

MARIA MANUELA CAMINO FELTES

**ESTUDO DA SÍNTESE QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE
TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE
PEIXE**

Florianópolis

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**ESTUDO DA SÍNTESE QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE
TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE
PEIXE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

MARIA MANUELA CAMINO FELTES

Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis, fevereiro de 2006.

“Estudo da Síntese Química e Enzimática de Triglicerídios Estruturados a Partir de Óleo de Peixe”

Por

Maria Manuela Camino Feltes

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Coordenadora do CPGEA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Jane Mara Block

Prof. Dr. José Miguel Muller

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2006.

Ao meu tio e padrinho querido, Paulo Luiz Notari Camino (*in memoriam*).

Ao meu pai amado, Armando Feltes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

A todos que colaboraram para a concretização deste trabalho, em especial:

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Prof. Jorge Luiz Ninow, pela orientação, amizade, confiança e incentivo.

Ao Químico João Francisco Gomes Correia, pelo interesse, auxílio, paciência e amizade. Sua criatividade, conhecimento e senso prático foram decisivos para o trabalho.

À Prof^ª. Julieta Monteiro, por ter me apresentado este tema fascinante.

À Prof^ª. Jane Mara Block, por ter me aberto várias portas, pelo auxílio, sugestões e interesse pelo aprimoramento do estudo.

Ao Prof. Luiz Antonio Gioielli, por toda sua atenção, pela agradável acolhida em seu laboratório e pelas sugestões bastante pertinentes para o enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Grimaldi, pela recepção em seu laboratório e pelas ótimas observações.

Ao Prof. Francisco Deschamps, por gentilmente ter realizado análises em seu laboratório.

Aos professores Maria da Graça Nascimento e Luiz Madureira pelo interesse, atenção e constante disponibilidade.

À Prof^ª Erna Vogt de Jong, pela troca de idéias e amizade.

À Novozymes, à Roche, à Support, à ADM e à Pesqueira Oceânica, pelas amostras para a realização desta pesquisa.

À Denise, Chiu e Roberta, do Laboratório de Óleos e Gorduras da USP, pela atenção no ensino das técnicas, pelas ótimas dicas e pela amizade.

Às queridas e sinceras amigas que, mesmo distantes, sempre compartilharam comigo as conquistas e incertezas desta jornada: Adri, Jessi, Flavia, Marisa e Paty Reis.

À Andreia e Cris, que conheci neste período e se tornaram muito importantes.

À Patrícia Albuquerque e Fernanda, pela recepção em Florianópolis.

À Luana pelo interesse, ótimas idéias e pela responsabilidade durante o trabalho.

A todos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO): em especial à Adriana, pelo companheirismo e sincera amizade; pelos bons momentos compartilhados: Fran, Gisa, Mônica, Bia, Jaci, Denise, Chalana, Adriane, Erika, Suzane, Francielo, Murilo, Américo, Ricardo, Thiago, Fabian. Aos professores Gláucia Maria Falcão de Aragão e Agenor Furigo Jr.

Às minhas primas, Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Bohrer Morel e Eng^a. Química Marisa Notari Bertoncello (*in memoriam*), e minha madrinha, Ivone Salerno, pela determinação, competência e por serem fonte de inspiração para minha formação.

Ao Alessandro, minha paixão, pelo carinho, incentivo, companheirismo, paciência e compreensão quando o trabalho exigiu nossa distância, e pelo amor incondicional.

À minha família, que eu amo demais: minha mãezinha, minha vó querida, meu pai, minha mana e minhas sobrinhas, por todos valores que me tornaram a pessoa que sou hoje, pelo apoio, incentivo para eu buscar meus sonhos e pelo imenso amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.2 JUSTIFICATIVA DO TEMA.....	17
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	19
2.2 OBTENÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE.....	30
2.3 PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS.....	35
2.4 INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA.....	40
2.5 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	44
2.6 ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS	53
2.7 TÉCNICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS.....	56
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 MODIFICAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE COMERCIAL	59
3.2 EXTRAÇÃO E MODIFICAÇÃO DO ÓLEO DE RESÍDUOS DE SARDINHA.....	62
3.3 COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS.....	64
4 ESTUDO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE	71
RESUMO	72
4.1 INTRODUÇÃO.....	72
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.4 CONCLUSÕES.....	87

4.5	AGRADECIMENTOS.....	87
5	EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE RESÍDUOS DE SARDINHA (<i>Sardinella brasiliensis</i>) PARA UTILIZAÇÃO COMO SUBSTRATO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS: ESTUDOS PRELIMINARES.....	88
	RESUMO	89
5.1	INTRODUÇÃO.....	89
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	93
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.4	CONCLUSÕES.....	101
5.5	AGRADECIMENTOS.....	102
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	103
7	SUGESTÕES	105
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9	ANEXOS.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas químicas dos ácidos graxos n-3 docosaheptaenóico e eicosapentaenóico	20
Figura 2 Bioconversão dos ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 e n-6 no organismo humano.....	21
Figura 3 Produção da pesca extrativa marinha no Estado de Santa Catarina no ano de 2004. Fonte: IBAMA (2005).....	26
Figura 4 Mecanismo da reação química para a síntese de lipídios estruturados – Mecanismo de adição à carbonila	41
Figura 5 Mecanismo da reação química para a síntese de lipídios estruturados – Condensação de Claisen	43
Figura 6 Representação esquemática das etapas da interesterificação enzimática entre um triglicerídeo e um ácido graxo livre: a) hidrólise do TAG, com a liberação do resíduo do AG nativo; b) incorporação do novo resíduo de AG.....	49
Figura 8 Exemplo de curva obtida pela análise por calorimetria de varredura diferencial	70
Figura 9 Curvas de fusão obtidas por DSC da mistura Trigliceril CM [®] e óleo de peixe ROPUFA [®]	84
Figura 10 Curvas de fusão obtidas por DSC da mistura do éster metílico do ácido cáprico com o óleo de peixe ROPUFA [®]	85
Figura 11 Perfil lipídico do óleo bruto de resíduos de sardinha (amostra superior) extraído pelo método de Bligh & Dyer, comparado com óleo de peixe comercial (amostra inferior), conforme análise por cromatografia em camada delgada.....	98
Figura 12 Cromatograma do éster metílico do ácido cáprico sintetizado conforme descrito no item 3.1.3.	117
Figura 13 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA [®] com os triglicerídios de cadeia média Trigliceril [®] CM após a interesterificação química.	118

Figura 14 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com os triglicerídios de cadeia média Trigliceril® CM após a interesterificação enzimática.....	118
Figura 15 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com o éster metílico do ácido cáprico após a interesterificação química.....	119
Figura 16 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com o éster metílico do ácido cáprico após a interesterificação enzimática.....	119
Figura 17 Cromatograma do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira extraído pela técnica de Bligh & Dyer.....	120
Figura 18 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira com os triglicerídios de cadeia média antes da interesterificação enzimática.....	120
Figura 19 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira com os triglicerídios de cadeia média após a interesterificação enzimática.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição em ácidos graxos de alguns óleos de peixe (g/100g de óleo).....	23
Tabela 2 Quantidades recomendadas para ingestão de ácidos graxos n-3, n-6, EPA e DHA por adultos saudáveis	24
Tabela 3 Reações para a troca de radicais acila entre acilgliceróis. Adaptado de (Osborn e Akoh 2002)	39
Tabela 4 Classificação das lipases quanto à especificidade.....	47
Tabela 5 Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo) do óleo de peixe ROPUFA® e limites máximos estipulados pela legislação.....	79
Tabela 6 Composição em ácidos graxos (% em massa), teores de ácidos graxos saturados e insaturados (%), relação EPA/DHA e n3:n6, e índice de iodo (g de iodo/100g) das amostras	81

Tabela 7 Índice de acidez (% em ácido oléico) das amostras de óleo antes e depois das interesterificações química e enzimática.....	82
Tabela 8 Dados obtidos das curvas de fusão das amostras analisadas por DSC	86
Tabela 9 Análises físico-químicas de resíduos de sardinha (<i>Sardinella brasiliensis</i>) (valores expressos em g/100g de matéria úmida e de matéria seca)*	96
Tabela 10 Rendimento e parâmetros de qualidade do óleo bruto de resíduos de sardinha extraído por Bligh & Dyer	97
Tabela 11 Composição em ácidos graxos (% em massa), teores de ácidos graxos (%), relação EPA/DHA e n3:n6, e índice de iodo (g de iodo/100g) das amostras.....	100

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGL	Ácido graxo livre
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AOCS	American Oil Chemists' Society
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLA	Ácido linoleico conjugado
C10:0	Ácido cáprico
DAG	Diglicerídio
DHA	Ácido docosahexaenóico
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
EPA	Ácido eicosapentaenóico
GLA	Ácido gama linolênico
I.A.	Índice de acidez
I.P.	Índice de peróxido

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Ácido linoleico
LE	Lípido estruturado
MAG	Monoglicerídio
MeC ₁₀	Éster metílico de ácido cáprico
NaOCH ₃	Metóxido de sódio
TAG	Triglicerídio
TBHQ	Tert-butil hidroquinona
TCC	Triglicerídio de cadeia curta
TCL	Triglicerídio de cadeia longa
TCM	Triglicerídio de cadeia média

RESUMO

Lipídios estruturados são triglicerídios construídos para conter uma composição em ácidos graxos ou estrutura específica. Podem ser sintetizados por reações de interesterificação, que pode ser química, com a vantagem do baixo custo, ou enzimática, atrativa devido à possibilidade de a reação ser dirigida. A utilização de óleo de peixe como substrato garante o fornecimento dos ácidos graxos n-3 eicosapentaenóico e docosahexaenóico, os quais, em combinação com ácidos graxos de cadeia média, proporcionam vantagens nutricionais e metabólicas. A interesterificação pode ser utilizada para a valorização de resíduos de sardinha, principal pescado capturado no Estado de Santa Catarina, rico nestes n-3. O objetivo deste trabalho foi o estudo da catálise química e enzimática (utilizando lipase *sn*-1,3 específica) para a obtenção de lipídios estruturados ricos em ácidos graxos n-3 (provenientes de óleo de peixe comercial) e em ácidos graxos de cadeia média, utilizando-se como doador acila tanto triglicerídio de cadeia média quanto éster metílico de ácido cáprico. A interesterificação enzimática do óleo de peixe com o éster proporcionou a obtenção de um lipídio estruturado com uma composição mais balanceada em ácidos graxos do que nos demais tratamentos aplicados, com 38,34% de ácidos graxos saturados (9,74% de cadeia média) e 29,36% de EPA e DHA nos triglicerídios. A análise dos produtos por calorimetria de varredura diferencial indicou que os óleos interesterificados apresentaram um perfil de fusão diferente do observado para as simples misturas físicas dos óleos de partida, com influência tanto do substrato quanto do tipo de catalisador. Devido à maior praticidade oferecida pelo triglicerídio de cadeia média, este substrato foi aplicado na interesterificação enzimática para a modificação da composição de óleo extraído de resíduos de sardinha. O óleo extraído dos resíduos de sardinha pelo método de Bligh & Dyer apresentou 12,1% de EPA e 16,5% de DHA. A interesterificação proporcionou a obtenção de triglicerídios com 38,2% de ácidos graxos de cadeia média e 17,5% de EPA e DHA. Óleo de peixe contendo ácidos graxos de cadeia média foi obtido com sucesso neste estudo, e apresenta grande potencial de aplicação em alimentos ou para uso clínico.

Palavras-chave: n-3, óleo de peixe, sardinha, ácido graxo de cadeia média, lipídio estruturado, interesterificação, lipase, catálise.

ABSTRACT

Structured lipids are tailor-made triacylglycerols with specific nutritional, chemical or physical properties because of their particular fatty acid composition or structure. Lipid modification strategies for the synthesis of structured lipids include chemical or lipase-catalyzed interesterification. This one offers the advantage of the control over the structure of the product. A structured lipid containing both medium-chain and the docosahexaenoic and the eicosapentaenoic acids from fish oil on a single glycerol backbone offers nutritional and therapeutic benefits. In Brazil the state of Santa Catarina is the largest producer of sardine, whose residues are rich in these n-3 fatty acids, being an excellent substrate for the synthesis of structured lipids. The aim of this study was the chemical and the enzymatic (with *sn*-1,3 specific lipase) incorporation of medium-chain fatty acids into fish oil, by using both medium chain triacylglycerols and capric acid methyl ester as acyl donor. Among these strategies, the enzymatic interesterification of the fish oil with the capric acid methyl ester as substrate yielded a more balanced fatty acid composition, with 38,34% of saturated fatty acids (9,74% of medium-chain fatty acids) and 29,36% of the docosahexaenoic and the eicosapentaenoic acids. The products were analyzed by differential scanning calorimetry. Interesterification produced noteworthy changes in melting profile, and both the catalyst and the substrate dictated the melting behavior of the samples. Due to its easy application, the medium chain triacylglycerol was the acyl donor in the lipase-catalyzed modification of sardine oil to incorporate medium-chain fatty acids. Lipids (5,43%) were recovered from the sardine residues by the Bligh & Dyer method. The sardine oil contained 12,1% of EPA and 16,5% of DHA. The fatty acid composition of the triacylglycerols of the interesterified sardine oil was markedly changed to contain about 38,2% of medium chain fatty acids and 17,5% of EPA and DHA. Fish oil with medium-chain fatty acids was successfully produced and may be interesting for food and clinical applications.

Keywords: n-3, fish oil, sardine, medium chain fatty acid, structured lipid, interesterification, lipase, catalysis.

1 INTRODUÇÃO

A quantidade e a qualidade dos lipídios ingeridos na dieta influenciam o estado de saúde do consumidor. Entretanto, não se encontram na natureza lipídios com funcionalidade otimizada.

Alimentos marinhos como peixes e algas são considerados funcionais por conterem os ácidos graxos (AGs) da série n-3 eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3), reconhecidos por sua importância no combate e prevenção a diversas doenças.

Apesar de sua importância na dieta, há uma tendência mundial de redução na ingestão de pescado, provocando um desbalanço de AGs n-3, o que foi verificado principalmente a partir do surgimento da sociedade industrial.

Outro ponto que deve ser considerado é o fato de que a composição em AGs e a estrutura dos triglicerídios (TAGs) influenciam nas propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais dos óleos e gorduras.

Exigências comerciais e nutricionais para a obtenção de óleo de peixe, e que envolvem composição balanceada, qualidade constante, flexibilidade de aplicação, estabilidade oxidativa e uniformidade do produto, podem ser atendidas mediante a aplicação de técnicas para a modificação deste lipídio. Uma das técnicas mais estudadas atualmente é a interesterificação, que promove o rearranjo dos TAGs originais, dando origem a novas moléculas conhecidas como lipídios estruturados (LE).

Esta reação permite que se modifique a composição em AGs ou sua distribuição nos TAGs originais, conferindo, portanto, novas propriedades ao produto. Não apresenta o inconveniente da formação de isômeros conformacionais na forma *trans* no produto, fato observado quando se aplica a hidrogenação parcial como método de transformação de óleos. A inserção de AGs saturados de cadeia média (AGCM) aos TAGs do óleo de peixe permite a obtenção de um LE com uma composição e balanço adequado de AGs. O produto passa a apresentar vantagens metabólicas, especialmente quando os AGs estão localizados em posições específicas dos TAGs, o que não é proporcionado pela simples mistura física de óleos e gorduras.

O AGCM provê energia de rápida absorção, além de promover a alteração das propriedades físico-químicas do lipídio original, como perfil de fusão e conteúdo de gordura sólida, ainda conferindo ao produto uma maior estabilidade à oxidação. A presença de EPA e DHA no LE obtido garante o provimento destes AGs essenciais, principalmente quando presentes na posição central dos TAGs.

A interesterificação química para a síntese de LE é uma técnica com grande potencial para aplicação em escala industrial devido a vantagens como baixo custo, rapidez da reação e necessidade de baixa quantidade de catalisador. A reação química promove uma distribuição ao acaso dos AGs nos TAGs, não permitindo, portanto, a obtenção de moléculas com estruturas específicas.

As lipases também podem ser utilizadas como catalisadores para a modificação de óleos e gorduras, pois estas enzimas, em determinadas condições, são capazes de promover a síntese de TAGs. A especificidade apresentada por algumas lipases permite a construção de moléculas com estrutura e composição específicas. Este é o caso das lipases 1,3-específicas, as quais podem promover a incorporação de AGCM às posições terminais das moléculas.

O novo lipídio apresentará vantagens nutricionais, podendo ser aplicado no enriquecimento de produtos com AGs n-3. Outra aplicação bastante interessante é a administração terapêutica do LE a pacientes com dificuldade de absorção de lipídios.

O óleo a ser utilizado como substrato para a síntese de LE pode ser extraído de peixes como sardinha, corvina e atum. Estes pescados apresentam produção e consumo expressivos no Brasil e destacam-se pelo elevado teor dos AGs poliinsaturados (AGPIs) EPA e DHA.

A obtenção de óleo a partir de resíduos de pescado e sua posterior modificação via reação de interesterificação poderia ser uma alternativa para a valorização deste material.

1.1 OBJETIVOS

Tendo em vista as considerações expostas, o objetivo geral deste trabalho foi realizar estudos exploratórios sobre diferentes estratégias para a síntese de triglicerídios estruturados de interesse nutricional, contendo os AGs n-3 EPA e DHA (provenientes de óleo de peixe comercial) e AGCM. Avaliou-se a aplicação de uma das estratégias em

estudos preliminares que visaram à modificação do óleo extraído de resíduos de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Comparação dos métodos químico e enzimático para a síntese de triglicerídios estruturados a partir do óleo de peixe comercial;
- Utilização de diferentes substratos para a síntese de triglicerídios estruturados: éster metílico de ácido cáprico (interesterificação) e triglicerídios de cadeia média (transesterificação);
- Caracterização dos triglicerídios estruturados quanto ao perfil de ácidos graxos e perfil de fusão;
- Extração com solventes de óleo de resíduos de sardinha-verdadeira e determinação do perfil de ácidos graxos;
- Síntese de triglicerídios estruturados ricos em EPA, DHA e AGCM a partir do óleo de resíduos de sardinha.

