. Lalicic'-Petronijevic' et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes aos nossos durante o período de armazenamento de 180 dias. Os autores observaram que as cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* NCFM® apresentaram viabilidade (superior a 7,0 log UFC/g) quando incorporadas em chocolate do tipo amargo e ao leite, mantidas a 4 °C e 20 °C.

A viabilidade da cepa probiótica é influenciada por outros fatores como, resistência da cepa, etapas do processamento que podem gerar estresse celular e condições de armazenamento (Markowiak & Ślizewska, 2017). No presente estudo, a taxa de sobrevivência do microrganismo *E. faecium* CRL 183 nos *spreads* de chocolate, após 180 dias de armazenamento à 20 °C, foi de 100%, indicando uma adaptação da cepa à matriz e condições de processamento e armazenamento.

4. Conclusão

Os resultados mostraram que foi possível produzir um novo *spread* potencialmente funcional de chocolate e avelã com adição cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 e TAGs modificados do tipo MLM nas concentrações de 25 g/100g e 50 g/100g. A adição de TAG do tipo MLM aumentou o teor de ácido

cáprico (ácido graxo de cadeia média) e não comprometeu a composição química, a estabilidade térmica, a segurança microbiológica e a viabilidade da cepa probiótica nos *spreads*. Embora alguns parâmetros de textura das amostras foram afetados significativamente pela incorporação do lipídeo estruturado, os parâmetros reológicos mostraram bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Casson sem comprometer sua estrutura.

A incorporação de TAGs modificados em *spreads* de chocolates pode ser considerada uma estratégia promissora para melhorar o seu perfil nutricional e diversificar o mercado de alimentos funcionais. Os *spreads* com substituição de 25 g/100g e 50 g/100g da gordura vegetal convencional por TAGs modificados apresentam potencial para atuar na modulação do sistema imune e do perfil lipídico, controle da obesidade, melhora da absorção dos ácidos graxos essenciais, oferecendo benefícios à saúde dos consumidores, em função da presença da cepa probiótica, TAGs modificados e maior teor de ácidos graxos insaturados.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Abed, S. M., Wei, W., Ali, A. H., Korma, S. A., Mousa, A. H., Hassan, H. M., ... Wang, X. (2018). Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *LWT*, 93(March), 306–315.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.057>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing

- rheological and textural qualities in chocolate – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.02.002>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2008). Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates. *Journal of Food Engineering*, 87(2), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.025>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2009). Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered dark chocolates. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.011>
- Agibert, S. A. C., & Lannes, S. C. da S. (2018). Dark chocolate with a high oleic peanut oil microcapsule content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5591–5597. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9102>
- Aidoo, R. P., Afoakwa, E. O., & Dewettinck, K. (2015). Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.043>
- Almeida, P. F., & Lannes, S. C. da S. (2017). Effects of chicken by-product gelatin on the physicochemical properties and texture of chocolate spread. *Journal of Texture Studies*, 48(5), 392–402. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12242>

- Altan, A., Lavenson, D. M., McCarthy, M. J., & McCarthy, K. L. (2011). Oil Migration in Chocolate and Almond Product Confectionery Systems. *Journal of Food Science*, 76(6), E489–E494. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02233.x>
- Álvarez, C. A., & Akoh, C. C. (2016). Preparation of Infant Formula Fat Analog Containing Capric Acid and Enriched with DHA and ARA at the sn-2 Position. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(4), 531–542. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2788-7>
- American Oil Chemists' Society. (2017). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. In *American Oil Chemists' Society*.
- Amevor, P. M., Laryea, D., & Barimah, J. (2018). Sensory evaluation, nutrient composition and microbial load of cashew nut–chocolate spread. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1480180>
- Aragon-Alegro, L. C., Alarcon Alegro, J. H., Roberta Cardarelli, H., Chih Chiu, M., & Isay Saad, S. M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.020>
- Association of Official Analytical Chemists. (2005). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. AOAC International. Arlington, U.S.A.
- Beckett, S. T. (2008). Industrial Chocolate Manufacture and Use. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444301588>

- Bedani, R., Pauly-Silveira, N. D., Cano, V. S. P., Valentini, S. R., Valdez, G. F. de, & Rossi, E. A. (2011). Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1238–1247. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300050>
- Bouaziz, M. A., Abbes, F., Mokni, A., Blecker, C., Attia, H., & Besbes, S. (2017). The addition effect of Tunisian date seed fibers on the quality of chocolate spreads. *Journal of Texture Studies*, 48(2), 143–150. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12225>
- Briones, V., & Aguilera, J. M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.002>
- Cavallini, D. C., Suzuki, J. Y., Abdalla, D. S., Vendramini, R. C., Pauly-Silveira, N. D., Roselino, M. N., ... Rossi, E. A. (2011). Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 126. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-126>
- Celiberto, L. S., Bedani, R., Dejana, N. N., Ivo de Medeiros, A., Sampaio Zuanon, J. A., Spolidorio, L. C., ... Cavallini, D. C. U. (2017). Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. *PLOS ONE*, 12(4), e0175935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175935>
- Celiberto, L. S., Bedani, R., Rossi, E. A., & Cavallini, D. C. U. (2015).

- Probiotics: The Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.941457>
- Chambre, D. R., Tociu, M., Stanescu, M. D., & Popescu, C. (2019). Influence of composition on the thermal behavior of oils extracted from the seeds of some Romanian grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6324–6332. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9909>
- Chevalley, J. (1975). Rheology of chocolate. *Journal of Texture Studies*, 6(2), 177–196. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1975.tb01247.x>
- CODEX. (2017). Section 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources.
- Codex Alimentarius Commission. (2007). *Codex Stan 256-2007* Standard for Fat Spreads and Blended Spreads (pp. 1–5). pp. 1–5.
- Codex Alimentarius Commission. (2015). General Standard for Food Additives. *Codex Stan 192-1995*, p. 490. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2012). Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.003>
- Costa, C. M., Osório, N. M., Canet, A., Rivera, I., Sandoval, G., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2018). Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(1), 1700320.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.201700320>

Da Porto, C., & Natolino, A. (2017). Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130, 239–245.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.02.013>

Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2015). Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*, 167, 205–212.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.082>

Downes, F. P., & Ito, K. (2001). Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. In F. P. Downes & K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*.

<https://doi.org/10.2105/9780875531755>

El-Hadad, N. N. M., Youssef, M. M., Abd El-Aal, M. H., & Abou-Gharbia, H. H. (2011). Utilisation of red palm olein in formulating functional chocolate spread. *Food Chemistry*, 124(1), 285–290.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.034>

El-kalyoubi, M., Khallaf, M. F., Abdelrashid, A., & Mostafa, E. M. (2011). Quality characteristics of chocolate – Containing some fat replacer. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 89–96.

<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2011.05.009>

Erdem, Ö., Gültekin-Özgüven, M., Berktaş, I., Erşan, S., Tuna, H. E., Karadağ, A., ... Cutting, S. M. (2014). Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and

- lemon fiber: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 187–193.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.020>
- Esperón-Rojas, A. A., Baeza-Jiménez, R., Cano-Sarmiento, C., & García, H. S. (2017). Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, 66(9), 991–996.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess17010>
- FAO / WHO. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Expert Consultation Report*, Córdoba, Argentina.
<https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
- Food Standards Agency. (2014). McCance and Widdowson's The Composition of Foods. In *McCance and Widdowson's The Composition of Foods*. <https://doi.org/10.1039/9781849737562>
- Foong, Y. J., Lee, S. T., Ramli, N., Tan, Y. N., & Ayob, M. K. (2013). Incorporation of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Isolated from Fermented Cocoa Beans into Dark Chocolate: Bacterial Viability and Physicochemical Properties Analysis. *Journal of Food Quality*, 36(3), 164–171. <https://doi.org/10.1111/jfq.12028>
- Glicerina, V., Balestra, F., Rosa, M. D., Bergenstål, B., Tornberg, E., & Romani, S. (2014). The Influence of Different Processing Stages on Particle Size, Microstructure, and Appearance of Dark Chocolate. *Journal of Food Science*, 79(7), E1359–E1365.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12508>

- Gurtler, J. B., Doyle, M. P., & Kornacki, J. L. (2014). The Microbiological Safety of Spices and Low-Water Activity Foods: Correcting Historic Misassumptions. In *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices* (pp. 3–13). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_1
- Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T., Dokić, L., Pajin, B., Torbica, A., Šarić, L., & Ikonić, P. (2014). Physical and sensory aspects of maltodextrin gel addition used as fat replacers in confectionery filling systems. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.044>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Himawan, C., Starov, V. M., & Stapley, A. G. F. (2006). Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. *Advances in Colloid and Interface Science*, 122(1–3), 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.06.016>
- Hu, J.-N., Shen, J.-R., Xiong, C.-Y., Zhu, X.-M., & Deng, Z.-Y. (2018). Investigation of Lipid Metabolism by a New Structured Lipid with Medium- and Long-Chain Triacylglycerols from Cinnamomum camphora Seed Oil in Healthy C57BL/6J Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(8), 1990–1998. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05659>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Modern Food

