

PAULA RENATA BUENO CAMPOS

**ACIDÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE  
TRIACILGLICERÓIS ESTRUTURADOS FUNCIONAIS**

Bragança Paulista

2010

i

PAULA RENATA BUENO CAMPOS

**ACIDÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE  
TRIACILGLICERÓIS ESTRUTURADOS FUNCIONAIS**

Orientadora

Profa Dra Patrícia de Oliveira Carvalho

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação *Strictu Sensu*  
em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2010

ii

QU 90 Campos, Paula Renata Bueno.

C216a            Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilgliceróis estruturados funcionais / Paula Renata Bueno Campos. -- Bragança Paulista, 2010.

69 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Óleo de soja. 2. Ácidos graxos poliinsaturados.  
3. Triacilglicerol estruturado. 4. Lípase. 5. Acidólise.

I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



CAMPOS, Paula Renata Buenos. "Acidólise Enzimática de Óleo de Soja para Obtenção de Triacilgliceróis Estruturados Funcionais". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e quatro de Junho de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª. Dr.ª. Patrícia de Oliveira Carvalho - Orientadora e Presidente**  
**Universidade São Francisco**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª. Dr.ª. Ildêize Barbosa da Silva Cunha**  
**Universidade Estadual de Campinas**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Maximiliano D'Addio Neffs**  
**Universidade de São Paulo**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

*A minha mãe Líbia Bueno Campos e aos meus irmãos*

*Pelo exemplo de força e garra.*

*Amo todos vocês!*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho pela sua valiosa orientação, ensinamentos e amizade.

Ao responsável técnico Fabiano Augusto Sallowicz.

Aos técnicos: Isabel Biaseto, Sônia, Leandro, Denilson e Everaldo pela amizade e apoio que me proporcionaram as condições ideais para realização de todos os experimentos desta dissertação de mestrado.

A todos os colegas do laboratório de biotecnologia da USF, em especial a Maria Elisa Melo Branco de Araújo e a Tatiane Noso pela amizade e pelos momentos e convivência.

À Catalent Brasil Ltda, em especial a Danila Ghiotti, pela gentileza em doar os encapsulados de óleo de peixe.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização desta obra.

*A DEUS agradeço por tudo!!!*

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!*

*Não é motivo para não querê-las.*

*Que tristes os caminhos, se não fora*

*a presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

## RESUMO

Lipases são biocatalisadores utilizados em processos biotecnológicos, devido principalmente à versatilidade das reações que catalisam, sua seletividade e a disponibilidade de fontes para sua obtenção. Estas enzimas são capazes de modificar a estrutura de triacilgliceróis (TAGs) alterando a sua composição em ácidos graxos (AGs) e/ou sua distribuição nas moléculas de glicerol, levando a obtenção de novos TAGs com propriedades físicas e funcionais diferentes do precursor, chamados de triacilgliceróis estruturados (TAG-Es). O objetivo do trabalho foi estudar o potencial de diferentes lipases microbianas nativas e comerciais na reação de acidólise (troca de radicais acil entre éster e ácido) entre o óleo de soja comercial e os ácidos graxos livres (AGL) extraídos do óleo de peixe para obtenção de TAG-Es contendo ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) de interesse, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os quais proporcionam vantagens nutracêuticas. Além da incorporação de EPA e DHA o estudo teve como foco a modificação do óleo de soja para obtenção de TAG-Es contendo taxas balanceadas de n-6/ n-3 com possibilidade de utilização na terapia nutricional parenteral. As reações foram realizadas em condições controladas de processo, na presença de nitrogênio e com antioxidante no meio reacional o que permite proteger os AGPI da oxidação. Após a seleção de duas enzimas comerciais (*Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* B), que mostraram maior potencial de incorporação de EPA e DHA ao óleo de soja, a otimização das condições de reação foi realizada a partir de um planejamento experimental seguindo o modelo DCCR (Design Central Composto Rotacional) e a Metodologia de Superfície de Resposta, a qual permitiu analisar o efeito conjunto de três variáveis que interferem na atividade enzimática (atividade de água das enzimas, relação em massa entre os substratos e o tempo de reação). A melhor resposta foi obtida em presença dos substratos na relação molar de 3:1 (ácidos graxos e óleo de soja), após 12 horas de reação à 40° C catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* em atividade de água ( $a_w$ ) de 0,8. Nestas condições foi possível obter um nível de incorporação de 9,2% (EPA + DHA) e uma relação de n-6/n-3 de 2,7:1, demonstrando o grande potencial desta lipase para obtenção de TAG-Es de interesse nutracêutico ou em nutrição parenteral.

*Palavras Chave:* óleo de soja, ácidos graxos poliinsaturados, triacilglicerol estruturado, lipase, acidólise.

## ABSTRACT

Lipases are biocatalysts used in biotechnological processes, mainly due to the versatility of the reactions they catalyze, their selectivity and their wide range of sources. These enzymes are capable of modifying the triacylglycerols (TAGs) structures, changing their fatty acid (FA) composition and/or the FA distribution in glycerol molecules, leading to new TAG with different physical and functional properties when compared to the precursory TAG; these new TAG are called Structured Triacylglycerols (STAG). The objective of this work was to study the potential of various native and commercial microbial lipases in acidolysis reactions (exchange of radical acil between esters and acids) between commercial soybean oil and free fatty acids (FFA) extracted from fish oil, aiming to produce STAG with interesting polyunsaturated fatty acids (PUFA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, which provide nutraceutical advantages. Besides incorporating EPA and DHA, this study focused on soybean oil modification to produce STAG with balanced PUFA n-6/n-3 rates aiming their application on parenteral nutritional therapy. The reactions were carried out in controlled process conditions, with the presence of nitrogen and adding an antioxidant in the reaction way, which provides the PUFA protection from oxidation. After selecting two commercial enzymes (*Rhizomucor miehei* and *Candida antarctica* B) which showed bigger potential to incorporate EPA and DHA to soybean oil, the optimization of reaction conditions was made using an experimental plan following the CCRD (Central Composite Rotational Design) model and Response Surface Methodology, which allowed the analysis of three variables that interfere with enzymatic activity (water activity of the enzyme, molar rate between substrates and reaction time). The best response was achieved using molar rate of 3:1 (FFA and soybean oil), after 12 hours of reaction at 40°C, catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase with water activity ( $a_w$ ) of 0,8. These conditions allowed an incorporation level of 9.2% (EPA + DHA) and an n-6/n-3 rate of 2,7:1, demonstrating the potential of this lipase to obtain these STAG show great potential for nutraceutical or parenteral nutrition use.

*Keywords:* soybean oil, polyunsaturated fatty acids, structured triacylglycerol, lipase, acidolysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCL= ácido graxo cadeia longa

AGCM= ácido graxo de cadeia média

AGPI= ácido graxo poliinsaturado

CA= lipase comercial de *Candida antarctica* B

CCD= cromatografia em camada delgada

CG= cromatografia a gás

DAG= diacilglicerol

DHA= ácido docosahexaenóico

EPA= ácido eicosapentaenóico

GLA= ácido gama linolênico

HDL= lipoproteína de densidade alta

LDL= lipoproteína de densidade baixa

LT= Leucotrieno

MAG= monoacilglicerol

PG= prostaglandina

RM= lipase comercial de *Rhizomucor miehei*.

TAG= triacilglicerol

TCM= triacilglicerol de cadeia média

TAG-Es= triacilglicerol estruturado

TX= tromboxano

VLDL=lipoproteína de densidade muito baixa.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sistema de abreviação dos ácidos graxos	3
Tabela 2.	Nomenclatura dos principais ácidos graxos encontrados na natureza	4
Tabela 3.	Composição do óleo de soja em triacilgliceróis	6
Tabela 4.	Fontes de ácidos graxos pertencentes às famílias n-3 e n-6	7
Tabela 5.	Quantidades recomendadas para ingestão de ácidos graxos n-3, n-6, EPA e DHA por adultos saudáveis	13
Tabela 6.	Composição de algumas emulsões lipídicas à base de óleo de soja disponíveis no mercado	15
Tabela 7.	Composição de ácidos graxos (%) de algumas emulsões lipídicas disponíveis no mercado	15
Tabela 8.	Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes	20
Tabela 9.	Especificidade de algumas lipases	21
Tabela 10.	Principais aplicações das lipases na indústria	26
Tabela 11.	Características das lipases comerciais utilizadas	32
Tabela 12.	Características das lipases nativas utilizadas	33
Tabela 13.	Atividade de água das enzimas <i>Rhizomucor miehei</i> e <i>Candida antarctica</i> B antes e após incubação com soluções salinas saturadas de $K_2CO_3$ e de KCl	35
Tabela 14.	Matriz experimental das reações de acidólise entre o óleo de soja e ácidos graxos livres do óleo de peixe	37

Tabela 15.	Condições experimentais no estudo da reação de acidólise	37
Tabela 16.	Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise catalisada por lipases comerciais e nativas	42
Tabela 17.	Planejamento experimental, com níveis codificados e reais da reação de acidólise entre óleo de soja e os ácidos graxos de óleo de peixe utilizando lipases comerciais	43
Tabela 18.	Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise após reação catalisada pela lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (RM)	45
Tabela 19.	Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise após reação catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CA)	46
Tabela 20.	Coeficientes de regressão para a reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	47
Tabela 21.	ANOVA da reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	47
Tabela 22.	Coeficientes de regressão para a reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> B	49
Tabela 23.	ANOVA da reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> B	49
Tabela 24.	Valores de K para amostras de óleo de soja antes e após acidólise com lipases de <i>Candida antarctica</i> B e <i>Rhizomucor miehei</i>	57
Tabela 25.	Índice de acidez (% em ácido oléico) para amostras de óleo de soja antes e após acidólise com lipases de <i>Candida antarctica</i> B	58

e *Rhizomucor miehei*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA)	4
Figura 2.	Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família n-3 e n-6	10
Figura 3.	Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases	18
Figura 4.	Mecanismo de ativação interfacial de lipases	24
Figura 5.	Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da $a_w$ e relação molar AG:OS na porcentagem de incorporação de EPA + DHA após acidólise com a lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	51
Figura 6.	Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da $a_w$ e relação molar AG:OS na porcentagem de incorporação de EPA + DHA após acidólise com a lipase de <i>Candida antarctica</i> B	51
Figura 7.	Comparação das previsões do modelo com os valores dos experimentos com a lipase <i>Rhizomucor miehei</i>	52
Figura 8.	Comparação das previsões do modelo com os valores dos experimentos com a lipase <i>Candida antarctica</i> B	52
Figura 9.	Cromatograma da composição de ácidos graxos (% em relação aos ácidos graxos totais) do óleo de soja original	53
Figura 10.	Cromatograma da composição de ácidos graxos (% em relação aos ácidos graxos totais) dos TAG-Es obtidos após acidólise com a lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	53

Figura 11.	Cromatografia em camada delgada do perfil lipídico dos substratos e produtos da reação de acidólise catalisada pela enzima <i>Rhizomucor miehei</i>	54
Figura 12.	Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja	56
Figura 13.	Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja modificada por reação de acidólise catalisada pela lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (ensaio 5)	56
Figura 14.	Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja modificada por reação de acidólise catalisada pela lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (ensaio 1)	56

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1.	Ácidos graxos	3
1.1.1.	Nomenclatura e famílias	3
1.1.2.	Fontes dos ácidos graxos essenciais	5
1.1.3.	Metabolismo dos ácidos graxos essenciais e produção de eicosanóides	8
1.1.4.	Efeitos nutricionais, médicos e recomendações dos AGPIs	11
1.2.	Uso de lipídeos em nutrição parenteral	14
1.3.	Lipases	17
1.3.1.	Fontes de lipases	19
1.3.2.	Propriedades bioquímicas	19
1.3.3.	Especificidade de lipases	20
1.3.4.	Mecanismo de atuação e principais fatores que influenciam a atividade das lipases	22
1.3.5.	Aplicações gerais de lipases	25
1.3.6.	Obtenção de triacilgliceróis estruturados (TAG-Es) a partir da reação de interesterificação	27
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
2.1.	Objetivo geral	30
2.2.	Objetivos específicos	30
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
3.1.	Reagentes específicos	31
3.2.	Equipamentos	31
3.3.	Amostras de óleos	31
3.4.	Enzimas	32

3.4.1.	Lipases comerciais	32
3.4.2.	Lipases produzidas no laboratório	33
3.5.	Métodos	34
3.5.1.	Obtenção de ácidos graxos livres do óleo de peixe	34
3.5.2.	Determinação de atividade de água ( $a_w$ ) das enzimas	34
3.5.3.	Testes preliminares para seleção das enzimas	35
3.5.4.	Design experimental para a reação de acidólise	36
3.5.5.	Extração dos triacilgliceróis estruturados do óleo de soja após acidólise	38
3.6.	Caracterização e composição química das amostras	38
3.6.1.	Análise da oxidação através de extinção específica por absorção na região do ultravioleta	38
3.6.2.	Índice de acidez	39
3.6.3.	Perfil lipídico dos substratos e produtos da acidólise por cromatografia em camada delgada (CCD)	39
3.6.4.	Composição em ácidos graxos por cromatografia a gás (CG)	40
3.6.5.	Caracterização dos triacilgliceróis por espectrometria de massas com ionização ambiente (EASI-MS)	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
4.1.	Seleção de lipases quanto à eficiência na incorporação de AGPI ao óleo de soja	41
4.2.	Influência das variáveis da reação de acidólise na composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis estruturados	43
4.3.	Perfil lipídico dos substratos e produtos de acidólise por cromatografia em camada delgada (CCD)	54
4.4.	Espectrometria de massas com ionização ambiente (EASI-MS)	55
4.5.	Análise dos produtos de oxidação do óleo de soja e produtos de reação	57
4.6.	Índice de acidez	58

<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes em aplicações biotecnológicas, devido principalmente à versatilidade das reações que catalisam, sua seletividade e a ampla gama de fontes para sua obtenção. Devido a sua seletividade (posicional ou de ácidos graxos), a aplicação industrial de lipases nas reações de biotransformação tem especial importância, uma vez que a maioria dos produtos originados não poderia ser obtida por processos químicos convencionais (HOU, 2002). Além disto, a rota enzimática, mais limpa ambientalmente sem agredir o meio ambiente, permite o desenvolvimento de produtos de propriedades nutricionais superiores e/ou de aplicação terapêutica específica, os quais representam um desafio tecnológico e uma nova fronteira de pesquisa.

Os processos enzimáticos para modificação de lipídeos permitem três tipos principais de reações: hidrólise, síntese de ésteres e interesterificação enzimática. A reação de interesterificação enzimática (genericamente refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou ainda de um éster e outro éster, na forma de glicerídeos (transesterificação) tem sido apontada como uma alternativa viável para obtenção de triacilgliceróis estruturados (TAG-Es).

Os TAGs-Es constituem uma classe lipídica caracterizada pela presença de triacilgliceróis (TAGs) projetados de modo a apresentarem em sua estrutura química ácidos graxos (AGs) com características desejáveis. Estes compostos formados pelo rearranjo de diferentes TAGs apresentam características físicas, químicas e nutricionais diferentes dos lipídios que lhes deram origem.

Lipídios estruturados podem ser definidos como TAGs reestruturados ou modificados visando alterar a composição em AGs e/ou sua distribuição nas moléculas de glicerol, por métodos químicos, enzimáticos ou de engenharia genética (CHRISTOPHE, 1998). Dependendo do rearranjo dos AGs e da composição resultante o produto gerado pode apresentar além de vantagens nutricionais também vantagens clínicas devido, por exemplo, aos efeitos antiinflamatórios e na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares os quais constituem alguns dos efeitos benéficos atribuídos aos ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) da família n-3.

É conhecido que os AGPI da família n-6, o ácido araquidônico e da família n-3 o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), quando incorporados nos fosfolipídeos de membranas celulares participam diretamente da resposta imune e inflamatória, servindo como substrato na síntese de eicosanóides pró-inflamatórios no caso dos AGPI n-6, e

com menor potencial inflamatório, quando por AGPI n-3. Embora alguns destes ácidos possam ser encontrados em óleos vegetais tais como soja e milho (AGPI n-6) e óleo de peixe (AGPI n-3), não existe no mercado um composto único como TAG-Es, capaz de fornecer um balanço adequado de AGs n-6/n-3.

O desenvolvimento de um novo TAG-Es obtido a partir do óleo de soja, o óleo vegetal mais abundante no Brasil, incorporado com os AGPI n-3 permitirá a obtenção de novos compostos com possibilidade de utilização na terapia nutricional parenteral contendo taxas balanceadas de n-6/n-3. A manutenção da resposta imune tem sido observada com a utilização de infusão de emulsão lipídica com razão n-6/n-3 em torno de 2:1 a 4:1, enquanto que emulsão lipídica à base de óleo de soja apresenta uma razão n-6/n-3 de 7:1 (HORIE *et al.*, 2007).

Os TAGs-Es apresentam vantagens metabólicas não proporcionadas pela mistura física de diferentes óleos, processo que tem sido utilizado nas preparações comerciais das emulsões lipídicas para terapia de nutrição parenteral. A possibilidade de infundir TAGs-Es contendo AGPI n-6 e n-3 por via parenteral pode otimizar os efeitos biológicos destes compostos, uma vez que resulta em rápida incorporação celular de AGs, além de evitar as perdas decorrentes do processo de digestão e absorção desses ácidos. Dados disponíveis até o momento indicam que doenças de caráter inflamatório podem ser sensíveis a emulsões lipídicas ricas em AGPI n-3 e que o aumento desses AGs pode colaborar no tratamento de pacientes com distúrbios respiratórios, artrite reumatóide, doenças cardíacas agudas dentre outras. Além disto, é conhecido que o DHA desempenha um importante papel no metabolismo cerebral, desenvolvimento cognitivo, acuidade visual, e metabolismo de neurotransmissores (WAITZBERG *et al.*, 2006).

Face ao exposto, considerando o crescente esforço no desenvolvimento de novos lipídeos através de duas vertentes: a redução de AGPI n-6 e a adição de AGPI n-3 para a obtenção de taxas balanceadas de n-6/n-3 (entre 2:1 e 4:1), o presente projeto teve por objetivo estudar a reação de acidólise catalisada por lipases a fim de incorporar AGPI n-3 ao óleo de soja comercial visando a síntese de TAGs-Es de interesse nutracêutico. O processo foi realizado em pequena escala em condições controladas, com a utilização de antioxidante no meio reacional e a presença de nitrogênio. A reação foi otimizada utilizando um planejamento experimental seguindo o modelo DCCR (Design Central Composto Rotacional) e a Metodologia de Superfície de Resposta, a qual permitiu analisar o efeito conjunto de variáveis que interferem na atividade enzimática (atividade de água das enzimas, a relação em massa entre os reagentes e o tempo de reação).

## 1.1. ÁCIDOS GRAXOS

### 1.1.1. NOMENCLATURA E FAMÍLIAS

A nomenclatura dos ácidos graxos (AGs) é feita pela substituição do sufixo O do hidrocarboneto com o mesmo número de carbonos na cadeia, pelo sufixo “oico”. Na Tabela 2 encontra-se nomenclatura dos principais AGs presentes na natureza. Os AGs com 2 a 6 átomos de carbono são considerados AGs de cadeia curta ou voláteis; de C6 a C12, cadeia média e C14 a C24 de cadeia longa.

São geralmente representados por símbolos numéricos, tais como: ácido oléico C18:1(9); ácido linoléico, C18:2(9,12); ácido linolênico, C18:3(9,12,15); onde o número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número a quantidade de duplas ligações. A posição da dupla ligação na cadeia carbônica é indicada entre parêntesis, pela identificação do átomo de carbono mais próximo da carboxila, implicado na respectiva insaturação. Estes ácidos podem ser abreviados conforme ilustra a Tabela 1.

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) possuem uma cadeia carbônica longa e um grupo carboxílico terminal. A presença de duplas ligações nesta cadeia permite separá-los em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (mais de uma dupla ligação). Os AGPIs podem ser divididos em famílias ou séries dependendo da localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metílico terminal: família ômega-9 ( $\omega$ 9 ou n-9) representada pelo ácido oléico, família ômega-6 ( $\omega$ 6 ou n-6) representada pelo ácido linoléico e a família ômega-3 ( $\omega$ 3 ou n-3) representada pelo ácido linolênico.

Tabela 1. Sistema de abreviação dos ácidos graxos.