1.2 JUSTIFICATIVA DO TEMA

Neste trabalho, foram propostas diferentes estratégias para promover a incorporação de AGCM aos TAGs de óleo de peixe, mediante reações de interesterificação. O interesse deste estudo se concentrou na busca por melhorias nas propriedades nutricionais, funcionais e metabólicas do produto.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho está estruturado em capítulos. O primeiro capítulo apresenta a introdução ao assunto, com os objetivos do trabalho e a justificativa do tema. O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre os assuntos estudados, abordando tópicos referentes a alimentos funcionais, óleo de peixe, produção de sardinha e geração de resíduos, modificação de óleos e gorduras, reações de interesterificação, e catalisadores químicos e enzimáticos.

No terceiro capítulo, estão apresentados o material e os procedimentos utilizados para as reações de interesterificação química e enzimática utilizando-se óleo de peixe comercial, o material e procedimentos para a extração do óleo de resíduos de sardinha –

utilizado como substrato na síntese enzimática de triglicerídios estruturados, bem como as metodologias analíticas para a caracterização dos óleos.

Em seguida, apresentamos dois capítulos em forma de artigo, com experimentos realizados de forma independente. No quarto capítulo, é apresentado o estudo das diferentes estratégias utilizadas para a síntese de lipídio estruturado a partir de óleo de peixe comercial, em que estão expostos os resultados experimentais, as discussões e conclusões parciais. No quinto capítulo, são apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes à extração do óleo de resíduos de sardinha e sua posterior utilização como substrato na síntese enzimática de triglicerídios estruturados.

No sexto capítulo, são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho, seguidas das sugestões para a continuidade desta pesquisa (indicadas no sétimo capítulo). As referências bibliográficas estão apresentadas no oitavo capítulo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os consumidores têm mostrado uma preocupação crescente com a dieta, já que há evidências científicas que apontam a influência dos alimentos sobre a saúde, o desempenho físico e o bem-estar. Sabe-se que alguns alimentos e ou ingredientes podem auxiliar no controle do peso, na redução e ou controle de doenças crônicas relacionadas à dieta, como doenças coronarianas, aterosclerose, hipertensão, câncer, osteoporose (Goldberg 1994).

Alimentos funcionais são aqueles que, além de seu valor nutritivo básico e do bem-estar que proporcionam, contêm um balanço adequado de ingredientes capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos à saúde, podendo atuar na prevenção e no tratamento de doenças crônicas e/ou degenerativas e melhorar a qualidade e a expectativa de vida (Goldberg 1994; Park et al. 1997; Sgarbieri e Pacheco 1999).

A legislação brasileira define como alegação de propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Considera como alegação de propriedade de saúde “aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” (Brasil 2005).

Na lista aprovada pela Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), constituída pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999, os produtos que contêm AGs da família n-3 enquadram-se como alimentos com propriedades funcionais e ou de saúde (Brasil 2005).

2.1.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os AGPIs das famílias n-3 ou n-6 contêm 18 a 22 átomos de carbono. A nomenclatura “n-x” utilizada para AGs, sugerida em 1977 pela “IUPAC-IUB Commission on

Biochemical Nomenclature”, especifica a posição da dupla ligação terminal relativa ao final apolar da molécula. O ácido α -linolênico (ALA) e o ácido linoleico (LA, 18:2-6) são considerados ácidos graxos essenciais para os humanos, e são precursores de outros AGPIs, também essenciais. A elongação (aumento da cadeia alquila) e a desaturação (inclusão de insaturações) do ALA forma o EPA e o DHA, cujas estruturas e nomenclatura oficial (determinada pela IUPAC) estão indicadas na Figura 1 abaixo. Já o LA é precursor do ácido γ -linolênico (GLA, 18:3n-6 (6,9,12)), que, por sua vez, é convertido no ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) (Bockisch 1993; Ward 1995).

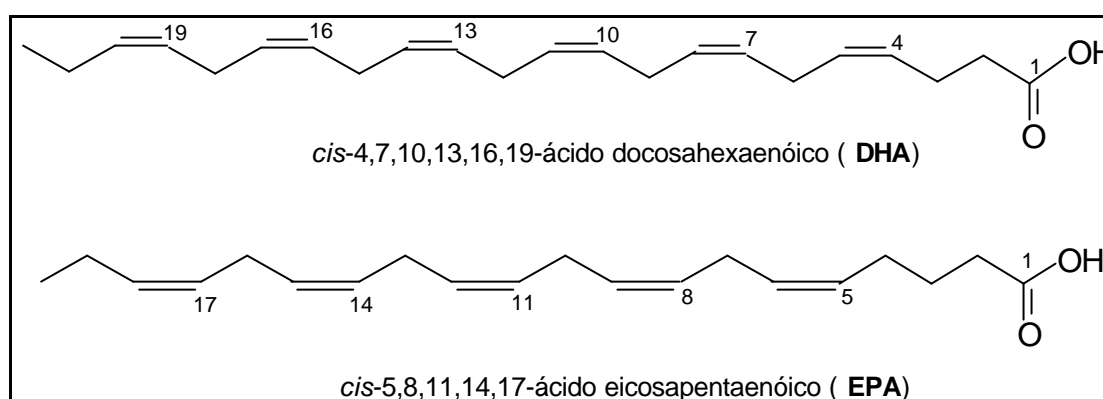


Figura 1 Estruturas químicas dos ácidos graxos n-3 docosahexaenóico e eicosapentaenóico

Há um crescente interesse nos AGs das famílias n-3 e n-6 devido ao importante papel a eles atribuído na saúde (Pigott e Tucker 1990; Simopoulos 1991; Gordon e Ratliff 1992; Vessby 1994; Akoh 1995; Ward 1995; Carvalho et al. 2003).

Os AGs n-3 EPA e DHA são importantes constituintes das membranas celulares e são seletivamente distribuídos nas classes de lipídios. Ambos são essenciais para a função cerebral e para o crescimento. O DHA é importante para as funções visual e cerebral nas crianças prematuras e provavelmente em toda a infância (Pigott e Tucker 1990; Gordon e Ratliff 1992; Goldberg 1994; Akoh 1995; Ward 1995; Jennings e Akoh 1999; Lands 2005), sendo incorporado ao sistema nervoso central durante o desenvolvimento do cérebro de bebês (Hartvigsen et al. 2003).

Os AGPI GLA, o AA e o EPA, todos com 20 átomos de Carbono, são precursores de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) de diferentes séries (1, 2 e 3, respectivamente), os quais apresentam efeitos contraditórios sobre a agregação plaquetária

e as reações inflamatórias (Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003), conforme será detalhado a seguir.

No organismo humano, o metabolismo dos AGs n-3 influencia a concentração dos n-6 e vice-versa (Park et al. 1997; BNF 2000). Este fato decorre da competição inibitória que existe entre os AGs destas duas famílias pelas enzimas (desaturases e elongases) envolvidas na sua bioconversão no organismo humano, resultando na capacidade dos n-3 ingeridos na dieta suprimirem a conversão do LA em AA, modulando a biosíntese de eicosanóides derivados deste AGPI, conforme vias metabólicas indicadas na Figura 2 (Willis et al. 1998).

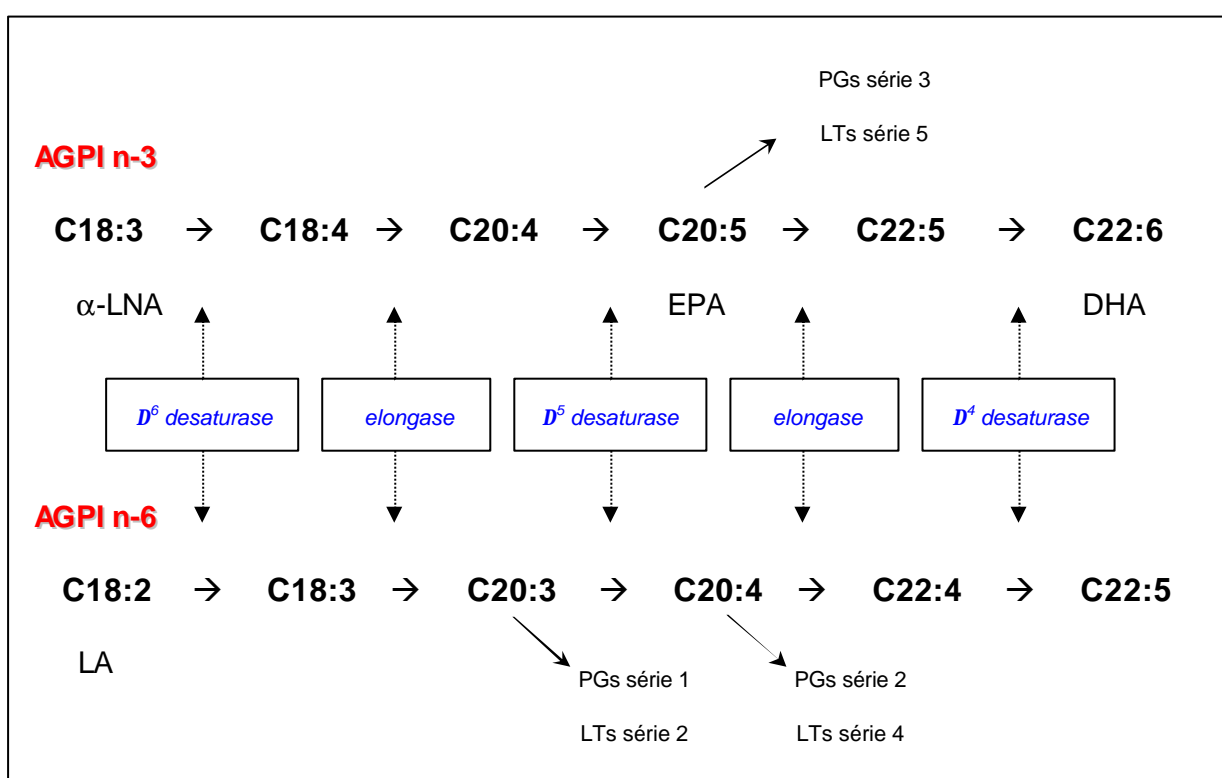


Figura 2 Bioconversão dos ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 e n-6 no organismo humano

Abreviaturas: PG = prostaglandinas; LT = leucotrienos. Adaptado (Willis et al. 1998).

Entre os efeitos biológicos e funcionais atribuídos aos AGs n-3 EPA e DHA, como consequência de seu metabolismo – em especial quando substituem parte do AA da dieta, resultando em eicosanóides da série 3 – pode-se citar a melhora da função imunológica; a

melhora às respostas inflamatórias, podendo ser aplicados no tratamento de asma, artrite e psoríase; a redução das concentrações séricas de TAGs e de VLDL (“Very low density lipoprotein” ou lipoproteína de muito baixa densidade), embora haja evidências de aumento no colesterol sérico LDL (“Low density lipoprotein” ou lipoproteína de baixa densidade); a prevenção da aterosclerose, a atuação na hipolipidemia, na trombose e, embora pouco expressivo, na redução da pressão sangüínea, podendo ser utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares; a redução nas mortes por ataque súbito do coração e por infarto do miocárdio; a prevenção e tratamento de certos tipos de câncer, como de cérebro, cólon e próstata; a prevenção da resistência à insulina em pacientes com diabetes mellitus. A deficiência nestes AGs pode levar a distúrbios neurológicos e visuais, dermatite e retardamento de crescimento (Pigott e Tucker 1990; Gordon e Ratliff 1992; FAO-WHO 1994; Akoh 1995; Ward 1995; Bell et al. 1996; Hasselmann e Kummerlen 1998; Willis et al. 1998; Jennings e Akoh 1999; Kris-Etherton et al. 2002).

2.1.2 ÓLEO DE PEIXE

A baixa conversão do ALA em EPA e DHA no organismo humano (Hartvigsen et al. 2003) faz com que a principal fonte destes AGs seja através da dieta, em especial através do consumo de pescados (Soccol e Oetterer 2003).

Os óleos de peixe refinados e desodorizados consistem principalmente de TAGs com uma complexa composição em AGs (Kulas et al. 2003). O conteúdo de óleo em peixes e a composição em AGs (incluindo n-3) nestes óleos variam conforme a espécie, a localização geográfica, fatores dietéticos (a fauna e a flora marinha, por exemplo, são ricas em n-3) e ambientais, a estação do ano e a origem (pescados cultivados ou selvagens) (Pigott e Tucker 1990; Stansby 1990; Ward 1995; Shahidi e Shukla 1996; Willis et al. 1998; Jennings e Akoh 1999; Aro et al. 2000; Jennings e Akoh 2001; Lands 2005).

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 palmitoleico (C16:1n-7), o ácido oleico (C18:1n-9) e seu isômero ácido *cis*-vacênico (C18:1n-7), além do ácido eicosenóico (C20:1n-9) e ácido cetoleico (C22:1n-11). Na carne e no óleo de fígado de peixes, os principais AGPI são o EPA e o DHA, localizados preferencialmente na posição *sn*-2 do TAG, conforme resultados de algumas pesquisas (Brockhoff et al. 1966; Turon et al. 2005), embora haja exceções. De maneira geral, os AGs saturados e os monoinsaturados ocupam a posição 1 e os monoinsaturados, a posição 3 (Stansby 1990; Gunstone et al. 1994; Lands 2005).

Algumas espécies de peixes podem conter quantidades significativas de alguns contaminantes ambientais, que podem representar riscos para a população (Kris-Etherton et al. 2002). Um deles (metilmercúrio), em altos níveis, pode ser perigoso para o desenvolvimento do sistema nervoso de fetos e de crianças (FDA 1995, revisão 2003; HHS e USDA 2005). Alguns peixes de amplo consumo apresentam baixos níveis deste contaminante, caso de sardinha, camarão, atum enlatado, salmão, anchova, arenque, bacalhau (FDA 1995, revisão 2003).

O óleo de muitos peixes contém de 8 a 12% de EPA e de 10 a 20% de DHA, sendo que os óleos de sardinha, anchova, salmão, savelha, cavala e fígado de bacalhau destacam-se pela alta concentração em n-3, geralmente de 15 a 20% (Pigott e Tucker 1990; Stansby 1990; Ward 1995), conforme indicado na Tabela 1, sendo as principais fontes para a obtenção industrial de óleos marinhos (Kulas et al. 2003).

Tabela 1 Composição em ácidos graxos de alguns óleos de peixe (g/100g de óleo)

Óleo	AGS	AGMI	AGPI	EPA	DHA	Colesterol (mg)
Arenque	19,2	60,3	16,1	7,1	4,3	766
Atum	25,8	33,3	30,3	6,1	18,2	575,8
Fígado de bacalhau	17,6	51,2	25,8	9,0	9,5	570
Salmão	23,8	39,7	29,9	8,8	11,1	485

Adaptado (Pigott e Tucker 1990)

Os óleos de peixe representam 2-3% dos óleos alimentícios disponíveis mundialmente (Gunstone 1967).

A ingestão semanal recomendada de EPA e DHA varia entre os órgãos internacionais, conforme se observa na Tabela 2 (FAO-WHO 1994; BNF 2000; Kris-Etherton et al. 2002; Medicine 2002; BNF 2004a; HHS e USDA 2005).

Estas recomendações foram estipuladas para garantir a proporção recomendada de n-6:n-3 entre 5:1 e 10:1 (Willis et al. 1998), apesar de algumas evidências sugerirem como ideal a proporção dietética de 1:1 (Simopoulos 1991). Recomenda-se que consumidores com histórico de doença cardiovascular, mulheres durante a gestação e a amamentação, e crianças aumentem o consumo de EPA e DHA (FAO-WHO 1994; Kris-Etherton et al. 2002).

Tabela 2 Quantidades recomendadas para ingestão de ácidos graxos n-3, n-6, EPA e DHA por adultos saudáveis

Fonte	Ano	Recomendação	Recomendação específica
Joint WHO/FAO Expert Consultation (Internacional)	2003	% em relação à ingestão diária de energia: 6-10% EPA+DHA 5-8% n-6 1-2% n-3	1-2 porções por semana de peixe (200-500mg de EPA+DHA por porção)
British Nutrition Foundation (Inglaterra)	2004	% em relação à ingestão diária de energia: Pelo menos 1,2% de ácido graxo essencial Mínimo 0,2% n-3 1-10% n-6 1,5g/semana n-3	No mínimo 2 porções de peixe por semana (~140g), sendo pelo menos 1 de espécie oleosa (1,5-3g EPA+DHA por semana)
Institute of Medicine (EUA)	2002	% em relação à ingestão diária de energia: 20-35% de lipídios, dos quais 5-10% n-6 (LA) 0,6-1,2% n-3 (ALA)	1,6g/dia ALA para homens e 1,1g/dia ALA para mulheres, dos quais 10% podem ser provenientes de EPA+DHA
FAO-WHO (Internacional)	1994	5:1-10:1 (LA:ALA)	Para indivíduos que consomem uma proporção maior do que 10:1 (LA:ALA), aumentar o consumo de alimentos ricos em n-3. Cuidados especiais devem ser tomados durante a gestação e o aleitamento.
American Heart Association (EUA)	2002		Consumir peixe (particularmente oleoso) pelo menos 2 vezes por semana; incluir óleos e alimentos ricos em ALA.