- Microbiology. In *Springer, New York* (19.ed).
<https://doi.org/10.1007/b100840>
- Jeyarani, T., Banerjee, T., Ravi, R., & Krishna, A. G. G. (2015). Omega-3 fatty acids enriched chocolate spreads using soybean and coconut oils. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1082–1088.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1053-4>
- Kadivar, S., De Clercq, N., Mokbul, M., & Dewettinck, K. (2016). Influence of enzymatically produced sunflower oil based cocoa butter equivalents on the phase behavior of cocoa butter and quality of dark chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.006>
- Kavadia, M. R., Yadav, M. G., Odaneth, A. A., & Lali, A. M. (2018). Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. *Biotechnology Reports*, 18, e00246. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00246>
- Kim, B. H., & Akoh, C. C. (2015). Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. *Journal of Food Science*, 80(8), C1713–C1724. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12953>
- Kinouchi, F. L., Maia, D. C. G., de Abreu Ribeiro, L. C., Placeres, M. C. P., de Valdez, G. F., Colombo, L. L., ... Carlos, I. Z. (2012). A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4144–4148.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.038>
- Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Szczepaniak, O.,

- Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., ... Cielecka-Piontek, J. (2019). Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. *Food & Function*, 10(2), 997–1006. <https://doi.org/10.1039/C8FO02099J>
- Konar, N., Özhan, B., Artik, N., & Poyrazoglu, E. S. (2014). Using polydextrose as a prebiotic substance in milk chocolate: effects of process parameters on physical and rheological properties. *CyTA - Journal of Food*, 12(2), 150–159. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.807437>
- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S., & Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.002>
- Kono, H., Fujii, H., Ishii, K., Hosomura, N., & Ogiku, M. (2010). Dietary medium-chain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Translational Research*, 155(3), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2009.08.011>
- Kornacki, J. L., Gurtler, J. B., & Stawick, B. A. (2015). 9. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.014>
- Korrapati, D., Jeyakumar, S. M., Putcha, U. K., Mendu, V. R., Ponday, L. R., Acharya, V., ... Vajreswari, A. (2018). Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma HDL-cholesterol and insulin sensitivity in healthy

- men with normal BMI compared to peanut oil. *Clinical Nutrition*, 38(4), 1956. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.026>
- Laličić-Petronijević, J., Popov-Raljić, J., Obradović, D., Radulović, Z., Paunović, D., Petrušić, M., & Pezo, L. (2015). Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. *Journal of Functional Foods*, 15, 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.046>
- Lee, Y., Tang, T., & Lai, O. (2012). Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *Journal of Food Science*, 77(8), R137–R144. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02793.x>
- Lemarié, F., Beauchamp, E., Legrand, P., & Rioux, V. (2016). Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*, 120, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.002>
- Liu, Y. (2015). Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0040-1>
- Malićanin, M., Rac, V., Antić, V., Antić, M., Palade, L. M., Kefalas, P., & Rakić, V. (2014). Content of Antioxidants, Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Grape Seed Oil Obtained by Ultra Sound Assisted Extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 989–999. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2441-2>

- Mandal, S., Hati, S., Puniya, A. K., Singh, R., & Singh, K. (2013). Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 1031–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00759.x>
- Manzocco, L., Calligaris, S., Camerin, M., Pizzale, L., & Nicoli, M. C. (2014). Prediction of firmness and physical stability of low-fat chocolate spreads. *Journal of Food Engineering*, 126, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.042>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Marten, B., Pfeuffer, M., & Schrezenmeir, J. (2006). Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*, 16(11), 1374–1382. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.015>
- Mayfield, S., Van de Walle, D., Delbaere, C., Shinn, S. E., Proctor, A., Dewettinck, K., & Patel, A. (2015). CLA-Rich Chocolate Bar and Chocolate Paste Production and Characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(11–12), 1633–1642. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2740-2>
- McGill, J., & Hartel, R. W. (2018). Investigation into the Microstructure, Texture and Rheological Properties of Chocolate Ganache. *Journal of Food Science*, 83(3), 689–699. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14053>
- Mirković, M., Seratlić, S., Kilcawley, K., Mannion, D., Mirković, N., &

- Radulović, Z. (2018). The Sensory Quality and Volatile Profile of Dark Chocolate Enriched with Encapsulated Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bacteria. *Sensors*, 18(8), 2570. <https://doi.org/10.3390/s18082570>
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
- Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, 225(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0379-9>
- Norhayati, H., Suzielawanis, I. R., & Khan, A. M. (2013). Effect of storage conditions on quality of prebiotic dark chocolate. *Malaysian Journal of Nutrition*, 19(1).
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., & Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993–998. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>
- Ostrowska-Ligęza, E., Górską, A., Wirkowska-Wojdyła, M., Bryś, J., Dolatowska-Żebrowska, K., Shamilowa, M., & Ratusz, K. (2018). Thermogravimetric characterization of dark and milk chocolates at different processing stages. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 134(1), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7091->

- Patel, A. R., Rajarethinem, P. S., Grędowska, A., Turhan, O., Lesaffer, A., De Vos, W. H., ... Dewettinck, K. (2014). Edible applications of shellac oleogels: spreads, chocolate paste and cakes. *Food Funct.*, 5(4), 645–652. <https://doi.org/10.1039/C4FO00034J>
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008>
- Prasanth Kumar, P. K., Jeyarani, T., & Gopala Krishna, A. G. (2016). Physicochemical characteristics of phytonutrient retained red palm olein and butter-fat blends and its utilization for formulating chocolate spread. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 3060–3072. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2279-8>
- Rossi, E. A., Cavallini, D. C. U., Carlos, I. Z., Vendramini, R. C., Dâmaso, A. R., & de Valdez, G. F. (2008). Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. *European Food Research and Technology*, 228(2), 275–282. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0932-9>
- Rossini, K., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2011). Changes in the color of white chocolate during storage: potential roles of lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions. *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 305–311. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0207-x>

- Sengupta, A., & Ghosh, M. (2011). Hypolipidemic effect of mustard oil enriched with medium chain fatty acid and polyunsaturated fatty acid. *Nutrition*, 27(11–12), 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.010>
- Sivieri, K., Spinardi-Barbisan, A. L. T., Barbisan, L. F., Bedani, R., Pauly, N. D., Carlos, I. Z., ... Rossi, E. A. (2008). Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *European Food Research and Technology*, 228(2), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0927-6>
- Son, Y.-J., Choi, S.-Y., Yoo, K.-M., Lee, K.-W., Lee, S.-M., Hwang, I.-K., & Kim, S. (2018). Anti-blooming effect of maltitol and tagatose as sugar substitutes for chocolate making. *LWT*, 88, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.018>
- TACO. (2011). Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. *Nepa – Núcleo de Estudos e Pesquisas Em Alimentação*. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0086-x>
- Toker, O. S., Konar, N., Palabiyik, I., Rasouli Pirouzian, H., Oba, S., Polat, D. G., ... Sagdic, O. (2018). Formulation of dark chocolate as a carrier to deliver eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effects on product quality. *Food Chemistry*, 254, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.019>
- Van Schalkwijk, D. B., Pasma, W. J., Hendriks, H. F. J., Verheij, E. R., Rubingh, C. M., Van Bochove, K., ... De Graaf, A. A. (2014). Dietary

- medium chain fatty acid supplementation leads to reduced VLDL lipolysis and uptake rates in comparison to linoleic acid supplementation. *PLoS ONE*, 9(7), e100376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100376>
- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.016>
- Wang, Y., Xia, L., Xu, X., Xie, L., & Duan, Z. (2012). Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.02.003>
- Willett, S. A., Martini, S., & Akoh, C. C. (2019). Enzymatic Modification of Menhaden Oil to Incorporate Caprylic and/or Stearic Acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(7), 761–775. <https://doi.org/10.1002/aocs.12227>
- Xie, W., & Hu, P. (2016). Production of Structured Lipids Containing Medium-Chain Fatty Acids by Soybean Oil Acidolysis Using SBA-15-pr-NH₂ – HPW Catalyst in a Heterogeneous Manner. *Organic Process Research & Development*, 20(3), 637–645. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00381>
- Yüksel-Bilsel, A., & Şahin-Yeşilçubuk, N. (2019). Production of probiotic kefir fortified with encapsulated structured lipids and investigation of matrix effects by means of oxidation and in vitro digestion studies. *Food*

Chemistry, 296(February), 17–22.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.181>

Zhao, X., Wang, X.-D., Liu, X., Zhu, W., Mei, Y., Li, W., & Wang, J. (2015).

Structured lipids enriched with unsaturated fatty acids produced by enzymatic acidolysis of silkworm pupae oil using oleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(6), 879–889.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.201400438>

Żyżelewicz, D., Nebesny, E., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2010). Effect of milk chocolate supplementation with lyophilised *Lactobacillus* cells on its attributes. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(No. 5), 392–406.