Nome descritivo	Sistema de abreviação			
	Numérico	D	n	$\omega$
Ácido oléico	18:1(9)	18:1 D9	18:1 n-9	18:1 $\omega$ 9
Ácido linoléico	18:2(9,12)	18:2 D9, 12	18:2 n-6	18:2 $\omega$ 6
Ácido linolênico	18:3(9,12,15)	18:3 D9, 12,15	18:3 n-3	18:3 $\omega$ 3

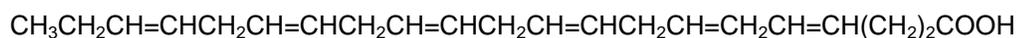
O ácido linolênico e o ácido linoléico são considerados AGs essenciais ao humano, e são precursores de outros AGPIs, também essenciais. A elongação (aumento da cadeia alquila) e a dessaturação (inclusão de insaturações) do ácido linolênico formam importantes AGPIs, os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), cujas estruturas e nomenclatura oficial (determinada pela IUPAC) estão indicadas na Figura 1. Os AGs são ingeridos principalmente como TAGs e fosfolipídeos.

Tabela 2. Nomenclatura dos principais ácidos graxos encontrados na natureza.

Nome descritivo	Nome sistemático	Átomos de carbono	Ligações duplas	Posição	Família
Láurico	Dodecanóico	12	0	-	-
Mirístico	Tetradecanóico	14	0	-	-
Palmitico	Hexadecanóico	16	0	-	-
Palmitoléico	Hexadecenóico	16	1	9	n-7
Esteárico	Octadecanóico	18	0	-	-
Oléico	Octadecenóico	18	1	9	n-9
Linoléico	Octadecadienóico	18	2	9,12	n-6
Alfa-linolênico	Octadecatrienóico	18	3	9,12,15	n-3
Gama-linolênico	Octadecatrienóico	18	3	6,9,12	n-6
Homo gama-linolênico	Eicosatrienóico	20	3	8,11,14	n-6
Araquidônico	Eicosatetraenóico	20	4	5,8,11,14	n-6
EPA	Eicosapentaenóico	20	5	5,8,11,14,17	n-3
DHA	Docosahexaenóico	22	6	4,7,10,13,16,19	n-3



**Ácido eicosapentaenóico (EPA)**



**Ácido docosahexaenóico (DHA)**

Figura 1. Estrutura química dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA).

### 1.1.2. FONTES DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

O ácido linoléico é encontrado em óleo de semente de vegetais como girassol, milho, soja e colza; e também em outras sementes como nozes, pistaches, amendoins e sementes de abóbora e sua presença tem sido associada com cloroplastos. Devido à grande quantidade de alimentos a base de óleos vegetais, o ácido linoléico é mais prevalente nas dietas atuais que no passado.

O ácido linolênico está presente principalmente no fitoplâncton e zooplâncton marinho (SCOTT *et al.*, 1999), bem como em peixes, focas, baleias e outros seres marinhos. Uma vez que o fitoplâncton encontra-se na base da cadeia alimentar marinha, todas as outras formas de vida marinha podem ser enriquecidas com este ácido graxo e seus metabólitos. Este ácido também pode ser encontrado em folhas verdes e em semente de linhaça.

O óleo de soja é constituído aproximadamente, pela seguinte composição em AGs: 4% esteárico, 7% linolênico, 11% palmítico, 22% oléico e 56% linoléico (FIRESTONE, 2006). A estrutura do óleo de soja depende do tipo de soja, condições de tempo, do tipo de terra e colheita. A composição do óleo de soja em TAGs pode ser observada na Tabela 3.

Em relação ao óleo de peixe, o conteúdo e a composição de seus AGs estão relacionados com fatores biológicos, tais como a espécie, idade, ciclo sexual, tipo de alimento e a localização geográfica. Os principais AGs saturados presentes em óleo de peixe são o palmítico (C16:0) e o mirístico (C14:0). Os AGs monoinsaturados compreendem principalmente o ácido palmitoléico (C16:1 n-7), o ácido oléico (C18:1n-9) e seu isômero ácido *cis*-vacênico (C18:1 n-7), além do ácido eicosenóico (C20:1n-9) e ácido cetoléico (C22:1 n-11). Na carne e no óleo de fígado de peixes, os principais AGPI são o EPA e o DHA. Os principais peixes contendo EPA e DHA são: arenque, anchova, savelha, atum e o fígado de bacalhau. O EPA e DHA chegam a representar 15 - 30% dos AGs totais (LANDS, 2005).

Os TAGs provindos de animais terrestres contêm uma maior quantidade de cadeias saturadas se comparados aos TAGs de animais aquáticos. Embora menos eficientes no armazenamento de energia, os TAGs insaturados oferecem uma vantagem para os animais aquáticos, principalmente para os que vivem em água fria: eles têm uma menor temperatura de fusão, permanecendo no estado líquido mesmo em baixas temperaturas. Se fossem saturados, ficariam no estado sólido e teriam maior dificuldade de mobilidade no organismo do animal.

A composição de TAGs de óleos de peixes marinhos é muito complexa, devido ao grande número de AGs altamente insaturados de cadeia longa. Num estudo sobre a distribuição dos AGs nos TAGs, sugere-se que existe um AGPI ocupando a posição 2 e freqüentemente um monoinsaturado (C16:1 ou 18:1) na posição 1, sendo que os AGs monoinsaturados de cadeia muito longa tendem a ocupar a posição 3 (BROCKERHOFF *et al.*, 1969).

A Tabela 4 mostra algumas das principais fontes de AGPI da série n-6 e n-3.

Tabela 3. Composição do óleo de soja em triacilgliceróis.

TRIACILGLICEROL*	NÚMERO DE CARBONOS**	COMPOSIÇÃO (%)
PSO	52	0,5 – 0,7
SOS	54	0,2
PPO	50	0,5 – 0,8
POO	52	2,1 – 3,4
SOO	54	1,0 – 1,2
PPL	50	0,9 – 3,1
PSL	52	2,3 – 3,1
SSL	54	0,7 – 1,1
OOO	54	1,4 – 3,3
POL	52	6,4 – 9,4
SOL	54	1,8 – 4,2
OOL	54	6,3 – 11,8
PLL	52	0,8 – 10,23
SLL	54	2,6 – 6,4
OLL	54	16 – 25,9
LLL	54	17,6 – 20,6
LnLO	54	3,7 – 4,8
LnOP	52	0,3
LnOO	54	0,6
LnLL	54	7,9 – 8,1
LnLP	52	2,4 – 3,7
LnLS	54	2,3
LnLnL	54	1,3 – 3,1
LnLnP	52	0,1
LnLnS	54	0,1
LnLnO	54	0,4

\*P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oléico; L: ácido linoléico; Ln: ácido linolênico.

\*\*número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos.

Fonte: FIRESTONE, 2006.

Tabela 4. Fontes de ácidos graxos pertencentes às famílias n-3 e n-6.

Fonte	Ácidos graxos (%)					
	Linoléico	Araquidônico	Linolênico	EPA	DHA	AGs saturados
Predominante n-6						
Óleo de Milho	57,0	-	1,0	-	-	13,0
Óleo de Girassol	56,0	-	0,3	-	-	10,0
Óleo de Amendoim	29,0	-	1,0	-	-	19,0
Predominante n-3						
Óleo de Linhaça	15,0	-	55,0	-	-	13,0
Óleo de Fígado de Bacalhau	2,0	-	1,0	12,0	12,0	19,0
Óleo de Arenque	2,0	1,0	1,0	13,0	8,0	32,0
Óleo de Cavala	2,0	2,0	1,0	10,0	16,0	35,0
Ambos n-6 e n-3						
Óleo de Soja	51,0	-	7,0	-	-	15,0
Óleo de Colza	22,0	-	11,0	-	-	8,0
Baixo de n-6 e n-3						
Manteiga	2,0	-	1,0	-	-	62,0
Leite Materno	7,0	0,2	0,7	0,6	0,3	50,0
Banha de Porco	10,0	-	1,0	-	-	36,0
Sebo	4,0	-	0,5	-	-	48,0
Gema de Ovo	11,0	6,0	0,2	-	-	53,0
Azeite de Oliva	8,0	-	0,7	-	-	14,0
Azeite de Dendê	9,0	-	0,3	-	-	48,0

Fonte: MINAZZI-RODRIGUES *et al.*, 1991.

### 1.1.3. METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS E PRODUÇÃO DE EICOSANÓIDES

O caráter essencial das duas séries de AGPIs n-3 e n-6 foi primeiramente reportado por BURR & BURR (1929) como resultado da alimentação de ratos jovens com dieta livre de gordura. Os ratos apresentaram retardamento mental, dermatite escamativa, alterações no transporte de lipídeos pelo sangue e problemas reprodutivos. Hoje, sabe-se que estas duas famílias de AGs desempenham importantes efeitos metabólicos e nutricionais no organismo.

Esses dois tipos de AGs são chamados essenciais porque não podem ser sintetizados no organismo humano, mas são sintetizados por plantas e devem ser fornecidos através da dieta. Quanto aos AGs pertencentes às outras séries de poliinsaturados n-7 e n-9, não são considerados essenciais, uma vez que podem ser sintetizados pelo organismo a partir de AGs saturados (KINSELLA, 1991).

Os eicosanóides são metabólitos oxigenados dos AGs essenciais. A família dos eicosanóides é composta por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos AGs hidroxilados. Os substratos para a formação dos eicosanóides são o ácido dihomo-gama-linolênico, o ácido araquidônico e o EPA. O AG precursor é clivado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou fosfolipase C, dependendo do subtipo fosfatidil ao qual o ácido graxo essencial está ligado. Após a ingestão, os AGs, uma vez absorvidos nas células e tecidos, podem ser dessaturados e alongados a AGPI de cadeia longa com 20 ou mais átomos de carbono entrando na constituição de lipídeos estruturais de membrana.

A presença dos AGs das séries n-6 e n-3 no corpo humano em especial nos tecidos em desenvolvimento é dependente da quantidade e do tipo de lipídeo da dieta, da atividade das enzimas dessaturases responsáveis pela síntese dos metabólitos e ao próprio processo de oxidação e acilação dos ácidos 18:3 n-3 e 18:2 n-6 (MANKU *et al.*, 1988). A obtenção destes importantes metabólitos parece ser fácil, pela simples ingestão dos ácidos linoléico e linolênico, uma vez que o próprio metabolismo do organismo se encarregaria das transformações restantes. Entretanto este processo tem como etapa crucial a enzima  $\Delta 6$  dessaturase a qual, além de insuficiente em humanos pode ser inibida por fatores como o baixo consumo de proteínas, envelhecimento, diabetes, álcool, problemas nutricionais como deficiência de piridoxina, zinco, magnésio, biotina e cálcio e também pelo colesterol (KINSELLA, 1991). Nessas condições de ineficiência orgânica de dessaturases é necessária a suplementação de AGPI na dieta. A administração direta dos metabólitos ativos apresenta a vantagem de eliminar a etapa limitante

( $\Delta 6$ -dessaturase) no metabolismo de AGPI, demonstrando efeitos favoráveis quando testados em animais de laboratório e no homem (MASUEV, 1997).

As famílias de AGs n-3 e n-6 utilizam o mesmo sistema enzimático, ocorrendo uma competição por cada enzima envolvida (DYEBERG, 1986). Esta competição altera todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT), os quais são provenientes dos AGs contendo 20 (vinte) átomos de carbono (FISCHER, 1989), conforme demonstrado na Figura 2.

Na via de metabolização da ciclooxigenase, há a formação de endoperóxidos lábeis como os prostanóides: prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e prostaciclina (PCI). Os prostanóides são substâncias muito potentes mesmo estando em concentrações muito baixas ( $10^{-9}$ g/g) e também possuem uma meia-vida muito curta (menor que 1 minuto), sendo degradados rapidamente a metabólitos com fraca ou nenhuma atividade. As PGs compreendem muitos subtipos, os quais possuem diferentes funções. A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu importante papel como imunomoduladora. Entre os tromboxanos, apenas o tromboxano A (TXA) é ativo, sendo o TXB inativo. Todos aqueles metabólitos formados a partir de ácido araquidônico (o precursor mais importante) recebem um sufixo "2" (PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PCI<sub>2</sub>) e aqueles oriundos do EPA recebem o sufixo "3" (PGE<sub>3</sub>, TXA<sub>3</sub>, PCI<sub>3</sub>). O ácido dihomo-gama-linolênico origina prostaglandinas do tipo 1, das quais a PGE<sub>1</sub> é a mais importante do grupo.

Na via da lipoxigenase, a qual leva a síntese de leucotrienos, os AGs essenciais liberados dos fosfolipídios pelas fosfolipases, são transformados em leucotrienos (LTs) pela enzima 5-lipoxigenase. Nesta via, há a formação do ácido hidroperoxieicosanóico e do leucotrieno A, os quais sucedem a formação dos demais membros ativos da família dos leucotrienos. Os LTs derivados do ácido araquidônico recebem um sufixo "4" e aqueles oriundos do EPA recebem o sufixo "5". Os LTs derivados do ácido dihomo-gama-linolênico recebem o sufixo "3", mas há pouca informação disponível sobre sua relevância clínica e bioquímica (FISCHER, 1989).

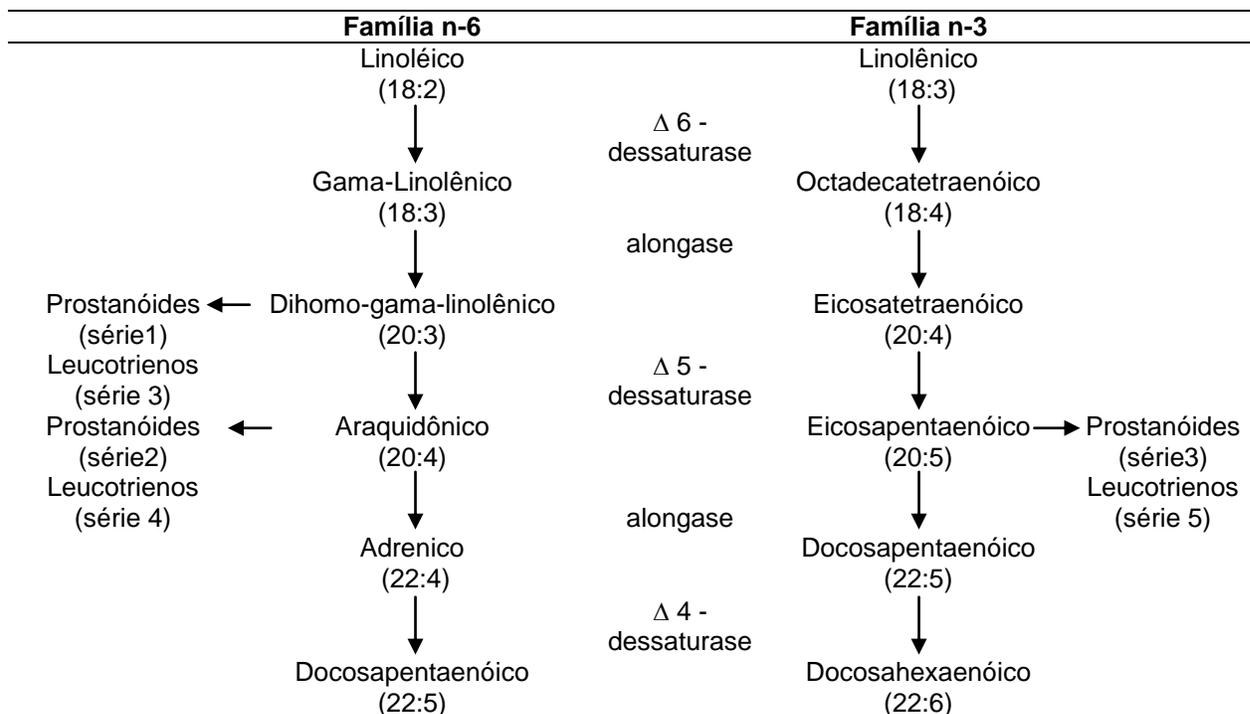


Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família n-3 e n-6.

Fonte: CARVALHO *et al.*, 2003 modificado.

#### 1.1.4. EFEITOS NUTRICIONAIS, MÉDICOS E RECOMENDAÇÕES DOS AGPIs

A importância dos ácidos graxos (AG) n-6 é conhecida desde meados de 1930. Já os AGs n-3, somente após 1980, tiveram a sua necessidade associada à prevenção, principalmente, de distúrbios neurológicos e visuais (CARMO & CORREIA, 2009).

Várias experiências têm comprovado os efeitos benéficos da ingestão de AGPI. Os trabalhos têm demonstrado efeitos benéficos na aterosclerose, arritmia, trombose, fluidez das membranas, hipertensão, obesidade, reações inflamatórias e sobre a resposta imunológica do organismo humano (CALDER, 1998; CONNOR, 2000). Esses efeitos parecem estar associados ao seu papel na integridade das membranas biológicas, a sua capacidade de reduzir o teor de lipídeos séricos e à conversão aos eicosanóides, que apresentam uma ação direta sobre a fisiologia e o sistema vascular (MINAZZI-RODRIGUES & PENTEADO, 1991).

Outros efeitos benéficos resultantes da ingestão de AGPI foram observados em certas doenças como câncer, diabetes e depressão (PEPPING, 1999). Estudos epidemiológicos têm relacionado o consumo de peixe com a baixa incidência de depressão em alguns países como Japão, Taiwan e Coreia (HIBBELN, 1998). Níveis baixos de DHA nos tecidos neurais estão relacionados com níveis baixos de serotoninas cerebrais e ácido hidroxindolacético, as quais estão diretamente relacionadas a tendência a depressão, suicídio e violência.

As alterações em processos inflamatórios e alérgicos relatados quando da administração de AGPI parecem ser resultado da inibição da formação dos compostos mediadores da inflamação (MASUEV, 1997).

Desde 1956, sugere-se que o óleo de peixe pode reduzir níveis altos de colesterol no sangue (BRONTE-STEWART *et al.*, 1956). O óleo de peixe mostrou atuar mais eficientemente na redução do colesterol, do que os óleos de milho e girassol, ricos em AGPI n-6 (KEYS *et al.*, 1957). Os estudos realizados têm demonstrado que os AGPI n-3 parecem atuar principalmente na diminuição dos níveis de TAGs plasmáticos, enquanto os AGPI n-6 diminuem a concentração de LDL - colesterol. Outros fatores, como fibras na dieta, antioxidantes, sais minerais e vitaminas também afetam os níveis plasmáticos de lipídeos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 1988). É estabelecido que a ingestão de óleo de peixe diminua a concentração de TAG do plasma em indivíduos normais e hipertrigliceridêmicos (SANDERS *et al.*, 1985). O consumo elevado de óleo de peixe (90-120g/dia) demonstrou reduzir também as concentrações de LDL-colesterol e LDL apoproteína B (apo B). Contudo, o efeito redutor de TAG plasmático é manifestado mesmo em baixas ingestões de óleo de peixe, na faixa de 10-15g/dia (SIMONS *et al.*, 1985). De acordo com HARRIS *et al.* (1988), a redução na concentração de TAGs do

plasma pode ser atribuída à queda da secreção de lipoproteínas ricas em TAGs provenientes do fígado (VLDL) ou do intestino delgado (VLDL e Quilomícrons), aumento da taxa de suas remoções, ou uma combinação desses fatores. Alguns dos mecanismos propostos pelos quais isto pode ocorrer se devem a atividade aumentada das enzimas responsáveis pela hidrólise de TAG, lipase lipoprotéica (LPL) e a lipase hepática de triacilglicerol (LHP) e facilidade de interação entre os quilomícrons e essas enzimas devido à diminuição da concentração de VLDL. Outros mecanismos, tais como redução de ácidos graxos livres no plasma devido à reduzida lipólise de TAG nos tecidos adiposos (SINGER *et al.*, 1990) ou aumento da oxidação de AGs no fígado (LOTTENBERG, 1992) foram propostos para elucidar a diminuição de VLDL frente a dietas ricas em AGPI.

Os AGs apresentam uma participação relevante nos processos de carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, como o de cólon, fígado, endométrio, próstata, mamário e outros. Um alto consumo de AGPI tem sido associado com a diminuição da incidência, crescimento e dispersão de diversos tumores experimentais. Além dos fatores nutricionais envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese humana, os fatores ambientais tais como fumo, álcool, higiene, stress, drogas, clima e poluição também devem ser levados em consideração (HILLS, 1981). As investigações têm concluído que os AGPI n-3 e n-6 atuam de forma diferente no processo de carcinogênese. O aumento na ingestão de AGPI n-3 é capaz de causar uma paralisação ou redução no desenvolvimento do tumor cancerígeno, enquanto a administração de quantidades equivalentes de AGPI n-6 pode resultar no aumento do desenvolvimento do tumor (HARVEI *et al.*, 1997; WHITEHOUSE *et al.*, 2001).

Embora os estudos *in vitro* e com animais fossem bastante promissores, os estudos clínicos, tanto epidemiológicos como os ensaios, têm mostrado resultados conflitantes. Essas disparidades podem estar associadas a diversos fatores, entre os quais se salientam: aqueles relacionados ao tipo de peixe consumido (com maior ou menor teor de gordura); a quantidade total de gordura ingerida; a razão AGPI n-3/AGPI n-6; a dosagem da suplementação de EPA e DHA seja por via oral, enteral ou parenteral; o tempo de administração da dieta ou do suplemento; o tipo e o estadiamento do câncer estudado; o tamanho da amostra analisada; a presença de outros fatores dietéticos, por exemplo, a ingestão de vitamina E; outros fatores de risco envolvidos, tais como: obesidade, prática de atividades físicas e, provavelmente, o genótipo individual. A maioria dos autores concorda que o benefício potencial não deve ser negligenciado, e que estudos clínicos com métodos adequados devem ser incentivados.