O mercado de óleo de peixe é bastante significativo, pois, considerando-se a ingestão de 1g de EPA e DHA por dia por pessoa, as vendas anuais somente nos Estados Unidos representariam quase 1 bilhão de dólares (Lands 2005).

Indivíduos que não apreciam peixe ou que não têm fácil acesso a este alimento podem recorrer a suplementos ou a alimentos enriquecidos com n-3 para suprir as necessidades dietéticas (BNF 2000; Kris-Etherton et al. 2002).

As cápsulas de óleo de peixe, quando adequadamente produzidas, apresentam a vantagem de serem isentas de contaminação por metilmercúrio e conterem baixas concentrações de contaminantes organoclorados, embora haja alguns obstáculos para a administração destes produtos. Sabe-se que a utilização de óleos de peixe como fonte de AGs n-3 é limitada pelo “flavor” indesejável percebido neste produto, pela sua instabilidade oxidativa, exigindo um aumento na ingestão de antioxidantes, bem como pela dificuldade em se produzir concentrados dos ácidos n-3 EPA e DHA individualmente a partir desta matéria-prima. Além disto, a ingestão destas cápsulas pode causar efeitos colaterais como imunodepressão, hemorragia clínica, glicemia, aumento do colesterol LDL, distúrbios gastrointestinais e náuseas (Gordon e Ratliff 1992; Ward 1995; Hasselmann e Kummerlen 1998; Kris-Etherton et al. 2002).

No mercado, entre os produtos adicionados de n-3, encontram-se principalmente cremes vegetais, margarinas e leites (Brasil 2005), com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde (Sgarbieri e Pacheco 1999), e outros produtos aos quais o óleo de peixe foi incorporado após ser submetido a modificações (Chapman e Regenstein 1997).

2.1.2.1 Óleo de sardinha

A produção total de pescado capturado pela pesca extrativa marinha em 2004 atingiu o volume de cerca de cento e treze mil toneladas no Estado de Santa Catarina. Na Figura 3, está indicada a produção das espécies mais representativas capturadas neste Estado durante este período, tendo havido um predomínio de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), cuja produção atingiu mais de vinte e oito mil toneladas, quantidade que representou 53,49% da produção total nacional (IBAMA 2005).

A industrialização da sardinha gera em média 35% e 47,8% de resíduos nas linhas de eviscerados e de espalmados, respectivamente (Pessatti 2001). O alto teor protéico da sardinha (16,50-22,40%, b.u.) (USP 1998; IBGE 1999) faz com que o principal destino dos resíduos seja para alimentação animal após serem submetidos a um processamento adequado (Seibel e Souza-Soares 2003; Arruda 2004; Borghesi 2004).

A sardinha-verdadeira destaca-se em relação a outros peixes da costa brasileira (atum, bonito, olho de boi, cavalinha e serra) quanto ao teor de AGs n-3 (Visentainer et al. 2000). A somatória de EPA e DHA nesta espécie de sardinha pode variar entre 23,7 e

34,1% dependendo da estação do ano e das partes analisadas (Badolato et al. 1994), sendo que um estudo recente indica um total de 22,90% (Pessatti 2001).

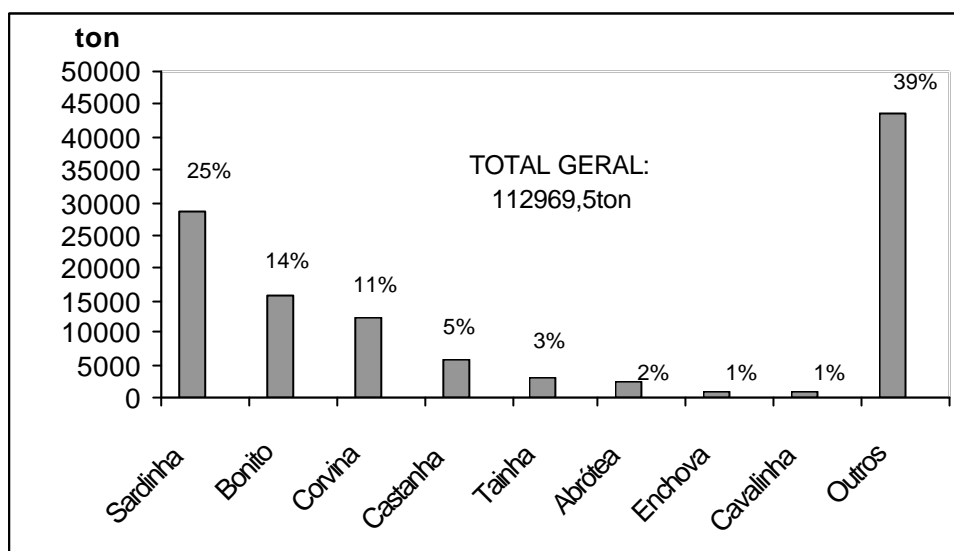


Figura 3 Produção da pesca extrativa marinha no Estado de Santa Catarina no ano de 2004. Fonte: IBAMA (2005)

Sua composição lipídica faz com que a inclusão de sardinha na dieta seja benéfica do ponto de vista nutricional e clínico (BNF 2004b), e torna esta espécie promissora para a obtenção de óleo visando o consumo humano (Soccol e Oetterer 2003).

2.1.3 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA

Ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são aqueles saturados que contêm 6 a 12 átomos de carbono. São obtidos principalmente pela hidrólise do óleo de coco ou de palmiste, seguida de fracionamento dos AGs resultantes para a concentração principalmente do ácido cáprico e do caprílico (C8:0), e de traços de C6:0 e C12:0. Os AGCM obtidos podem ser submetidos à reesterificação com glicerol para formar TAGs, conhecidos como triglicerídios de cadeia média (TCM) (Akoh 1995; Bell e Bradley 1997; Akoh 1998; Willis et al. 1998).

O ácido decanóico, comumente conhecido como ácido cáprico, obtido principalmente do óleo de coco, contém 10 átomos de carbono e apresenta ponto de fusão de 31,6°C. O TAG simples deste ácido graxo apresenta ponto de fusão de 31,5°C, enquanto

o ponto de fusão de seu éster metílico é de $-12,8^{\circ}\text{C}$ (Gunstone 1967; Bailey 1979; ISEO 2006). Já o ácido octanóico ou ácido caprílico, com 8 átomos de carbono, apresenta ponto de fusão de $16,7^{\circ}\text{C}$ (Bailey 1979; ISEO 2006). Estes valores fazem com que um TCM contendo principalmente estes dois AGs em sua composição – principalmente o caprílico – apresente-se líquido à temperatura ambiente (D'Agostini 2001).

2.1.3.1 *Metabolismo*

Ao contrário dos triglicerídios de cadeia longa (TCL), os TCM são absorvidos intactos pela mucosa intestinal, e então os AGs são liberados por uma lipase microssomal da célula mucosa. Os AGCM liberados são metabolizados tão rapidamente quanto a glicose no corpo, apresentando pouca tendência de depósito como gordura, porque eles não são prontamente reesterificados a triglicerídios como acontece com os AGs de cadeia longa (AGCL). Ao invés disso, os AGCM são transportados rapidamente pela via porta ao fígado sob a forma de AGLs complexados com albumina, o que é possível por serem menores e mais hidrofílicos do que os AGCL. No fígado, os AGCMs são prontamente oxidados pela célula, já que não necessitam de carnitina para serem transportados até a mitocôndria, característica importante para provimento de energia a pacientes com insuficiência na absorção de lipídios (Goldberg 1994; Bell e Bradley 1997; Hasselmann e Kummerlen 1998; Mu e Hoy 2000; Osborn e Akoh 2002).

2.1.3.2 *Propriedades e aplicações*

TCMs são úteis para aplicações médicas, já que são utilizados como fonte rápida e fácil de energia, sendo indicados especificamente para pacientes com insuficiência pancreática, atresia biliar, quilúria, fístula quilosa, doença celíaca, reseção do intestino delgado e fibrose cística. Também são utilizados como uma fonte significativa de energia para crianças prematuras. Apesar de úteis no controle da obesidade, níveis elevados de TCM podem ter efeitos tóxicos e são capazes de aumentar potencialmente os níveis de colesterol sérico, além de estes TAGs não proporcionarem ácidos graxos essenciais. Na nutrição enteral e parenteral, normalmente se utiliza uma mistura física de TCM com TCL, os quais podem ser provenientes dos óleos de milho, soja ou girassol. Esta combinação garante o provimento de ácidos graxos essenciais pelo TCL, e as vantagens da fácil digestibilidade, absorção e metabolismo pelos TCM. Além disso, esta combinação proporciona um aumento na absorção total pelo intestino tanto do TCM quanto do TCL (Jandacek et al. 1987; Goldberg 1994; Hasselmann e Kummerlen 1998; Mu e Hoy 2000; Osborn e Akoh 2002; Dunford 2004; Xu 2004; ISEO 2006). Os TCM fornecem menos

calorias (8,3kcal/g) do que os TCL, podendo ser aplicados na substituição de óleos vegetais em alimentos com baixo teor ou teor reduzido de calorias (Goldberg 1994; Akoh 1998; ISEO 2006).

A estrutura química dos TCM resulta em propriedades funcionais diferentes das apresentadas por óleos e gorduras convencionais. Sua composição, rica em AGs saturados, implica em menor suscetibilidade à oxidação. São óleos estáveis a temperaturas tão baixas quanto 0°C, na qual permanecem claros e não viscosos, e apresentam solubilidade em água maior do que os TCL. Estas propriedades fazem com que, tecnologicamente, os TCM sejam aplicados no transporte de “flavors”, cores e vitaminas; no fornecimento de brilho e na prevenção de aderência em produtos de confeitaria (Akoh 1998).

2.1.4 LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

Sabe-se que, na natureza, há uma distribuição posicional dos AGs nas moléculas de TAGs que é própria de cada óleo e gordura (Kubow 1996). A natureza, a localização e a adequada proporção dos AGs nas moléculas de TAG determinam o metabolismo, a funcionalidade, a biodisponibilidade, e as características químicas e físicas dos óleos e gorduras (Akoh 1995; Kubow 1996; Willis et al. 1998; Mu e Hoy 2001; Kodali e List 2005; ISEO 2006).

As reações de síntese de lipídios permitem a modificação das estruturas originais dos TAGs, para o desenvolvimento de novos óleos e gorduras que combinam os benefícios e as propriedades de cada AG em um único TAG (Bell e Bradley 1997).

Estas novas substâncias são conhecidas como LE, definidos por alguns autores (Akoh 1995; Osborn e Akoh 2002; Osborn e Akoh 2004; Xu 2004) como aqueles TAGs que tenham sido construídos para a melhoria das propriedades da molécula nativa, seja ela o glicerol, um monoglicerídeo (MAG), diglicerídeo (DAG) ou TAG, mediante a modificação das posições ou da composição em AGs da estrutura original.

2.1.4.1 *Metabolismo*

Na digestão dos lipídios da dieta, as lipases pancreáticas atuam no intestino delgado, hidrolisando seletivamente as posições *sn*-1 e *sn*-3 do TAG. As lipases pancreáticas são auxiliadas pelas lipases pré-duodenais. O MAG formado, por sua porção polar e apolar, funciona como um excelente agente emulsificante. Os produtos da lipólise, incluindo AGLs, MAG e DAG, são solubilizados junto com os fosfolipídios e o colesterol pelos lisofosfolipídios e pelos sais biliares para o interior das misturas, sendo então

absorvidos. Os AGLs formados são destinados para a obtenção de energia. A taxa de hidrólise na posição *sn*-2 é muito lenta, fazendo com que o ácido graxo nesta posição permaneça intacto como 2-MAG durante a digestão e a absorção. O 2-MAG é encaminhado para reesterificação com AGs de origem endógena ou exógena, para a formação de novos TAGs. Estes são então empacotados para o interior dos quilomicrons e excretados para o interior do sistema linfático. A taxa de hidrólise dos TAGs pelas lipases envolvidas neste metabolismo é influenciada pelo comprimento da cadeia e pela insaturação dos AGs nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Há uma preferência destas lipases pelos AGCM, cuja hidrólise é mais rápida e mais completa do que a dos AGCL (Akoh 1995; Kubow 1996; Bell e Bradley 1997; Osborn e Akoh 2002). A natureza dos AGLs, MAGs e DAGs formados durante a lipólise é influenciada pela distribuição posicional dos AGs nas moléculas de TAGs originais (Akoh 1995; Kubow 1996; Mu e Hoy 2001).

2.1.4.2 Vantagens

Dispondo-se do conhecimento do metabolismo de lipídios, pode-se definir criteriosamente a estrutura e a composição do LE de forma a alcançar o máximo efeito desejado, seja na atuação contra doenças específicas – já que são fatores determinantes, por exemplo, para os efeitos colesterolêmicos e aterogênicos do lipídio – na melhoria de certos estados metabólicos, na manutenção do bem-estar de indivíduos saudáveis, ou ainda na aquisição de propriedades funcionais para determinadas aplicações tecnológicas (Akoh 1995; Kubow 1996; Willis et al. 1998; Mu e Hoy 2001; ISEO 2006).

A absorção do AG de interesse no TAG estruturado é mais eficaz do que em um TAG simples ou em uma mistura física do AG de interesse com AGCM (Akoh 1995). As misturas físicas de TCM e TCL para aplicações médicas apresentam a desvantagem da retenção da taxa de absorção individual de cada óleo, característica contornada mediante a interesterificação das misturas, que promove uma modificação química nas estruturas (Goldberg 1994; Xu 2004).

LEs podem ser aqueles TAGs especificamente construídos para conter, preferencialmente na mesma molécula, uma mistura de AGs com cadeias alquila de diferentes comprimentos, de forma a explorar o máximo potencial de cada AG. Pode-se incorporar AGCC ou AGCM, ou ambos, às posições *sn*-1,3 do esqueleto do glicerol (ou à posição *sn*-2), e AGCL, em especial ácidos graxos essenciais, ou outro AG de interesse (AGCM, *n*-3, *n*-6, *n*-9), à posição *sn*-2 (ou às posições *sn*-1,3) (Akoh 1998; Osborn e Akoh 2002; Xu 2004).

Um LE que combina AGCL e AGCM/AGCC fornece produtos com um metabolismo único: benefícios à saúde atribuídos aos AGCL (principalmente os ácidos graxos essenciais), rapidamente absorvidos como 2-MAG quando presentes na posição *sn*-2 do TAG, e rápida oxidação de AGCM e AGCC para provimento de energia, sem deposição no tecido adiposo, quando nas posições 1 e 3 (Jandacek et al. 1987; Jennings e Akoh 1999; Mu e Hoy 2000; Jennings e Akoh 2001; Mu e Hoy 2001; Xu 2004).

Um lipídio com esta estrutura atua na melhoria da absorção de gorduras em pacientes com fibrose cística; na redução do TAG sérico, do colesterol LDL e do colesterol total; na preservação da função reticuloendotelial; na atenuação do catabolismo de proteínas, e a uma maior síntese destas biomoléculas no músculo do esqueleto e no fígado; na melhoria do balanço de nitrogênio; na resposta hipermetabólica frente a alguma injúria térmica; na redução calórica dos lipídios, com uma melhor manutenção do peso corpóreo; na melhoria da função imunológica, sendo vantajoso para pacientes imunosuprimidos ou transplantados; na prevenção de trombose; na redução do risco de câncer, causando a inibição ou a redução da taxa de crescimento de tumores; no tratamento de deficiência na absorção de lipídios, em emulsões administradas na dieta enteral e parenteral; em alimentos do tipo “snack”; em pacientes obesos; na alimentação infantil, especialmente de bebês prematuros; na alimentação de idosos (Goldberg 1994; Akoh 1995; Willis et al. 1998; Jennings e Akoh 1999; Stein 1999; Mu e Hoy 2001; Osborn e Akoh 2002).

2.2 OBTENÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE

Os óleos marinhos estão presentes na carne de peixes “gordos”, no fígado de peixes “magros” e na camada de gordura de mamíferos marinhos como as baleias (Kulas et al. 2003). Para a produção industrial de óleo de peixe, são utilizados principalmente peixes pequenos e com alto teor de óleo, apesar de também serem aproveitados peixes descartados e resíduos do processamento, principalmente provenientes do enlatamento (Lee 1963).

Os óleos de peixe refinados têm o “status” de “Generally Recognized As Safe” (GRAS) pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) e uma lista de alimentos foram aprovados pelo FDA para a fortificação com AGPIs n-3. A produção mundial de cerca de um milhão de toneladas de óleo de peixe por ano contém uma combinação total de cerca de dez a vinte e cinco mil toneladas de EPA mais DHA (Lands 2005).

A oferta de óleo de peixe é limitada no mercado, devido ao refino mais elaborado exigido por este produto, quando comparado aos óleos vegetais (Hasselmann e Kummerlen

1998). Os principais países produtores são Peru, países escandinavos, Chile, Estados Unidos e Japão. Observou-se uma flutuação na oferta de óleo de peixe ao longo dos anos, com tendência a uma redução. No Japão, por exemplo, a oferta de quinhentas mil toneladas deste óleo em 1986 caiu para menos de cinquenta mil toneladas no ano de 1994 (Lands 2005), tendo apresentado um aumento para quase sessenta e sete mil toneladas em 2003. De 1993 a 2003, a produção de óleo no Brasil manteve-se em torno de três mil toneladas (FAO-WHO 1994).

A seguir, serão discutidas as metodologias para a extração de óleo de peixe e para sua estabilização com antioxidantes.