<https://doi.org/10.17221/217/2009-CJFS>

Figuras

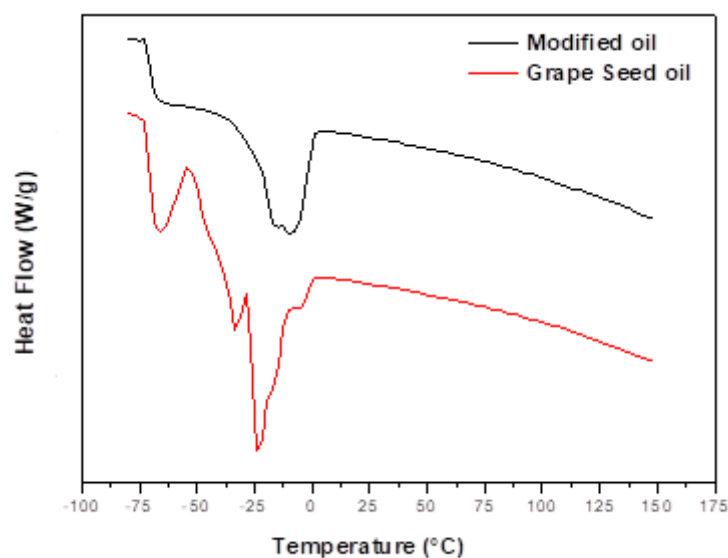


Fig. 1. Curvas DSC: perfis de fusão do óleo de semente de uva antes e após a reação de acidólise enzimática em um reator de leito fixo (óleo/cáprico: 1:3, p/p, 45 °C).

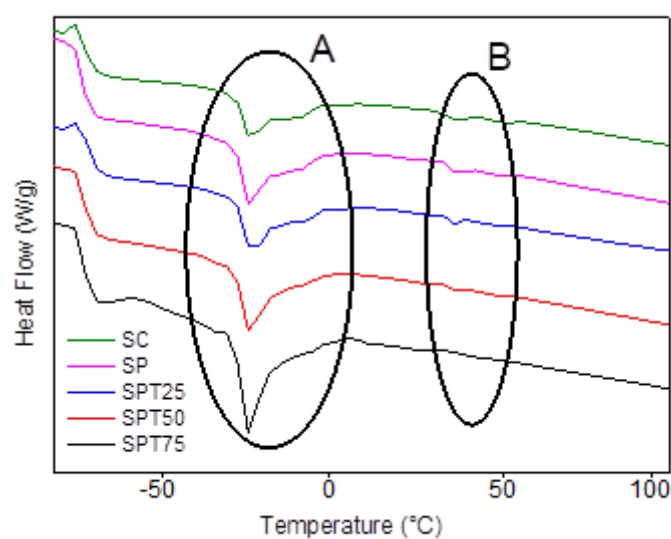


Fig. 2. Curvas DSC: perfis de fusão dos *spreads* de chocolate com adição de TAG modificado em diferentes proporções: SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probióticos; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

Tabelas

Tabela 1. Composição proximal dos *spreads* de chocolate.

	Tratamentos				
	SC	SP	SPT25	SPT50	SPT75
Cinzas (%)	2.08±0.03 ^a	2.01±0.02 ^a	2.02±0.02 ^a	2.07±0.06 ^a	2.01±0.03 ^a
Proteínas (%)	7.74±0.25 ^a	7.28±0.24 ^a	7.22±0.55 ^a	7.80±0.33 ^a	7.45±0.06 ^a
Lipídeos (%)	43.91±1.79 ^a	43.70±1.48 ^a	42.83±1.01 ^a	42.81±1.03 ^a	44.25±0.75 ^a
Umidade (%)	0.18±0.09 ^a	0.13±0.03 ^a	0.23±0.07 ^a	0.13±0.03 ^a	0.16±0.09 ^a
Carboidratos(%)	46.09±2.11 ^a	46.88±1.66 ^a	47.70±1.49 ^a	47.19±1.31 ^a	46.13±0.74 ^a
kcal (kcal/100g)	610.54±8.65 ^a	609.95±7.48 ^a	605.18±5.32 ^a	605.24±5.18 ^a	612.54±4.02 ^a
Atividade de água (A _w)	0.40±0.02 ^a	0.40±0.01 ^a	0.40±0.01 ^a	0.37±0.02 ^a	0.38±0.02 ^a

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

Tabela 2. Parâmetros de cor dos diferentes tratamentos dos *spreads*

	Parâmetros de Cor				
	L*	a*	b*	C*	h°
SC	1.83±0.35 ^a	1.59±0.46 ^a	1.54±0.26 ^a	2.09±0.73 ^a	41.40±1.48 ^b
SP	0.17±0.02 ^c	0.20±0.05 ^b	0.22±0.02 ^c	0.30±0.04 ^b	47.51±7.76 ^{a,b}
SPT25	0.37±0.33 ^{b,c}	0.18±0.04 ^b	0.19±0.01 ^c	0.25±0.02 ^b	49.66±2.40 ^a
SPT50	0.19±0.05 ^c	0.17±0.04 ^b	0.24±0.04 ^c	0.29±0.05 ^b	54.35±6.46 ^a
SPT75	0.97±0.14 ^b	0.72±0.08 ^a	0.68±0.08 ^b	0.99±0.11 ^a	43.40±1.65 ^{a,b}

L*: luminosidade; a*: vermelho/verde; b*: amarelo/verde; C*: croma; h°: ângulo hue. Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p < 0.05) (n=5). SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

Tabela 3. Características físico-químicas dos *spreads* de chocolate.

Parâmetros	SC	SP	SPT25	SPT50	SPT75
<i>Reologia</i>					
Viscosidade η_{Ca} (Pa.s)*	1.45 ± 0.04 ^a	0.89 ± 0.05 ^{b,c}	0.85 ± 0.02 ^c	0.94± 0.01 ^b	nd
Limite de escoamento T_{Ca} (Pa)*	5.35 ±0.14 ^a	4.09 ± 0.23 ^b	2.54 ± 0.08 ^c	1.31 ± 0.12 ^d	nd
R ²	1.00	0.99	1.00	1.00	nd
<i>Textura</i>					
Dureza (g)*	154.70±40.13 ^a	128.20±27.04 ^a	55.61±11.83 ^b	42.17±16.04 ^b	nd
Consistência (g.sec)*	2484.42±792.87 ^a	2058.61±223.51 ^{a,b}	913.00±309.57 ^{b,c}	502.94±125.05 ^c	nd
Adesão (g)*	31.37±3.25 ^a	25.04±6.02 ^a	3.90±1.16 ^b	3.95±2.48 ^b	nd

*Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (p < 0.05). SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos. Nd= não determinado.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (%) dos *spreads* de chocolate.

Ácidos graxos	Tratamentos				
	SC	SP	SPT25	SPT50	SPT75
(C10:0) cáprico	nd	nd	1.08±0.02 ^c	1.61±0.11 ^b	1.91±0.01 ^a
(C16:0) palmítico	14.58±1.75 ^a	12.92±0.45 ^a	12.67±0.02 ^a	12.24±0.15 ^a	11.76±0.40 ^a
(C18:0) esteárico	5.58±0.27 ^b	5.39±0.03 ^{b,c}	6.21±0.08 ^a	5.25±0.06 ^{b,c}	4.92±0.01 ^c
(C18:1) oléico	38.87±1.08 ^a	38.51±0.53 ^{a,b}	39.60±0.45 ^a	37.29±0.33 ^{a,b}	36.28±0.08 ^b
(C18:2) linoléico	35.48±0.96 ^{b,c}	37.30±0.40 ^{a,b}	34.95±0.47 ^c	38.17±0.40 ^a	39.36±0.20 ^a
(C18:3) linolênico	2.85±0.03 ^c	3.09±0.03 ^b	2.88±0.04 ^c	3.13±0.02 ^b	3.50±0.01 ^a
(C20:0) araquídico	1.14±0.77 ^a	0.84±0.24 ^a	0.84±0.42 ^a	0.75±0.36 ^a	0.75±0.28 ^a
(C20:1) gadoléico	0.50±0.26 ^a	0.60±0.04 ^a	0.50±0.25 ^a	0.49±0.24 ^a	0.57±0.15 ^a
(C22:0) behênico	1.01±0.45 ^a	1.34±0.11 ^a	1.28±0.26 ^a	1.07±0.21 ^a	0.94±0.23 ^a
Σ ácidos graxos saturados	22.31	20.49	22.08	20.92	20.28
Σ ácidos graxos insaturados	77.70	79.50	77.93	79.08	79.71
MUFA	39.37	39.11	40.10	37.78	36.85
PUFA	38.33	40.39	37.83	41.30	42.86

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

nd não detectado.

Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)

Tabela 5. Temperatura *onset* de fusão (T_{onset}), temperatura de pico de fusão (T_{peak}), entalpia de fusão (ΔH) para o óleo de semente de uva antes e após a reação.

	T_{onset1} (°C)	T_{peak1} (°C)	T_{onset2} (°C)	T_{peak2} (°C)	T_{onset3} (°C)	T_{peak3} (°C)	$\Delta H 1$ (J/g)	$\Delta H 2$ (J/g)	$\Delta H 3$ (J/g)
Óleo de uva	-62.80	-53.83	-38.51	-33.23	-27.41	-23.29	15.78	6.35	38.93
TAG modificado	-40.37	-9.08	-	-	-	-	68.20	-	-

Tabela 6. Temperatura *onset* de fusão (T_{onset}), temperatura de pico de fusão (T_{peak}), entalpia de fusão (ΔH) para os *spreads* de chocolate.