O mecanismo de inibição da secreção de TAG pelos AGPI n-3 de cadeia longa ocorre, provavelmente, através da redução da via de síntese do TAG. Foi demonstrado que o EPA

pode causar diminuição da síntese do TAG hepático, através da redução da atividade das principais enzimas responsáveis pela síntese de NADPH (enzima málica e desidrogenase 6-fosfato) (NOSSEN *et al.*, 1986).

Alguns dos efeitos dos AGPI sobre os sistemas imune e inflamatório são independentes da geração de eicosanóides e podem ser devidos, em parte, a alteração no metabolismo de glicose e glutamina (CURI *et al.*, 1999). Estudos enfatizam que os AGPI da série n-3 afetam as funções imunológicas. Estes ácidos apresentam efeito supressor, inibindo a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão (CALDER *et al.*, 1998; DE PABLO *et al.*, 2000). A ingestão semanal recomendada de EPA e DHA varia entre os órgãos internacionais, conforme se observa na Tabela 5.

Tabela 5. Quantidades recomendadas para ingestão de ácidos graxos n-3, n-6, EPA e DHA por adultos saudáveis.

<b>Fonte</b>	<b>Ano</b>	<b>Recomendação</b>
British Nutrition Foundation- BNF (Inglaterra)	2004	% em reação à ingestão diária de energia: Pelo menos 1,2% de ácido graxo essencial Mínimo 0,2% n-3 1-10% n-6 1,5 g/semana n-3
Institute of Medicine (EUA)	2002	% em reação à ingestão diária de energia: 20-35% de lipídeos, dos quais 5-10% n-6 (Linoléico) 0,6-1,2% n-3 (Linolênico)
FAO-WHO (Internacional)	1994	5:1- 10:1 (linoléico: linolênico)

## 1.2. USO DE LIPÍDEOS EM NUTRIÇÃO PARENTERAL

A utilização parenteral de lipídeos como rotina na clínica médica teve início em 1961, com o desenvolvimento na Europa, de emulsão lipídica à base de óleo de soja, e representou importante marco na história da terapia nutricional de pacientes sob regime parenteral. Na década de 70 observou-se que emulsões lipídicas à base de óleo de soja poderiam influenciar negativamente nas funções imunológicas, o que foi relacionado ao excesso de AGPI n-6 e baixa quantidade de AGPI n-3 encontrados nessa emulsão e ao aumento do estresse oxidativo relacionado ao excesso de AGPI, levando a mudanças de conceitos no uso e formulação de emulsões lipídicas parenterais (HORIE *et al.*, 2007).

Na década de 1990, considerações sobre o metabolismo e imunologia referentes ao óleo de soja e triacilgliceróis de cadeia média (TCMs) resultaram no desenvolvimento de emulsões lipídicas sintéticas, tais como as contidas no *Structolipid* (Fresenius Kabi). Estes TAGs são feitos por hidrólise do óleo de soja e TCMs com reesterificação aleatória subsequente de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) nas posições 1, 2 ou 3 do glicerol. O tipo de AG da cadeia do TAG influencia o tempo de circulação de lipídeos, emulsões com AGCM 1,3 são removidas mais lentamente da circulação do que aquelas com AGCL nessas posições (WANTEN & CALDER, 2007).

Atualmente, reconhece-se que, tanto o excesso de AGPI n-6 como o de AGPI n-3 em emulsão lipídica tem efeito imunossupressor, enquanto a manutenção da resposta imune pode ser observada pela infusão de emulsão lipídica com razão n-6/n-3 em torno de 2:1 a 4:1. Emulsão lipídica à base de óleo de soja tem alto teor de AGPI n-6 e pouca quantidade de AGPI n-3, apresentando uma razão n-6/n-3 de 7:1 (HORIE *et al.*, 2007).

Enormes avanços ocorreram nos últimos anos em relação à composição das emulsões lipídicas para nutrição parenteral. Atualmente há no mercado emulsões lipídicas com somente AGCL (óleo de soja); mistura de AGCL com AGCM e emulsões preparadas pela mistura física de óleo de soja, oliva, peixe e TCMs (DE SOUZA *et al.*, 2008).

A Tabela 6 mostra a composição de algumas emulsões lipídicas tradicionais para uso parenteral, preparadas à base de óleo de soja, disponíveis no mercado. A composição de AGs de algumas delas está mostrada na Tabela 7.

Tabela 6. Composição de algumas emulsões lipídicas à base de óleo de soja disponíveis no mercado.

Composição (%)	Lipovenos <sup>®</sup> TCL*	Lipovenos <sup>®</sup>	Lipofundin <sup>®</sup>	Ivelip <sup>®</sup>
	20% <sup>1</sup>	TCM** 20% <sup>1</sup>	TCM** 20% <sup>2</sup>	TCL* 20% <sup>3</sup>
Óleo de soja	20	10	10	20
TCM	-	10	10	-
Glicerol	2,5	2,5	2,5	2,5
Fosfolípido de ovo	1,2	1,2	-	-
Lecitina de ovo	-	-	1,2	1,2
Alfa-tocoferol	-	-	20	-
Osmolaridade (mOsm/L)	273	273	380	270

Laboratórios: <sup>1</sup> Fresenius Kabi, <sup>2</sup> B. Braun, <sup>3</sup> Baxter \*TCL- triacilglicerol de cadeia longa, \*\*TCM- triacilglicerol de cadeia média.

Fonte: DE SOUZA *et al.*, 2008 com modificações.

Tabela 7. Composição de ácidos graxos (%) de algumas emulsões lipídicas disponíveis no mercado.

Composição de ácidos Graxos* (%)	Lipovenos <sup>®</sup>	Lipovenos <sup>®</sup>	ClinOleic <sup>®</sup>	Omegaven <sup>®</sup>	SMOFlipid <sup>®</sup>
	TCL** 20%	TCM*** 20%	20%	10%	20%
C6:0	-	0,3	-	-	0,2
C8:0	-	60,0	-	-	32,3
C10:0	-	33,8	-	-	22,7
C12:0	-	0,4	-	-	0,3
C14:0	0,2	0,1	-	4,7	1,9
C16:0	23,5	13,0	12,9	10,6	18,2
C16:1	-	0,3	0,7	8,6	3,3
C18:0	8,0	5,2	3,5	2,1	5,5
C18:1 n-9	46,9	24,9	56,5	14,3	55,3
C18:2 n-6	104,1	52,4	17,2	3,3	37,2
C20:4 n-6	-	-	0,5	2,6	1,0
C18:4 n-3	-	-	-	3,8	0,9
C18:3 n-3	13,5	7,5	2,3	1,2	4,7
C20:5 n-3	-	-	-	20,6	4,7
C22:5 n-3	-	-	-	2,4	0,7
C22:6 n-3	-	-	0,5	15,8	4,4

\*Valores fornecidos pelos fabricantes (Fresenius-Kabi Bad- Homburg, Alemanha e Baxter Internacional Inc.) \*\*TCL- triacilglicerol de cadeia longa,\*\*\*TCM- triacilglicerol de cadeia média.

Fonte: HORIE *et al.*, 2007.

Pacientes cirúrgicos de unidade de terapia intensiva que receberam como nutrição parenteral uma emulsão lipídica à base de óleo de soja suplementado com óleo de peixe foram associados a um menor tempo de internação hospitalar em UTI geral quando comparados a pacientes que receberam emulsão lipídica sem óleo de peixe, no entanto, as taxas de infecção foram semelhantes entre os grupos (WANTEN & CALDER, 2007).

O desenvolvimento de emulsão lipídica à base de óleo de peixe, rica em AGPI n-3 traz significativos avanços. A possibilidade de infundir AGPI n-3 por via parenteral pode otimizar seus efeitos biológicos, já que possibilita sua rápida incorporação celular e reduz as perdas decorrentes do processo de digestão e absorção desses AGs. Dados disponíveis até o momento indicam que doenças de caráter inflamatório podem ser sensíveis a emulsão lipídica rica em AGPI n-3 e que o aumento desses AGs pode colaborar no tratamento de pacientes com desordens respiratórias, fibrose cística, artrite reumatóide, arteroesclerose, doenças cardíacas agudas, pacientes cirúrgicos e câncer associado com caquexia (ADOLPH, 2001).

Recentemente, tornou-se disponível na Europa e também no Brasil, uma nova emulsão lipídica chamada SMOF, feita à base de mistura física de 30% de óleo de soja (suprimento de AGs essenciais), 30% de TCMs (fonte rápida de energia e perfil metabólico satisfatório), 25% de óleo de oliva (efeito imunológico neutro e menos susceptível à peroxidação que AGPIs) e 15% de óleo de peixe (manutenção da resposta imune e efeito antiinflamatório) e se caracteriza por apresentar conteúdo equilibrado de AGs e uma razão n-6/n-3 dentro da faixa considerada ótima pela literatura (aproximadamente 2,5:1). Durante a oferta de emulsão lipídica à base de mistura de diferentes óleos, os AGPI n-3 neles contidos são rapidamente incorporados em fosfolipídeos plasmáticos e membranas celulares de leucócitos e plaquetas, resultando na modulação favorável de variáveis imunológicas e inflamatórias e apontando sua potencial indicação em condições de hiperinflamação e de supressão da resposta imune (WAITZBERG *et al.*, 2006). O desenvolvimento de novas emulsões lipídicas mais balanceadas e, com efeito imunomodulador, permitirá a utilização de emulsões lipídicas não somente para terapia nutricional, mas como uma verdadeira nutrição imunoparenteral.

É importante também que as emulsões lipídicas contendo AGPI contenham antioxidantes para prevenir danos decorrentes da peroxidação lipídica. Para isto, novos substratos têm sido utilizados para o desenvolvimento de emulsão lipídica, resultando na disponibilidade para uso clínico destes compostos, que se distinguem entre si pelo conteúdo de AG e sua fonte de origem.

### 1.3. LIPASES

Lipase ou triacilglicerol hidrolases (E.C 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, metabolizando essencialmente lipídeos. Sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar/apolar, além de apresentarem maior afinidade por AGCL, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Isso é justificado pelo fato de uma parte da superfície da enzima se encontrar em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar (BORGSTON & BROCKMAN, 1984).

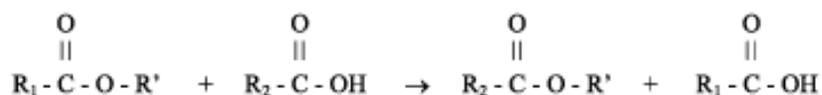
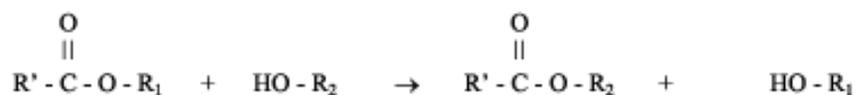
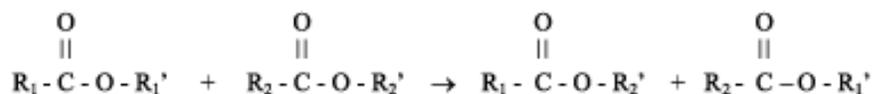
Lipase é um tipo de carboxi esterase pertencente à classe das serinas hidrolases, que representa a família de enzimas que compreende as lipases, esterases, proteases e amilases (KIDD *et al.*, 2001) e não necessita de cofatores (substâncias inorgânicas necessárias para ajudar na catálise ou aumentar a taxa de reação da mesma). A lipase catalisa a hidrólise de óleos e gorduras sob condições fisiológicas favoráveis, metabolizando essencialmente lipídeos. É uma enzima solúvel em água que atua na interface água/óleo, hidrolisando as ligações de ésteres do meio não-aquoso. Tem como função natural a hidrólise de TAGs em glicerídeos e AGs durante a digestão. No início eram obtidas a partir de pâncreas de animais e utilizadas como auxiliar digestivo no consumo humano.

As lipases catalisam reações de hidrólise de lipídeos em sistemas livres de solventes, apenas água e substrato, ou na presença de solventes orgânicos. A presença de solventes orgânicos pode propiciar o aumento do poder catalítico das lipases, um fenômeno chamado ativação interfacial.

A diferenciação entre lipases e esterases, ainda não está completamente definida. SARDA E DESNUELLE (1958) definiram as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/ água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água.

Os processos enzimáticos para modificação de lipídeos permitem três tipos de reações catalisadas por lipases: hidrólise, esterificação ou interesterificação. Genericamente, a reação de interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou ainda de um éster e outro éster, na forma de glicerídeos ou de monoéster, reação intitulada por alguns autores de transesterificação. As reações catalisadas por lipases estão demonstradas esquematicamente na Figura 3.

---

**Reação de Hidrólise****Reação de Esterificação****Reação de Interesterificação****Acidólise** (reação de éster com ácido)**Alcoólise** (reação de éster com álcool)**Transesterificação** (reação de éster com éster)

---

Figura 3. Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases.

Fonte: CARVALHO *et al.*, 2003.

### 1.3.1. FONTES DE LIPASES

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopsis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. As lipases de microrganismos são as mais utilizadas, devido à facilidade de obtenção da enzima e o número ilimitado de microrganismos possíveis capazes de produzi-las. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em síntese orgânicas são de origem microbiana, como *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomices lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, 2009).

Essas fontes microbiológicas são classificadas como GRAS – *Generally Regard as Safe* na grande maioria das vezes, ou seja, não são nocivas à saúde humana (JAEGER & REETZ, 1998). Graças a avanços na tecnologia de DNA as lipases microbianas antes não acessíveis comercialmente, por apresentar um baixo rendimento do processo fermentativo, passam agora maior atividade enzimática a um custo mais acessível, sendo atualmente produzidas por diversas indústrias como a Gist Brocades, Novozymes e Amano.

### 1.3.2. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

As lipases podem ter peso molecular variando entre 20 a 75 KDa, dependendo da fonte, apresentam atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C . Lipases são geralmente estáveis em soluções aquosas neutras, apresentando atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, a sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as mais termoestáveis.

Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando difícil a comparação apenas com os dados disponíveis na literatura ou fornecidos pelos fabricantes. Conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8. Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes.

Propriedades	Fontes de lipases			
	<i>Candida rugosa</i>	Lipase pancreática	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rhizopus delemar</i>
Massa molecular (KDa)	65	50	54	44
Especificidade	Não específica	1,3 específica	Não específica	1,3 específica
Temperatura ótima (°C)	40	45	40	-
pH ótimo	7,5	8	6,3	5,6
Termo-estabilidade (°C)	37 (pH 7)	40 (pH 8 por 30')	55 (pH 6 por 15')	65 (pH 6 por 15')

Fontes: KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER (1998); IWAI & TSUJISAKA (1984).

### 1.3.3. ESPECIFICIDADE DE LIPASES

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato.

A especificidade demonstrada pelas lipases é em relação à posição do ácido graxo no TAG ou em alguns casos ao próprio ácido graxo e seu grau de insaturação. Quanto à especificidade, as lipases se dividem em três grupos: i) Lipases não-específicas; ii) Lipases 1,3-específicas; iii) Lipases ácido graxos específicas (MACRAE & HAMMOND, 1985).

- Lipases 1,3 específicas (ex: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roquefortii*) catalisam as reações nas posições dos alcoóis primários do glicerol (posição 1 e 3), formando assim, produtos com composições diferentes daqueles obtidos por lipases não-seletivas ou mesmo por catalisadores químicos. A lipase pancreática é uma típica lipase 1,3 específica, algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) tem demonstrado possuir este tipo de especificidade (HASSANIEN & MUKHERJEE, 1986). Na reação de hidrólise de TAG por esta classe de lipases, há liberação de AGs; 1,2 (2,3)-DAG e 2-MAG. Estes produtos podem sofrer migração acila espontânea convertendo-se em 1-3-DAG e 1(3)-MAG, os quais são substratos para as lipases.

- Lipases não-específicas atuam nas três posições dos alcoóis primários (1, 2 ou 3) aleatoriamente. São incluídas as lipases do *Geotrichum candidum*, *Candida cylindracea*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens*

- Lipases ácido graxo específicas: essas atuam preferencialmente na hidrólise de ésteres, cujos AGs são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9. Ésteres com AGs insaturados, ou sem insaturação no carbono 9 são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudada é a lipase de *Geotrichum candidum*, seletiva para ligações duplas na posição cis $\Delta$ 9. A especificidade de algumas lipases está discriminada na Tabela 9.

Tabela 9. Especificidade de algumas lipases.

Lipase	Especificidade
<i>Aspergillus niger</i>	Moderadamente 1,3-específica
<i>Candida antarctica</i> B	1,3-específica
<i>Candida antarctica</i> A	Não-específica ou 2-específica
<i>Candida rugosa</i>	Não-específica
<i>Rhizomucor oryzae</i>	Altamente 1,3-específica
<i>Rhizomucor miehei</i>	Moderadamente 1,3-específica
<i>Geotrichum candidum</i>	Ácido graxo específica
<i>Rhizomucor javanicus</i>	Levemente 1,3 específica

Fonte: BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999.

Lipases também apresentam enantioseletividade, ou seja, a capacidade da enzima de reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero do produto em relação ao outro (FABER, 2000).

#### 1.3.4. MECANISMO DE ATUAÇÃO E PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE DAS LIPASES

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação, chamado ativação interfacial. Em 1958, SARDA & DESNUELLE definiram as lipases em termos cinéticos baseados neste fenômeno de ativação interfacial, que difere do modelo clássico de Michaelis-Menten.

As lipases são enzimas solúveis em água que catalisam reações hidrolíticas de TAGs insolúveis, elas atuam somente na interface óleo-água, não obedecendo, portanto às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, uma vez que essas são válidas apenas para reações catalíticas que ocorrem em uma fase homogênea. Assim, as reações catalisadas por lipases são analisadas, em geral, utilizando-se o substrato lipídico sob a forma de emulsão. Por outro lado, à medida que a reação se desenvolve (formação de produtos e a degradação do substrato), a composição da interface óleo-água na emulsão varia (JAEGER & REETZ, 1998).

A velocidade da reação não é determinada pela concentração de lipídeos na emulsão, mas sim pela sua área de emulsão das partículas por unidade de volume. A atividade lipásica bem como a sua produção e, indiretamente, a taxa de crescimento do microrganismo produtor é influenciada pelo tamanho das partículas da emulsão e sua estabilidade (HADEBALL, 1991).

É importante que haja na emulsão do substrato uma interface ampla e estável de gotículas lipídicas, para o ensaio controlado da atividade lipásica. Somente em emulsão de óleo em água (O/A) perfeitamente dispersa, homogênea e bem estabilizada, as determinações da atividade lipásica fornecem resultados reprodutíveis. Qualquer tipo de modificação na interface reflete na atividade lipásica e sua síntese. Essas interferências podem ser causadas por proteínas, sais biliares, AGs, mono e diacilgliceróis, resultantes do TAG durante a ação da lipase (HADEBALL, 1991).

Esse mecanismo de atuação é facilmente explicado através de sua estrutura tridimensional e de seu sítio ativo. O sítio ativo da lipase é geralmente caracterizado pela tríade composta dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou glutâmico), complexos acil-enzima sendo intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipases (JAEGER & REETZ, 1998). O sítio ativo é coberto por uma cadeia polipeptídica em forma de  $\alpha$  hélice comumente chamada de tampa, ou *lid* (CAJAL *et al.*, 2000).

Em presença de meios aquosos homogêneos, com ausência de solventes orgânicos e interfaces, estruturas obtidas através de técnicas de cristalografia mostram que o sítio ativo das lipases está totalmente isolado do meio de reação através do *lid*, o que se chama de

conformação fechada, apresentando uma baixa atividade lipolítica (GROCHULSKI *et al.*, 1994). Por outro lado, quando a lipase se adsorve a uma interface, esse *lid* se desloca, expondo o sítio ativo para o meio de reação, tornando-o acessível ao substrato, ao que se chama conformação aberta da enzima em interfaces lipídicas (GROCHULSKI *et al.*, 1993). Nesta conformação, o movimento do *lid*, não apenas abre o acesso ao sítio ativo, como também expõe uma extensa zona hidrofóbica o que provavelmente interage favoravelmente com a interface lipídica (DEREWENDA *et al.*, 1992).

Desta forma, esses dados permitiram estabelecer que no mecanismo catalítico das lipases o que ocorre é a ativação interfacial (SARDA & DESNUELLE, 1958; BRZOZOWSKI *et al.*, 2000; CAJAL *et al.*, 2000; MILED *et al.*, 2001). Complementarmente, dado que o substrato natural das lipases são os óleos e as gorduras, esta atividade na interface é um requisito indispensável para a sua função biológica.