2.2.1 MÉTODO CONVENCIONAL

O método convencional para a obtenção industrial de óleo é conhecido como processo úmido, aplicado principalmente para peixes com alto conteúdo de óleo (Lee 1963; Lands 2005). Envolve as etapas de cozimento, prensagem e ou filtração e centrifugação do material. O cozimento da massa, por injeção direta ou indireta de vapor, é essencial para a liberação da água e do óleo do material durante o tratamento com altas pressões. A prensagem tem a finalidade de remover a porção líquida do material, conhecida como miscela, composta por água, sólidos hidrossolúveis, sólidos suspensos e óleo. Estes materiais podem ser separados por filtração seguida de centrifugação para a obtenção de duas porções. Uma delas, a torta de prensagem, é composta por sólidos úmidos, geralmente submetidos a secagem, visando a obtenção de farinha de pescado, ou a hidrólise, para a obtenção de silagem biológica, ácida ou enzimática, produtos posteriormente destinados para alimentação animal. A outra porção é referente a uma fase líquida (licor de prensagem), composta por sólidos solúveis e óleo bruto (Lee 1963; Pigott e Tucker 1990; Gunstone et al. 1994; Morales-Ulloa e Oetterer 1997; Guerard et al. 2002; Seibel e Souza-Soares 2003; Arruda 2004; Borghesi 2004).

O óleo de peixe na forma bruta contém uma série de substâncias indesejáveis, classificadas conforme segue: (a) matérias suspensas, mucilaginosas, coloidais, resinas ou polímeros; (b) AGLs presentes ou produzidos antes ou durante o processamento do peixe; (c) corantes naturais; (d) substâncias voláteis que conferem odor ou “flavor”; e (e) acilgliceróis saturados (Lee 1963).

Para consumo humano, o óleo recuperado na centrifugação deve ser processado para a remoção destas substâncias. Ele deve ser refinado, podendo ser submetido a degomagem, saponificação e lavagens ácidas, podendo ser realizada uma nova

centrifugação. Pode-se ainda promover a modificação do óleo submetendo-o a fracionamento, processo que consiste no resfriamento da amostra até o maior ponto de fusão, o que permite a precipitação de cada ácido graxo e de seus alquil-ésteres, os quais são separados da amostra por filtração (Lee 1963).

O óleo obtido deve ser armazenado seco e livre de sólidos. Uma alternativa para a obtenção de um óleo com melhor qualidade é o imediato resfriamento do óleo resultante das etapas de cozimento e prensagem, o que retarda a oxidação e a deterioração dos TAGs (Pigott e Tucker 1990; Gunstone et al. 1994).

2.2.2 MÉTODO COM SOLVENTES

A extração de óleo de peixe com solventes (preferencialmente desaerados) é amplamente utilizada em escala laboratorial, principalmente para a determinação do teor de gordura total de amostras. Quando o tecido encontra-se liofilizado, a extração com solventes é dificultada e a reidratação da amostra é aconselhável para uma adequada recuperação de lipídios (Lee 1963; Christie 1982).

O método universalmente utilizado para a extração de lipídios com solventes é o de Bligh & Dyer (Bligh e Dyer 1959), que utiliza o sistema ternário de solventes clorofórmio:metanol:água, adicionados em duas etapas. É indicado quando se deseja a extração de lipídios de grandes quantidades de tecidos (Christie 1982).

Esta técnica apresenta vantagens sobre as demais extrações com solventes, inclusive sobre o método de Soxhlet, quanto ao rendimento do processo, à qualidade do produto, à rapidez da técnica e também ao fato de não demandar grandes volumes de solventes. Permite a extração de todas as classes de lipídios da amostra, sejam estes polares (resíduos de ácidos graxos de cadeia curta – AGCC, AGLs e produtos primários da oxidação) ou apolares (TAGs, ésteres de colesterol). Isto é possível porque o clorofórmio é um solvente orgânico para qualquer classe de lipídios, e o metanol tem a função dupla de facilitar a umectação da amostra e desfazer as fortes ligações entre os lipídios e as membranas celulares ou sua ligação nas lipoproteínas (Bligh e Dyer 1959; Christie 1982). A escolha destes solventes é fundamental para o rendimento em lipídios totais proporcionado por esta técnica, podendo ser 15 a 30% superior do que o obtido em sistemas com solventes de menor toxicidade, que utilizam, por exemplo, um alcano (geralmente hexano), um álcool (iso-propanol) e água (Undeland et al. 1998).

Além disso, a extração por Bligh & Dyer é realizada a frio, preservando a integridade dos lipídios extraídos, o que permite sua utilização posterior para qualquer

finalidade, característica extremamente atrativa para a extração de óleos de peixe, altamente insaturados. Outra vantagem é o fato de este método independer da umidade da amostra (Bligh e Dyer 1959; Undeland et al. 1998).

Para uma extração eficaz pelo método de Bligh e Dyer, é primordial manter as proporções 1:2:0,8 e 2:2:1,8 entre os volumes utilizados no sistema ternário de solventes antes e após a diluição, respectivamente. Estes volumes foram determinados para amostras com 80% de umidade, sendo que variações na umidade da amostra exigem o ajuste da água do sistema de solventes, de forma a garantir as proporções citadas. Desta forma, na primeira etapa de adição de solventes (clorofórmio e metanol), ocorre a formação de um sistema miscível (monofásico) formado com a água contida na amostra. A etapa seguinte, com uma nova diluição com clorofórmio e água, garante a formação de um sistema bifásico, sendo que a fração lipídica está contida na camada clorofórmica, cuja separação e evaporação do solvente permite a obtenção de um extrato lipídico purificado (Bligh e Dyer 1959; Christie 1982; Brum 2004).

2.2.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS

Um óleo de peixe com qualidade superior ao extraído pelo método tradicional pode ser obtido via hidrólise enzimática de peixes inteiros, de descarte ou de resíduos do beneficiamento de peixes. Este método tem como objetivo a obtenção de hidrolisados protéicos de peixe via ação de proteases, gerando como subproduto um óleo de excelente qualidade devido às temperaturas amenas aplicadas no processo (Pigott e Tucker 1990; Shahidi et al. 1997; Arruda 2004; Borghesi 2004).

Outro método que pode ser aplicado para a extração de óleo de peixe em escala comercial é a extração com fluido supercrítico, com a substituição dos solventes líquidos tradicionais (comumente hexano) por solventes supercríticos, normalmente o dióxido de carbono líquido, com as vantagens da similaridade de suas características com as do éter de petróleo, o baixo custo, atoxicidade e alto poder de solubilização (Pigott e Tucker 1990; Barthelet e Daun 2005).

2.2.4 OXIDAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE COM ANTIOXIDANTES

Os AGPIs presentes no óleo de peixe conferem baixa estabilidade oxidativa a este produto, sendo um parâmetro crítico para a vida-de-prateleira de óleos de peixe e de

produtos alimentícios aos quais lipídios de origem marinha foram incorporados (Pigott e Tucker 1990; Kulas et al. 2003).

À temperatura ambiente, as insaturações dos AGs do óleo de peixe reagem prontamente com o oxigênio para a formação de hidroperóxidos, os quais são instáveis, particularmente a altas temperaturas e na presença de íons de metais de transição. Os hidroperóxidos se decompõem a produtos secundários, muitos de baixa massa molecular, voláteis e com acentuadas propriedades olfativas, que conferem o “flavor” característico e desagradável de óleo de peixe rançoso (Bockisch 1993; Kulas et al. 2003).

Além dos produtos secundários da oxidação, a trimetilamina presente no óleo de peixe também contribui para os odores desagradáveis observados neste produto (Chapman e Regenstein 1997; Kulas et al. 2003). Além disso, a ingestão de óleos marinhos degradados pode expor o consumidor aos produtos tóxicos da autooxidação dos lipídios (Shahidi e Shukla 1996; Siqueira et al. 1997).

A presença de antioxidantes no óleo de peixe irá minimizar a exposição do produto à oxidação (Siqueira et al. 1997). A concentração e o tipo dos antioxidantes naturalmente presentes e o processamento a que o óleo será submetido determinarão a necessidade da adição de antioxidantes para a manutenção da qualidade do óleo de peixe obtido e dos produtos aos quais ele foi adicionado (Pigott e Tucker 1990; Wanasundara e Shahidi 1998; Kulas et al. 2003), que podem ser os seguintes:

- Antioxidantes naturais: tocoferol, ácido ascórbico, extrato de chá verde sem clorofila;
- Antioxidantes sintéticos: *tert*-butil hidroquinona (TBHQ), hidroxitolueno butilado (BHT);
- Combinações de antioxidantes: tocoferol/palmitato de ascorbila, tocoferol/ácido ascórbico, α -tocopherol/extrato de alecrim, tocoferol/fosfolipídios (em particular a fosfatidiletanolamina) e sistemas ternários de antioxidantes, como tocoferol, ácido ascórbico ou palmitato de ascorbila, e concentrados de fosfolipídios (lecitina).

Entre os antioxidantes citados, o palmitato de ascorbila apresenta maior atividade em óleos vegetais do que em gorduras animais e o BHT é pouco eficaz em óleos com muitas insaturações. A incorporação de BHT e de BHA a alimentos tem sido limitada devido aos indícios de toxicidade e ou mutagenicidade destes antioxidantes (Lands 2005).

A seguir, estão relacionadas as características do TBHQ, que tornam este antioxidante vantajoso para aplicação em óleo de peixe:

- O TBHQ é aprovado para uso alimentício (Lands 2005), sendo geralmente usado como antioxidante em alimentos de origem animal e em óleos e gorduras ;
- É mais eficaz do que outros antioxidantes presentes no mercado (Oliveira 2003);
- Em gorduras animais, o TBHQ mostrou-se mais eficaz do que outros antioxidantes sintéticos e também naturais na estabilização de óleos de savelha e de foca (Wanasundara e Shahidi 1998) e de óleo bruto de fígado de tubarão e de suas frações, sendo indicado para a incorporação a óleos que serão submetidos a muitas etapas de processamento (Pacheco e Barrera-Arellano 1994);
- A legislação brasileira estipula que o TBHQ (INS 319) seja adicionado aos alimentos no limite máximo de 200mg/kg de gordura do produto (Brasil 2005).

2.3 PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e as gorduras são fundamentais na dieta de homens e de animais: são a principal fonte de energia da dieta, fornecendo em torno de 9kcal/g, sendo constituídos principalmente por TAGs. Nutricionalmente, são importantes para o transporte e a proteção das vitaminas lipossolúveis (A, E, D, K), e para o fornecimento de ácidos graxos essenciais, necessários para a síntese de membranas, de hormônios reguladores e de outros componentes do organismo (Bailey 1979; Pigott e Tucker 1990; Turatti 2000; HHS e USDA 2005; ISEO 2006).

No preparo e no consumo de alimentos, os óleos e gorduras contribuem com várias características sensoriais: melhoram a palatabilidade dos alimentos, conferem “flavor” e cor aos alimentos, melhoram sua aparência, provêm uma sensação de saciedade, funcionam como um eficiente meio de transferência de calor no preparo de alimentos (em especial em frituras), têm ação lubrificante em “dressings”, auxiliam no processo de fermentação por promoverem a retenção de ar, conferem uma textura característica nos processos de cozimento. As principais fontes de lipídios na dieta são as carnes, os produtos lácteos, as aves, os peixes, as sementes oleaginosas, os óleos e as gorduras vegetais (Bailey 1979; Pigott e Tucker 1990; ISEO 2006).

O consumo de alguns óleos e gorduras, entretanto, está relacionado com a incidência de doenças cardiovasculares e câncer. Este é o caso das gorduras saturadas, fato que levou muitos governos a recomendarem a redução de sua ingestão, junto ao aumento no consumo de AGPIs (Goldberg 1994; Kubow 1996).

Para atender a estas exigências nutricionais, as indústrias passaram a utilizar o processo de hidrogenação para a modificação da composição de óleos contendo AGs insaturados. Neste processo, ocorre a adição de hidrogênio às insaturações dos AGs da matéria-prima, dando origem a bases gordurosas que podem substituir industrialmente as gorduras saturadas. Na hidrogenação parcial, as duplas ligações dos AGs insaturados são convertidas da forma *cis* para a forma *trans*; já na hidrogenação total, todas duplas ligações são eliminadas, mas o produto resultante é quebradiço (Goldberg 1994; Mancini-Filho e Chemin 1996; Rousseau e Marangoni 2002; Solomons e Fryhle 2002; ISEO 2006). A hidrogenação total ou parcial do óleo de peixe permite a obtenção de gorduras com maior estabilidade oxidativa para aplicações em margarinas e “shortenings” (Pigott e Tucker 1990; Chapman e Regenstein 1997; Lands 2005), apesar de provocar a redução no conteúdo dos AGPIs (Lands 2005).

As gorduras hidrogenadas passaram a ser utilizadas em produtos largamente consumidos, o que implicou no aumento da ingestão de gorduras na forma *trans* (Goldberg 1994; ISEO 2006). Apesar dos avanços tecnológicos que a hidrogenação proporcionou, diversas pesquisas revelaram que os efeitos fisiológicos das gorduras *trans* obtidas por este processo – excluindo-se, portanto, as gorduras *trans* naturalmente presentes em produtos obtidos de animais ruminantes (Mancini-Filho e Chemin 1996; ISEO 2006) – são mais prejudiciais do que os proporcionados pelas gorduras saturadas, aumentando os riscos de doenças cardiovasculares e possivelmente de câncer (Goldberg 1994; Kodali e List 2005).

A preocupação com a saúde levou à criação de regulamentações por Governos como o Norte-americano (ISEO 2006) e o Brasileiro (Brasil 2005), para a indicação do teor de gorduras *trans* nos rótulos de alimentos a partir de 2006.

A utilização mundial de gordura passou de cinquenta e dois para cento e quatro milhões de toneladas métricas de 1976-1980 a 1996-2000, respectivamente. A expectativa é de que se atinja cento e oitenta e quatro milhões de toneladas métricas em 2016-2020 (Lands 2005). Além do aumento na ingestão de gordura, inclusive *trans*, as mudanças na dieta da população também levaram a uma deficiência em AGs n-3 e um desbalanço na proporção de n-6:n-3, principalmente nas dietas dos países ocidentais, nos quais se encontra atualmente na faixa de 20 a 50:1 (Leaf e Weber 1987; Simopoulos 1991; Vessby 1994; Willis et al. 1998).

As indústrias de óleos e gorduras novamente se viram frente ao desafio de buscar diferentes ingredientes e tecnologias para a obtenção de produtos com propriedades

funcionais e ou de saúde, com reduzido teor de gordura (ou com a eliminação deste nutriente) e livres de isômeros *trans*.

Uma alternativa ao processo de hidrogenação é a mistura física de TAGs com diferentes comprimentos de cadeia alquila, embora com o inconveniente de fornecer produtos com a retenção da taxa de absorção individual original dos TAGs. Além disso, os produtos são obtidos em uma mistura de TAGs com distribuição aleatória dos AGs, o que não favorece a absorção dos AGCL presentes nas posições terminais dos TAGs (Akoh 1995; Khare e Nakajima 2000; Mu e Hoy 2000; Versleijen et al. 2005).

O fracionamento é outro processo de modificação de gorduras, no qual ocorre a remoção dos sólidos da matéria-prima por cristalização controlada (abaixamento da temperatura), seguida por técnicas de separação que envolvem uso de solventes ou secagem. O fracionamento a seco é a técnica mais usada (Rousseau e Marangoni 2002; ISEO 2006), podendo ser utilizado para a obtenção das frações oleína e estearina a partir de gordura abdominal de frango (Ming 2001; Ming e Gioielli 2002), de óleo de palma (Vieira et al. 1997) e também de óleo de peixe (Pacheco e Barrera-Arellano 1994). O outro processo de fracionamento, com solventes, é utilizado na produção de manteigas duras, óleos especiais e alguns óleos para salada (ISEO 2006).

Como alternativa aos óleos e gorduras convencionais, foram também desenvolvidos os substitutos de gordura, classificados em três categorias: substitutos à base de gordura, substitutos à base de proteína e substitutos à base de carboidratos. Um dos produtos desenvolvidos à base de gordura é a olestra, um substituto de gordura comercial obtido da combinação entre ésteres de sacarose e AGs. Esta composição confere ao produto aparência e textura das gorduras naturais, com a vantagem de ser “zero caloria”. Outros substitutos de gorduras de baixa caloria são os ésteres de poligliceróis e os LEs nos quais os AGCL foram substituídos por AGCM ou AGCC nas moléculas (Akoh 1998; Osborn e Akoh 2002; Solomons e Fryhle 2002; ISEO 2006).

O conhecimento das reações de hidrólise e síntese de acilgliceróis direcionou as pesquisas de transformação de óleos e gorduras para as reações de interesterificação. Neste caso, o objetivo é a obtenção, via química ou enzimática, de LEs com propriedades tecnológicas e nutricionais otimizadas (Goldberg 1994; ISEO 2006), assunto que será discutido com detalhe em momento oportuno.

Além da interesterificação enzimática, com a aplicação de lipases para a modificação de óleos e gorduras, a biotecnologia engloba ainda a hibridização e a modificação genética de plantas e animais como estratégias para a obtenção de produtos

com características específicas. Além de um aumento no rendimento em óleo, estes processos biológicos podem fornecer produtos com propriedades alergênicas reduzidas, ou com vantagens nutricionais e funcionais, através da modificação da composição em AGs das matérias-primas. Entre as possibilidades desta técnica, pode-se citar a redução no conteúdo de AGs saturados e o desenvolvimento de plantas capazes de produzir AGs n-3. Apesar de seus benefícios, a aceitação de alimentos produzidos por biotecnologia ainda é controversa, principalmente nos países da Europa, devido à preocupação dos consumidores com os efeitos da ingestão de organismos geneticamente modificados (ISEO 2006).