Tratamentos	$T_{onset 1}$ (°C)	T_{peak1} (°C)	$T_{onset 2}$ (°C)	$T_{peak 2}$ (°C)	$\Delta H 1$ (J/g)	$\Delta H 2$ (J/g)
SC	-27.14	-21.71	33.13	38.29	20.68	1.90
SP	-27.23	-22.06	34.34	38.10	26.53	1.80
SPT25	-27.18	-21.55	34.50	36.95	24.89	1.16
SPT50	-27.42	-22.23	34.14	36.27	25.78	1.06
SPT75	-27.75	-22.41	-	-	32.40	-

SC – sem adição de TAGs modificados e probióticos; SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

Tabela 7. Viabilidade celular (log UFC/g) do microrganismo probiótico (*E. faecium* CRL 183) nos *spreads* durante o armazenamento a 20°C.

Tempo de armazenamento (dias)	Tratamentos			
	SP	SPT25	SPT50	SPT75
T0	7.91±0.19 ^{aC}	8.74±0.13 ^{aB}	8.60±0.11 ^{aB}	9.25±0.07 ^{aA}
T30	8.55±0.13 ^{aA}	8.63±0.31 ^{aA}	8.62±0.15 ^{aA}	8.49±0.20 ^{bA}
T60	8.46±0.15 ^{aA}	8.46±0.15 ^{aA}	8.33±0.35 ^{aA}	8.63±0.31 ^{bA}
T90	8.40±0.17 ^{aA,B}	8.68±0.07 ^{aA}	8.57±0.12 ^{aA,B}	8.26±0.13 ^{bB}
T120	8.03±0.08 ^{aB}	8.44±0.18 ^{aA}	8.39±0.14 ^{aA}	8.23±0.05 ^{bA,B}
T150	8.42±0.27 ^{aA}	8.72±0.07 ^{aA}	8.39±0.15 ^{aA}	8.54±0.14 ^{bA}
T180	8.38±0.43 ^{aA}	8.69±0.09 ^{aA}	8.33±0.35 ^{aA}	8.41±0.17 ^{bA}

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p <0,05). Médias (± desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (p <0,05). SP – sem adição de TAGs modificados e com probiótico; SPT25 – 25g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT50 – 50g/100g de TAGs modificados e probióticos; SPT75 – 75g/100g de TAGs modificados e probióticos.

Considerações finais

Foi possível produzir lipídeos estruturados do tipo MLM por acidólise enzimática de óleo de semente de uva catalisada pela Lipozyme RM IM em reator de leito fixo. A Lipozyme RM IM mostrou-se altamente estável com a incorporação do C10:0 ao longo de 120h de reação. O grau de incorporação observado mostrou como esse sistema é promissor para aplicação industrial, uma vez que foi alcançado um valor máximo de 43,0% em 54 horas de reação. Os resultados deste trabalho poderão auxiliar a indústria de alimentos na incorporação de TAG do tipo MLM, uma vez que o óleo de semente de uva mostrou-se uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados essenciais.

Os *spreads* de chocolate e avelã, com incorporação do microrganismo probiótico *E. faecium* CRL 183 e com substituição de 25g/100g e 50g/100g da gordura por TAG modificados do tipo MLM, desenvolvidos no presente estudo, apresentam potencial para atuar no controle da obesidade, melhora da absorção dos ácidos graxos essenciais, modulação do perfil lipídico e da resposta imune, em função da presença da cepa probiótica e dos TAGs modificados, sendo uma alternativa para melhorar o perfil nutricional dos alimentos e tem como função diversificar o mercado de alimentos funcionais.

Estudos adicionais para verificar o efeito dos *spreads* desenvolvidos na modulação da microbiota, obesidade, doenças inflamatórias intestinais, entre outras condições, são necessários para confirmar o potencial funcional do produto.

Referências

1. Bouaziz MA, Abbes F, Mokni A, Blecker C, Attia H, Besbes S. The addition effect of Tunisian date seed fibers on the quality of chocolate spreads. *J Texture Stud* [Internet]. 2017 Apr;48(2):143–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jtxs.12225>
2. Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, et al. The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules* [Internet]. 2019 Aug 30;24(17):3163. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/17/3163>
3. Kobus-Cisowska J, Szymanowska D, Maciejewska P, Szczepaniak O, Kmiecik D, Gramza-Michałowska A, et al. Enriching novel dark chocolate with *Bacillus coagulans* as a way to provide beneficial nutrients. *Food Funct* [Internet]. 2019;10(2):997–1006. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO02099J>
4. Patel AR, Rajarethinem PS, Grędowska A, Turhan O, Lesaffer A, De Vos WH, et al. Edible applications of shellac oleogels: spreads, chocolate paste and cakes. *Food Funct* [Internet]. 2014;5(4):645–52. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00034J>
5. Jeyarani T, Banerjee T, Ravi R, Krishna AGG. Omega-3 fatty acids enriched chocolate spreads using soybean and coconut oils. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Feb 6;52(2):1082–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1053-4>
6. Codex Alimentarius Commission. General Standard for Food Additives. *Codex Stan 192-1995*. 2015. p. 490.

7. Brasil. Resolução RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. 2005. p. 1–6.
8. Codex Alimentarius Commission. Codex Stan 256-2007 Standard For Fat Spreads and Blended Spreads. 2007. p. 1–5.
9. El-Hadad NNM, Youssef MM, Abd El-Aal MH, Abou-Gharbia HH. Utilisation of red palm olein in formulating functional chocolate spread. Food Chem [Internet]. 2011 Jan;124(1):285–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.034>
10. Zhao X, Wang X-D, Liu X, Zhu W, Mei Y, Li W, et al. Structured lipids enriched with unsaturated fatty acids produced by enzymatic acidolysis of silkworm pupae oil using oleic acid. Eur J Lipid Sci Technol [Internet]. 2015 Jun;117(6):879–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400438>
11. Reena MB, Gowda LR, Lokesh BR. Enhanced Hypocholesterolemic Effects of Interesterified Oils Are Mediated by Upregulating LDL Receptor and Cholesterol 7- α - Hydroxylase Gene Expression in Rats. J Nutr [Internet]. 2011 Jan 1;141(1):24–30. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.127027>
12. Sengupta A, Roy S, Mukherjee S, Ghosh M. Production of Medium Chain Fatty Acid Rich Mustard Oil Using Packed Bed Bioreactor. J Oleo Sci [Internet]. 2015;64(2):153–9. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/64/2/64_ess14184/_article
13. Vafeiadou K, Weech M, Altowaijri H, Todd S, Yaqoob P, Jackson KG, et al. Replacement of saturated with unsaturated fats had no impact on

- vascular function but beneficial effects on lipid biomarkers, E-selectin, and blood pressure: results from the randomized, controlled Dietary Intervention and VAScular function (DIVAS) study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2015 Jul 1;102(1):40–8. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/102/1/40/4564241>
14. Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J* [Internet]. 2006 Nov;16(11):1374–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606001609>
 15. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2009 Apr 1;89(4):1019–24. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/4/1019/4596700>
 16. Papada E, Kaliora AC, Gioxari A, Papalois A, Forbes A. Anti-inflammatory effect of elemental diets with different fat composition in experimental colitis. *Br J Nutr* [Internet]. 2014 Apr 14;111(7):1213–20. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114513003632/type/journal_article
 17. Xie W, Zhang C. Propylsulfonic and arenesulfonic functionalized SBA-15 silica as an efficient and reusable catalyst for the acidolysis of soybean oil with medium-chain fatty acids. *Food Chem* [Internet]. 2016 Nov;211:74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.025>
 18. Cao Y, Qi S, Zhang Y, Wang X, Yang B, Wang Y. Synthesis of

- Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification of Triacetin with Camellia Oil Methyl Esters and Preliminary Evaluation of their Plasma Lipid-Lowering Effect in Mice. *Molecules* [Internet]. 2013 Mar 25;18(4):3733–44. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/3733>
19. Liu Y. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2015 Dec 9;6(1):41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40104-015-0040-1>
 20. Xie W, Hu P. Production of Structured Lipids Containing Medium-Chain Fatty Acids by Soybean Oil Acidolysis Using SBA-15-pr-NH₂-HPW Catalyst in a Heterogeneous Manner. *Org Process Res Dev* [Internet]. 2016 Mar 18;20(3):637–45. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.oprd.5b00381>
 21. Abed SM, Wei W, Ali AH, Korma SA, Mousa AH, Hassan HM, et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *LWT* [Internet]. 2018 Jul;93(March):306–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.057>
 22. Yüksel-Bilsel A, Şahin-Yeşilçubuk N. Production of probiotic kefir fortified with encapsulated structured lipids and investigation of matrix effects by means of oxidation and in vitro digestion studies. *Food Chem*. 2019;296(February):17–22.
 23. Kavadia MR, Yadav MG, Odaneth AA, Lali AM. Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. *Biotechnol Reports* [Internet].