A ativação e subsequente ligação das lipases a interfaces lipídicas são processos complexos. As mudanças da energia livre envolvidas nesses processos são causadas por vários fatores como pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van Der Waals, interações hidrofóbicas entre outros (PETERS *et al.*, 1998). No entanto, o fato de que em meios aquosos homogêneos as lipases apresentem atividade, mesmo que baixa, sugere que as lipases encontram-se em equilíbrio entre a conformação fechada e distintas conformações abertas que permitem que elas sejam ativas na ausência de interfaces.

Muitos aspectos do mecanismo catalítico das lipases ainda não estão esclarecidos, porém os dados estruturais das lipases permitem algumas conclusões: A maioria das lipases apresenta profundas mudanças estruturais durante a ativação interfacial: a “tampa” *lid* se move deixando a enzima na forma aberta e ativa, proporcionando uma grande superfície hidrofóbica de interação lipídeo-proteína. A abertura da “tampa” pode ser facilitada por solventes orgânicos, provavelmente por diminuição da constante dielétrica do meio. Na Figura 4 pode ser observado esquema com o mecanismo de ativação interfacial de lipases.

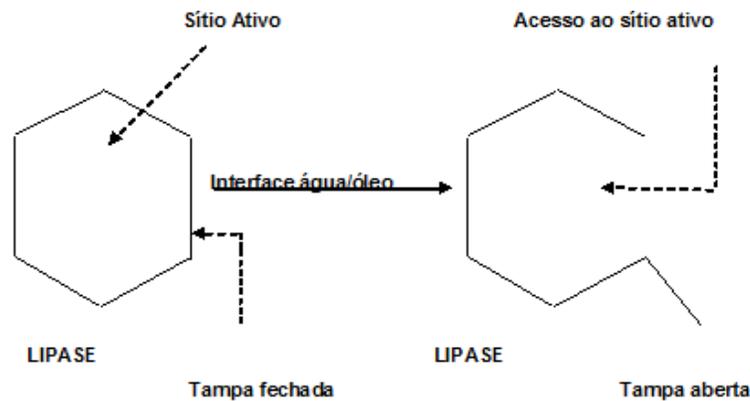


Figura 4. Mecanismo de ativação interfacial de lipases.  
 Fonte: FREGOLENTE, 2009 adaptado.

A água desempenha um papel crucial na modulação das propriedades catalíticas das lipases. Uma enzima completamente desidratada não é cataliticamente ativa. A água ligada à enzima aumenta a flexibilidade interna da molécula, o que é necessário para a atividade catalítica. As enzimas podem se ligar a quantidades de água diversas, dependendo da atividade de água termodinâmica (ADLERCREUTZ, 1991). A atividade enzimática é dependente da quantidade de água associada à enzima e em menor grau ao conteúdo total de água existente no sistema.

PINYAPHONG & PHUTRAKUL (2009) relataram a influência da atividade de água inicial da enzima na interesterificação de óleo de palma com estearato de metila utilizando lipase de *Carica papaya*. A reação alcançou melhores resultados quando a  $a_w$  inicial da enzima era de 0,11 e decaiu conforme a mesma aumentou. Tal fato pode ser explicado pelo papel da água durante a síntese. Na interesterificação catalisada por lipase, a hidrólise e a esterificação acontecem simultaneamente. Sendo um reagente na etapa de hidrólise e um produto na etapa de esterificação, a água modela o equilíbrio enzimático da interesterificação (GODERIS, 1990).

A relação entre os substratos apresenta relevante importância na reação, sendo que o excesso de um deles pode resultar em acúmulo do ácido graxo correspondente no meio reacional, em função da hidrólise parcial dos triacilgliceróis. A presença de altos níveis de AGs pode resultar em níveis elevados de grupos carboxílicos ionizados, que acidificam a fase micro porosa ao redor da lipase, podendo causar desorção da água da interface, conseqüentemente, levar à perda da atividade enzimática (MARANGONI, 2002).

### 1.3.5. APLICAÇÕES GERAIS DE LIPASES

O grande interesse na produção de lipases microbianas tem crescido nas últimas décadas devido ao seu largo potencial em aplicações industriais (MACARIO *et al.*, 2009). Cada aplicação requer uma propriedade única da enzima com respeito à especificidade, estabilidade, dependência de temperatura e pH. A seleção de microrganismos com atividade lipolítica pode facilitar descoberta de novas lipases, aumentando com isso, o número de aplicações.

De acordo com pesquisas recentes do BCC Research, o mercado global para enzimas industriais em 2007 foi de 2,3 bilhões de dólares, e é esperado para 2012 um aumento para 2,7 bilhões (BUSINESS WIRE, 2007). Pesquisadores e empresários industriais estão cada vez mais interessados nos processos enzimáticos, visando diminuição de custos de processo, diminuição de resíduos e subprodutos oriundos das rotas químicas e principalmente, obtenção de novos e mais saudáveis produtos que atendam às necessidades do mercado consumidor.

As lipases vêm conquistando de forma crescente o mercado de enzimas industriais, suas aplicações abrangem os mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosmética, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel no tratamento de resíduos industriais, entre outros, que podem ser vistos na Tabela 10.

Quando falamos da indústria oleoquímica, a aplicação de lipases com o objetivo de obter concentrados em AGPI, de importância médica ou nutricional têm despertado interesse de muitos pesquisadores e de fabricantes de produtos alimentícios com a finalidade de obter concentrados de AGPIs esterificados ao glicerol na forma de acilgliceróis utilizando processos enzimáticos (CARVALHO *et al.*, 2003), bem como comercializar produtos (leite e derivados, biscoitos, pães, etc.) enriquecidos com AGPI (KOLANOWSKI & LAUFENBERG, 2006).

A enantioseletividade é uma das características mais interessantes das lipases para sua possível utilização em química fina, a preparação de enantiômeros puros de intermediários quirais é um passo fundamental em muitos processos industriais relevantes (PALOMO, 2008), permitindo produzir compostos enantiopuros difíceis de serem preparados através de métodos químicos convencionais (CARVALHO *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2009).

Tabela 10. Principais aplicações das lipases na indústria.

<b>Setor Industrial</b>	<b>Utilização</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos	MIKIO <i>et al.</i> , 2001
Panificação	Melhoramento do sabor e qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos	GANDHI, 1997
Derivados do ovo	Melhoramento da qualidade de aroma e remoção de excesso de gorduras	Maionese, molhos e cremes	SISAK <i>et al.</i> , 2006
Processamento de Óleos	Transesterificação de óleos naturais, Hidrólise de óleos, diacilgliceróis e monoacilgliceróis	Óleos e gorduras modificadas	BORNSCHEUER, 1995 KOGURI, 2007
Química Fina	Síntese de ésteres	Ésteres	BORNSCHEUER, 1999 . SHIMADA <i>et al.</i> , 2007
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos	FUSE <i>et al.</i> , 2000
Cosmético	Remoção de lipídeos, hidratação da pele, clareamento de manchas	Cosméticos em geral	BOUSQUET <i>et al.</i> , 1999
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais Processamento de couro	Produtos de couro	THANIKAIVELAN <i>et al.</i> , 2004.

### 1.3.6. OBTENÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS ESTRUTURADOS A PARTIR DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO

Os triacilgliceróis estruturados (TAG-Es) podem ser definidos como TAGs reestruturados ou modificados por alterar a composição em AGs e/ou sua distribuição nas moléculas de glicerol, por métodos químicos, enzimáticos ou de engenharia genética (OSBORN & AKOH, 2002). Podem ser sintetizados com o objetivo de melhorar ou modificar suas características físicas (viscosidade, consistência, ponto de fusão, polimorfismo) e/ou químicas (estabilidade oxidativa), bem como para modificar uma ou mais propriedades nutricionais dos TAGs (presença ou ausência de AGs saturados ou insaturados de interesse nutracêutico).

Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos AGs relacionados ao comprimento da cadeia, número de insaturações e distribuição estereoespecífica no metabolismo e saúde, há crescente interesse em usar óleos e gorduras para a redução do risco de doenças, bem como para a melhoria da saúde (WILLIS *et al.*, 1998). TAG-Es contendo AGs n-3 podem apresentar características favoráveis quanto à resposta imune, síntese de eicosanóides e ações antiinflamatórias (SILVA & GIOIELLI, 2006).

Os TAG-Es são normalmente obtidos por interesterificação, seja química ou enzimática. A interesterificação química é realizada através do aquecimento de misturas de óleos e AGs na presença de catalisadores como o sódio metálico, metilato ou etilato de sódio e outros alquilatos de metais alcalinos (Na, K e suas ligas). Durante o processo, a mistura é aquecida e os AGs trocam de posição na molécula do TAG. A inespecificidade do processo, a variabilidade na qualidade do catalisador, a necessidade de um período de indução e perdas de óleo pela formação de sabões de ésteres metílicos são algumas das desvantagens da interesterificação química.

Numerosas aplicações de interesterificação enzimática de óleos têm sido empregadas para produção de gorduras especiais (MUKHERJEE, 1990). Sob a perspectiva de produzir lipídeos com composições específicas para aplicações funcionais e medicinais, os métodos de interesterificação enzimática, utilizando lipases são mais interessantes. A interesterificação enzimática tem a vantagem de permitir grande controle sob a distribuição posicional dos AGs do produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. Nessas reações o TAG reage com um ácido graxo (acidólise), um álcool (alcoólise) ou outro éster (transesterificação), resultando em um rearranjo dos AGs do TAG formando um novo TAG, com propriedades físicas e químicas diversas. Esse rearranjo durante a interesterificação é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio de reação

deve ser suficientemente baixa para minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça ativa. Em geral, sob condições nas quais as quantidades de água no sistema é restrita, a hidrólise de gordura pode ser minimizada de tal forma que a interesterificação seja a reação dominante (GOLDBERG, 1990).

A obtenção de acilgliceróis contendo 70% de AGPI n-3, em especial DHA (48%) e EPA (12%), foi realizada via interesterificação de óleo de fígado de bacalhau e concentrados de AGPI livres, ou seus ésteres, catalisada por lipase imobilizada de *Mucor miehei* (HARALDSSON & HÖSKULDSSON, 1989). A mesma enzima foi usada para a obtenção de óleo de sardinha contendo 25% de EPA e 40% de DHA após acidólise entre o óleo de sardinha e AGPI livres na ausência de solvente (YAMANE *et al.*, 1992). Na seleção de lipases microbianas utilizadas para aumentar os níveis de AGPI do óleo de sardinha após reação de acidólise, a lipase de *Pseudomonas* sp. apresentou a maior capacidade entre as lipases testadas, tendo o conteúdo total destes AGs atingido 44% nos acilgliceróis, comparado com 29% do óleo de sardinha original (ADACHI *et al.*, 1993).

A reação de interesterificação também tem sido utilizada para tornar os óleos vegetais mais ricos em AGPI de interesse nutricional. LI ZU YI & WARD (1993) relataram a incorporação de aproximadamente 20% (em relação aos AGs totais) de AGPI nos óleos de milho, girassol, amendoim, oliva e soja usando lipase imobilizada obtida de *Mucor miehei* e de *Pseudomonas* sp., a qual mostrou alta atividade catalítica e permitiu o uso repetido da enzima imobilizada sem perda significativa na sua atividade.

A lipase de *Mucor miehei* foi utilizada por LANGHOLZ *et al.* (1989) para concentrar AGPI e mostrou discriminar DHA na reação de acidólise de óleo marinho com concentrados de EPA e DHA livres preparados por complexação com uréia. O conteúdo de DHA nos AG livres aumentou marcadamente (27% a 80%) após a reação de acidólise, demonstrando baixa incorporação deste ácido nos acilgliceróis. Os ésteres metílicos dos outros AGs foram preferencialmente formados, concentrando DHA na fração de AG livres.

A obtenção de óleo de sardinha rico em AGPI n-3 contendo 25% de EPA e 40% de DHA por acidólise enzimática catalisada pela lipase imobilizada de *Mucor miehei* foi realizada entre o óleo de sardinha e AGPI livres na ausência de solvente (YAMANE *et al.*, 1992).

LEE *et al.* (2000) mostraram que, embora tenham composição total de AGs similar, lipídeos modificados enzimaticamente e misturas físicas de lipídeos possuem diferentes vias metabólicas, com base na estrutura e devido à diferença na composição de AGs na posição 2 de moléculas lipídicas. Neste estudo, o óleo de soja foi modificado através da incorporação de

ácido caprílico (C8:0) nas posições 1 e 3. Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) permaneceram intactos na posição 2. Este TAG-Es foi comparado a uma mistura física de óleo de soja e ácido caprílico. Foram encontrados TAGs de ácido caprílico no fígado e tecido adiposo de ratos alimentados com TAGs-Es, enquanto ele não estava presente nos ratos alimentados com a mistura física. Isto sugere que o posicionamento e a distribuição de ácido caprílico são importantes no metabolismo dos TAGs e podem levar a diferentes influências fisiológicas.

KOJIMA *et al.* (2006) estudaram a acidólise de trioleína com EPA ou DHA em hexano, utilizando lipases imobilizadas em Celite 545. As lipases utilizadas nesse estudo foram: *Pseudomonas fluorescens* HU380, *P. fluorescens* AK102 e *Candida rugosa*. A temperatura mostrou influência significativa na incorporação dos AGPI sendo que a lipase de *P. fluorescens* HU380 mostrou a maior taxa de incorporação a baixa temperatura (aproximadamente de 20% à 10° C).

HITA *et al.* (2007) obtiveram TAG-Es com ácido caprílico localizado nas posições 1 e 3 da molécula de glicerol e DHA na posição 2, por acidólise de óleo de atum e ácido caprílico livre, catalisada por várias lipases imobilizadas em reator de bancada. Os melhores resultados foram obtidos com as lipases de *Rhizopus oryzae* (Lipase D) e *Rhizopus delemar* (Lipase Rd), imobilizadas em Accurel MP1000 (de polipropileno microporoso), com uma relação lipase / suporte de 1:1,5 (w/w). A atividade das lipases imobilizadas manteve-se estável por um período mínimo de cinco dias nas condições operacionais (até 40°C).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi realizar estudos exploratórios sobre a reação de acidólise catalisada por lipases nativas e comerciais a fim de incorporar AGPI de interesse, EPA e DHA obtidos do óleo de peixe, ao óleo de soja comercial visando a síntese de TAGs-Es de interesse nutracêutico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar diferentes lipases microbianas nativas e comerciais na reação de acidólise visando a incorporação de AGPI (EPA + DHA) extraídos do óleo de peixe ao óleo de soja comercial;
2. Selecionar as lipases de maior eficiência na obtenção de TAG-Es com balanço adequado de n-6/n-3 (relação entre 2:1 e 4:1);
3. Otimizar a reação de acidólise catalisada pelas lipases comerciais selecionadas (*Candida antarctica* e *Rhizomucor miehei*) através do planejamento de superfície de resposta utilizando as seguintes variáveis da reação: razão molar entre os reagentes, tempo de reação e  $a_w$  inicial da enzima;
4. Caracterização química dos produtos obtidos antes e após reação enzimática.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. REAGENTES ESPECÍFICOS**

- Reagentes químicos: Ácidos, bases e solventes (grau P.A. de marca Merck); Todos os reagentes usados foram de grau analítico
- Padrões para cromatografia a gás: Ésteres metílicos de ácidos graxos: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido alfa-linolênico, ácido gama-linolênico (GLA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosaheptaenóico (DHA) foram obtidos em mistura ou separadamente (Sigma).
- Padrões para cromatografia em camada delgada: trioleína, 1,2 (2,3)- dioleína, 1,3- dioleína 1(3)-monoleína, e ácido oléico livre (Sigma).
- Silicagel 60G.

#### **3.2. EQUIPAMENTOS**

- Agitador rotatório de tubos marca Phoenix modelo AP 56.
- Balança analítica marca Scientech modelo AS 210
- Banho-Maria termostatzado marca Ética MOD 316
- Cromatógrafo a gás marca CHROMPACK modelo CP9001 com detector de ionização de chama e coluna cromatográfica CPSil 88.
- Espectrofotômetro marca Jenway 6105 UV/Vis. Spectrophotometer.
- Incubador shaker rotatório marca Tecnal modelo TE- 421.
- Placas de cromatografia em camada delgada de Sílicagel 60 G.

#### **3.3. AMOSTRAS DE ÓLEOS**

- Óleo de soja vegetal comestível (Liza), fabricado pela Cargill Foods, adquirido em comércio local.
- Encapsulado de óleo de peixe, gentilmente doado por Catalent Pharma Solutions do Brasil, de acordo com certificado de análise das cápsulas fornecido pelo laboratório, contendo DHA 12,1% e EPA 20,5%.

### 3.4. ENZIMAS

#### 3.4.1. LIPASES COMERCIAIS

Foram utilizadas diferentes lipases comerciais selecionadas segundo suas propriedades e seletividades. Algumas características de cada lipase, conforme informações nas fichas técnicas das lipases estão descritas na Tabela 11.

Com exceção das lipases RM (Lipozyme<sup>®</sup> RM-IM) e CA (Novozyme<sup>®</sup> 435) todas as demais preparações foram usadas na forma livre. A RM é imobilizada em uma resina macroporosa de troca aniônica, do tipo fenólica, no qual a enzima é fortemente ligada por adsorção, sem a utilização de agentes de ligação cruzada. O aspecto do produto é granular com tamanho de partícula entre 0,2 e 0,6 mm e densidade entre 350 e 450 kg/m<sup>3</sup>. A preparação enzimática CA é imobilizada em resina macroporosa de troca iônica do tipo acrílica. O produto é constituído por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 e 2 % .

Tabela 11. Características das lipases comerciais utilizadas.

Sigla	Microrganismo de origem	Seletividade	Seletividade por tamanho de cadeia do AG	Nome comercial Fornecedor
RM	<i>Rhizomucor miehei</i>	moderadamente 1,3-seletiva	curta	Lipozyme <sup>®</sup> RM IM Novozymes S/A
CA	<i>Candida antarctica</i> B	1,3-específica	curta, média e longa	Novozyme <sup>®</sup> 435 Novozymes S/A
TL	<i>Thermomices lanuginosus</i>	levemente 1,3 seletiva	-	Lipolase <sup>®</sup> Novozymes S/A
CR	<i>Candida rugosa</i>	não seletiva	-	Amano Pharmaceutical Co
AN	<i>Aspergillus niger</i>	moderadamente 1,3-seletiva	curta, média e longa	Amano Pharmaceutical Co

### 3.4.2. LIPASES PRODUZIDAS NO LABORATÓRIO

Além das lipases comerciais, três preparações enzimáticas brutas, extraídas de microrganismos nativos, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum*, foram previamente produzidas em laboratório por fermentação líquida em meio contendo (% m/v) óleo de oliva (2,0%) peptona (2,0 %), extrato de levedura (0,5%), NaNO<sub>3</sub> (0,1%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1%) e MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,05%) segundo CARVALHO *et al.* (2003), e testadas quanto a eficiência de incorporação de EPA e DHA no óleo de soja. Algumas características de cada lipase encontradas na literatura e suas respectivas atividades (CARVALHO *et al.*, 2003) estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12. Características das lipases nativas utilizadas.

Sigla	Microrganismo de origem	Seletividade	Seletividade por tamanho de cadeia do AG	Atividade hidrolítica (U/mL)
AN	<i>Aspergillus niger</i>	moderadamente 1,3-específica	curta, média e longa	18,2
GC	<i>Geotrichum candidum</i>	Ácido graxo específica	Ácidos graxos de cadeia longa com insaturação na posição 9	12,8
PS	<i>Penicillium solitum</i>	-		10,5

Fonte: CARVALHO *et al.*, 2003

### 3.5. MÉTODOS

#### 3.5.1. OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DO ÓLEO DE PEIXE

O óleo de peixe foi hidrolisado para a extração dos ácidos graxos livres baseando-se no método proposto por KATES (1972). Foram pesados 5 g de óleo de peixe encapsulado em 4 frascos erlenmeyer. A cada frasco foram acrescentados 50 mL de solução de KOH 3,3% em etanol 90%, e a mistura foi incubada em shaker a 70°C, 160 rpm, por 60 minutos em atmosfera de N<sub>2</sub>. A mistura contendo ácidos graxos saponificados foi mantida sob refrigeração para posterior extração dos mesmos. Aos ácidos graxos saponificados, colocados em 4 tubos de ensaio grande, foram adicionados 2 gotas de solução de fenolftaleína 1% em etanol 90% e 30 mL de hexano. As soluções foram agitadas em vórtex por 2 minutos e submetidas a repouso para separação das fases. À fase inferior, foi acrescentado 0,3 mL de solução de HCl 1 N e 20 mL de hexano. As soluções foram agitadas em vórtex por 2 minutos e submetidas a repouso. A fase superior, contendo ácidos graxos em hexano, foi pipetada e reservada, sendo o solvente posteriormente eliminado com nitrogênio antes da reação de acidólise. Os ácidos graxos obtidos, foram armazenados em frascos âmbar e mantidos congelados - 20°C até utilização posterior (análise e reação de acidólise).