Outra possibilidade biotecnológica é a produção, em quantidades substanciais, de óleos e gorduras específicos, caso da produção de óleos e gorduras únicos por microrganismos, como no caso do uso de *Candida lipolytica* cultivada em óleos vegetais, ou do cultivo de fungos para a obtenção de GLA, ou ainda de *Mortierella alpina* para a produção de AA (Goldberg 1994).

2.3.1 INTERESTERIFICAÇÃO

As reações que envolvem a troca de radicais acila ($R-C^+=O \leftrightarrow R-C\equiv O^+$) de ácidos carboxílicos e seus derivados podem ser classificadas conforme indicado na Tabela 3, apesar de haver certa divergência entre os autores. As reações de hidrólise de TAGs levam à formação de AGLs, acilgliceróis parciais (MAG, DAG) e glicerol. A reação inversa é a esterificação ou esterificação direta, que envolve a troca de radicais acila entre uma molécula de glicerol e um AGL. As reações de acidólise (éster-AG), alcóólise (éster-álcool) – especificamente chamada de glicerólise quando o glicerol é o álcool envolvido – e transesterificação (éster-éster) são genericamente chamadas de interesterificação (Marangoni e Rousseau 1995; Willis et al. 1998; Gunstone 1999; Rousseau e Marangoni 2002; Carvalho et al. 2003). Na interesterificação, o doador do grupo acila pode ser tanto um AGL quanto um TAG ou um éster do ácido graxo (Akoh 1995; Gunstone 1999; Xu 2004). Estas reações podem ser utilizadas para a síntese de LE.

As reações de troca de radicais acila, em especial as de interesterificação, permitem o rearranjo ou a modificação de AGs nas moléculas de TAG, dando origem a LEs que apresentam propriedades (nutricionais, funcionais e físicas) diferentes dos óleos e gorduras originais, sejam eles naturais, hidrogenados ou fracionados (Kubow 1996; Kodali e List 2005; ISEO 2006).

Tabela 3 Reações para a troca de radicais acila entre acilgliceróis. Adaptado de (Osborn e Akoh 2002)

Estratégia	Reação
Esterificação direta*	$R_1\text{-CO-OH} + R_2\text{-OH} \rightarrow R_1\text{-CO-OR}_2 + \text{HOH}$
Transesterificação (reação de troca de éster)	$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{-CO-OR}_4 \rightarrow R_1\text{-CO-OR}_4 + R_3\text{-CO-OR}_2$
Acidólise	$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_2\text{-CO-OH} \rightarrow R_2\text{-CO-OR}_1 + R_1\text{-CO-OH}$
Alcólise	$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_2\text{-OH} \rightarrow R_1\text{-CO-OR}_2 + R_2\text{-OH}$

* A reação inversa é a hidrólise de ésteres.

R, R₁, R₂, R₃, R₄ = cadeia alquila com diferentes comprimentos e/ou graus de saturação.

Quando se deseja a purificação do produto de interesse, pode-se remover industrialmente os produtos intermediários da reação (AGLs, ésteres dos AGs, DAGs e TAGs) mediante o resfriamento controlado (Shreve e Brink Jr. 1980) ou a destilação da massa interesterificada (Fomuso e Akoh 2002).

A distribuição dos AGs nas moléculas pode ser randômica (ao acaso) ou dirigida, e a reação pode ser intra ou intermolecular. Quando a reação é intramolecular, não há mudanças no grau de saturação do produto e não ocorre isomerização *cis-trans*, apesar de se perceberem alterações em suas propriedades físicas (Rousseau e Marangoni 2002; Kodali e List 2005; ISEO 2006).

A interesterificação é um processo que ocorre na presença de um catalisador (ISEO 2006), que pode ser químico, com a vantagem do baixo custo e da simplicidade do processo, ou enzimático, o qual tem um grande potencial de se tornar economicamente viável (Kodali e List 2005).

Junto à hidrogenação, a interesterificação é o método mais antigo de modificação de gorduras utilizado para o preparo de gorduras plásticas, praticada comercialmente nos Estados Unidos desde a década de 50 para a melhoria do comportamento cristalino de banha de porco. Esta tecnologia é utilizada mundialmente para o preparo de uma variedade de margarinas livres de isômeros *trans*, “spreads”, “shortenings”, substitutos de manteiga de cacau, alimentos com reduzido valor calórico e gorduras para cozimento (Osborn e Akoh 2002; List e Reeves 2005). A interesterificação tem sido amplamente empregada para a modificação do óleo de palma, em especial para evitar o fenômeno de pós-endurecimento característico deste óleo (Vieira et al. 1997; Grimaldi et al. 2005).

2.4 INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

Uma das formas mais difundidas para a obtenção de LE é a interesterificação química aleatória (Akoh 1995), que ocorre em condições de alto consumo de energia (alta temperatura e pressão) (Marangoni e Rousseau 1995; Osborn e Akoh 2002; Carvalho et al. 2003).

O processo químico engloba basicamente a secagem da mistura dos óleos por volta de 100°C sob vácuo, seguido da adição do catalisador, sendo geralmente concluída após cerca de 30 minutos. O catalisador pode ser neutralizado ao término do processo e filtrado, ou removido por lavagem com água. O óleo então é submetido a lavagem, remoção da umidade, clarificação e desodorização para a obtenção do produto final (Marangoni e Rousseau 1995; Kodali e List 2005; ISEO 2006).

2.4.1 CATALISADORES QUÍMICOS

A interesterificação química ocorre na presença de catalisadores como o sódio metálico, potássio metálico e suas ligas, metoxilato ou etoxilato de sódio ou de potássio (Marangoni e Rousseau 1995; Osborn e Akoh 2002; Carvalho et al. 2003).

Os catalisadores químicos são de fácil aplicação, baratos, ativos na faixa de 50 a 90°C, e são eficazes em pequenas quantidades. A qualidade da matéria-prima afeta profundamente o rendimento do processo, influenciando no tipo e na quantidade necessária de catalisador e na perda de óleo. A presença de umidade, AGLs e peróxidos nos substratos constituem-se em venenos do catalisador, podendo desativá-lo (Marangoni e Rousseau 1995; Osborn e Akoh 2002; Klinkesorn et al. 2004; Kodali e List 2005).

Os catalisadores químicos em geral são utilizados na proporção de cerca de 0,1% em massa dos reagentes, não podendo exceder 0,2% para óleos secos e refinados (Marangoni e Rousseau 1995), apesar de haver relatos de 0,5% como limite máximo e da utilização de maior quantidade (por exemplo, 1,5%) quando há presença de venenos no meio (Klinkesorn et al. 2004).

2.4.2 MECANISMO DA REAÇÃO

As reações químicas de interesterificação consistem de três etapas principais (Figura 4).

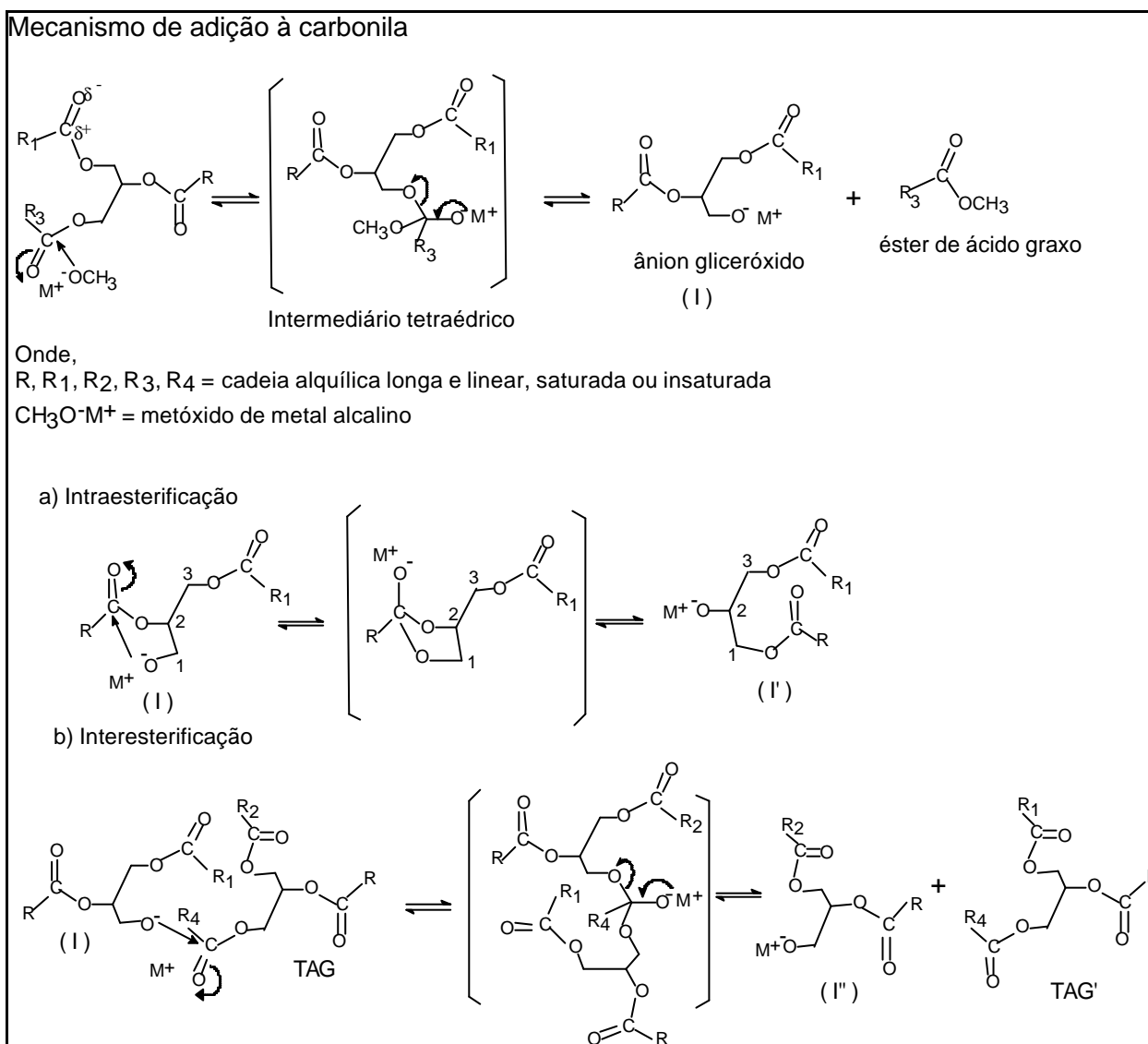


Figura 4 Mecanismo da reação química para a síntese de lipídios estruturados – Mecanismo de adição à carbonila

As etapas ilustradas na Figura 4 envolvem a ativação do catalisador, a hidrólise da ligação éster e troca de AGs. A troca de AGs entre os sítios hidroxila dos TAGs não ocorre diretamente, mas por meio de uma série de reações de alcólise que envolvem acilgliceróis parciais. A interesterificação depende das propriedades do grupo carbonila (C=O), o qual é predisposto a ataque nucleofílico, sendo que o oxigênio eletronegativo desloca os elétrons da ligação CO para próximo de si, levando a uma carga parcial positiva no carbono, configurando um caráter de íon acílio. Neste mecanismo, vale ressaltar que impedimentos estéricos afetam o rendimento da reação (Rousseau e Marangoni 2002).

O estado de transição da reação é um intermediário tetraédrico relativamente estável com uma carga parcial negativa no oxigênio. Ao passo que a reação progride, um alquil-éster é liberado e o intermediário citado reverte para uma geometria plana típica de carbonila na forma de éster ou de acilgliceróis, juntamente com íons glicerilato (I), os quais, na condição de nucleófilos, atacam carbonos parcialmente positivos de carboxila dos TAGs, rearranjando estas moléculas. Há uma forte evidência de que a hidrólise da ligação carbonila entre o oxigênio e o carbono é o mecanismo para a liberação do grupo (Rousseau e Marangoni 2002). O outro mecanismo proposto para a reação química de síntese de LEs é o mecanismo de condensação de Claisen (Figura 5). Neste caso, o metóxido de sódio (NaOCH_3) ou outro alcóxido de metal alcalino remove um hidrogênio ácido do carbono α da carbonila do carbono, resultando na formação de um enolato de éster. Esta reação produz um carbânion, um poderoso nucleófilo. Este nucleófilo ataca grupos carbonila, formando um intermediário β -ceto-éster de glicerol, o qual fica livre para atacar outras carbonilas de acilgliceróis e trocar ésteres intra e intermoléculas. Uma vez que este carbânion é criado, o processo continua até que se atinja um equilíbrio termodinâmico (Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002).

2.4.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS

A interesterificação química é um processo simples, de fácil aumento de escala e barato. É um método geralmente rápido, embora o tempo de reação dependa das condições da reação, como concentração do catalisador, temperatura e solubilidade do catalisador nos substratos, podendo variar de 5 min a 6h, podendo atingir o equilíbrio somente após 24h (Marangoni e Rousseau 1995; Osborn e Akoh 2002; Klinkesorn et al. 2004; Kodali e List 2005).

A catálise química apresenta o inconveniente da falta de especificidade, sem o controle da distribuição posicional dos AGs no produto final, obtido em TAGs com distribuição aleatória dos AGs (Akoh 1995; Osborn e Akoh 2002), levando à necessidade de etapas adicionais para a obtenção do produto de interesse (Akoh 1995). O aquecimento necessário para a modificação química de óleos e gorduras não é conveniente quando se trabalha com AGs termolábeis (Bailey 1979; Carvalho et al. 2003). Sob as altas temperaturas e nos pHs extremos dos processos químicos tradicionais, os AGPI podem sofrer destruição parcial, por oxidação, da configuração natural das duplas ligações, todas na forma *cis*, migração das duplas ligações ou isomerização *cis-trans* (Haraldsson e

Thorarensen 1994), podendo fornecer resíduos tóxicos e AGs de coloração escura (Carvalho et al. 2003).

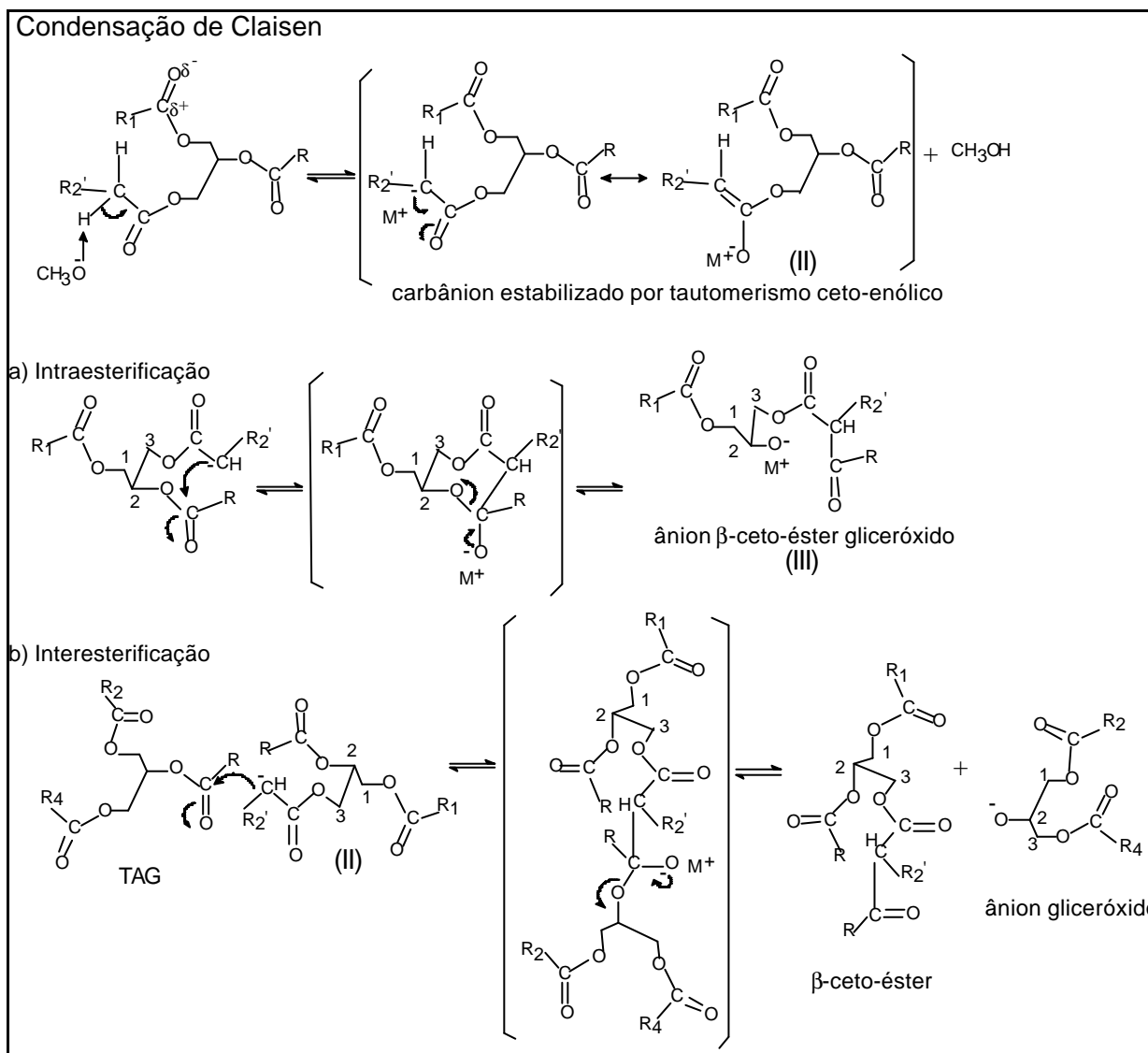


Figura 5 Mecanismo da reação química para a síntese de lipídios estruturados – Condensação de Claisen

A distribuição aleatória dos AGs no produto pode ser alterada por cristalização e separação dos produtos saturados com ponto de fusão mais alto, mediante a condução da reação a temperaturas inferiores à temperatura de cristalização dos componentes com maior ponto de fusão formados durante a reação (Kodali e List 2005). Neste caso, a

interesterificação química é classificada como dirigida (Marangoni e Rousseau 1995) ou seletiva (Shreve e Brink Jr. 1980).