- 2018 Jun;18:e00246. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00246>
24. Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol* [Internet]. 2013 May 15;16(3):1–38. Available from:
<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/1417>
 25. Kadivar S, De Clercq N, Mokbul M, Dewettinck K. Influence of enzymatically produced sunflower oil based cocoa butter equivalents on the phase behavior of cocoa butter and quality of dark chocolate. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2016 Mar;66:48–55. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815302243>
 26. Yüksel A, Şahin-Yeşilçubuk N. Encapsulation of structured lipids containing medium- and long chain fatty acids by complex coacervation of gelatin and gum arabic. *J Food Process Eng* [Internet]. 2018 Dec 12;41(8):e12907. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpe.12907>
 27. Lu J, Jin Q, Wang X, Wang X. Preparation of medium and long chain triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a solvent-free system. *Process Biochem* [Internet]. 2017 Mar;54:89–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.015>
 28. Žáček P, Bukowski M, Mehus A, Johnson L, Zeng H, Raatz S, et al. Dietary saturated fatty acid type impacts obesity-induced metabolic

- dysfunction and plasma lipidomic signatures in mice. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2019 Feb;64:32–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286318306351>
29. Esperón-Rojas AA, Baeza-Jiménez R, Cano-Sarmiento C, García HS. Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *J Oleo Sci* [Internet]. 2017;66(9):991–6. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/66/9/66_ess17010/_article
 30. Wang Y, Xia L, Xu X, Xie L, Duan Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2012 Oct;90(4):707–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.02.003>
 31. Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chem* [Internet]. 2011 Aug;127(3):993–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>
 32. Bourlieu C, Bouhallab S, Lopez C. Biocatalyzed modifications of milk lipids: applications and potentialities. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2009 Oct;20(10):458–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409001794>
 33. Lee Y, Tang T, Lai O. Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *J Food Sci* [Internet]. 2012 Aug;77(8):R137–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02793.x>

34. Hu J-N, Shen J-R, Xiong C-Y, Zhu X-M, Deng Z-Y. Investigation of Lipid Metabolism by a New Structured Lipid with Medium- and Long-Chain Triacylglycerols from *Cinnamomum camphora* Seed Oil in Healthy C57BL/6J Mice. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Feb 28;66(8):1990–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b05659>
35. Korrapati D, Jeyakumar SM, Putcha UK, Mendu VR, Ponday LR, Acharya V, et al. Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma HDL-cholesterol and insulin sensitivity in healthy men with normal BMI compared to peanut oil. *Clin Nutr* [Internet]. 2018 Dec;38(4):1956. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561419302134>
36. Sengupta A, Ghosh M. Hypolipidemic effect of mustard oil enriched with medium chain fatty acid and polyunsaturated fatty acid. *Nutrition* [Internet]. 2011 Nov;27(11–12):1183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.010>
37. Courchesne-Loyer A, Lowry C-M, St-Pierre V, Vandenberghe C, Fortier M, Castellano C-A, et al. Emulsification Increases the Acute Ketogenic Effect and Bioavailability of Medium-Chain Triglycerides in Humans. *Curr Dev Nutr* [Internet]. 2017 Jul;1(7):e000851. Available from: <https://academic.oup.com/cdn/article/4259865>
38. Martínez I, Perdicaro DJ, Brown AW, Hammons S, Carden TJ, Carr TP, et al. Diet-Induced Alterations of Host Cholesterol Metabolism Are Likely To Affect the Gut Microbiota Composition in Hamsters. *Appl*

- Environ Microbiol [Internet]. 2013 Jan 15;79(2):516–24. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03046-12>
39. Carey H V., Assadi-Porter FM. The Hibernator Microbiome: Host-Bacterial Interactions in an Extreme Nutritional Symbiosis. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2017 Aug 21;37(1):477–500. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071816-064740>
 40. Ferrara F, Tedin L, Pieper R, Meyer W, Zentek J. Influence of medium-chain fatty acids and short-chain organic acids on jejunal morphology and intra-epithelial immune cells in weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* [Internet]. 2017 Jun;101(3):531–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12490>
 41. Kono H, Fujii H, Ishii K, Hosomura N, Ogiku M. Dietary medium-chain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res* [Internet]. 2010 Mar;155(3):131–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2009.08.011>
 42. Soumanou MM, Pérignon M, Villeneuve P. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2013 Mar;115(3):270–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201200084>
 43. Kim J, Chung M-Y, Choi H-D, Choi I-W, Kim BH. Enzymatic Synthesis of Structured Monogalactosyldiacylglycerols Enriched in Pinolenic Acid. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Aug 12;66(30):8079–85. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b02599>

44. Araújo MEMB de, Campos PRB, Alberto TG, Contesini FJ, Carvalho P de O. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016 Oct;47(4):1006–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216305676>
45. Zou X-G, Hu J-N, Zhao M-L, Zhu X-M, Li H-Y, Liu X-R, et al. Lipozyme RM IM-Catalyzed Acidolysis of Cinnamomum camphora Seed Oil with Oleic Acid To Produce Human Milk Fat Substitutes Enriched in Medium-Chain Fatty Acids. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2014 Oct 29;62(43):10594–603. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf503691p>
46. Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2015 Jan;41:1447–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114008089>
47. Chnadhapuram M, Sunkireddy YR. Preparation of palm olein enriched with medium chain fatty acids by lipase acidolysis. *Food Chem* [Internet]. 2012 May;132(1):216–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.059>
48. Moreira DKT, Santos PS, Gambero A, Macedo GA. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity. *Food Res Int* [Internet]. 2017 May;95:52–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.005>

49. Salvi HM, Kamble MP, Yadav GD. Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase: Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 23;184(2):630–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-017-2572-7>
50. Kadhum AAH, Shamma MN. Edible lipids modification processes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017 Jan 2;57(1):48–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2013.848834>
51. Poppe JK, Matte CR, de Freitas VO, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Záchia Ayub MA. Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2018 Jul;34(4):952–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2650>
52. Wang J, Liu X, Wang X, Dong T, Zhao X, Zhu D, et al. Selective synthesis of human milk fat-style structured triglycerides from microalgal oil in a microfluidic reactor packed with immobilized lipase. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016 Nov;220:132–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.023>
53. Zenevicz MCP, Jacques A, Silva MJA, Furigo A, Oliveira V, de Oliveira D. Study of a reactor model for enzymatic reactions in continuous mode coupled to an ultrasound bath for esters production. *Bioprocess Biosyst Eng* [Internet]. 2018 Nov 16;41(11):1589–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-018-1985-1>

54. Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 Sep;33(5):511–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>
55. Feng X, Patterson DA, Balaban M, Fauconnier G, Emanuelsson EAC. The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. *Chem Eng J* [Internet]. 2013 Apr;221:407–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894713001836>
56. Ganguly S, Nandi S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. *Biochem Eng J* [Internet]. 2015 Oct;102:2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.020>
57. Ma B, Yu H, Pan J, Xu J. High-yield production of enantiopure 2-hydroxy-2-(2'-chlorophenyl) acetic acid by long-term operation of a continuous packed bed reactor. *Biochem Eng J* [Internet]. 2016 Mar;107:45–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.002>
58. Costa CM, Osório NM, Canet A, Rivera I, Sandoval G, Valero F, et al. Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2018 Jan;120(1):1700320. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201700320>
59. Bassan N, Rodrigues RH, Monti R, Tecelão C, Ferreira-Dias S, Paula

- A V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. LWT [Internet]. 2019 Jan;99(May):600–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.013>
60. Ifeduba EA, Akoh CC. Modification of Stearidonic Acid Soybean Oil by Immobilized *Rhizomucor miehei* Lipase to Incorporate Caprylic Acid. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2014 Jun 22;91(6):953–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2433-2>
 61. Silroy S, Sengupta A, Bhattacharyya DK, Ghosh M. Optimization of reaction parameters of acidolysis reaction between mustard oil and capric acid by using *Thermomyces lanuginosus* lipase. J Food Sci Technol [Internet]. 2014 Apr 11;51(4):715–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0543-5>
 62. Amri Z, Lazreg-Aref H, Mekni M, El-Gharbi S, Dabbaghi O, Mechri B, et al. Oil Characterization and Lipids Class Composition of Pomegranate Seeds. Biomed Res Int [Internet]. 2017;2017:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2037341/>
 63. Hashemi SMB, Mousavi Khaneghah A, Nikmaram N, Raeisi S, Rahman MS, Avallone S. Heating, microwave and UV irradiation effects on oxidative stability of Sardasht red grape (*Vitis vinifera* cultiv. Sardasht) seed oil. Int J Food Sci Technol [Internet]. 2017 Jun;52(6):1341–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.13421>
 64. Maszewska M, Florowska A, Dłużewska E, Wroniak M, Marciniak-

- Lukasiak K, Żbikowska A. Oxidative Stability of Selected Edible Oils. *Molecules* [Internet]. 2018 Jul 17;23(7):1746. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1746>
65. Sabir A, Unver A, Kara Z. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agric* [Internet]. 2012 Jul;92(9):1982–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5571>
 66. Ma Z, Zhang H. Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants* [Internet]. 2017 Sep 15;6(3):71. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/3/71>
 67. Taghvaei M, Jafari SM. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Mar 6;52(3):1272–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1080-1>
 68. CODEX. SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources. FAO. 2017.
 69. Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem* [Internet]. 2015 Jan;167:205–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614009807>
 70. Malićanin M, Rac V, Antić V, Antić M, Palade LM, Kefalas P, et al. Content of Antioxidants, Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of