#### 3.5.2. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) DAS ENZIMAS

A influência do valor de  $a_w$  das enzimas selecionadas nas reações de interesterificação foi investigada, considerando que altos valores de  $a_w$  promovem a hidrólise, reação que compete com a esterificação. A atividade inicial de água das enzimas *Rhizomucor miehei* (RM) e *Candida antarctica* B (CA) foi previamente determinada através do método Karl Fischer (JACKSON & KING, 1997). O valor encontrado de  $a_w$  inicial das enzimas RM e CA foi por volta de 0,6.

Considerando a necessidade de estabelecer o efeito da atividade de água na reação de acidólise, a  $a_w$  inicial de cada enzima foi modificada através do uso de soluções salinas saturadas, que podem adsorver ou liberar água sem que sua umidade relativa de equilíbrio seja alterada (DITCHFIELD, 2000). Para promover atividades de água pré-definidas (por volta de 0,4 e 0,8 a 25°C) às enzimas, foram realizados testes de incubação das enzimas em soluções saturadas de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ( $a_w$ = 0,432 a 25°C) e de KCl ( $a_w$ = 0,844 a 25°C), segundo metodologia descrita por SPIESS & WOLF (1987). Após o preparo das soluções saturadas, o sobrenadante

foi incubado a 25°C em shaker, sem agitação, durante 16 horas e 30 minutos, com 15 mg de cada enzima. Posteriormente, as soluções foram submetidas à filtração à vácuo para separação das enzimas, que foram acondicionadas em placas de Petri tampadas e envoltas em filme de PVC para melhor vedação, nas quais posteriormente a  $a_w$  foi novamente determinada pelo método de titulação por Karl Fischer (JACKSON & KING, 1997). A atividade de água das enzimas RM e CA, após incubação com soluções saturadas de  $K_2CO_3$  e de KCl, foi determinada novamente pelo método Karl Fischer, segundo dados da Tabela 13.

Tabela 13. Atividade de água das enzimas *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* B antes e após incubação com soluções salinas saturadas de  $K_2CO_3$  e de KCl.

Enzima	$a_w$ inicial	$a_w$ após incubação com solução de $K_2CO_3$	$a_w$ após incubação com solução de KCl
RM*	0,66 ± 0,03	0,49 ± 0,04	0,87 ± 0,05
CA**	0,75 ± 0,04	0,54 ± 0,02	0,98 ± 0,05

\*RM- *Rhizomucor miehei*

\*\*CA- *Candida antarctica* B

### 3.5.3. TESTES PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DAS ENZIMAS

Com o objetivo de comparar a eficiência das diferentes preparações de lipases na incorporação de EPA e DHA no óleo de soja, a reação de acidólise foi realizada em uma única condição experimental. A reação foi realizada em pequena escala em frascos vedados de 50 mL, em condições controladas de processo utilizando agitador orbital em shaker com a utilização de antioxidante no meio reacional (BHT a 0,001%) e presença de nitrogênio, o que permite proteger os AGPI da oxidação. A mistura de substrato consistiu em AGs livres do óleo de peixe e óleo de soja em meio sem solvente orgânico (item 3.5.4) totalizando 1,332 g de meio de reação em cada ensaio nas seguintes condições: razão molar de AG e óleo de soja (AG:OS) igual a 3:1, concentração de 10% de lipase em relação a massa total do meio de reação e 0,001% de BHT. A mistura foi incubada em shaker, a 160 rpm, a 40°C por 12 horas. As reações foram interrompidas colocando os frascos em banho de gelo, seguido de filtração a vácuo da solução para retirada da enzima. O óleo modificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de  $N_2$  a -20°C. Os TAGs foram separados (item 3.5.5) e analisados quanto a composição de AGs por cromatografia à gás (item 3.6.4).

### 3.5.4. DESIGN EXPERIMENTAL PARA A REAÇÃO DE ACIDÓLISE

A otimização estatística dos experimentos para as duas lipases previamente selecionadas RM e CA, foi feita utilizando três variáveis ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) com três níveis cada uma baseado num fatorial  $2^3$  com quatro pontos centrais, como pode ser visto na Tabela 14. As variáveis independentes estudadas, ou fatores, foram: tempo de reação (em horas;  $X_1$ ), a relação em massa entre AGs e óleo de soja (em gramas;  $X_2$ ) e a atividade de água da enzima ( $X_3$ ), conforme ilustrado na Tabela 15. A variável dependente (resposta de interesse) investigada foi o grau de incorporação (%) dos AGPIs EPA + DHA ao óleo de soja.

A reação foi realizada entre o óleo de soja (OS) e ácidos graxos (AGs) livres do óleo de peixe em meio sem solvente orgânico, em diferentes relações de massa dos substratos (AG:OS), totalizando 1,332 g de meio de reação em cada ensaio. Os meios foram incubados em frascos vedados do tipo erlenmeyer com capacidade para 50 mL, juntamente com 0,133 g de enzima (equivalente a 10% da massa do meio de reação) com diferentes valores de  $a_w$  inicial (0,4; 0,6 e 0,8) e 0,001% de BHT. A reação ocorreu em incubadora do tipo shaker, a 160 rpm, a 40°C, em tempos que variaram de acordo com a matriz experimental (12; 24 e 36 horas). As reações foram interrompidas emergindo os frascos em banho de gelo, seguido de filtração a vácuo da solução para retirada da enzima. Para as reações, a temperatura de trabalho (40°C) foi escolhida de forma a garantir a dissolução homogênea dos substratos sem desnaturar a enzima. Após separação dos produtos da reação de acidólise (item 3.5.5), o perfil dos TAGs foi analisado por espectrometria de massas com ionização ambiente, (EASI) (item 3.6.5) e a composição de AGs destes compostos determinados por CG (item 3.6.4). Os produtos da reação de acidólise foram acompanhados por CCD, segundo descrito no item 3.6.3.

Tabela 14. Matriz experimental das reações de acidólise entre o óleo de soja e ácidos graxos livres do óleo de peixe

Ensaio	Valor codificado		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Tabela 15. Condições experimentais no estudo da reação de acidólise.

Variáveis	Níveis de variáveis codificados		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> tempo de reação (horas)	12	24	36
X <sub>2</sub> relação molar ácido graxo (AG) : óleo de soja (OS)	3 : 1	1 : 1	1 : 3
X <sub>3</sub> atividade de água da enzima (a <sub>w</sub> )	0,4	0,6	0,8

### **3.5.5. EXTRAÇÃO DOS TRIACILGLICERÓIS ESTRUTURADOS DO ÓLEO DE SOJA APÓS ACIDÓLISE**

Após a reação de acidólise, os TAGs-Es do óleo de soja e AGs livres foram separados segundo descrito por HITA *et al.* (2007). À mistura final da reação enzimática foram adicionados hexano e solução de KOH 0,8 N em etanol 30%. Após homogenização, as fases hidroalcoólica (sais de potássio de AGs) e de hexano (TAG) foram separadas e mais duas extrações com hexano foram realizadas. O volume total de solvente foi evaporado em atmosfera de N<sub>2</sub> e a fração obtida armazenada em frascos âmbar e mantida congelada - 20°C para posterior análise da composição em AG dos TAG-Es. A recuperação dos TAGs-Es foi por volta de 60-70% do peso inicial da amostra.

## **3.6. CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS**

### **3.6.1. ANÁLISE DA OXIDAÇÃO ATRAVÉS DE EXTINÇÃO ESPECÍFICA POR ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA**

A oxidação de amostras de óleo de soja, óleo de peixe encapsulado e dos produtos da reação enzimática (escolhidos seis pontos aleatoriamente), foi avaliada indiretamente por espectrofotometria, através do método oficial AOAC Ch 5-91 (AOAC, 1990). Foi medida a absorbância na região do UV a 232 nm ( $Abs_{232nm}$ , relacionada com a presença de produtos iniciais de oxidação, isto é, hidroperóxidos conjugados) e a 270 nm ( $Abs_{270nm}$ , produtos de oxidação finais, isto é, ácidos graxos livres, aldeídos e cetonas) utilizando soluções a 1% das amostras em isoctano; como branco, foi utilizado apenas isoctano. As análises foram realizadas em triplicata, os valores de absorbância foram convertidos em valores de extinção específica (K) (AOAC, 1990). Os valores de K foram expressos pela média e desvio padrão das determinações. Os resultados, tratados estatisticamente no programa BioEstat 5.0 através de ANOVA para verificação de diferenças entre as médias amostrais e teste t para amostras pareadas, em um nível de significância de 5%, foram expressos pela média e desvio padrão das determinações.

### 3.6.2. ÍNDICE DE ACIDEZ

A determinação do índice de acidez do óleo de soja antes e após reação de acidólise foi realizada em triplicata, segundo descrito na literatura (ARO *et al.*, 2000), com as seguintes modificações: 0,5 g de óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 20 mL de etanol/éter etílico (1:2, v/v) e titulado com solução etanólica de hidróxido de sódio 0,1 N, usando solução de fenolftaleína 1% em etanol 95% como indicador. Os resultados de índice de acidez (I. A.), expressos como porcentagem de ácido oléico foram calculados pela fórmula abaixo:

$$I.A. (\% \text{ ácido oléico}) = V \times N \times 28,2 \times fc/m$$

Onde,

V= volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

N= normalidade da solução de NaOH;

Fc= fator de correção da solução de NaOH 0,1N

m= massa da amostra (g).

Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados, submetidos à ANOVA e teste t em um nível de significância de 5%, com auxílio do software BioEstat 5.0, foram expressos pela média e desvio padrão das determinações.

### 3.6.3. PERFIL LIPÍDICO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DA ACIDÓLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise qualitativa do perfil lipídico antes e após acidólise foi realizada por CCD permitindo a comparação entre as amostras. Placas de vidro com 20 cm de comprimento x 20 cm de largura foram previamente limpas com acetona e tratadas com 30g de sílica gel 60G (Merck, Alemanha) em suspensão com 75 mL de água. Após a secagem da sílica, as placas foram ativadas em estufa a 110°C, durante 1 hora antes de sua utilização. A fase móvel usada foi composta de clorofórmio/acetona/metanol (95:4, 5:0, 5, v/v/v) (MEDINA *et al.*, 1999). A cuba cromatográfica, revestida com papel filtro, foi submetida a saturação com o sistema de solventes durante aproximadamente 1 hora. Amostras de óleo de soja, ácidos graxos livres obtidos do óleo de peixe encapsulado e produtos da reação de acidólise foram monitorados utilizando os padrões de ácido oléico, de monoleína, dioleína e trioleína, diluídas em hexano. As bandas foram reveladas com vapores de cristais de iodo ressublimado.

### **3.6.4. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS (CG)**

O perfil de AGs dos substratos e dos TAG-Es obtidos após acidólise foi determinado por CG. O procedimento adotado neste trabalho foi uma adaptação do método descrito por AOAC, 1995. Em tubo de ensaio contendo os ácidos graxos, foram adicionados 2 mL de solução 0,5N de NaOH em metanol. O tubo, fechado, foi submetido a banho de água fervente por aproximadamente 3 a 5 minutos, e após resfriamento em água corrente, foi adicionado à mistura 2,5 mL de reagente esterificante BF<sub>3</sub>-metanol e levado novamente ao banho de água fervente e novamente resfriado em água corrente. Foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl e o tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos. Após a agitação, acrescentou-se 2,5mL de hexano para extração. Após separação das camadas, o sobrenadante contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, foi utilizado para a análise. Foi utilizado o cromatógrafo a gás marca CHROMPACK modelo CP9001 com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Chrompack (CP- Sil 88 50mx 0,25 mm). A temperatura do detector foi de 280°C, a do injetor, 250°C e a temperatura inicial da coluna de 180°C por 7 minutos com programação de 10°C/min. até temperatura máxima de 210°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 2,0 mL/min. na coluna. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos de ésteres de ácidos graxos injetados nas mesmas condições. A quantificação foi realizada por normalização das áreas calculadas por meio de integrador (Chromato-Integrator) e expressa em porcentagem relativa de cada ácido graxo em relação aos ácidos graxos totais.

### **3.6.5. CARACTERIZAÇÃO DOS TRIACILGLICERÓIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO AMBIENTE (EASI-MS)**

A análise dos TAGs foi realizada em espectrômetro de massa LCMS 2010 monoquadrupolar (Shimadzu) acoplado a técnica de ionização EASI desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massas Thomson (UNICAMP, Campinas, SP) segundo descrito por SIMAS *et al.*, 2010. Para as análises dos TAGs os espectros foram adquiridos no modo íon positivo, utilizando as seguintes condições: pressão do gás N<sub>2</sub> de 100 psi com ângulo de superfície de injeção de 30° e fluxo de metanol de 20 µL/min. Uma pequena gota de amostra de (2 µL) foi colocado diretamente sobre uma superfície de papel (envelope marrom tipo Kraft) e os espectros de massa foram obtidos na faixa de 700 a 1200 m/z e os TAG detectados como [TAG + Na]<sup>+</sup>.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SELEÇÃO DE LIPASES QUANTO À EFICIÊNCIA NA INCORPORAÇÃO DE AGPI AO ÓLEO DE SOJA

Lipases comerciais produzidas por diferentes microrganismos através de recombinações genéticas estão amplamente disponíveis no comércio. Cada qual apresenta propriedades cinéticas e especificidades quanto ao tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação do ácido graxo diferentes. No presente trabalho foram testadas cinco lipases comerciais e três lipases nativas produzidas no laboratório. As lipases nativas utilizadas, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum*, foram previamente selecionadas e caracterizadas em trabalhos anteriores (CAMPOS *et al.*, 2002, CARVALHO *et al.* 2003).

A composição dos principais AGs dos substratos usados na reação assim como dos produtos formados após catálise por cada uma das enzimas está discriminada na Tabela 16. Os resultados evidenciam que as lipases comerciais RM e CA foram as mais eficientes na obtenção de TAGs-Es com significativa redução dos níveis AGPI n-6 e acréscimo de AGPI n-3 comparado ao óleo de soja, resultando em uma relação n-6/n-3 de 4,6 e 4,8 respectivamente. A utilização das demais enzimas levaram a obtenção de TAGs-Es contendo altos níveis de AG n-6, numa relação n-6/n-3 de 5,8:1 a 13,1:1.

A hidrólise preferencial dos ácidos linoléico (18:2 n-6) e oléico (18:1 n-9) ocorreu provavelmente porque os TAGs que compõem a maior parte do óleo de soja possuem dois ou até mesmo três moléculas de ácido linoléico e/ou oléico esterificadas.

Os resultados indicam ainda que as lipases *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* B, as quais possuem especificidade posicional (1,3) parecem hidrolisar de forma preferencial o ácido linoléico provavelmente porque os TAG que compõem a maior parte do óleo de soja possuem este ácido preferencialmente nas posições 1 e 3.

AKOH *et al.*(1996) utilizando lipase de *Candida antarctica* inespecífica obtiveram óleo de prímula enriquecido com 43% de EPA, em 24 horas, através de acidólise em presença de solvente, demonstrando uma boa incorporação de EPA com lipase inespecífica, a qual não tem seletividade posicional de ácido graxo.

HUANG & AKOH (1994) utilizaram a mesma lipase em meio com solvente orgânico para catalisar a acidólise do óleo de soja com EPA e DHA nas formas de ácidos graxos livres e de ésteres etílicos, alcançando 32,9% de incorporação do DHA ao óleo de soja.

Tabela 16. Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise catalisado por lipases comerciais e nativas.

Ácidos graxos	Antes da reação		Após a reação enzimática*: soja + peixe (1:3)							
	Soja	Peixe	RM	CA	TL	CR	AN <sup>1</sup>	GC	PS	AN <sup>2</sup>
<b>AG saturados</b>	<b>12,6</b>	<b>26,6</b>	<b>18,7</b>	<b>20,2</b>	<b>19,1</b>	<b>18,2</b>	<b>17,9</b>	<b>20,8</b>	<b>17,5</b>	<b>19,0</b>
C14:0	-	7,4	2,4	1,2	0,8	2,1	2,0	3,0	1,2	2,4
C16:0	11,4	16,5	13,1	15,3	14,9	12,3	13,5	14,1	13,5	14,3
C18:0	1,2	2,7	3,2	3,7	3,4	3,8	2,4	3,7	2,8	2,3
<b>AG monoinsaturados</b>	<b>25,8</b>	<b>25,7</b>	<b>25,2</b>	<b>20,2</b>	<b>22,1</b>	<b>21,6</b>	<b>21,5</b>	<b>19,2</b>	<b>24,5</b>	<b>21,7</b>
C16:1 n-7	-	8,1	2,3	1,9	1,5	0,8	0,8	3,3	2,8	0,8
C18:1 n-9	25,8	15,3	22,9	18,3	20,6	20,8	20,7	15,9	21,7	20,9
C20:1 n-9	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AG poliinsaturados</b>	<b>61,5</b>	<b>40,5</b>	<b>52,9</b>	<b>58,0</b>	<b>57,4</b>	<b>58,0</b>	<b>58,4</b>	<b>56,2</b>	<b>56,0</b>	<b>56,3</b>
C18:2 n-6	56,5	4,6	43,5	47,8	50,6	49,4	54,0	49,4	51,2	52,3
C18:3 n-3	5,0	2,4	4,2	3,8	3,2	4,3	4,4	3,5	4,8	4,0
C20:5 n-3 (EPA)	-	19,8	2,3	2,5	1,9	2,8	-	1,4	-	-
C22:5 n-3	-	2,3	0,9	0,8	-	-	-	-	-	-
C22:6 n-3(DHA)	-	11,4	2,0	2,9	1,7	1,5	-	1,9	-	-
<b>Outros</b>		<b>7,2</b>	<b>3,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>3,8</b>	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>
EPA + DHA	-	31,2	6,3	5,4	3,6	4,3	-	3,3	-	--
n-3 AGPI	5,0	35,9	9,4	10,0	6,8	8,6	4,4	6,8	4,8	4,0
n-6 AGPI	56,5	4,6	43,5	47,8	50,6	49,4	54,0	49,4	51,2	52,3
Razão n-6/n-3	11,3	0,13	4,6	4,8	7,4	5,8	12,3	7,3	10,7	13,1

\*Reação catalisada por lipases comerciais: RM: *Rhizomucor miehei* imobilizada, CA: *Candida antarctica* B imobilizada, TL: *Thermomices lanuginosus*, CR: *Candida rugosa*, AN<sup>1</sup>: *Aspergillus niger* e lipases nativas: GC: *Geotrichum candidum*, PS: *Penicillium solitum*, AN<sup>2</sup>: *Aspergillus niger*. Condições da reação descritas no item 3.5.3.

## 4.2. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DA REAÇÃO DE ACIDÓLISE NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS TRIACILGLICERÓIS ESTRUTURADOS

Considerando que nos testes de seleção preliminar as enzimas RM e CA foram mais eficientes na incorporação de EPA e DHA nos TAGs do óleo de soja, nas condições de ensaio utilizadas, o planejamento experimental foi realizado com 12 experimentos para cada uma delas utilizando três variáveis ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) com três níveis cada uma baseado num fatorial  $2^3$  com quatro pontos centrais. A Tabela 17 apresenta os valores de incorporação de EPA + DHA (% relativa/AG totais) obtidos no planejamento experimental utilizado nas reações de acidólise.

Tabela 17. Planejamento experimental, com níveis codificados e reais da reação de acidólise entre óleo de soja e os ácidos graxos de óleo de peixe utilizando lipases comerciais.