2.4.4 APLICAÇÕES COMERCIAIS

Comercialmente, as principais aplicações para a interesterificação química são a melhoria das propriedades físicas de banha de porco e a produção de margarinas livres de isômeros *trans* (Marangoni e Rousseau 1995).

Algumas empresas do ramo alimentício desenvolveram quimicamente LEs para uso nutricional. Entre os produtos comerciais disponíveis, encontram-se alguns com AGCL e AGCM em sua composição, caso do Captex[®] (C8:0, C10:0, C18:2), da empresa ABITEC (Columbus, Ohio); e do LE Neobee[®], composto por C8:0, C10:0 e AGCL (Stepan Company, Maywood, New Jersey) (Akoh 1995).

Um dos LEs disponível comercialmente é a Caprenina (The Procter & Gamble Co.), uma mistura de TAGs com distribuição aleatória dos AGs (ácido caprílico, ácido cáprico e ácido behênico, C22:0, obtido da hidrogenação do ácido erúxico). Fornece somente 5kcal/g, e suas propriedades funcionais, similares às da manteiga de cacau, permite sua aplicação em coberturas para produtos de confeitaria (Akoh 1998; D'Agostini 2001).

O Salatrim é outro LE obtido quimicamente, comercializado pela Nabisco Foods Group (Parsippany, New Jersey, EUA) sob o nome de Benefat. Representa uma família de TAGs estruturados contendo pelo menos um AGCC e pelo menos um AGCL, ligados aleatoriamente ao esqueleto de glicerol, fornecendo apenas 55% das calorias das gorduras convencionais. Pode ser aplicado em coberturas para chocolates aromatizados, batatas fritas, caramelos e “toffees”, recheios para produtos de panificação e confeitaria, “spreads”, molhos, e produtos lácteos como sobremesas do tipo “frozen” e queijos (Akoh 1998; D'Agostini 2001).

2.5 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Os sistemas de reação enzimática normalmente consistem da lipase (dispersa no meio ou imobilizada), da água associada à enzima, dos substratos e, se presente, do solvente. O rendimento do processo pode ser aumentado via adição de sílica gel, peneiras moleculares, remoção do produto (por cristalização, por exemplo), remoção da água e das substâncias voláteis porventura formadas (Gunstone 1999). Alguns autores aconselham o

condicionamento prévio da enzima para a ativação deste biocatalisador (Shimada et al. 1997; Xu et al. 2000).

Na interesterificação enzimática, a reação em batelada pode ser conduzida em balão de três bocas (Díaz Gamboa e Gioielli 2003b) ou em frascos recobertos de diversas capacidades (Camacho Páez et al. 2002; Fadiloglu et al. 2003; Wongkasul et al. 2004). Nestes estudos de bancada, a reação é conduzida, de maneira geral, em banho térmico com agitação. Para as reações em larga escala, pode-se utilizar um reator em batelada de 40 kg (Xu et al. 1998). Como exemplo de reator contínuo, há indicação de coluna de vidro empacotada com enzima imobilizada e recoberta com alumínio (Camacho Páez et al. 2002) ou encamisada (Fomuso e Akoh 2002), ou ainda um reator com membrana de ultrafiltração, o que permite a redução da temperatura de trabalho e desloca o equilíbrio da reação mediante a separação dos subprodutos (Xu et al. 2000).

Comercialmente, o processo consiste na passagem dos substratos por uma série de reatores que contêm a enzima imobilizada. Quatro reatores, contendo 100-400 kg de enzima cada, podem produzir de vinte a cem toneladas de gordura por dia. A enzima é termoestável e pode ser reutilizada, e o fato de não haver reações paralelas elimina a necessidade de pós-processamento (List e Reeves 2005). Depois da reação, o óleo obtido é desodorizado para a obtenção do produto final (Rousseau e Marangoni 2002).

2.5.1 BIOCATALISADORES: LIPASES

As enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases são as ferramentas mais úteis na síntese orgânica, catalisando a hidrólise e a formação de ligações C-O de ésteres, lactonas ou carbonatos. Estas enzimas são catalisadores quirais, de fácil aplicação, sem a necessidade de uma coenzima para sua ação, comercialmente disponíveis em grande número e variedade, com uma considerável versatilidade de aplicação (Gais e Theil 2002).

As hidrolases mais utilizadas e as mais versáteis são as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3), por apresentarem alta atividade não somente em água como também em meio aquoso na presença de um co-solvente, e, com maior importância, em meio orgânico com solvente apolar, condição em que promovem o pronto processamento de substratos lipofílicos. Outra razão para a ampla utilização das lipases é sua grande disponibilidade na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas (Castro e Anderson 1995; Cheetham 1995; Gunstone 1999; Gais e Theil 2002; Rousseau e Marangoni 2002).

As lipases catalisam a hidrólise total ou parcial das ligações éster de TAGs, liberando DAGs, MAGs, AGLs e glicerol (Macrae 1983; Carvalho et al. 2003). As características das lipases permitem que estas enzimas ajam reversivelmente na reação inversa, isto é, na esterificação, interesterificação e na resolução de misturas racêmicas. Estas reações ocorrem quando as enzimas estão presentes em meio com condições experimentais favoráveis, com restrição de água (Castro e Anderson 1995; Cheetham 1995; Wanasundara e Shahidi 1997; Castro et al. 2004).

As lipases consistem de 199-641 resíduos de aminoácidos. A funcionalidade destes biocatalisadores depende de uma mudança conformacional, que permite o acesso do substrato ao sítio ativo, o qual consiste da tríade serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina, conhecida como regra dos três pontos ou tríade catalítica (Costa Neto 2002). A serina é o nucleófilo necessário para a catálise e os outros dois aminoácidos estão envolvidos em um sistema de “cadeia de cargas” definido para melhorar a catálise. Esta tríade está encoberta por uma curva superficial conhecida como dobra, que consiste de um curto fragmento helicoidal de uma longa curva superficial mantida por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Durante a ativação interfacial, a dobra é deslocada mediante ligações com a interface, expondo o substrato ao sítio ativo. Simultaneamente, o meio hidrofóbico ao redor do sítio ativo fica exposto e forma um forte sítio de ligação na interface. Durante a catálise, a tríade é envolvida por um mecanismo de grupo de cargas (Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002).

Conforme indicado na Tabela 4, segundo a especificidade pelo substrato, as lipases são classificadas em diferentes grupos: lipases não específicas ou aleatórias, lipases regioespecíficas, lipases estereoespecíficas e lipases ácido graxo específicas, onde também estão indicados os microrganismos, plantas e outras fontes das quais estas enzimas são obtidas (Castro e Anderson 1995; Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003; Xu 2004). Além desta especificidade, muitas lipases também apresentam enantiosseletividade frente a vários ésteres, álcoois e substratos ácidos (Wanasundara e Shahidi 1997; Gais e Theil 2002).

As lipases não específicas não apresentam especificidade pela natureza do grupo acila ou pela sua posição no esqueleto do glicerol, fornecendo produtos com distribuição aleatória dos AGs em todas posições da molécula, a exemplo do que ocorre na catálise química (Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003).

As lipases *sn*-1,3-específicas caracterizam-se pela especificidade pelas posições *sn*-1 e *sn*-3 das moléculas de acilglicerol (Carvalho et al. 2003), sendo que algumas enzimas

são incapazes de agir na posição *sn*-2 da molécula devido a um impedimento estérico, ou seja, o ácido graxo presente nesta posição é incapaz de entrar no sítio ativo do biocatalisador (Macrae 1983; Willis et al. 1998).

Há lipases que diferenciam os AGs *n*-3 EPA e DHA durante a catálise, em geral apresentando maior especificidade pelo primeiro (Haraldsson 2001).

A especificidade apresentada por algumas lipases permite que a distribuição dos AGs nas moléculas ocorra de forma dirigida, levando à construção de moléculas com estruturas específicas (Akoh 1995; Rousseau e Marangoni 2002; ISEO 2006).

Tabela 4 Classificação das lipases quanto à especificidade

Classificação	Especificidade	Fontes produtoras das lipases
Não específica	-	<i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Corynebacterium acnes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida rugosa</i> (anteriormente <i>C. cylindraceae</i>), <i>Candida antarctica</i>
Regioespecífica	Posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3	<i>Rhizopus delemar</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Penicillium roquefortii</i> , lipase pancreática suína e algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino)
	Posição <i>sn</i> -2	<i>Candida parapsilosis</i> (também apresenta especificidade por AGPI)
Ácido graxo específica	AGCL com ligação dupla <i>cis</i> na posição 9	<i>Geotrichum candidum</i>
	AGCC e AGCM	<i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus delemar</i>

Independente da especificidade apresentada pela lipase, pode-se observar migração acila durante a reação, fenômeno estritamente químico, que leva a uma troca espontânea de AGs de um sítio éster para outro. Estas reações paralelas provocam uma redistribuição aleatória dos AGs nos acilgliceróis, resultando em estruturas que não haviam sido previstas para a lipase aplicada (Macrae 1983; Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003).

O controle das condições da reação enzimática permite a obtenção de um máximo rendimento do LE a ser sintetizado, quando se objetiva distribuir os AGs em posições específicas da molécula de TAG (Christie 1982; Xu et al. 1998; Jennings e Akoh 1999; Jennings e Akoh 2001; Rousseau e Marangoni 2002; Yang et al. 2005).

2.5.2 MECANISMO DA REAÇÃO

O mecanismo genérico das reações de interesterificação enzimática consiste de diferentes etapas, ilustradas na Figura 6.

A primeira etapa é uma reação de hidrólise. Nos acilgliceróis, ocorre inicialmente o ataque nucleofílico do grupo hidroxila da serina na ligação éster de determinado resíduo de AG nativo (R_1) ligado ao esqueleto do glicerol, o qual pode apresentar originalmente diferentes graus de esterificação. A ligação éster é hidrolisada, liberando o AG nativo e produzindo um acilglicerol menos substituído, contendo pelo menos um grupo hidroxila no sítio onde inicialmente se encontrava o AG liberado. Forma-se então um intermediário acila-enzima, que envolve a enzima e o AG liberado. Uma vez que este complexo é formado, a fração álcool do substrato original (ROH) é liberada. Em uma segunda etapa, ocorre a hidrólise do intermediário acila-enzima, dando lugar finalmente à troca de AG durante a interesterificação (R_2). Esta reação pode ocorrer tanto por uma substituição direta quanto por uma esterificação após a liberação do primeiro AG (Reyes e Hill 1994; Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002; Xu 2004).

Esta seqüência de reações de hidrólise da estrutura original e reesterificação, com múltiplas entradas e saídas de reagentes e produtos, faz com que o mecanismo da interesterificação seja conhecido como “ping-pong” (Gunstone 1999).

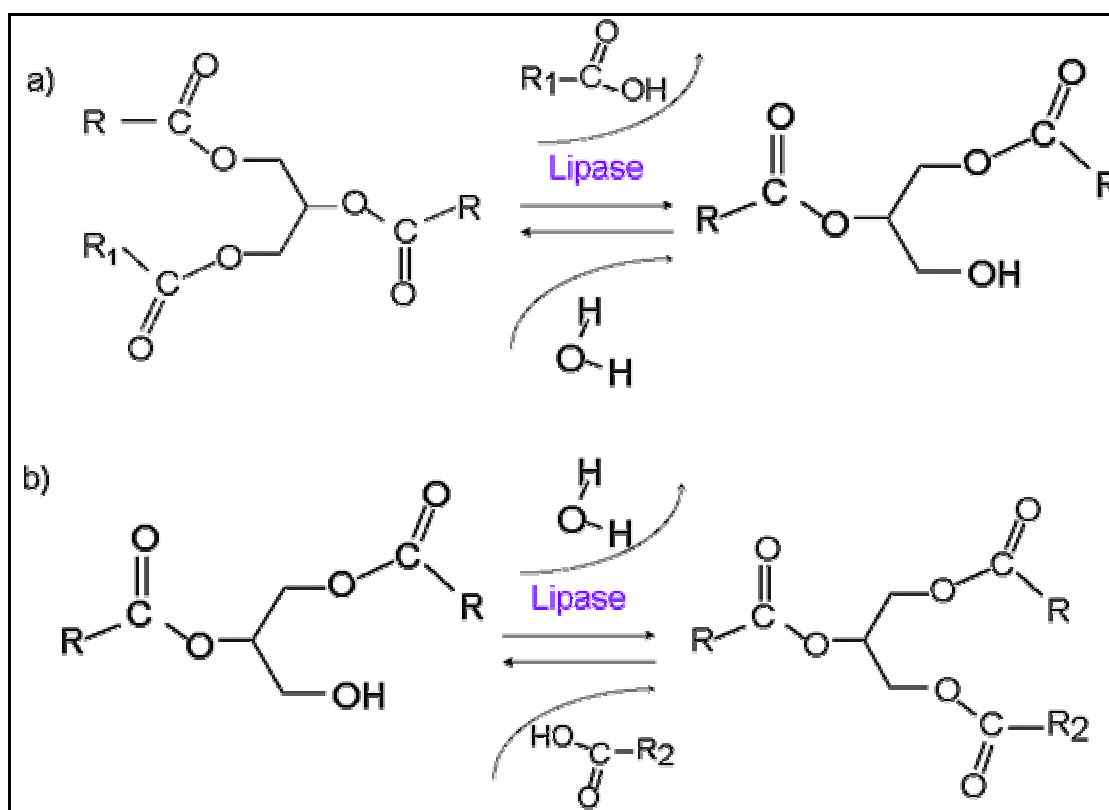


Figura 6 Representação esquemática das etapas da interesterificação enzimática entre um triglicerídeo e um ácido graxo livre: a) hidrólise do TAG, com a liberação do resíduo do AG nativo; b) incorporação do novo resíduo de AG

2.5.3 FATORES QUE AFETAM A REAÇÃO

A taxa de reação, o rendimento do processo e a obtenção dos produtos desejados – relacionados à atividade, à especificidade e à estabilidade das lipases – dependem de alguns fatores, a saber: origem da enzima, temperatura, pH, força iônica, conteúdo de água, solvente, proporção molar dos substratos, concentração da enzima, tempo de incubação, presença de inibidores ou de promotores, e se a enzima encontra-se livre ou imobilizada (Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002).

Geralmente, as lipases livres (não imobilizadas) são oticamente ativas entre 30 e 40°C, e as lipases obtidas de animais e plantas são menos termoestáveis do que as microbianas. O aumento da temperatura além do ponto ótimo provoca a desnaturação das moléculas da enzima pela destruição das ligações, como as pontes dissulfeto, e pode levar à hidrólise das ligações peptídicas e à deamidação dos resíduos de asparagina e glutamina,

provocando a inativação das enzimas (Osborn e Akoh 2002). Estes processos podem ser evitados mediante a eliminação da água do meio e a imobilização da enzima. Em meio aquoso, o pH ótimo para a maioria das lipases de origem animal fica entre 8 e 9, enquanto para as microbianas, o pH ótimo fica na faixa de 5,6 a 8,5 (Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002). O pH e a temperatura são fatores que interferem no predomínio da hidrólise ou da síntese (Rousseau e Marangoni 2002).

A imobilização de enzimas torna a biosíntese e a biotransformação de lipídios comercial e economicamente viável por permitir a fácil recuperação destes biocatalisadores por filtração, permitindo sua reutilização, bem como por proporcionar um aumento na sua estabilidade, na sua atividade e na sua seletividade, quando comparadas às enzimas liofilizadas e dispersas no meio (Akoh 1995; Gais e Theil 2002; Osborn e Akoh 2002). Para se obter tais vantagens, recomenda-se o uso de suportes porosos, onde a enzima imobilizada possa trabalhar adequadamente em solventes orgânicos (Khare e Nakajima 2000).

Em alguns trabalhos, a avaliação do rendimento do processo utilizando-se a enzima imobilizada em subseqüentes reações indica a possibilidade de reutilização 10 a 14 vezes (Macrae 1983; Yang et al. 2003), com a recuperação da enzima após cada reação mediante centrifugação e/ou filtração (Khare e Nakajima 2000; Langone e Sant'Anna 2002) ou passagem por coluna de sulfato de sódio anidro (Jennings e Akoh 1999; Jennings e Akoh 2001).

Para direcionar a reação enzimática para a hidrólise ou para a esterificação, é fundamental controlar a atividade de água, o conteúdo de água e/ou a água contida na preparação de lipase, na mistura de substratos e aquela porventura formada durante a reação. Entretanto, um conteúdo de água residual geralmente menor do que 1% (variando de 0,04 a 11%, m/v) é necessário para a atividade catalítica de muitas lipases, já que mantém a dinâmica enzimática durante as interações não covalentes (Macrae 1983; Haraldsson e Thorarensen 1994; Akoh 1995; Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002), promovendo a produção, via hidrólise, dos acilgliceróis intermediários formados (Rousseau e Marangoni 2002). O ajuste do conteúdo de água do sistema pode ser realizado mediante diferentes técnicas (Xu et al. 1998; Díaz Gamboa e Gioielli 2003b; Fadiloglu et al. 2003; Wongkasul et al. 2004).