- Grape Seed Oil Obtained by Ultra Sound Assisted Extraction. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2014 Jun 28;91(6):989–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2441-2>
71. Chambre DR, Tociu M, Stanescu MD, Popescu C. Influence of composition on the thermal behavior of oils extracted from the seeds of some Romanian grapes. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2019 Nov 8;99(14):6324–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.9909>
 72. Zhang H, Zheng M, Shi J, Tang H, Deng Q, Huang F, et al. Enzymatic preparation of “functional oil” rich in feruloylated structured lipids with solvent-free ultrasound pretreatment. *Food Chem* [Internet]. 2018 May;248:272–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617320356>
 73. Irandoost P, Ebrahimi-Mameghani M, Pirouzpanah S. Does grape seed oil improve inflammation and insulin resistance in overweight or obese women? *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2013 Sep 19;64(6):706–10. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2013.775228>
 74. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989 May;66(5):365-78.
 75. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 Aug

- 10;11(8):506–14. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
76. FAO / WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Expert Consult report, Córdoba, Argentina. 2001;
 77. Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019 Aug 2;103(16):6463–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-019-09978-7>
 78. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 15;9(9):1021. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>
 79. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018 - Diário Oficial da União - Imprensa Nacional. Diário Oficial da União. 2018.
 80. Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, et al. Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 Jun;101(6):4822–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218302352>
 81. Walsham ADS, MacKenzie DA, Cook V, Wemyss-Holden S, Hews CL,

- Juge N, et al. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic Escherichia coli Adherence to Human Intestinal Epithelium. Front Microbiol [Internet]. 2016 Mar 1;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00244>
82. Cavallini DC, Suzuki JY, Abdalla DS, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. Lipids Health Dis [Internet]. 2011;10(1):126. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-10-126>
 83. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Rev Bras Ciências Farm [Internet]. 2006 Mar;42(1):1–16. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 84. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol [Internet]. 2000 Dec;84(3):197–215. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003758>
 85. Bengoa AA, Iraporda C, Acurcio LB, de Cicco Sandes SH, Costa K, Moreira Guimarães G, et al. “Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir.” Food Res Int [Internet]. 2019 Sep;123:48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691930273X>
 86. Celiberto LS, Bedani R, Rossi EA, Cavallini DCU. Probiotics: The

- Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2015 May 21;00–00. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.941457>
87. Piatek J, Gibas-Dorna M, Olejnik A, Krauss H, Wierzbicki K, Zukiewicz-Sobczak W, et al. The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination - in vitro study. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(1):99–102.
 88. Matsuoka K, Uemura Y, Kanai T, Kunisaki R, Suzuki Y, Yokoyama K, et al. Efficacy of *Bifidobacterium breve* Fermented Milk in Maintaining Remission of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2018 Jul 15;63(7):1910–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-018-4946-2>
 89. Tamaki H, Nakase H, Inoue S, Kawanami C, Itani T, Ohana M, et al. Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig Endosc* [Internet]. 2016 Jan;28(1):67–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/den.12553>
 90. Peng L, Zhong Y, Wang A, Jiang Z. Probiotics combined with aminosalicyclic acid affiliates remission of ulcerative colitis: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Jan 31;39(1):BSR20180943. Available from: <http://biosciorep.org/lookup/doi/10.1042/BSR20180943>
 91. Laličić-Petronijević J, Popov-Raljić J, Obradović D, Radulović Z,

- Paunović D, Petrušić M, et al. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. J Funct Foods [Internet]. 2015 May;15:541–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615001632>
92. Riboldi GP, Frazzon J, D'Azevedo PA, Frazzon APG. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2009 Mar;40(1):125–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 93. Bedani R, Pauly-Silveira ND, Cano VSP, Valentini SR, Valdez GF de, Rossi EA. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2011 Sep;42(3):1238–47. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000300050&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 94. Cavallini DC, Abdalla DS, Vendramini RC, Bedani R, Bomdespacho LQ, Pauly-Silveira ND, et al. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. Lipids Health Dis [Internet]. 2009;8(1):40. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-8-40>
 95. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, De Oliveira MG, De Valdez GF.

- Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. Arch Latinoam Nutr. 2003;53(1).
96. Celiberto LS, Bedani R, Dejana NN, Ivo de Medeiros A, Sampaio Zuanon JA, Spolidorio LC, et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. Smidt H, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Apr 24;12(4):e0175935. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175935>
 97. Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. Eur Food Res Technol [Internet]. 2008 Dec 1;228(2):231–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-008-0927-6>
 98. Kinouchi FL, Maia DCG, de Abreu Ribeiro LC, Placeres MCP, de Valdez GF, Colombo LL, et al. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. Food Chem Toxicol [Internet]. 2012 Nov;50(11):4144–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006187>
 99. Konar N, Toker OS, Oba S, Sagdic O. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2016 Mar;49:35–44. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300297>

100. Terpou A, Mantzourani I, Galanis A, Kanellaki M, Bezirtzoglou E, Bekatorou A, et al. Employment of *L. paracasei* K5 as a Novel Potentially Probiotic Freeze-Dried Starter for Feta-Type Cheese Production. *Microorganisms* [Internet]. 2018 Dec 26;7(1):3. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/3>
101. Ye Q, Georges N, Selomulya C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Aug;78:167–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441830013X>
102. Santaella N, Cerri MO, De Paula AV. Caracterização hidrodinâmica de um reator de leito fluidizado e determinação da velocidade mínima de fluificação em função da massa de biocatalisador. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. São Carlos SP; 2017.
103. Hamam F, Budge SM. Structured and Specialty Lipids in Continuous Packed Column Reactors: Comparison of Production Using One and Two Enzyme Beds. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2010 Apr 1;87(4):385–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-009-1515-z>
104. Amini Z, Ilham Z, Ong HC, Mazaheri H, Chen W-H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Convers Manag* [Internet]. 2017 Jun;141:339–53.

Available

from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890416308391>

105. Al-Zuhair S, Almenhali A, Hamad I, Alshehhi M, Alsuwaidi N, Mohamed S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of a pilot plant. *Renew Energy* [Internet]. 2011 Oct;36(10):2605–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.05.010>

Apêndices

Apêndice 1. Material suplementar dos ensaios preliminares com diferentes configurações de reatores usados para determinação das condições ideais dos experimentos na reação de síntese enzimática de lipídeos estruturados.

Reação de acidólise para a síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir do óleo de semente de uva em reator em batelada

As reações de acidólise do óleo de semente de uva foram avaliadas em reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 3 cm, altura de 6 cm), operando em regime de batelada (Figura 1), catalisada pela Lipozyme RM IM em banho termostático a 45°C sob agitação constante de 500 rpm com agitador magnético sendo utilizada uma razão molar de 1:3 (óleo de uva:ácido cáprico) e uma porcentagem do biocatalisador de 3% e 6%. Foram coletadas amostras nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas para posterior análise da composição de ácidos graxos e do grau de incorporação.



Figura 1. Sistema operacional da reação de acidólise enzimática de óleo de semente de uva em reator de vidro encamisado, operando em regime de batelada. Fonte: O autor.

Reação de acidólise para a síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir do óleo de semente de uva em reator de leito fluidizado

As reações de acidólise do óleo de semente de uva catalisada pela Lipozyme RM IM, razão molar de 1:3 (óleo de uva:ácido cáprico) foram avaliadas em reator de coluna de leito fluidizado (diâmetro interno de 2,00 cm, altura de 18,70 cm), operando em modo batelada, com recirculação em banho termostático a 45°C (Figura 2). O reator foi preenchido com uma massa de biocatalisador de aproximadamente 3g. A mistura da reação foi bombeada continuamente através do sistema pela ação de uma bomba com vazão máxima de 300 mL/h. O ensaio foi conduzido por 48h para análise da composição de ácidos graxos e grau de incorporação.



Figura 2. Sistema operacional da reação de acidólise enzimática de óleo de semente de uva em reator de leito fluidizado. Fonte: O autor.

Reação de acidólise para a síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM) a partir do óleo de semente de uva em em reator de leito fixo

A síntese de TAG MLM por acidólise do óleo de semente de uva com ácido cáprico usando Lipozyme RM IM, relação 1:3 (óleo de uva:ácido cáprico), foi avaliada no reator de coluna de leito fixo, operando em modo contínuo, com recirculação em banho termostático a 45°C (Figura 3). O reator de coluna de leito fixo (diâmetro interno de 2,00 cm, altura de 18,70 cm) foi preenchido com uma massa de biocatalisador 3% m/m. A vazão empregada foi de 6 mL/h, correspondendo a um tempo espacial de 6 horas. Foram coletadas amostras nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h para posterior análise da composição de ácidos graxos e verificação do grau de incorporação.



Figura 3. Sistema operacional da reação de acidólise enzimática de óleo de semente de uva em reator de leito fixo. Fonte: O autor.

Resultados

Ensaio de reação de acidólise em reator de tanque agitado operando em batelada

Nesse estudo, a reação de acidólise foi conduzida utilizando lipase comercial imobilizada *sn*-1,3 específica (Lipozyme RM IM) em reator de tanque agitado em batelada para verificar a capacidade de incorporação do ácido cáprico nos TAGs. O objetivo deste ensaio foi verificar o efeito do tempo reacional e da massa de biocatalisador na cinética das reações. A Tabela 1 mostra a composição de ácidos graxos antes e após a reação de acidólise com óleo de uva em todos os tempos analisados.