Ensaio	Variáveis			% EPA + DHA	
	t (h) ( $X_1$ )	(AG:OS) ( $X_2$ )	$a_w$ ( $X_3$ )	RM	CA
1	-1 (12)	-1 (3:1)	-1 (0,4)	3,6	-
2	+1 (36)	-1 (3:1)	-1 (0,4)	-	5,9
3	-1 (12)	+1 (1:3)	-1 (0,4)	0,4	1,5
4	+1 (36)	+1 (1:3)	-1 (0,4)	0,2	0,2
<b>5</b>	<b>-1 (12)</b>	<b>-1 (3:1)</b>	<b>+1 (0,8)</b>	<b>9,2</b>	<b>7,4</b>
<b>6</b>	<b>+1 (36)</b>	<b>-1 (3:1)</b>	<b>+1 (0,8)</b>	<b>9,3</b>	<b>7,2</b>
7	-1 (12)	+1 (1:3)	+1 (0,8)	1,5	0,8
8	+1 (36)	+1 (1:3)	+1 (0,8)	1,2	2,6
9	0 (24)	0 (1:1)	0 (0,6)	3,5	4,9
10	0 (24)	0 (1:1)	0 (0,6)	3,0	3,5
11	0 (24)	0 (1:1)	0 (0,6)	3,0	3,4
12	0 (24)	0 (1:1)	0 (0,6)	2,5	3,3

t = tempo de reação (horas); AG: OS = Razão molar ácido graxo:óleo de soja;  $a_w$  = atividade de água

O maior nível de incorporação, correspondente a 9,3% de EPA + DHA, pôde ser observado quando utilizada a RM nas condições do ensaio 6 (tempo de reação = 36 h, relação AG:OS = 3:1 e  $a_w$  = 0,8). Para a mesma lipase, nas condições experimentais do ensaio 5 (tempo de reação = 12 h, relação AG:OS = 3:1 e  $a_w$  = 0,8), foi observada uma incorporação muito próxima (9,2% de EPA + DHA) em um tempo de reação inferior ao tempo de reação do

ensaio 6, fato que constitui vantagem. Nas mesmas condições experimentais, ou seja, nos ensaios 5 e 6, foram alcançados os maiores níveis de incorporação de EPA e DHA (7,4% para o ensaio 5 e 7,2% para o ensaio 6) quando utilizada a lipase *Candida antarctica* B.

A composição dos principais ácidos graxos dos substratos e dos produtos de reação nas diferentes condições do planejamento está apresentada nas Tabelas 18 e 19. Em relação à composição de AGs do óleo de soja antes da reação, observa-se o predomínio de ácido linoléico (18:2 n-6, 56,5%), ácido oléico (18: 1 n-9, 25,8%) e ácido palmítico (16:0, 11,4 %), não havendo a presença dos AGPI de interesse EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3). Por outro lado, os principais AGs encontrados no óleo de peixe foram os ácidos EPA (19,8%), palmítico (C16:0, 16,5%), oléico (18: 1 n-9, 15,3%) e DHA (11,4%), sendo que o conteúdo total de AGPIs n-3 foi de 35,9%.

Após a reação de acidólise catalisada pelas enzimas RM e CA nas diferentes condições a composição de AGs dos TAGs foi alterada. Os TAGs modificados extraídos do meio reacional apresentaram na sua composição conteúdos de EPA e DHA que variaram de 0 a 9,4 % para a RM e de 0 a 7,4 % para a CA, dependendo da condição da reação (ensaios 1 a 12). Nos ensaios 5 e 6, nos quais os conteúdos de EPA e DHA nos TAGs foram maiores para as duas enzimas testadas, houve redução nas porcentagens de ácido linoléico dos TAGs do óleo de soja em relação aos seus níveis antes da reação de acidólise. Esta alteração refletiu de forma positiva na relação n-6/n-3, reduzindo de 11,3:1 do óleo de soja antes da reação para 3,3:1 após acidólise com lipase de CA e para 2,6-2,7:1 após reação catalisada pela lipase RM. Nestas condições, pode-se observar que os AGs saturados, em especial os ácidos palmítico (16:0) e mirístico (14;0), também foram incorporados ao óleo de soja, refletindo no aumento de seu conteúdo nos TAGs modificados, uma vez que o óleo de peixe contém quantidades significativas desses ácidos. A taxa de incorporação do EPA foi superior à do DHA em quase todos os ensaios (com exceção do ensaio 8 da enzima CA), possivelmente pelo fato do óleo de peixe usado possuir maior porcentagem de EPA (20,5%) em relação ao DHA (12,1%).

Os resultados obtidos estão de acordo com HARALDSSON & THORARENSEN (1999), que utilizaram lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (1,3 específica) para catalisar a acidólise de 1,2-diacil-glicero-3-fosfatidilcolina com concentrado de AGPI n-3 (contendo 55% de EPA e 30% de DHA, numa proporção EPA/DHA de 1,8:1) em meio livre de solvente, obtendo fosfolipídeos enriquecidos em EPA (32%) e em DHA (16%).

Tabela 18. Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise após reação catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* (RM).

Ácidos graxos	Antes da reação		Após a reação (soja + peixe) com RM (ensaios de 1 a 12)											
	Soja	Peixe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>AG saturados</b>	<b>12,6</b>	<b>26,6</b>	<b>19,2</b>	<b>17,5</b>	<b>19,6</b>	<b>19,1</b>	<b>23,2</b>	<b>22,0</b>	<b>20,7</b>	<b>19,7</b>	<b>20,9</b>	<b>18,9</b>	<b>19,9</b>	<b>20,4</b>
C14:0	-	7,4	2,1	0,7	1,0	2,0	3,9	3,2	2,5	1,6	2,4	0,2	1,3	3,6
C16:0	11,4	16,5	13,1	14,0	14,9	14,5	15,1	15,0	14,5	14,5	14,8	15,3	14,8	13,1
C18:0	1,2	2,7	4,0	2,8	3,7	2,6	4,2	3,8	3,7	3,6	3,7	3,4	3,8	3,7
<b>AG monoinsaturados</b>	<b>25,8</b>	<b>25,7</b>	<b>20,6</b>	<b>22,9</b>	<b>20,6</b>	<b>21,1</b>	<b>23,0</b>	<b>23,8</b>	<b>20,5</b>	<b>21,0</b>	<b>21,9</b>	<b>23,0</b>	<b>21,9</b>	<b>21,2</b>
C16:1 n-7	-	8,1	-	-	0,2	0,2	4,1	3,1	0,4	0,5	1,3	1,2	1,0	1,9
C18:1 n-9	25,8	15,3	20,6	22,9	20,4	20,9	18,9	20,7	20,1	20,5	20,6	21,8	20,9	19,3
C20:1 n-9	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AG poliinsaturados</b>	<b>61,5</b>	<b>40,5</b>	<b>57,0</b>	<b>58,5</b>	<b>57,8</b>	<b>56,1</b>	<b>52,7</b>	<b>52,3</b>	<b>57,8</b>	<b>58,5</b>	<b>54,8</b>	<b>55,8</b>	<b>56,3</b>	<b>56,1</b>
C18:2 n-6	56,5	4,6	49,3	54,0	52,2	50,6	38,0	37,9	51,0	51,4	46,2	47,6	48,0	47,8
C18:3 n-3	5,0	2,4	4,1	4,5	5,3	5,3	5,5	5,1	5,3	5,4	5,1	5,2	5,3	5,8
C20:5 n-3 (EPA)	-	19,8	3,6	-	0,3	0,2	6,0	5,7	0,6	0,8	2,2	1,9	1,9	1,7
C22:5 n-3	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
C22:6 n-3 (DHA)	-	11,4	-	-	0,1	-	3,2	3,6	0,9	0,4	1,3	1,1	1,1	0,8
<b>Outros</b>	<b>-</b>	<b>7,2</b>	<b>3,2</b>	<b>1,1</b>	<b>1,9</b>	<b>3,7</b>	<b>1,1</b>	<b>1,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>2,4</b>	<b>2,3</b>	<b>1,9</b>	<b>2,3</b>
EPA + DHA	-	31,2	3,6	-	0,4	0,2	9,2	9,3	1,5	1,2	3,5	3,0	3,0	2,5
n-3 AGPI	5,0	35,9	7,7	4,5	5,7	5,5	14,2	14,4	6,8	7,1	8,6	8,2	8,3	8,3
n-6 AGPI	56,5	4,6	49,3	54,7	52,2	52,6	38,5	37,9	51,0	51,4	39,6	47,6	48,0	47,8
Razão n-6/n-3	11,3	0,13	6,4	12,1	9,1	9,6	2,7	2,6	7,5	7,2	4,6	5,8	5,8	5,7

Condições dos ensaios segundo planejamento descrito na tabela 17.

Tabela 19. Composição dos principais ácidos graxos (%) do óleo de soja, óleo de peixe e dos produtos de acidólise após reação catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B (CA).

Ácidos graxos	Antes da reação		Após a reação (soja + peixe) com CA (ensaios de 1 a 12)											
	Soja	Peixe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>AG saturados</b>	<b>12,6</b>	<b>26,6</b>	<b>23,3</b>	<b>20,2</b>	<b>20,2</b>	<b>18,9</b>	<b>23,5</b>	<b>21,7</b>	<b>21,0</b>	<b>19,7</b>	<b>18,6</b>	<b>19,3</b>	<b>21,1</b>	<b>19,6</b>
C14:0	-	7,4	1,8	1,3	1,4	1,4	3,8	3,8	2,3	2,6	0,9	2,0	2,5	2,0
C16:0	11,4	16,5	18,1	15,3	15,3	13,9	15,8	14,0	15,1	13,3	13,8	13,6	14,9	13,8
C18:0	1,2	2,7	3,4	3,6	3,5	3,6	3,9	3,9	3,6	3,8	3,9	3,7	3,7	3,8
<b>AG monoinsaturados</b>	<b>25,8</b>	<b>25,7</b>	<b>20,8</b>	<b>25,2</b>	<b>23,0</b>	<b>21,5</b>	<b>23,5</b>	<b>25,3</b>	<b>20,5</b>	<b>22,5</b>	<b>23,3</b>	<b>23,5</b>	<b>21,9</b>	<b>23,0</b>
C16:1 n-7	-	8,1	-	3,1	-	0,1	2,5	2,6	0,4	0,8	1,3	1,2	1,2	1,1
C18:1 n-9	25,8	15,3	20,8	21,6	23,0	21,4	21,0	22,7	20,1	21,7	22,0	21,7	20,7	21,9
C20:1 n-9	-	2,3	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-
<b>AG poliinsaturados</b>	<b>61,5</b>	<b>40,5</b>	<b>53,9</b>	<b>53,6</b>	<b>55,6</b>	<b>58,4</b>	<b>52,0</b>	<b>51,6</b>	<b>57,5</b>	<b>56,9</b>	<b>57,3</b>	<b>55,9</b>	<b>55,5</b>	<b>55,2</b>
C18:2 n-6	56,5	4,6	50,4	42,9	48,0	52,9	39,8	39,6	51,4	49,0	47,5	46,9	46,9	46,7
C18:3 n-3	5,0	2,4	3,5	4,8	6,1	5,3	4,8	4,8	5,3	5,3	4,9	5,2	5,2	5,2
C20:5 n-3 (EPA)	-	19,8	-	4,2	1,0	0,2	5,4	5,4	0,6	1,3	3,1	2,3	2,2	2,3
C22:5 n-3	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
C22:6 n-3 (DHA)	-	11,4	-	1,7	0,5	-	2,0	1,8	0,2	1,3	1,8	1,2	1,2	1,0
<b>Outros</b>	<b>-</b>	<b>7,2</b>	<b>2,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,5</b>	<b>2,2</b>
EPA + DHA	-	31,2	-	5,9	1,5	0,2	7,4	7,2	0,8	2,6	4,9	3,5	3,4	3,3
n-3 AGPI	5,0	35,9	3,5	10,7	7,6	5,5	12,2	12,0	6,1	7,9	9,8	9,0	8,6	8,5
n-6 AGPI	56,5	<b>4,6</b>	50,4	42,9	58,0	52,9	39,8	39,6	51,4	49,0	47,5	46,9	46,9	46,7
Razão n-6/n-3	11,3	0,13	14,4	4,1	7,6	9,6	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	8,4	6,2	4,8	5,2	5,4	5,5

Condições dos ensaios segundo planejamento descrito na tabela 17.

As Tabelas 20 e 21 apresentam os coeficientes de regressão e a ANOVA para os experimentos realizados com o emprego da enzima RM; e as Tabelas 22 e 23 apresentam as análises estatísticas e a ANOVA para a enzima CA.

Tabela 20. Coeficientes de regressão para a reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor	Lim.de conf. -90,%	Lim. de conf. +90,%
Média	3,32	0,11	28,74	0,000093	3,05	3,59
AG:OS (L)	-2,79	0,14	-19,76	0,000283	-3,13	-2,46
a <sub>w</sub> (L)	1,69	0,14	11,93	0,001267	1,35	2,02
tempo (L) x a <sub>w</sub> (L)	0,89	0,14	6,27	0,008176	0,55	1,22
AG:OS (L) x a <sub>w</sub> (L)	-1,31	0,14	-9,24	0,002680	-1,64	-0,97

Significância de 90%.

Tabela 21. ANOVA da reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	115,75	6	19,29	15,87
Resíduos	6,08	5	1,21	
Falta de ajuste	5,60	2	2,80	
Erro puro	0,48	3	0,16	
Total	121,83	11	11,07	

$R^2 = 0,95$

$F_{6;5;0,1} = 3,11$

Todas as variáveis mostradas na tabela de coeficientes de regressão para a lipase *Rhizomucor miehei* (Tabela 20) foram significativas neste estudo, como mostram seus p-valores, inferiores ao nível  $\alpha$  de significância utilizado (0,1). O software utilizado nas análises estatísticas removeu automaticamente as variáveis cujos p-valores foram superiores ao nível  $\alpha$  de significância utilizado. Todas as variáveis estatisticamente significativas para esta enzima são lineares. Pode-se observar na Tabela 20 que a relação molar AG:OS teve efeito negativo sobre a variável dependente, o que indica que uma relação molar ácido graxo/óleo de soja de 3:1 (valor codificado = -1) possibilita uma incorporação de EPA + DHA mais efetiva, ou seja,

quanto maior a proporção de AGs em relação ao óleo de soja, maior a resposta de interesse. A variável  $a_w$  da enzima teve efeito positivo sobre a resposta de interesse, o que indica que o maior valor de  $a_w$  testado (0,8) permitiu alcançar maiores graus de incorporação de EPA + DHA. Ainda na Tabela 20, observa-se que a variável tempo de reação não foi significativa para este estudo, porém a interação entre esta variável e a  $a_w$  é estatisticamente significativa, o que indica que o tempo, apesar de não influenciar diretamente na taxa de reação, passa a influenciar a mesma quando há variação na  $a_w$  da enzima.

Para as variáveis cujos efeitos sobre a resposta são positivos ( $a_w$  e a interação tempo de reação x  $a_w$ ), podemos observar que os valores de  $t_{calc}$  (11,93 para  $a_w$  e 6,27 para  $t \times a_w$ ) são superiores ao valor de  $t_{tab}$  (2,35). Isto demonstra que o efeito destas variáveis foi maior do que o erro padrão. Quanto maior o valor do efeito, maior o impacto da variável sobre a resposta, desta forma pode-se afirmar que a variável  $a_w$  (efeito =1,69) teve maior influência sobre a variável dependente do que a interação entre esta mesma variável e o tempo (efeito = 0,89). Para as variáveis cujos efeitos foram negativos (AG:OS e interação AG:OS x  $a_w$ ), observamos que os valores de  $t_{calc}$  (-19,76 para AG:OS e -9,24 para AG:OS x  $a_w$ ) foram inferiores a  $t_{tab}$  negativo (-2,35). Isto indica que o efeito foi maior que o erro padrão. Entre todas as variáveis estudadas, a AG:OS foi a que teve maior impacto sobre a variável dependente. Como o  $F_{calc}$  (15,87) é altamente significativo e a porcentagem de variação explicada pelo modelo ( $R^2$ ) foi boa (95,0%), conclui-se que o modelo se ajusta adequadamente aos dados experimentais.

O modelo experimental gerado é expresso pela equação:

$$z = 2,08 + 0,38x - 8,61y - 0,05 \times 24x + 0,37 \times 24y + 4,90xy - 1,36$$

A superfície de resposta e a curva de contorno para os ensaios com a lipase *Rhizomucor Miehei*, obtidas com o auxílio do software Statistica 9.0, estão representadas na Figura 5.

Tabela 22. Coeficientes de regressão para a reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor	Lim. de Conf.	Lim. de Conf.
					-90,%	+90,%
Média	3,46	0,21	16,47	0,000487	2,96	3,95
tempo (L)	0,72	0,26	2,78	0,068667	0,11	1,32
AG:OS (L)	-1,87	0,26	-7,29	0,005334	-2,48	-1,27
a <sub>w</sub> (L)	1,33	0,26	5,19	0,013913	0,73	1,94
tempo x AG:OS	-0,62	0,26	-2,41	0,095320	-1,22	-0,01
AG:OS x a <sub>w</sub>	-0,90	0,26	-3,50	0,039335	-1,51	-0,30

Significância de 90%.

Tabela 23. ANOVA da reação de acidólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	55,98	5	11,20	4,58
Resíduos	14,68	6	2,45	
Falta de ajuste	13,09	3	4,36	
Erro puro	1,59	3	0,53	
Total	70,66	11	6,42	

$$R_2 = 0,79$$

$$F_{5;6;0,1} = 3,4$$

As variáveis mostradas na tabela de coeficientes de regressão para a lipase *Candida antarctica* B (Tabela 22) são significativas, pois seus p-valores são inferiores ao nível  $\alpha$  de significância utilizado (0,1). Na mesma tabela, observa-se que a variável tempo de reação teve efeito significativo sobre a resposta, ao contrário do que ocorreu no estudo com a enzima RM. As variáveis tempo de reação e a<sub>w</sub> tiveram efeito positivo sobre a resposta. Os valores de *t<sub>calc</sub>* para estas variáveis (2,78 para tempo e 5,19 para a<sub>w</sub>) são superiores ao valor de *t<sub>tab</sub>* (2,35). Desta forma, conclui-se que os efeitos destas variáveis foram maiores do que o erro padrão. A variável a<sub>w</sub> (efeito = 1,33) teve maior influência sobre a variável dependente do que a variável tempo de reação (efeito = 0,72). Mais uma vez, a relação molar AG:OS teve efeito negativo sobre a resposta (efeito = -1,87), indicando que altos valores na relação ácido graxo / óleo de soja permitem a obtenção de melhores resultados quanto à incorporação de EPA e DHA no

processo de acidólise. Todas as interações significativas entre as variáveis foram negativas (efeitos de -0,62 para tempo de reação x AG:OS e de -0,90 para AG:OS x  $a_w$ ). Analisando os valores de  $t_{calc}$  para as variáveis e interações entre variáveis de efeito negativo (-7,29 para a AG:OS -2,41 para tempo de reação x AG:OS e -3,50 para AG:OS x  $a_w$ ), observamos que todos eles são inferiores ao valor de  $t_{tab}$  negativo (-2,35), indicando que os efeitos foram maiores do que o erro padrão. Como ocorrido no caso dos experimentos utilizando a enzima RM, a AG:OS foi a variável de mais impacto sobre a resposta de interesse.

O  $F_{calc}$  (4,58) pode ser considerado significativo, por ser superior ao valor de  $F_{tab}$ . A porcentagem de variação explicada pelo modelo ( $R^2$ ) foi de 79,0%. Por se tratar de um processo enzimático, pode-se considerar o modelo satisfatório, embora este não seja tão eficiente quanto o modelo obtido para o estudo com a lipase RM.

O modelo experimental pode ser expresso pela equação:

$$z = - 7,25 - 1,55x + 4,50y + 0,39 x 24x - 0,14 x 24y + 3,38xy + 9,27$$

A superfície de resposta e a curva de contorno para os ensaios com a lipase *Candida antarctica* B, obtidas com o auxílio do software Statistica 9.0, estão representadas na Figura 6.

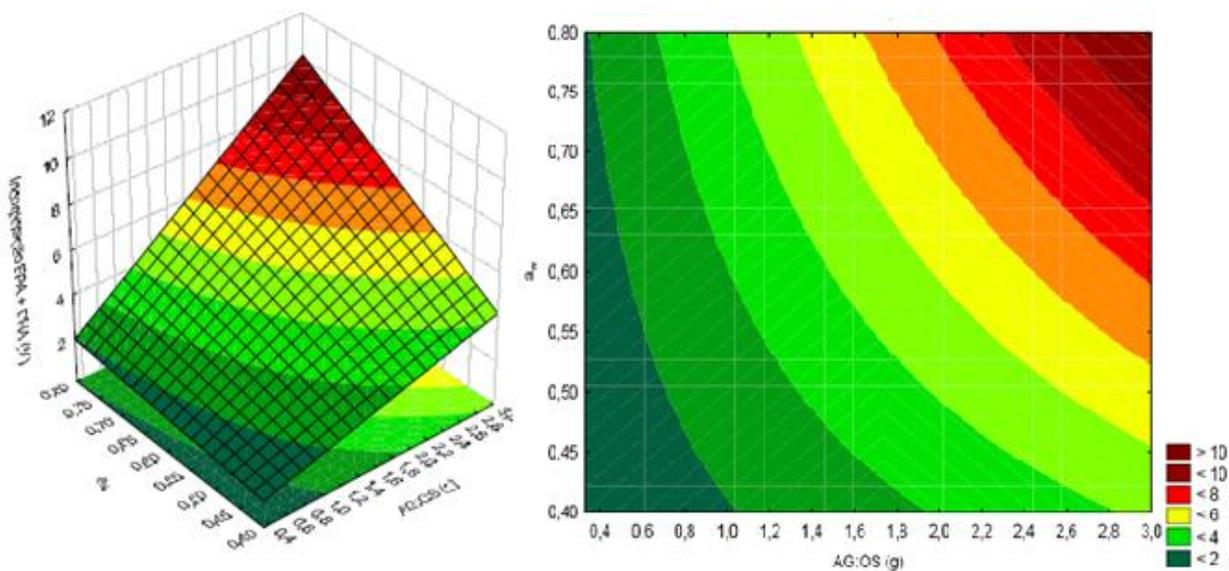


Figura 5. Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da  $a_w$  e relação molar AG:OS na porcentagem de incorporação de EPA + DHA após acidólise com a lipase de *Rhizomucor miehei*.