A formação de ésteres via esterificação direta apresenta o inconveniente da formação de água, o que se torna um problema para o equilíbrio da reação e para a inativação da enzima, fato que não ocorre na interesterificação (Anthonsen 2003). Por esta

razão, este processo apresenta maior importância do que a hidrólise e ou a síntese de ésteres na biotransformação de óleos e gorduras (Wanasundara e Shahidi 1997; Rousseau e Marangoni 2002).

Quando se utiliza solvente em reações catalisadas por lipases, a escolha por solventes orgânicos hidrofóbicos ($2 < \log P < 4$) (Castro e Anderson 1995; Cheetham 1995; Gais e Theil 2002; Monteiro et al. 2003) permite a redução da afinidade pela água ligada à lipase, evitando sua inativação e aumentando a taxa de reação catalisada pela enzima no sentido de síntese, promovendo também um aumento na solubilidade de substratos apolares, bem como uma maior termoestabilidade da enzima (Akoh 1995; Castro e Anderson 1995; Cheetham 1995; Jennings e Akoh 1999; Khare e Nakajima 2000; Jennings e Akoh 2001; Gais e Theil 2002; Monteiro et al. 2003).

2.5.4 VANTAGENS E DESAFIOS

A aplicação de lipases na transformação de lipídios apresenta muitas vantagens tecnológicas frente aos processos químicos e físicos. A seletividade e a especificidade inerentes às lipases permitem que a síntese enzimática de LE ocorra sem ou com poucas reações paralelas indesejáveis, o que facilita a recuperação do produto desejado. Esta característica permite principalmente um preciso controle sobre a incorporação do ácido graxo de interesse a uma posição específica no esqueleto do glicerol, fornecendo moléculas com um metabolismo único, permitindo uma melhor absorção dos AGs de interesse, o que não é viável no processo químico, em que são obtidos TAGs com distribuição aleatória dos AGs, nem na mistura física. Isto leva a produtos menos tóxicos do que aqueles obtidos nestes outros processos, e de maior valor agregado (Akoh 1995; Ray e Bhattacharyya 1995; Khare e Nakajima 2000; Mu e Hoy 2000; Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002; Kodali e List 2005).

As lipases reduzem a energia de ativação das reações químicas, característica comum a todas as enzimas (Wanasundara e Shahidi 1997; Rousseau e Marangoni 2002).

Duas outras razões bastante atrativas para a utilização de enzimas, decorrentes das condições brandas de pH e temperatura e da pressão normal utilizadas na reação, é a energia economizada no processo e a ocorrência de uma degradação térmica mínima. Esta vantagem é interessante para a modificação enzimática de óleo de peixe, rico em poliinsaturados, favorecendo uma maior estabilidade oxidativa do produto, uma maior vida-de-prateleira e uma melhor qualidade (Gunstone 1999; Osborn e Akoh 2002).

Outro ponto interessante atribuído ao método enzimático é a redução no custo de resíduos, reduzindo os problemas ambientais. Além disso, as lipases não são desativadas pela umidade do meio, como ocorre com catalisadores químicos como o NaOCH_3 (Rousseau e Marangoni 2002).

Apesar das vantagens da síntese e modificação de óleos e gorduras via enzimática, esta tecnologia deverá ser otimizada para se tornar economicamente viável e, conseqüentemente, competitiva, principalmente frente à síntese química e aos processos físicos. A síntese de LE utilizando-se enzimas poderá ser mais vantajosa mediante a redução dos custos do processo (imobilização das enzimas para sua reutilização, aplicação de enzimas não comerciais, estudo de bioreatores, melhoramento genético das lipases), e com a realização de mais pesquisas para o melhor esclarecimento da absorção, das propriedades físicas, químicas, nutricionais e funcionais dos LEs contendo AGs de interesse em posições específicas do TAG, de forma a melhor direcionar sua aplicação. A dificuldade no aumento de escala do processo enzimático também é um fator que pode limitar a aplicação industrial desta tecnologia. Além disso, a interesterificação enzimática ocorre muito mais lentamente do que a interesterificação química. Outro ponto a se observar é que, quando a interesterificação é incompleta e quando se deseja um TAG específico, é necessário remover do meio os substratos que não reagiram, bem como os produtos intermediários (Akoh 1995; Gunstone 1999; Khare e Nakajima 2000; Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002). Além disso, em nível industrial, é necessário ajustar os parâmetros de reação para a melhor relação custo-benefício, de forma a otimizar o processo (Jennings e Akoh 2001).

2.5.5 APLICAÇÕES COMERCIAIS

Uma das principais aplicações comerciais da interesterificação enzimática é a produção de substitutos de manteiga de cacau a um preço acessível (Marangoni e Rousseau 1995), área em que podem ser utilizados como substrato óleo de piqui e ácido esteárico (Facioli e Gonçalves 1998).

Na obtenção de produtos de interesse nutricional, pode-se citar a obtenção de gorduras livres de *trans*, principalmente margarinas e “shortenings”, mediante interesterificação enzimática, produtos disponibilizados comercialmente a partir de 2004. A ADM Food Oils foi a pioneira na produção, sendo que outras empresas (Loders Crocklaan, Premium Vegetable Oils Sdn Bhd) também oferecem diversos produtos no mercado (Kodali e List 2005).

O produto Betapol foi desenvolvido pela Unilever para conter uma proporção de 65% de ácido palmítico na posição *sn-2* e ácido oleico ou linoleico nas posições terminais, para ser utilizado como substituto da gordura do leite humano em fórmulas para crianças (Akoh 1995; Kubow 1996; Schmid et al. 1998; D'Agostini 2001; Mu e Hoy 2001).

2.6 ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

A interesterificação de misturas de óleos e gorduras é bastante utilizada para conferir novas propriedades (físicas, químicas, sensoriais) aos substratos originais. O LE obtido pode conter AGs de interesse nutricional, apresentando, por exemplo, uma composição balanceada de AGCM e AGCL, cuja aplicação poderá ser como suplemento alimentar ou no enriquecimento de alimentos (Marangoni e Rousseau 1995; Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003; Kodali e List 2005).

Pode-se incorporar CLA a óleos vegetais (Lee et al. 2004), enriquecer manteiga com CLA (Garcia et al. 1998), biosintetizar 1,3-oleil-2-palmitoilglicerol (OPO) para uso em alimentação infantil (Schmid et al. 1999), sintetizar um LE rico em ácido oleico e caprílico ou láurico (Wongsakul et al. 2004), por exemplo, a partir da acidólise tanto de óleo de amendoim (Lee e Akoh 1998) como de gordura de frango (Lee e Foglia 2000) com ácido caprílico.

É possível sintetizar um LE do tipo OPO para substituir o Betapol, com a vantagem da maior proporção de ácido palmítico na posição *sn-2* (94% molar), através da alcóolise de tripalmitina com lipase *sn-1,3*-específica, e posterior esterificação do 2MAG formado com ácido oleico, utilizando-se o mesmo catalisador (Schmid et al. 1998).

Uma das áreas mais estudadas na interesterificação, devido à sua importância nutricional, é o desenvolvimento de técnicas para a obtenção de alimentos ricos nos AGPI n-3 EPA e DHA, de forma a promover um aumento no seu consumo. Neste sentido, as principais aplicações das reações de interesterificação são a incorporação de concentrados destes AGs n-3 (na forma de AGLs, ésteres etílicos ou ésteres de glicerol) a óleos e gorduras vegetais, cujo consumo universal é expressivo (Ward 1995; Akoh et al. 1996; Khare e Nakajima 2000), e a outros óleos e fórmulas alimentícias; a concentração de n-3 em óleo de peixe, como óleo de fígado de bacalhau (Haraldsson et al. 1989) ou óleo de atum (Klinkesorn et al. 2004); e a reação de glicerol com AGPIs n-3 ou com seus ésteres (Marangoni e Rousseau 1995; Gunstone 1999). Há também a possibilidade do enriquecimento de fosfolipídios com concentrados de AGLs de EPA e DHA, para aplicação

como suplemento alimentar de animais ou humanos, ou como emulsificante rico nestes AGs n-3 (Haraldsson 2001).

Uma pesquisa confirmou que a incorporação de éster etílico de EPA a TAGs trissaturados ocorre aleatoriamente mediante o uso de lipase imobilizada de *C. antarctica*, não específica, e em posições específicas quando se aplica lipase imobilizada de *Mucor miehei*, *sn*-1,3-específica (Lee e Akoh 1996).

Em outro estudo (Moura et al. 2005), foi testada a incorporação de ésteres etílicos de AGCL provenientes de óleo de peixe a triglicerídios de cadeia média (1:2,5 em mol), utilizando-se uma lipase *sn*-1,3-específica (5% em massa dos substratos), imobilizada e sem condicionamento prévio. Após 30 horas de reação a 60°C, com agitação de 1000rpm sob vácuo, houve incorporação máxima (66,66%) de ésteres aos TAGs, obtendo-se LE específico de interesse nutricional, com os AGCL nas posições terminais das moléculas.

Uma pesquisa indicou que a imobilização de lipase *sn*-1,3-específica de *Rhizopus japonicus* em suporte de Celite permite a incorporação de 25% de DHA aos TAGs de óleo de soja (1:2 em massa) após 24 horas de reação a 40°C com agitação de 500rpm, em meio com *n*-hexano (Khare e Nakajima 2000).

Em um estudo, avaliou-se a incorporação de AGCM (C10:0), na forma livre, a óleo de peixe, em uma proporção molar de 2:1, respectivamente. A reação foi catalisada pela lipase imobilizada *sn*-1,3-específica IM60[®] (10%, m/m dos reagentes), do fungo *Rhizomucor miehei*. Após 24 horas a 55°C e 200rpm, a transesterificação na presença de hexano resultou na incorporação média (molar) de 31,1% de C10:0, enquanto os teores de EPA e DHA foram de 12,6% e 13,7%, respectivamente. No caso da reação sem solvente, houve incorporação média de 28,8% de C10:0, sendo que os valores de EPA e DHA foram, respectivamente, de 16,1% e 13,5%. Não se verificou C10:0 na posição *sn*-2 dos TAGs. Foi observado um aumento na incorporação do AGCM ao óleo com o aumento do tempo de incubação, da concentração de enzima, da proporção molar de substrato e com a redução no conteúdo de água do sistema. Na reação tanto na presença quanto na ausência de solvente, a incorporação máxima de C10:0 ocorreu após 72 h (Jennings e Akoh 2001).

Em outra pesquisa realizada pelos mesmos autores, foi avaliada a incorporação de C10:0 aos TAGs de uma amostra de óleo de peixe (Pronova Biocare, Noruega), misturados na proporção molar de 2:1, respectivamente. Após 24 horas, a 55°C e 200rpm, também com a lipase IM60[®] (10%, m/m dos reagentes), obteve-se a incorporação média de 43% (molar) de C10:0 aos TAGs no caso da reação com hexano, com 27,8% de EPA e 23,5% de DHA. A reação sem solvente forneceu TAGs com 31,8% (molar) de C10:0, 33,2%

de EPA e 28,3% de DHA. Neste caso, observou-se predominância de EPA e DHA na posição central dos TAGs, confirmando a síntese de LE, embora tenha sido detectada certa migração acila durante o processo (Jennings e Akoh 1999).

Testou-se a incorporação enzimática de C10:0 aos TAGs de óleo de peixe (proporção molar de 3:1) em hexano, utilizando-se diferentes lipases. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp. (4%, m/m dos substratos), à temperatura de 45°C, a 250rpm e com um conteúdo de água de 2% (m/m dos substratos e enzima). Nestas condições, a reação, após 24h, proporcionou a síntese de LE contendo 20,3% de C10:0, principalmente nas posições terminais dos TAGs, sendo que a posição central das moléculas foi ocupada predominantemente por EPA e DHA (Hamam e Shahidi 2005).

Em trabalho de 2003, foi realizada a interesterificação química para a obtenção de LE a partir de misturas binárias de óleo de pescado comercial e gordura de palmiste, rica em ácido láurico. Após 1 hora a 60°C com agitação e sob pressão reduzida, na presença de metóxido de sódio (0,4%, em massa), o produto apresentou comportamento físico plástico e 5,0 a 23,4% de AGPIs n-3, em quantidades que foram dependentes das proporções utilizadas dos substratos (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a).

Os mesmos autores (Díaz Gamboa e Gioielli 2003b) testaram a mistura física, a interesterificação química (nas mesmas condições anteriores) e também enzimática para a obtenção de LE a partir de misturas binárias de óleo de pescado comercial e gordura de palmiste. Para a biocatálise, adicionou-se 0,3% de água e a enzima imobilizada de *Rhizomucor miehei* foi aplicada na proporção de 5% (em massa dos substratos). Esta reação ocorreu durante 6 horas a 65°C, sob agitação e em atmosfera de nitrogênio. Obtiveram um produto com comportamento físico plástico e observaram que o conteúdo de gordura sólida dos produtos não diferiu significativamente para os produtos obtidos pelas diferentes tecnologias.

A produção de LEs ricos em EPA e DHA pode ser feita por meio de reações em duas etapas, que envolve primeiro uma reação de alcóolise, com a formação de um 2-MAG que, depois de isolado (em geral, por fracionamento), é esterificado (Schmid et al. 1998; Torres et al. 2002; Xu 2004).

Concentrados de EPA e DHA podem ser obtidos a partir de óleo de fígado de bacalhau ou de microalgas, para serem utilizados na síntese de TAGs ricos nestes n-3 após reação enzimática de glicerólise, com rendimentos que podem chegar a 96,5% (Robles Medina et al. 1999).

A concentração de AGPIs utilizando lipases pode também ser realizada através da esterificação de glicerol em uma primeira etapa enzimática para adição de AGCM nas posições terminais, seguida de uma catálise química para incorporação de EPA ou DHA na posição 2 do esqueleto de glicerol (Halldorsson et al. 2001). A incorporação dos AGs n-3 nesta posição da molécula em uma reação em duas etapas pode apresentar um rendimento de 90% ou mais dependendo das condições utilizadas (Haraldsson 2001).

A acidólise de TAGs de cadeia média com um concentrado de EPA e DHA obtidos de óleo de peixe, catalisada por uma lipase *sn*-1,3-específica em reator com membrana de ultrafiltração, com simultânea separação dos AGCMs liberados durante o processo, oferece incorporação 15% superior dos AGPIs n-3 em relação à reação conduzida na ausência de membrana, por deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação do produto de interesse (Xu et al. 2000).

A modificação de óleos de grau alimentício também pode ser realizada com finalidades tecnológicas (Marangoni e Rousseau 1995; Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003; Kodali e List 2005). A espalhabilidade da manteiga, por exemplo, pode ser melhorada mediante sua interesterificação química com óleo de milho (Rodrigues e Gioielli 2003), reação que também proporciona o enriquecimento do produto com AGPI n-6. A espalhabilidade e os atributos sensoriais da manteiga também podem ser modificados por meio de sua interesterificação (química ou enzimática) com óleo de canola (Rousseau et al. 1996b; Rousseau et al. 1996c; Marangoni e Rousseau 1998; Rousseau e Marangoni 1999). A interesterificação química de óleos vegetais líquidos (algodão, amendoim, soja, milho e canola) com TAGs trissaturados (gordura de soja e de algodão totalmente hidrogenadas) pode ser realizada para a obtenção de margarinas e “shortenings” (List et al. 1995).

2.7 TÉCNICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS

A literatura apresenta diferentes metodologias analíticas para o acompanhamento do progresso da reação de síntese de LEs.

A cromatografia gasosa (CG) geralmente é aplicada para a determinação da composição total de AGs da amostra, que deve ser submetida a derivatização prévia (Morrison e Smith 1964; Lepage e Roy 1984; Brengartner 1985; Lee e Akoh 1996; Shimada et al. 1997; Mu et al. 2000; Xu et al. 2000; Camacho Páez et al. 2002).

A distribuição estereoespecífica dos AGs nos TAGs dos LEs obtidos pode ser determinada de forma a se verificar a ocorrência de migração acila durante a reação

(desejável quando se aplicou uma lipase específica), para a verificação das vias metabólicas de utilização dos TAGs e para o controle de qualidade de alimentos que contenham óleos e gorduras naturais ou modificados. A composição em AGs da posição *sn*-2 dos TAGs da amostra pode ser obtida na literatura (Gunstone 1967) ou a partir da análise por CG dos acilgliceróis obtidos após a hidrólise enzimática com lipase pancreática (D'Agostini e Gioielli 2002).

Esta lipase, apesar de bastante utilizada com esta finalidade, não é eficaz para a determinação da estrutura de TAGs que contêm quantidades significativas de AGCC ou AGCM, como a gordura do leite, ou AGPI, caso dos óleos marinhos e de outros óleos e gorduras de sementes com AGs incomuns (Gunstone 1967; Christie 1982). Como alternativa para estes produtos, há a possibilidade de a análise regioespecífica dos TAGs ser realizada por degradação química com reagente de Grignard (Christie 1982), seja pelo método tradicional (Gilman e McGlumphy 1928; Becker et al. 1993) ou modificado (Turon et al. 2002). Nas duas técnicas, após a hidrólise, a fração de acilglicerol de interesse é isolada por cromatografia em camada delgada (Christie 1982).

A partir da composição em AGs da posição *sn*-2 dos TAGs e da composição total em AGs dos TAGs da amostra, pode-se estimar a composição das posições *sn*-1 e *sn*-3, utilizando-se as teorias 1,3-random 2-random para gorduras naturais e 1,2,3-random para LE (Bailey 1979), conforme realizado em alguns estudos (Ming 2001; D'Agostini e Gioielli 2002; Rodrigues 2002).