Tabela 1- Composição de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) dos TAGs obtidos antes e após a reação de acidólise de óleo de uva

Ácidos graxos	Óleo de uva não modificado	Óleo de uva modificado com Lipozyme RM IM							
		3% m/m				6% m/m			
		(massa de enzima/massa de meio)				(massa de enzima/massa de meio)			
		6h	12h	24h	48h	6h	12h	24h	48h
C10:0 (Cáprico)	nd	19,37	24,62	26,13	25,99	24,77	24,74	27,32	26,73
C16:0 (Palmítico)	11,92	7,05	5,51	4,97	5,52	5,35	5,90	5,10	5,80
C18:0 (Esteárico)	4,68	2,60	1,67	1,67	1,66	1,67	1,91	1,65	1,90
C18:1n9 (Oleico)	28,11	23,35	21,93	21,65	21,29	22,28	21,73	21,05	21,05
C18:2n6 (Linoleico)	49,63	43,42	42,15	41,64	41,49	41,91	41,59	40,95	40,58
C18:3n3 (Linolênico)	5,04	4,23	4,12	3,93	4,05	4,02	4,12	3,92	3,94
C20:3 (Dihomo-linolênico)	0,62	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*nd: não detectado

Como esperado, a composição de ácidos graxos do óleo de uva foi alterada após a reação de acidólise enzimática com diminuição dos principais ácidos graxos devido a incorporação do ácido graxo de cadeia média (C10:0) no óleo de uva puro.

A partir da composição em ácidos graxos dos produtos reacionais, foram calculados os valores de grau de incorporação (GI,%) do ácido cáprico no óleo de semente de uva. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

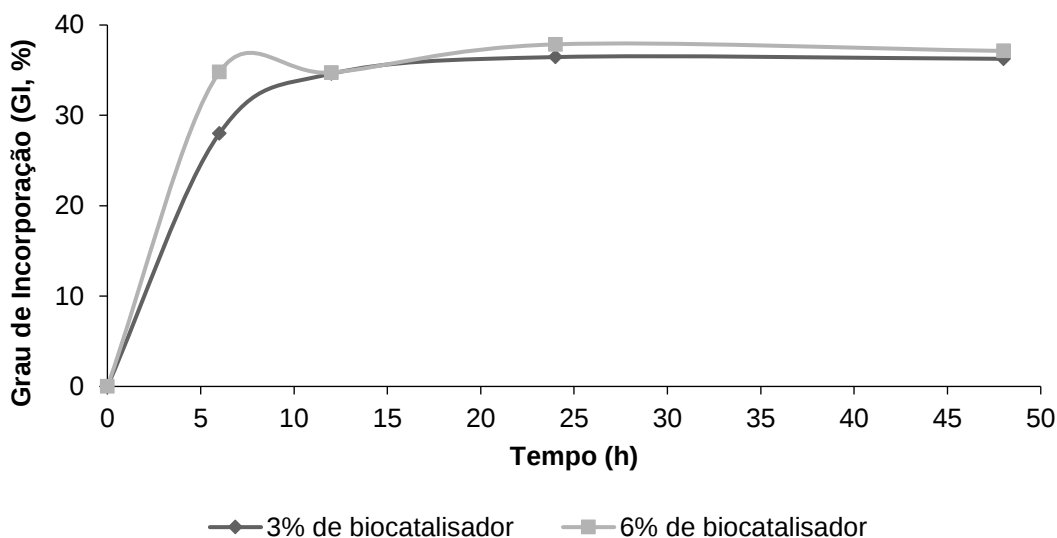


Figura 4. Grau de incorporação (GI, %) em função do tempo (h): influência da massa do biocatalisador do ácido graxo de cadeia média (C10) na reação de acidólise com óleo de uva em reator batelada.

De acordo com os resultados, observa-se que o GI do ácido cáprico no óleo de semente de uva variou de 28,00% a 37,86%, dependendo da quantidade de biocatalisador empregada. Para o sistema empregando-se menor massa de biocatalisador, obtiveram-se valores GI máximo a partir de

24 horas de reação (36,45%). Dobrando-se a quantidade do biocatalisador, o GI aumentou de 28,00 % para 34,80 % em 6 horas. A partir de 12 horas o GI obtido foi praticamente o mesmo (34,61% e 34,74%), independentemente da massa de enzima avaliada. Após as 12 horas iniciais de reação, não foram observados aumentos consideráveis nos valores de GI.

Bassan et al. (59) alcançaram valores semelhantes ao nosso estudo com um GI de 34,53% utilizando a Lipozyme RM IM em reator de tanque agitado e óleo de uva na presença de ácido cáprico e em condições otimizadas (proporção molar óleo:ácido (1:2) e carga enzimática de 8%). Observa-se que um aumento na carga enzimática promove a disponibilidade de sítios ativos, aumentando a taxa do sistema de reação e conseqüentemente, o grau de incorporação nos triglicerídeos (17,21,23,43). No entanto, uma baixa carga de enzima é necessária para que o processo enzimático seja economicamente viável em escala industrial (23,43).

Com os resultados obtidos, considerando a incorporação de ácido cáprico, o custo da Lipozyme RM IM e visando-se uma economia do processo, a concentração de 3% m/m (em relação à massa do meio) foi selecionada para as investigações posteriores das reações.

Ensaio de reação de acidólise em reator de leito fluidizado

Foram realizadas reações de acidólise, nas mesmas condições reacionais da reação anterior, em reator fluidizado operando em modo batelada com recirculação em banho termostático a 45°C por 48h e vazão de 300 mL/h para garantir a fluidização do sistema (Figura 2). A Tabela 2

mostra a composição de ácidos graxos e o grau de incorporação (GI,%) do ácido cáprico no óleo de semente de uva após reação de acidólise.

Nota-se através da composição de ácidos graxos que houve a incorporação de ácido cáprico (C10:0) no óleo de uva devido a ação da enzima *sn*-1,3 específica, atingindo um grau de incorporação após 48h de reação de 38,13% (Figura 5). A caracterização hidrodinâmica do reator de leito fluidizado e suas propriedades foram estudadas em detalhe por Santaella et al. (102), no entanto, no estudo utilizou-se o óleo de algodão, e o grau máximo de incorporação de ácido cáprico observado foi de 40,88% após 15 horas de reação. Da mesma forma, Hamam e Budge (103) relataram um GI máximo de 31,80% ao final de 12 horas de reação de acidólise enzimática catalisada pela Lipozyme RM IM e ácido cáprico na incorporação de óleo de peixe.

Tabela 2- Composição de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) e grau de incorporação (%) dos TAGs obtidos após a reação de acidólise de óleo de uva em reator de leito fluidizado.

Ácidos graxos	Óleo de uva não modificado	Óleo de uva modificado com Lipozyme RM IM	
		24h	48h
C10:0 (Cáprico)	nd	24,92	27,59
C16:0 (Palmítico)	11,92	6,91	6,51
C18:0 (Esteárico)	4,68	2,41	2,22
C18:1n9 (Oleico)	28,11	21,02	20,41
C18:2n6 (Linoleico)	49,63	40,97	39,65
C18:3n3 (Linolênico)	5,04	3,78	3,63
C20:3 (Dihomo-linolênico)	0,62	nd	nd
TOTAL	100,00	100,00	100,00

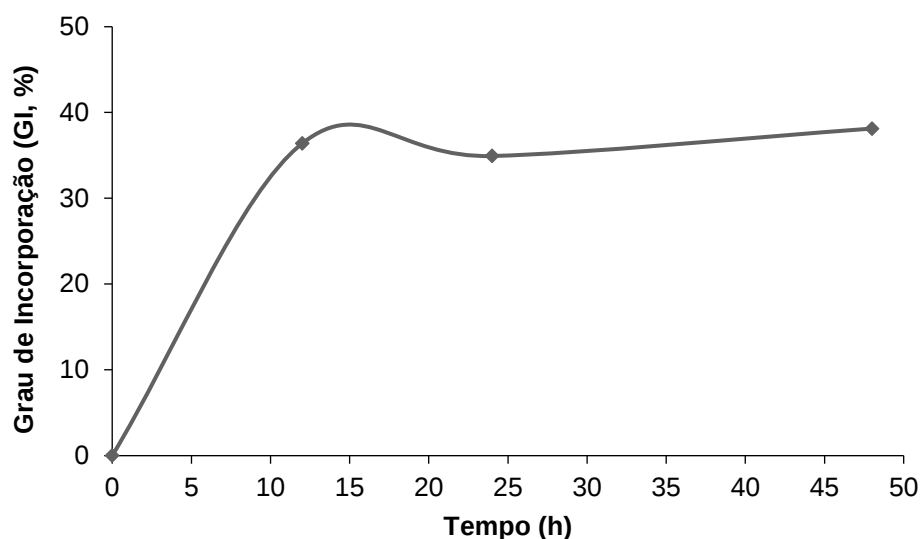


Figura 5. Grau de incorporação (GI, %) em função do tempo (h) do ácido graxo de cadeia média (C10) na reação de acidólise com óleo de uva em reator de fluidizado.