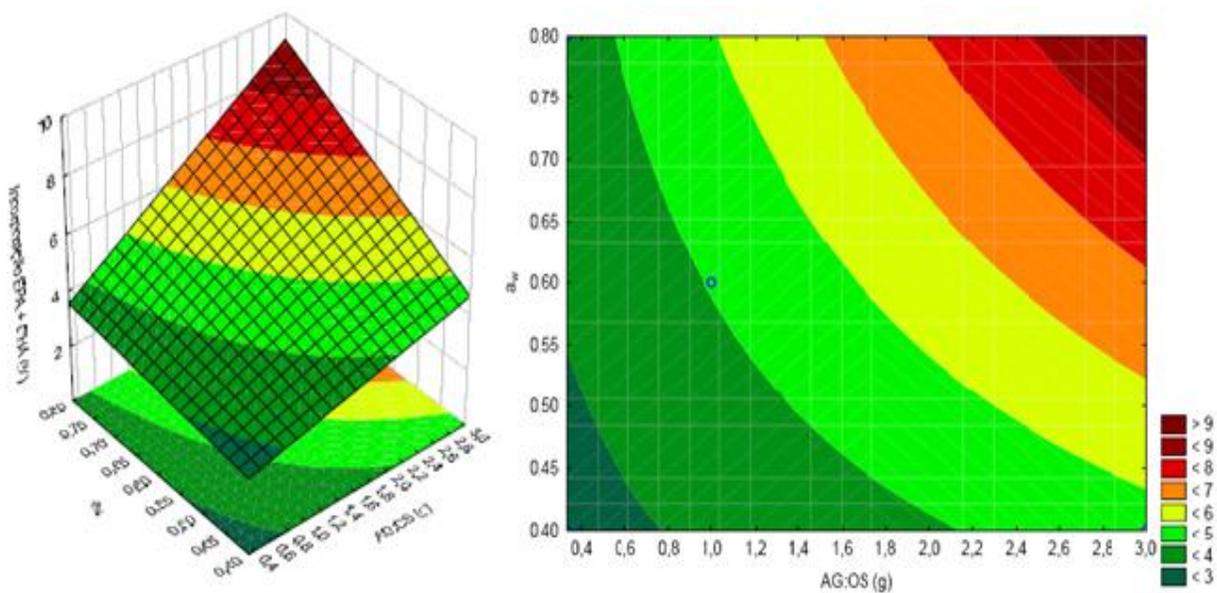


Figura 6. Superfície de resposta e curva de contorno do efeito da  $a_w$  e relação molar AG:OS na porcentagem de incorporação de EPA + DHA após acidólise com a lipase de *Candida antarctica* B.

As Figuras 7 e 8 mostram uma comparação entre as previsões feitas através do modelo e os valores experimentais observados para os ensaios com cada enzima. Observamos que para ambas as enzimas, os desvios entre os valores observados estão distribuídos normalmente, ou seja, observamos desvios positivos e negativos na mesma proporção, não havendo comportamento tendencioso na distribuição dos mesmos. Os valores observados para a enzima RM estão mais próximos aos valores previstos se comparados aos valores observados para CA, o que indica a melhor adequação do modelo para a primeira enzima, corroborando com a afirmação baseada nos valores de  $F_{calc}$  de 15,87 e de  $R^2$  de 0,95, de que o modelo para RM está mais adequadamente ajustado do que o modelo para CA ( $R^2$  de 0,79).

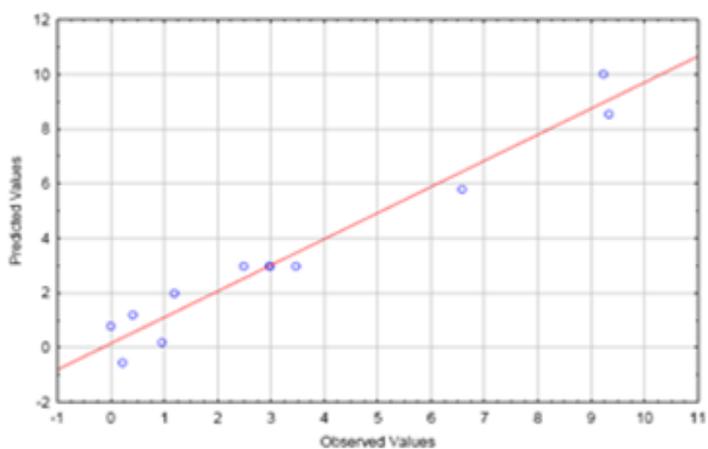


Figura 7. Comparação das previsões do modelo com os valores dos experimentos com a lipase de *Rhizomucor miehei*.

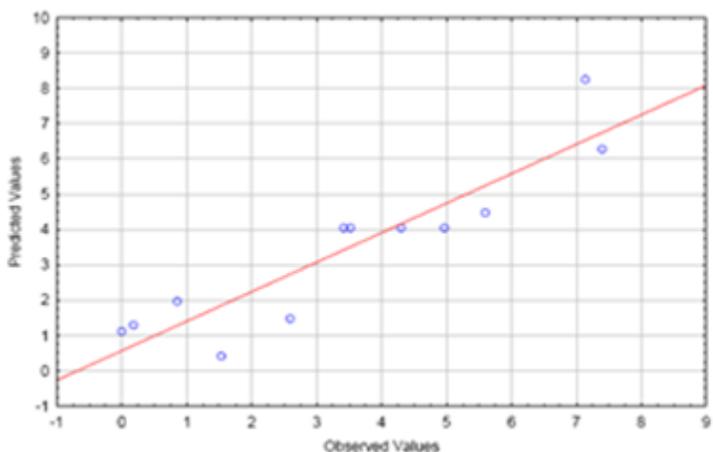


Figura 8. Comparação das previsões do modelo com os valores dos experimentos com a lipase de *Candida antarctica B*.

A Figura 9 ilustra o cromatograma da composição de AGs do óleo de soja antes da reação de acidólise e a Figura 10 representa a composição de AGs dos TAGs extraídos após a reação de acidólise com a lipase RM no ensaio 5.

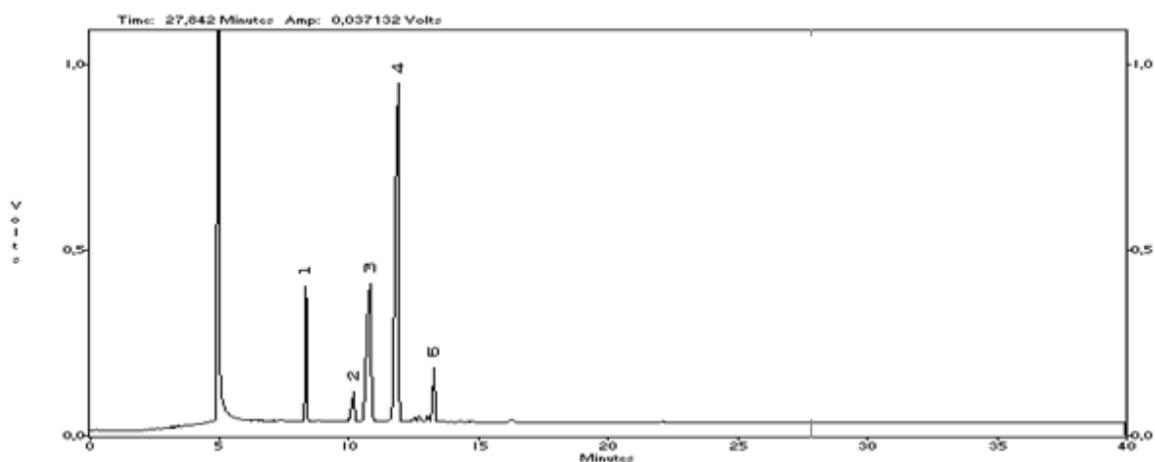


Figura 9. Cromatograma da composição de ácidos graxos (% em relação aos ácidos graxos totais) do óleo de soja original.

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.4. Picos: 1. ácido palmítico; 2. ácido esteárico; 3. ácido oléico; 4. ácido linoléico; 5. ácido linolênico.

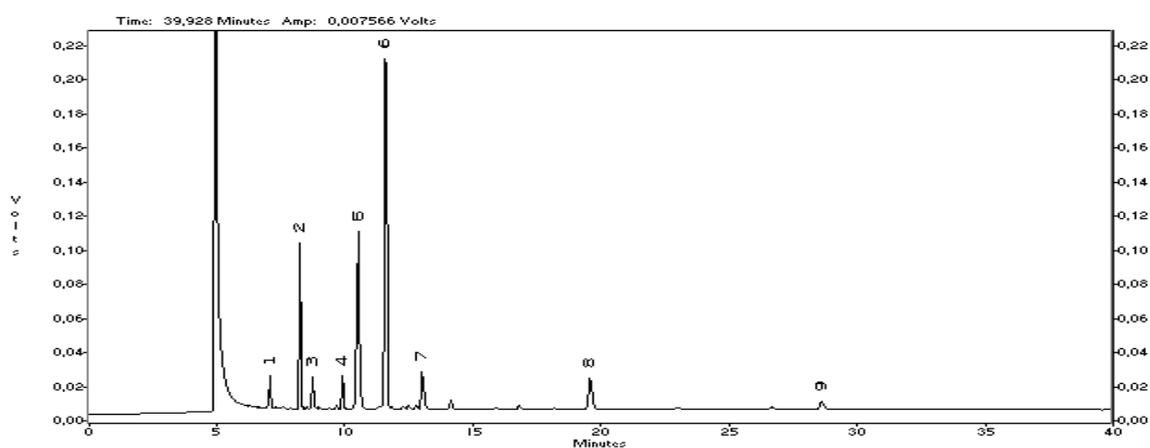


Figura 10. Cromatograma da composição de ácidos graxos (% em relação aos ácidos graxos totais) dos TAG-Es obtidos após acidólise com a lipase de *Rhizomucor miehei*.

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.4. Picos: 1. ácido mirístico; 2. ácido palmítico; 3. ácido palmitoléico; 4. ácido esteárico; 5. ácido oléico; 6. ácido linoléico; 7. ácido linolênico; 8. EPA; 9. DHA.

### 4.3. PERFIL LIPÍDICO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DE ACIDÓLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD foi utilizada no monitoramento da reação de hidrólise química do óleo de peixe e também para as reações de acidólise enzimática. A Figura 11 mostra o perfil dos substratos e produto modificado após acidólise com RM.

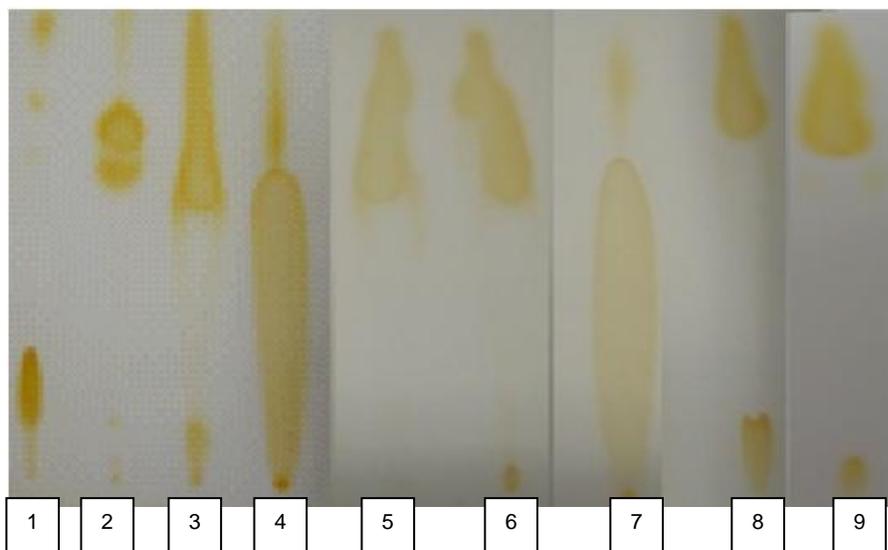


Figura 11: Cromatografia em camada delgada do perfil lipídico dos substratos e produtos da reação de acidólise catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*.

1. Padrão de monoleína, 2. Padrão de dioleína, 3. Padrão de trioleína, 4. Padrão de ácido oléico, 5. óleo de soja, 6. óleo de peixe, 7. Ácidos graxos livres do óleo de peixe após hidrólise química, 8. Produtos da reação de acidólise (ensaio 5), 9. TAG-Es (ensaio 5).

Comparando-se as amostras de óleo de soja comercial (ponto 5) e o óleo de peixe (ponto 6) com os padrões de monoleína (ponto 1), dioleína (ponto 2), trioleína (ponto 3) e ácido oléico livre (ponto 4), observamos que tanto óleo de soja, quanto o de peixe apresentam predominantemente TAG em sua composição. Após a reação de hidrólise química do óleo de peixe, observamos a obtenção dos ácidos graxos livres com pequenas quantidades residuais de TAG (ponto 7), o que comprova uma boa reação de hidrólise e separação dos ácidos graxos livres nas condições utilizadas. Na Figura pode-se também visualizar os TAGs (ponto 8) formado na reação de acidólise catalisada pela RM na condição 5 (descrita nas Tabelas 15 e 16), assim como os TAGs modificados extraídos do meio reacional (ponto 9).

#### 4.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO AMBIENTE (EASI-MS)

Os espectros obtidos por espectrometria de massas com ionização ambiente (EASI-MS: Ambient *Sonic-Spray* Ionization Mass Spectrometry) no modo positivo estão demonstrados nas Figuras 13 a 15. Estes espectros (*fingerprint*) fornecem uma avaliação qualitativa da composição dos TAG do óleo de soja antes da acidólise conforme demonstrado na Figura 12 e dos produtos resultantes após a acidólise catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* em duas condições experimentais (Figuras 14 e 15).

No espectro do óleo de soja é possível identificar pelos valores de suas massas moleculares os principais TAGs de sua composição na forma de  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$ : PLL ( $m/z$  877), PLO ( $m/z$  879), POO ( $m/z$  881), LLLn ou OLnLn ( $m/z$  899), LLL ou OLLn ( $m/z$  901), OLL ou OOLn ( $m/z$  903) ou OOL ( $m/z$  905); e  $[\text{TAG} + \text{K}]^+$ : LLLn ou OLnLn ( $m/z$  915), LLL ou OLLn ( $m/z$  917), OLL ou OOLn ( $m/z$  919) e OOL ( $m/z$  921), onde: P = ácido palmítico, O = ácido oléico, L = ácido linoléico e Ln = ácido linolênico, sendo que os demais picos possivelmente correspondem aos produtos de oxidação.

Conforme demonstrado na Figura 13, o espectro do óleo de soja modificado evidencia novos picos de maior massa molecular, os quais comprovam que os novos TAGs formados foram incorporados com EPA e DHA nas condições experimentais do ensaio 5. Foi possível identificar alguns TAGs-Es formados após acidólise com *Rhizomucor miehei* na forma de  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  LLEPA ( $m/z$  900), OLEPA ou PLDHA ( $m/z$  902), PODHA ( $m/z$  904), EPALEPA ( $m/z$  922); LLDHA ( $m/z$  926), LODHA ( $m/z$  928), EPALDHA ( $m/z$  948), DHALDHA ( $m/z$  974). onde: P = ácido palmítico, O = ácido oléico, L = ácido linoléico, Ln = ácido linolênico, EPA = ácido eicosapentaenóico e DHA = ácido docosahexaenóico, sendo que os demais picos possivelmente correspondem aos produtos de oxidação.

Por outro lado, conforme demonstrado na Figura 14, o espectro do óleo de soja modificado nas condições experimentais do ensaio 1, mostra pequenas variações se comparado ao espectro do óleo de soja antes da reação (Figura 12), ou seja, nas condições deste ensaio pode-se observar pequenas variações na estrutura dos TAGs originais.

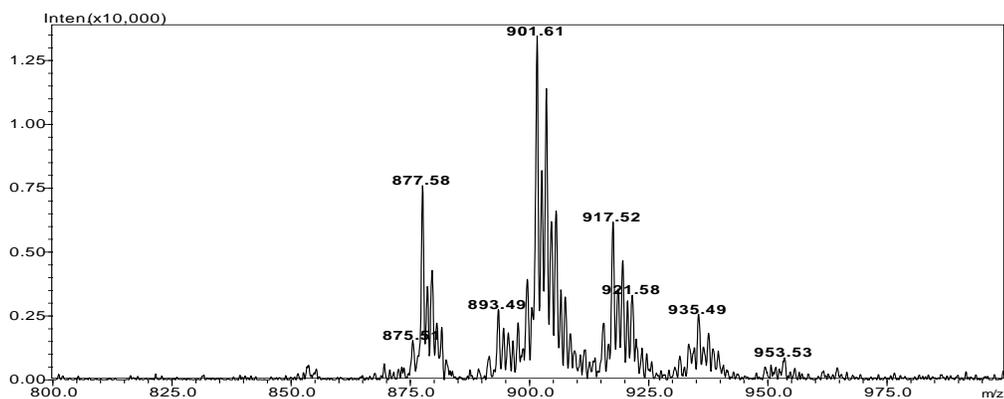


Figura 12. Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja.

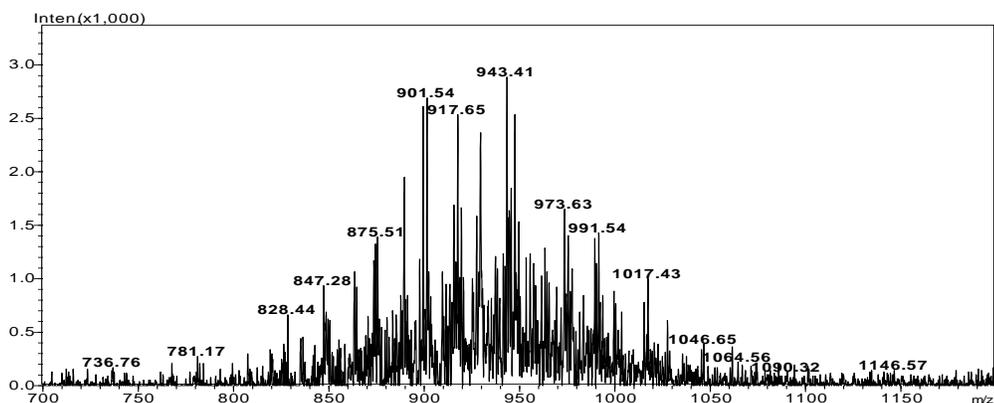


Figura 13. Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja modificada por reação de acidólise catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* (ensaio 5).

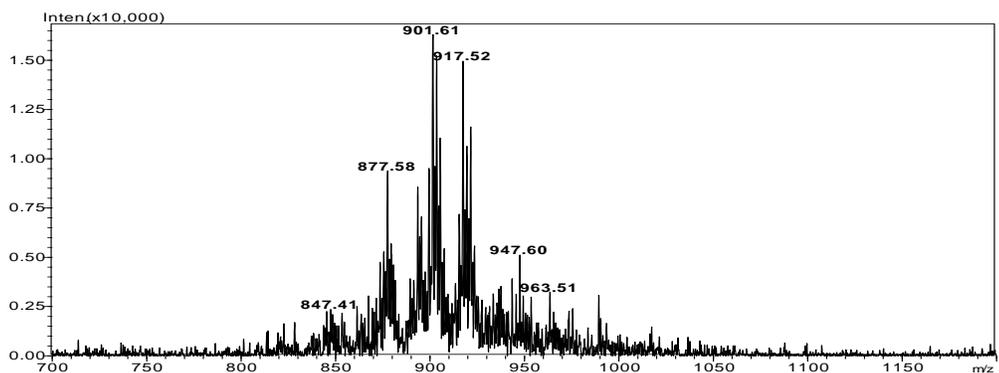


Figura 14. Espectro de massa EASI-MS da amostra de óleo de soja modificada por reação de acidólise catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* (ensaio 1).

#### 4.5. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA E PRODUTOS DE REAÇÃO.

As médias e desvios padrão do índice K para o óleo de soja (OS) antes e após a reação de acidólise utilizando as lipases *Candida antarctica* B e *Rhizomucor miehei* podem ser vistos na Tabela 24.

Tabela 24. Valores de K para amostras de óleo de soja antes e após acidólise com lipases de *Candida antarctica* B e *Rhizomucor miehei*.

Amostra	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>
ÓLEO DE SOJA (antes da reação)	1,60 ± 0,1	0,93 ± 0,1
CA* ensaio 6	1,32 ± 0,2	0,82 ± 0,7
CA* ensaio 8	1,50 ± 0,7	1,00 ± 0,6
RM** ensaio 1	0,92 ± 0,6	0,63 ± 0,7
RM** ensaio 4	0,79 ± 0,6	0,55 ± 0,5

\*CA- Ensaio com a lipase *Candida antarctica* B em diferentes condições de reação, conforme indicado na Tabela 17

\*\*RM- Ensaio com a lipase *Rhizomucor miehei*. em diferentes condições de reação, conforme indicado na Tabela 17

Podemos observar na Tabela 24, que os valores de índice K<sub>232</sub> e K<sub>270</sub> dos ensaios não mostraram significância  $\alpha=0,05$ , comparado ao óleo de soja antes da reação. Todas as amostras analisadas apresentaram valores de K<sub>232</sub> maiores do que os valores de K<sub>270</sub>, mostrando que as amostras analisadas possuem mais produtos de oxidação primária, indicando que as mesmas se encontram no início do processo oxidativo.

A sensibilidade de um óleo à oxidação aumenta com o aumento de seu conteúdo de AGPI (OSÓRIO *et al.*, 2001). O óleo de peixe é rico em AGPI, principalmente EPA e DHA. A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos corpos graxos (lipídios e matérias graxas).

#### 4.6. ÍNDICE DE ACIDEZ

As médias e desvios padrão do índice de acidez para o óleo de soja antes da reação de acidólise e para algumas amostras de óleo de soja após acidólise com as lipases CA e RM escolhidas aleatoriamente podem ser vistos na Tabela 25.

Tabela 25. Índice de acidez (% em ácido oléico) para amostras de óleo de soja antes e após acidólise com lipases de *Candida antarctica* B e *Rhizomucor miehei*.

Amostra	I.A. (% em ácido oléico)
ÓLEO DE SOJA (antes da reação)	2,82 ± 1,0
CA* ensaio 1	2,11 ± 1,0
CA* ensaio 6	3,52 ± 0,23
CA* ensaio 8	2,46± 0,80
RM** ensaio 1	2,11 ± 0,52
RM** ensaio 4	2,41± 0,41
RM** ensaio 7	4,23± 0,95

\*CA- Ensaio com a lipase *Candida antarctica* B.em diferentes condições de reação, conforme indicado na Tabela 17.

\*\*RM- Ensaio com a lipase *Rhizomucor miehei*.em diferentes condições de reação, conforme indicado na Tabela 17.

As diferenças entre as médias de acidez para as amostras antes e após a reação enzimática não foram significativas ao nível  $\alpha=0,05$ . Isto demonstra que as diferentes condições experimentais não alteraram significativamente o índice de acidez das amostras e, portanto, pode-se afirmar que o processo de acidólise e as diferentes condições de reação não geraram ácidos graxos livres em quantidades superiores àquelas já existentes no óleo de soja original, fato que se deve à incorporação dos AGs do óleo de peixe às moléculas de TAGs do óleo de soja. Caso restasse quantidade significativa de ácidos graxos livres no meio após a reação de acidólise, observaríamos diferenças significativas entre as médias das amostras.

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres.

## 5. CONCLUSÃO

- As lipases comerciais *Rhizomucor miehei* (Lipozyme<sup>®</sup> RM-IM) e de *Candida antarctica* B (Novozyme<sup>®</sup> 435) demonstraram maior eficiência na incorporação de AGPI de interesse, EPA e DHA, ao óleo de soja, possivelmente devido ao tipo de seletividade (1,3-seletiva) destas enzimas.
- Os resultados mostraram que a reação de acidólise nas condições testadas com as lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme<sup>®</sup> RM-IM) e de *Candida antarctica* B (Novozyme<sup>®</sup> 435) promoveu uma troca favorável de radicais acil entre os TAGs do óleo de soja e os AGs livres do óleo de peixe, aumentando os níveis de AGs n-3 e reduzindo os AGs n-6, mostrando ser uma alternativa viável para obtenção de TAGs-Es de interesse nutracêutico.
- Com a otimização da reação de acidólise com as lipases comerciais RM e CA, obteve-se uma razão n-6/n-3 dentro das proporções ideais recomendadas em literatura para nutrição parenteral, atendendo ao objetivo proposto por este estudo. Dentre as variáveis investigadas, a relação molar entre ácidos graxos e óleo de soja foi a que apresentou maior influência sobre a incorporação dos AGPI de interesse aos TAGs do óleo de soja.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, P. On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media support effects on water controlled activity. **European Journal of Biochemistry**, 9, 609-614, 1991.

ADOLPH M. Lipid emulsions in parenteral nutrition: state of the art and future perspectives. **Clinical Nutrition**, 20 (4), S11–S14, 2001.

AL-ZUHAIR, S.; DOWAIDAR, A.; KAMAL, H. Dynamic Modeling of Biodiesel Production from Simulated Waste Cooking Oil Using Immobilized Lipase. **Biochemical Engineering Journal**, 44, 256-262, 2009.

AKOH, C. C.; JENNINGS, B. H.; LILLARD, D. A. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 73 (8), 1059-1062, 1996.

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis** 15<sup>a</sup> ed. Washington: AOAC, 1990.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>a</sup> ed., v.1. Washington: AOAC, 1995.

ARO, T.; TAHVONEN, R.; MATTILA, T.; NURMI, J.; SIVONEN, T.; KALLIO, H. Effects of season and processing on oil content and fatty acids of baltic herring (*Clupea harengus membras*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(12), 6085-6093, 2000.

BORGSTON, B. & BROCKMAN, H. L. **Lipases**. 4<sup>a</sup> edição. Amsterdam, Holland: Elsevier, 1984.

BORNSCHEUER, U.T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. **Enzyme Microbial Technology**, 17, 578-586, 1995.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. p.164-167.

BOUSQUET, M. P.; WILLEMOT, R. M.; MONSAN, P.; BOURES, E. Lipase-catalyzed  $\alpha$ -butylglucoside lactate synthesis in organic solvent for dermo-cosmetic application. **Journal of Biotechnology**, 68, 61-69, 1999.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION (Inglaterra). Energy and nutrients fat. 2004. Disponível em [www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html](http://www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html). Acesso em 30 de março de 2010.

BROCKERHOFF, H.; HOYLE, H. J.; WANG, P. C.; LITCHFIELD, C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. **Lipids**, 3(1), 24-29, 1969.

BRONTE-STEWART, B.; ANTONIS, A.; EALES, L.; BROCK, J. F. Effects of feeding different fats on serum-cholesterol level. **The Lancet**, 1, 521-527, 1956.

BRZOZOWSKI, A. M.; SAVAGE, H.; VERMA, C. S.; TURKENBURG, J.P.; LAWSON, D. M.; SVENDSEN, A. e PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, 39, 15071-15082, 2000.

BURR, G.O. & BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **Journal of Biological Chemistry**, 82, 345-367, 1929.

BUSINESS WIRE (2007). Disponível em [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_m0EIN/is\\_2007\\_Dec\\_5/ai\\_n27466820](http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EIN/is_2007_Dec_5/ai_n27466820). Acesso em 28 de Fevereiro de 2010.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S. A. & ALSINA, M. A. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginose* lipase. **Biochemistry**, 39, 413-423, 2000.

CALDER, P. C. Immunoregulatory and antiinflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31, 467-490, 1998.

CAMPOS, P. R. B. OLIVEIRA, B. F.; NOFFS, M. D.; CARVALHO, P. O. Isolamento e seleção de microorganismos produtores de lipase como biocatalizadores na hidrólise parcial de óleo de sardinha. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, 20(1), 07-14, 2002.

CARMO, M. C. N. S. & CORREIA, M. I. T. D. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 55(3), 279-287, 2009.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T. & SILVA, D. M. . Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, 26(1), 75-80, 2003.

CARVALHO, P. O.; CONTESINI, F. J.; IKEGAKI, M. Resolução enzimática do (R,S)-ibuprofeno e (R,S)-cetoprofeno por lipases microbianas de fontes nativas e comerciais. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37(3), 329-37, 2006.

CHRISTOPHE, A.B. Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use. **American Oil Chemists` Society Press**, 239-263, 1998.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71, 171S-75S, 2000.

CURI R.; NEWSHOLME P.; PITHON-CURI T. C.; PIRES-DE-MELO M.; GARCIA C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT J. P. I.; GUIMARAES A. R. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32 (1), 15-21, 1999.

DE PABLO, M. A.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology and Cell Biology**, 78 (1), 31-39, 2000.

DEREWENDA, U.; BRZozowski, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a trygliceride lipase. **Biochemistry**, 31, 1532-1541, 1992.

DE SOUZA, F. I. S.; TESKE, M.; SARNI, R. O. S. Nutrição no recém-nascido pré-termo: proposta de protocolo prático. **Revista Paulista de Pediatria**, 26 (3), 278-89, 2008.

DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para medida de atividade de água**. 195f. Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2000.

DYEBERG, J. Linolenato-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutritional Review**, 44(4), 125-135, 1986.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**.4ª edição. Berlin: Springer, 2000.

FAN YY, MCMURRAY DN, LY LH, CHAPKIN RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. **Journal of Nutrition**, 133, 1913-20, 2003.

FAO-WHO. **Fats and oils in human nutrition: report of a Joint expert consultation**. **FAO food and nutrition paper n° 57**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1994.

FIRESTONE, D. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes. 2ª edição. Washington: **American Oil Chemists` Society Press**, 237, 2006.

FISCHER, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. **Advance of Lipids Research**, 23, 169-96, 1989.

FREGOLENTE, P. B. L. **Obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis através de glicerólise enzimática e destilação molecular**. 94 f. Dissertação (Mestrado Faculdade de Engenharia Química- Departamento de Processos Químicos) - UNICAMP, 2009.

FUSE, T.; ODA, G.; ARAI, K.; TAKAMURA, K.; KUSU, F. Electrochemical determination of lipase activity in pharmaceutical preparations. **Eletrochimica Acta**, 45, 2933-2937, 2000.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 74, 621-634, 1997.

GODERIS, H. L. Lipase-catalyzed ester exchange reaction in organic media with controlled humidity. **Biotechnology and Bioengineering**, 130, 256-265, 1990.

GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M-D. The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. **European Journal of Biochemistry**, 190, 603-609, 1990.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARISSON, D., RUBIN, D e CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, 268, 12843-12847, 1993.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. **Protein Science**, 3, 82-91, 1994.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, 11, 159-167, 1991.

HARALDSSON, G G. & HÖSKULDSSON, P. A. The preparation of triglycerides highly enriched with  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids via lipase catalyzed interesterification. **Tetrahedron Letters**, 30 (13), 1671-1674, 1989.

HARALDSSON, G. G. & THORARENSEN, A. Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 76 (10), 1143-1149, 1999.

HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E.; ALAM, N.; ILLINGWORTH, D. R. Reductions of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. **Journal of Lipid Research**, 29, 1451-1460, 1988.

HARVEI, S.;BJERVE, K. S.; TRETLI, S.; JELLUM, E.; ROBSAHM, T. E. ; VATTEN, L. Prediagnostic level of fatty acids in serum phospholipids:omega-3 and omega-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. **International Journal of Cancer**, 71(4), 545-551, 1997.

HASSANIEN, F. R.; MUKHERJEE, K. D. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 63 (7), 893-897, 1986.

HIBBELN, J. R. Fish consumption and major depression. **The Lancet**, 351, 1213, 1998.

HILLS, M. J. Dietary fat and human cancer. **Proceedings of Nutrition Society**, 40, 15-19, 1981.

HITA, E.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; RAMÍREZ, A.; ESTEBAN, L.; JIMENÉZ, M. J.; MUNIO, M. M.; GONZALEZ, P. A.; MOLINA, E.; Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, 42, 415-422, 2007.

HORIE, L. M.; TORRINHAS, R. S.; NARDI, L. D.; WAITZBERG, D. L.; FALCÃO, M. C. Lipídeos em Nutrição Parenteral Pediátrica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, 22 (3), 249-255, 2007.

HOU, C. T. Industrial Uses of Lipase. In: KUO, T. M. & GARDNER, H. W. **Lipid Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 605-628, 2002.

HUANG, K-H. & AKOH, C. C. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acid into vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 71 (11), 1277-1280, 1994.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids.** Washington, DC: National Academy of Sciences, 2002.

IWAI, M.; TSUJISAKA, H. Fungal lipases, **Lipases.** Amsterdam: Elsevier, 443-469, 1984.

JACKSON, M. A. & KING, J. W. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 74 (2), 103-106, 1997.

JAEGER, K. E. & REETZ, M. T. Microbial Lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 16, 396-403, 1998.

KASLAUSKAS, R. J. & BORNSCHEUER, U. T. **Biotransformation with lipases, In: A Multi-volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, edição Rehn**, 8, 37-192, 1998.

KATES, M. Lipid Extraction Procedures. **Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids**, Amsterdam: NorthHolland Publishing Co, 347-353, 1972.

KEYS, A.; ANDRESON, J. T.; GRANDE, F. "Essencial" fatty acids, degree of unsaturation, and effect of corn (maize) oil on the serumcholesterol level in man. **The Lancet**, 1, 66-68, 1957.

KINSELLA, J.E.  $\gamma$ -Linolenic acid: Function and effects on linoleic acid metabolism and eicosanoid - mediated reactions. **Advances in Food and Nutrition Research**, 35, 1-184, 1991.

KIDD, D.; LIU, Y.; CRAVATT, B. F. Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. **Biochemistry**, 40, 4005-4015, 2001.

KOGURI, Y.; AZUMA N. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 1397-1403, 2007.

KOJIMA, Y.; SAKURADANI, E.; SHIMIZU, S. Different specificity of two types of Pseudomonas lipases for C20 fatty acids with a  $\Delta 5$  unsaturated double bond and their application for selective concentration of fatty acids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101 (6), 496-500, 2006.

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. **European Food Research and Technology**, 472-477, 2006.

KRIS-ETHERTON, P. M.; KRUMMEL, D.; RUSSEL, M. E.; DREON, D.; MACKEY, S.; BORCHRES, J.; WOOD, P. D. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins, and coronary heart disease. **Journal of American Dietetic Association**, 88, 1373-1385, 1988.

LANDS, W. E. M. Fish, omega-3 and human health. 2. Edição. Champaign: **American Oil Chemists` Society Press**, 220, 2005.

LANGHOLZ, P.; ANDERSEN, P.; FORSKOY, T.; SCHMIDISDORFF, W. Application of a specificity of *Mucor miehei* lipase to concentrate docosahexaenoic acid (DHA). **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 66 (8), 1120-1123, 1989.

LEE, K. T.; AKOH C. C.; FLATT, W. P.; LEE, J. H. Nutritional effects of enzymatically modified soybean oil with caprylic acid versus physical mixture analogue in obese Zucker rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48 (11), 5696-5701, 2000.

LI ZU YI; WARD, O. P. Enzyme catalysed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Letters**, 15 (2), 185-188, 1993.

LOTTENBERG, A.M.P. Effects of dietary fish oil on the rate of very low density lipoprotein triglycerol formation and on the metabolism of chylomicrons. **Lipids**, 27 (5), 326-330, 1992.

MACARIO, A., MOLINER, M., CORMA, A., GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous Mesoporous Mater**, 118, 334-340, 2009.

MACRAE, A. R. & HAMMOND, R. C. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, 3, 193, 1985.

MANKU, M. S.; MORSE-FISHER, N.; HORROBIN, D.F. Changes in human plasma essential fatty acid levels as a result of administration of linoleic acid and gamma-linolenic acid. **European Journal of Clinical Nutrition**, 42, 55-62, 1988.

MARANGONI, A. J. Lipases: Structure, Function, and Properties. In KUO, T. M; GARDNER, H. W. **Lipid Biotechnology**. United States of America: Marcel Dekker, 716, 2002.

MASUEV, K. A. The effect of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 class on the late phase of the allergic reaction in bronchial asthma patients. **Terapevticheskii Arkhiv**, 69 (3), 31-33, 1997.

MEDINA, A. R.; CERDÁN, L. E.; GIMÉNEZ, A. G.; PÁEZ, B. C.; GONZÁLEZ, M. J. I.; GRIMA, E.M. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Journal of biotechnology**, 70, 379-391, 1999.

MIKIO, T.; MASSAO, O.; FUJI, T. Lipase hydrolysis of Milk fat and its soft fractions. Research Bulletin of Obihiro university. **Natural Science**, 22, 89-94, 2001.

MILED, N.; BEISSON, F.; DE CARO, A.; ARONDEL, V. e VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 11, 165-171, 2001.

MINAZZI-RODRIGUES, R. S. & PENTEADO, M. V. C. Importância dos óleos de peixe e nutrição humana. **Cadernos de Nutrição**, 3, 41-97, 1991.

MUKHERJEE, K. D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. **Biocatalysis**, 3, 277-278, 1990.

NOSSEN, J. O.; RUSTAN, A. C.; GLOPPESTAD, S. H.; MALBAKKEN, S.; DREVON, C. A. Eicosapentaenoic acid inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 879, 56-65, 1986.

OSBORN, H. T. & AKOH, C. C. Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 1, 93-103, 2002.

OSÓRIO, N. M.; FERREIRA-DIAS, S.; GUSMÃO, J. H.; FONSECA, M. M. R. Response surface modelling of the production of n-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 11 (.4-6), 677-686, 2001.

PALOMO, J. M. Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. **Current Bioactive Compounds**, 4, 126-138, 2008.

PEPPING, J. Omega-3 essential fatty acids. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 56 (8), 719-724, 1999.

PETERS, G. H.; SVENDSEN, A.; LANGBERG, H.; VIND, J.; PATKAR, S. A.; TOXVAERD, S.; KUNNUNEN, P. K.J. Active serineinvolved in the stabilization of the active site loop in the *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, 37, 12375-12383, 1998.

PINYAPHONG, P.; PHUTRAKUL, S. Modification of Palm Oil Structure to Cocoa Butter Equivalent by *Carica papaya* Lipase-Catalyzed Interesterification. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, 54, 536-540, 2009.

SANDERS, T. A. B.; SULLIVAN, D. R.; REEVE, J.; THOMPSON, G. R. Triglyceride-lowering effects of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridaemia. **Atherosclerosis**, 5, 459-462, 1985.

SARDA, L & DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, 30, 513-521, 1958.

SCOTT, C. L.; FALK-PETERSEN, S.; SARGENT, J. R.; HOP, H.; LONNE, O. J.; POLTERMANN, M. Lipids and trophic interactions of ice fauna and pelagic zooplankton in marginal ice zone of the Barents Sea. **Polar Biology**, 21, 65-70, 1999.

SHIMADA, Y.; HIROTA, Y.; BABA, T.; SUGIHARA, A.; MORYIAMA, S.; TOMINAGA, Y.; TERAI, T. Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids. **Journal American Oil Chemistry Society**, 713-716, 2007.

SILVA, R. C & GIOIELLI, L. A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42 (2), 223-235, 2006.

SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; CABRAL, E. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. N. Instantaneous characterization of vegetable oils *via* TAG e FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Revista Analyst**, 135, 738-744, 2010.

SIMONS, L. A.; HICKIE, J. B.; BALASUBRAMANIAM, S. On the effects of n-3 fatty acids (MaxEpa) on plasma lipids and lipoprotein in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, 45, 75-88, 1985.

SINGER, P.; WIRTH, M.; BERGER, I. A. A possible contribution of decrease in free fatty acids to low serum triglycerid level after diets supplemented with n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. **Atherosclerosis**, 83, 167-175, 1990.

SISAK, C.; CSANADI, Z.; RONAY, E.; SZAJANI, B. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 1002-1007, 2006.

SPIESS, W. E. L. & WOLF, W.R. Critical evaluation of methods to determine moisture sorptions isotherms. In: ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water activity: theory and applications to food**. New York: Marcel Dekker Inc., 215-233, 1987.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.; NAIR, B. U.; RAMASANI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, 22, 181-188, 2004.

ZHOU, G.; CHEN, Y.; YANG, S. Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. **Microporous and Mesoporous Mater**, 119, 223-229, 2009.

WAITZBERG D. L.; TORRINHAS R. S.; JACINTHO T. M. New parenteral lipid emulsions for clinical use. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 30 (4), 351-67, 2006.

WANTEN, G. J. A. & CALDER. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. **American Journal Clinical Nutrition**, 85, 1171-84, 2007.

WHITEHOUSE, A. S.; SMITH, H. J.; DRAKE, J. L.; TISDALE, M. J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**, 61 (9), 3604-9, 2001.

WILLIS, W.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38 (8), 639-674, 1998.

YAMANE, T.; SUZUKI, T.; SAHASHI, Y.; VIKERSVEEN, L.; HOSHINO, T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis with out solvent. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, 69 (11), 1104-1107, 1992.