Ensaio de reação de acidólise em reator de leito fixo

Reatores contínuos de leito fixo são tradicionalmente empregados na maioria dos processos enzimáticos, devido à sua alta eficiência (51,53,104). Uma das vantagens do reator de leito fixo em relação ao reator de leito fluidizado é o maior controle da temperatura, menor vazão e degradação dos elementos internos (105). As reações envolvendo enzimas imobilizadas são preferencialmente operadas em modo contínuo para melhorar a sua produtividade e promover menor tensão de cisalhamento, evitando danos ao suporte e uma maior estabilidade enzimática a longo prazo (51).

Com o objetivo de melhorar o desempenho da reação, visando aumentar o GI e diminuir o tempo de recirculação gerando menor oxidação do produto,

foi realizado um ensaio preliminar em reator de leito fixo operando em modo contínuo (Figura 3).

Optou-se por utilizar as mesmas condições reacionais de 45°C por 48h, razão molar de 1:3 óleo:ácido, 3% m/m (em relação à massa do meio) e vazão de 6 mL/h. Nestas condições, o tempo espacial foi de 6 horas.

A Tabela 3 mostra a composição de ácidos graxos e a incorporação de ácido cáprico (C10) no óleo de semente de uva. Observam-se alterações na composição dos ácidos graxos com diminuição dos ácidos graxos de cadeia longa, principalmente, ácido oleico e linoléico.

Tabela 3- Composição de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) dos TAGs obtidos após a reação de acidólise de óleo de uva.

Ácidos graxos	Óleo de uva não modificado	Óleo de uva modificado com Lipozyme RM IM			
		6h	12h	24h	48h
C10:0 (Cáprico)	nd	23,10	24,05	24,79	24,39
C16:0 Palmítico)	11,92	6,52	6,44	6,55	6,32
C18:0 (Esteárico)	4,68	2,56	2,41	2,35	2,37
C18:1n9 (Oleico)	28,11	20,46	19,99	19,93	20,16
C18:2n6 (Linoleico)	49,63	43,46	43,11	42,50	42,99
C18:3n3 (Linolênico)	5,04	3,92	3,99	3,88	3,78
C20:3 (Dihomo-linolênico)	0,62	nd	nd	nd	nd
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

O grau de incorporação do ácido cáprico em reator de leito fixo é mostrado na Figura 6. Analisando os resultados, observa-se que o grau médio de incorporação do ácido cáprico no óleo de semente de uva foi de 35,43% no estado estacionário (24h).

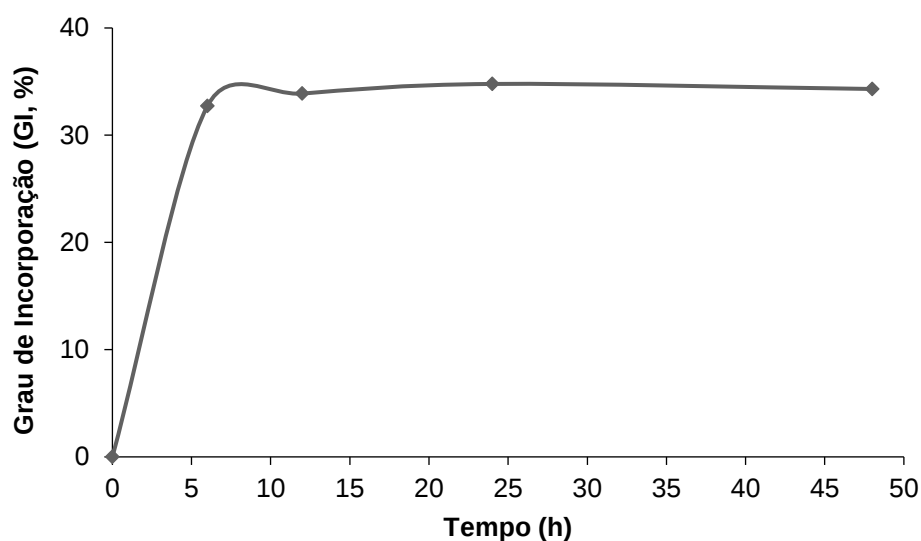
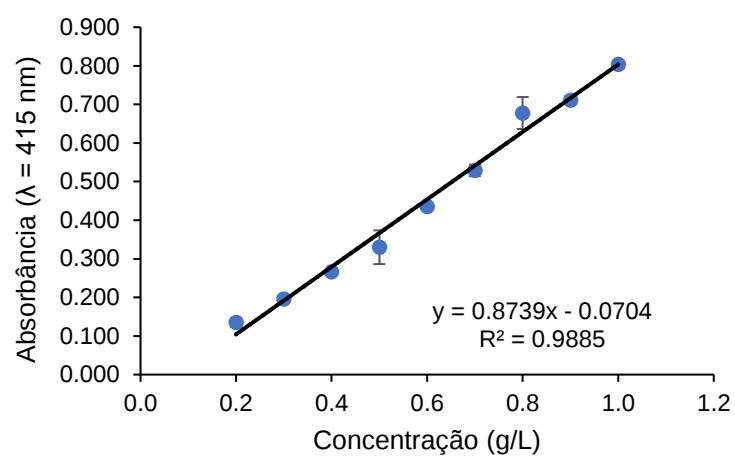


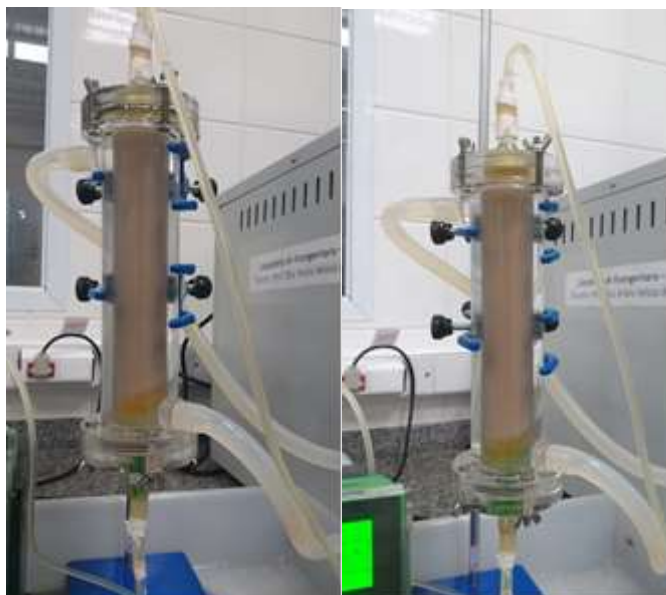
Figura 6. Grau de incorporação (GI, %) em função do tempo (h) do ácido graxo de cadeia média (C10) na reação de acidólise com óleo de uva em reator de leito fixo.

Portanto, levando-se em conta os resultados obtidos no experimento preliminar, e as vantagens de se utilizar o sistema de leito fixo, foi realizado um estudo detalhado da caracterização hidrodinâmica do reator para produção dos TAGs do tipo MLM. Além disso, foi demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, alto grau de incorporação do ácido cáprico (no estado estacionário o GI médio foi de 34,40%), utilizando o óleo

de semente de uva a 65°C e razão molar de 1:4 (óleo:ácido, respectivamente), (59).

Apêndice 2. Curva de calibração do traçador (Corante Mix Verde®).

Apêndice 3. Experimento do teste de traçador no reator de leito fixo: (a) tempo de início da entrada no traçador na base do reator (b) tempo intermediário.



(a)

(b)

Apêndice 4. Sistema operacional da reação de acidólise enzimática de óleo de semente de uva em reator de leito fixo (a) e em reator de leito fixo associados (b).

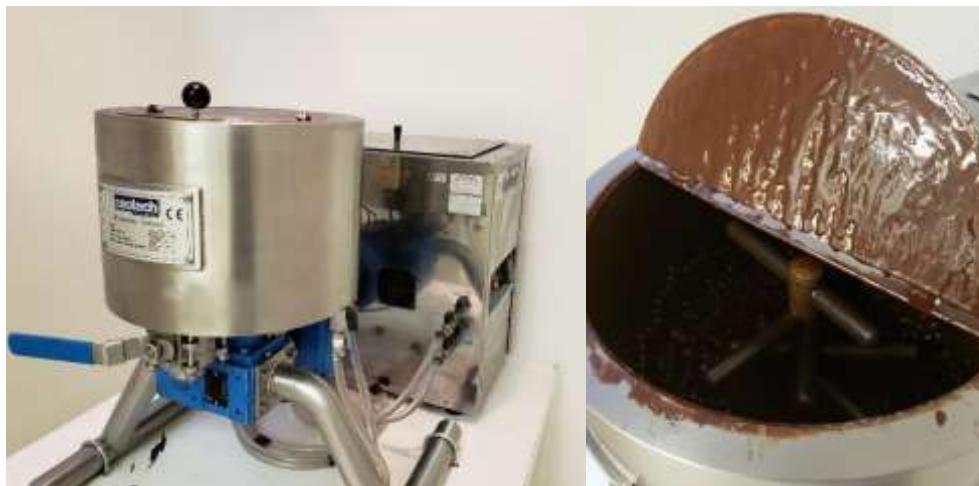
(a)



(b)



Apêndice 5. Processamento dos *spreads* de chocolate e avelã em moinho de esferas.



Apêndice 6. Formulações de *spreads* de chocolate e avelã