A determinação direta da posição dos AGs nas moléculas de TAGs pode ser feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa (Caboni et al. 1992; Huang e Akoh 1996; Mu et al. 2000; Fomuso e Akoh 2002) ou ressonância magnética nuclear de C13 (RMN ¹³C), aplicada por exemplo para óleo de palma (Ng 1985) e azeite de oliva (Sacchi et al. 1992).

O efeito da interesterificação nas propriedades físicas dos óleos e gorduras modificados pode ser avaliado segundo diferentes métodos. A determinação do conteúdo de gordura sólida (CGS) da amostra pode ser feita por ressonância magnética nuclear pulsante (RMNp), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e técnicas dilatométricas. Os termogramas obtidos pela análise por DSC fornecem a temperatura e o calor de fusão das amostras, e esta técnica pode também ser utilizada para a determinação da morfologia dos cristais (forma polimórfica α , β , β') das amostras, o que também pode ser verificado por difração de raio-X e microscopia de luz polarizada. A estrutura cristalina das amostras pode ser determinada por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de varredura a

laser confocal. O efeito da interesterificação sobre óleos e gorduras pode ser verificado mediante a avaliação da reologia do produto, via determinação do ponto de gotejamento (método Mettler), da textura (penetrômetro em cone, máquina de teste Instron ou um analisador de textura), da viscosidade e das propriedades viscoelásticas da amostra (Osborn e Akoh 2002; Rousseau e Marangoni 2002).

As medições mecânicas são importantes para a definição da aplicação tecnológica dos LEs obtidos, mas a análise sensorial é determinante para a verificação da aceitação do produto pelo consumidor (Osborn e Akoh 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo foi dividido em três seções. Na primeira, estão descritos o material e a metodologia para a modificação do óleo de peixe comercial, a qual foi realizada mediante a interesterificação química e enzimática utilizando-se como doador acila tanto éster metílico de ácido cáprico quanto triglicerídios de cadeia média. Na segunda, é descrita a metodologia para a extração de óleo de resíduos de sardinha, bem como os procedimentos para sua posterior utilização como substrato em reação de transesterificação enzimática, visando a síntese de triglicerídios estruturados. Por fim, na terceira seção, é apresentada a metodologia para a determinação da composição e caracterização de cada óleo estudado nas duas primeiras seções.

3.1 MODIFICAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE COMERCIAL

3.1.1 MATERIAL

Utilizou-se o ácido cáprico, na forma livre, da Sigma. O óleo de peixe utilizado foi o ROPUFA n-3 '30' Food Oil[®] (Roche Brasil). Os triglicerídios de cadeia média (Trigliceril CM[®]) eram da empresa Support Produtos Alimentícios Ltda (Brasil) e estão indicados nas próximas seções como TCM.

Para a reação enzimática, utilizou-se a lipase *sn*-1,3-específica Lipozyme[®] RM IM (Novozymes Brasil) de *Rhizomucor miehei* produzida por um microrganismo geneticamente modificado, *Aspergillus oryzae*. Esta lipase, de grau alimentício, é imobilizada em suporte do tipo fenólico e trabalha em conteúdos de água baixos (geralmente 2-3%), apresentando atividade máxima quando a matriz contendo a enzima e o suporte contém aproximadamente 10% (m/m) de água. Este biocatalisador pode ser usado em temperaturas em uma faixa de 30 a 70°C.

Todos reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 OBTENÇÃO DO METÓXIDO DE SÓDIO

Utilizou-se NaOCH_3 como catalisador para as reações de interesterificação química (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a). Para sua obtenção, adicionou-se 1g de NaOH a 25mL de metanol, e deixou-se sob refluxo a 60°C até a completa dissolução da base. Posteriormente, eliminou-se o solvente em evaporador rotativo a vácuo, e o NaOCH_3 obtido, na forma de um pó fino, foi armazenado em frasco plástico escuro em dessecador.

3.1.3 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DE ÁCIDO CÁPRICO

O éster metílico do ácido cáprico (MeC_{10}) foi sintetizado mediante esterificação do ácido cáprico (C10:0 na forma livre), tomando-se como base metodologia descrita na literatura (Klinkesorn et al. 2004). Foram realizadas algumas modificações desta técnica, considerando-se a massa molecular de $172,27\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o C10:0 e de $186,30\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o MeC_{10} , cuja densidade (d) é de $0,873\text{g/mL}$. O procedimento foi realizado conforme descrito a seguir: o ácido cáprico (5g) foi esterificado com 40mL de HCl em metanol (3,5:1, v/v), sob refluxo durante 15 minutos. A mistura foi resfriada, e adicionou-se 200mL de água destilada. O MeC_{10} foi extraído com 2 x 100mL de hexano. A camada de hexano foi transferida para outro recipiente, e adicionou-se sulfato de sódio anidro para a remoção da umidade. O solvente foi removido em evaporador rotativo a vácuo, a 40°C . A síntese do éster foi realizada em triplicata. O MeC_{10} foi armazenado a -20°C sob atmosfera de nitrogênio até a utilização.

Retirou-se uma alíquota de $50\mu\text{L}$ do MeC_{10} obtido a cada experimento, para a confirmação de sua pureza. Esta análise foi realizada no cromatógrafo gasoso CG-90, equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida MXT-5 (Restek), $15\text{m} \times 0,53\text{mm}$. As condições de análise foram: gás de arraste: nitrogênio, numa vazão de $5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; gás make-up: hidrogênio a 24mL por minuto; temperatura do injetor: 190°C ; temperatura do detector: 230°C ; temperatura da coluna: 100 até 230°C numa razão de 7°C por minuto. O cromatograma foi obtido através do software Clarity Lite, e a composição qualitativa da amostra foi determinada por comparação do tempo de retenção do pico com o do respectivo padrão do MeC_{10} , preparado segundo literatura (Hartman e Lago 1973).

3.1.4 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS PARA AS REAÇÕES

Realizou-se a mistura dos substratos nas proporções seguintes: ROPUFA[®]:MeC₁₀ (1:2, em mol) e ROPUFA[®]:TCM (1:1, em massa). As misturas foram mantidas em frasco âmbar a -20°C, sob atmosfera de nitrogênio, até o momento do uso. Antes da reação, traços de umidade foram removidos das misturas em evaporador rotativo a vácuo a 90-95°C durante 1h.

Para as reações a seguir, a temperatura de trabalho (60°C) foi escolhida de forma a garantir a dissolução homogênea dos substratos, bem como a manutenção da atividade da lipase.

3.1.5 INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

Para a reação de interesterificação química, foi utilizada metodologia descrita na literatura (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a). O catalisador escolhido foi o metóxido de sódio, NaOCH₃, utilizado na proporção de 0,4% (m/m dos reagentes). A reação ocorreu durante 1 hora a 60°C e 56mmHg, sob agitação magnética. A Figura 7 apresenta uma foto do sistema utilizado para as reações química e enzimática.

A reação foi interrompida através da adição de 0,5mL de solução aquosa 4% (m/v) de ácido cítrico (Klinkesorn et al. 2004). O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, a -20°C até o momento das análises.

3.1.6 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a interesterificação enzimática, foi utilizada metodologia descrita na literatura (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a). Adicionou-se 5% (m/m dos reagentes) da lipase Lipozyme RM IM[®]. A reação ocorreu durante 6 horas, sob agitação magnética, a 60°C e 56mmHg, utilizando-se o sistema indicado na Figura 7.

A reação foi interrompida através da centrifugação (3.000rpm por 15 minutos) e filtração a vácuo da enzima remanescente no líquido sobrenadante. O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, a -20°C.



Figura 7 Sistema utilizado para as reações de interesterificação química e enzimática

3.2 EXTRAÇÃO E MODIFICAÇÃO DO ÓLEO DE RESÍDUOS DE SARDINHA

3.2.1 MATÉRIA-PRIMA

Resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), compostos por cabeças, vísceras, cauda, pele, espinha e escamas, foram gentilmente cedidos pela Pesqueira Oceânica, localizada em Florianópolis (SC). O pescado foi identificado como sendo proveniente da costa catarinense, sem informação, por parte do fornecedor, quanto ao mês de captura.

O material foi coletado diretamente na linha de produção, sem escolha de sexo, idade e estágio de maturação sexual, para que os resultados obtidos fornecessem dados representativos da espécie, e transportado até o laboratório em isopor com gelo, sendo imediatamente selecionado e congelado.

No momento do uso, o material, totalizando 15kg, foi descongelado, lavado em água corrente e triturado em um multiprocessador, até a formação de uma pasta homogênea. Adicionou-se uma solução do antioxidante *tert*-butil hidroquinona (TBHQ) na proporção de 500mg/kg de óleo contido na matéria-prima, conforme instruções do fornecedor (amostra gentilmente cedida pela ADM World, Brasil). A pasta não utilizada imediatamente foi mantida a -20°C.

Para a reação de interesterificação, foram utilizados triglicerídios de cadeia média, TCM, (Trigliceril CM[®]) da empresa Support Produtos Alimentícios.

3.2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO DO PESCADO

A extração do óleo dos resíduos de sardinha foi realizada segundo metodologia de Bligh & Dyer (1959) modificada, conforme descrito na literatura (Christie 1982): cerca de 100g da amostra úmida (pasta, obtida conforme descrito no item 3.2.1, com umidade de 71,3%) foram homogeneizados durante 4 minutos, em béquer com agitação, com 100mL de clorofórmio e 200mL de metanol. Após completa homogeneização, observou-se uma única fase. Filtrou-se a mistura a vácuo e o resíduo tissular foi homogeneizado com 100mL de clorofórmio, realizando-se nova filtração a vácuo. Os filtrados foram combinados e transferidos para um funil de separação, agitando-se vigorosamente após adição de 100mL de solução aquosa de KCl 0,88% (m/v). O funil de separação contendo a amostra diluída permaneceu sob refrigeração durante 2 horas para facilitar a separação das fases (Aro et al. 2000). A fase inferior, orgânica, foi recolhida e filtrada, adicionando-se sulfato de sódio anidro para a remoção de umidade. Os solventes foram eliminados em evaporador rotativo a vácuo. A extração do óleo foi realizada em triplicata.

Todos solventes utilizados na extração do óleo, de grau analítico, foram degaseificados em ultra-som antes do uso. O óleo obtido foi armazenado em frasco âmbar e mantido congelado a -20°C, sob atmosfera de nitrogênio, para utilização posterior (análises e interesterificação) sem nenhum tratamento adicional.

3.2.3 ANÁLISE DO RENDIMENTO EM ÓLEO

Após a evaporação do solvente, a fração do óleo bruto foi pesada para o cálculo do rendimento em óleo, em relação ao material de origem. Os resultados foram expressos como g/100g de matéria úmida.

3.2.4 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a reação de interesterificação, utilizou-se a proporção em massa de 1:1, TCM para óleo de resíduos de sardinha. Realizou-se a remoção prévia de traços de umidade da mistura, mediante o aquecimento durante 60 min a 90-95°C em evaporador rotativo a vácuo. Utilizou-se 5% (m/m dos reagentes) da lipase *sn*-1,3-específica Lipozyme RM IM® (gentilmente fornecida pela Novozymes Brasil). Após 6 horas sob agitação a 60°C e 56mmHg (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a), a reação foi interrompida através da centrifugação (3.000rpm por 15 minutos) e filtração a vácuo da enzima remanescente no líquido sobrenadante. O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, e mantido a -20°C até o momento das análises.

3.2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas realizadas nos resíduos de sardinha seguiram metodologia oficial (AOAC 1990; AOAC 2002). A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante. Os lipídios totais foram obtidos por extrator Soxhlet, durante 6 horas, utilizando-se hexano como solvente, seguido de aquecimento em estufa para evaporação total do solvente. A análise de proteínas foi feita pelo método de Kjeldahl (Nx6,25). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média, em g/100g de matéria úmida.

3.3 COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS

Foram realizadas análises de caracterização dos óleos, que incluíram composição em AGs, obtida por CG; índice de iodo (I.I.); perfil lipídico (por cromatografia em camada delgada, CCD); índice de acidez (I.A.); índice de peróxido (I.P.); comportamento térmico por calorimetria de varredura diferencial (DSC). As análises realizadas em cada óleo estão detalhadas nos próximos itens.

3.3.1 PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico foi verificado por CCD: as amostras foram aplicadas em cromatofolhas de alumínio com 20cm de comprimento, contendo sílica gel 60G e revelador de fluorescência (Macherey-Nagel, Alemanha). Foram testados diferentes sistemas de solventes para a separação das frações lipídicas da amostra, a saber: hexano/éter etílico/ácido fórmico nas proporções, em volume, 80:20:2 (Christie 1982) e 70:30:1 (Xu et al.

1998); éter de petróleo/éter etílico (80:20); 8cm com hexano/éter etílico/ácido fórmico (50:20:0,3) e 10cm com hexano/tolueno (50:50) (Klinkesorn et al. 2004). As amostras foram eluídas duas vezes com cada um destes sistemas de solventes.

A visualização das bandas foi feita a 254nm ou após revelação com solução alcoólica de ácido fosfotúngstico, conforme será descrito nos Capítulos 4 e 5, respectivamente.

Para a verificação do perfil lipídico das amostras, optou-se pela utilização da fase eluente hexano/éter etílico/ácido fórmico (80:20:2, v/v/v), a qual proporcionou uma melhor separação das frações lipídicas presentes nos óleos, na seguinte ordem de eluição (a partir da frente do solvente): alquil-ésteres, ésteres de colesterol; TAGs; AGLs; colesterol; 1,3-DAGs; 1,2-DAGs; MAGs; e lipídios complexos (Christie 1982).

3.3.2 ÍNDICE DE ACIDEZ

A determinação de AGLs foi realizada segundo descrito na literatura (Aro et al. 2000), com as seguintes modificações: cerca de 0,5g do óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 20mL de etanol-éter etílico (1:2, v/v), e titulado com solução etanólica de KOH 0,01M (título utilizado para os experimentos com óleo de peixe comercial, conforme indicado no Capítulo 4) ou 0,0358M (título utilizado para os experimentos com óleo de resíduos de sardinha, relatados no Capítulo 5), utilizando-se como indicador uma solução de fenolftaleína 1% em etanol 95%. As análises foram feitas em duplicata e os resultados de índice de acidez (I.A.) foram expressos como percentagem de ácido oléico, calculada pela fórmula:

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

onde:

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

N = normalidade da solução de KOH

f_c = fator de correção da solução de KOH

m = massa da amostra (g)

Esta análise foi realizada em duplicata e os resultados foram tratados estatisticamente com o auxílio do *software* Statistica 5.11 para a verificação de diferenças estatísticas significativas entre as médias, em um nível de significância de 5%. Caso tenham

sido detectadas diferenças, aplicou-se teste de Tukey para a identificação das médias que diferiram entre si.

3.3.3 ÍNDICE DE PERÓXIDO

O índice de peróxido (I.P.) foi determinado segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS 1990): cerca de 1g do óleo foi dissolvido em 20mL de solução ácido acético-clorofórmio (3:2, v/v) e 0,5mL de solução saturada de KI. Após 1 minuto em repouso, adicionou-se 10mL de água destilada. No caso dos experimentos realizados com óleo de resíduos de sardinha (detalhados no Capítulo 5), após a etapa de adição de água, procedeu-se à separação da fase superior da solução resultante para a realização da etapa indicada a seguir (titulação); nos experimentos do Capítulo 4, a separação da fase superior não se fez necessária. Após adição de 1mL de solução indicadora de amido a 1%, fez-se a titulação com solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N. A concentração de peróxidos (meq de O_2 /kg de óleo) foi calculada através da fórmula:

$$\text{I.P. (meq de O}_2\text{/kg de óleo)} = (\text{S}-\text{B}) \times \text{N} \times 1000/\text{m}$$

onde:

B = volume gasto na titulação do branco (reagentes sem a amostra) (mL)

S = volume gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução padronizada de tiosulfato de sódio

m = massa de amostra (g)

A análise foi realizada em duplicata e os resultados foram tratados estatisticamente com o auxílio do *software* Statistica 5.11 para a verificação de diferenças entre as médias, em um nível de significância de 5%. Caso tenham sido detectadas diferenças, aplicou-se teste de Tukey para a identificação das médias que diferiram entre si.

3.3.4 ISOLAMENTO DOS TAGS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA

Após a interesterificação enzimática, o óleo de peixe, dissolvido em hexano (500mg de óleo/mL de solvente), foi aplicado em placas de CCD para isolamento dos TAGs, conforme descrito no item 3.3.1. A banda referente aos TAGs foi raspada da placa, transferida para um tubo de vidro com tampa de rosca e a fração lipídica foi extraída da sílica com 2 x 6mL de éter etílico. O solvente foi evaporado em banho-maria a 75-80°C sob

corrente de nitrogênio. Os TAGs recuperados foram preparados conforme descrito no item 3.3.5, para a posterior determinação da composição em AGs (item 3.3.6) (Christie 1982).

3.3.5 PREPARO DOS ÉSTERES METÍLICOS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA

Os ésteres metílicos dos AGs para análise por CG foram obtidos conforme descrito na literatura (Hartman e Lago 1973). Os ésteres foram obtidos pela saponificação de 150-200mg de óleo com 3,5mL de solução metanólica 0,5N de hidróxido de potássio, fervendo-se por 5min em banho de água a 75-80°C. Foram adicionados à solução quente 10,5mL do reagente de esterificação (preparado pelo refluxo, durante 15 min, de uma mistura de 2g de cloreto de amônio, 60mL de metanol e 3mL de ácido sulfúrico concentrado) e a mistura foi refluxada durante 5 min. Transferiu-se a mistura para um funil de separação, adicionando-se 20mL de éter de petróleo e 40mL de água destilada. A camada aquosa foi descartada e a camada de éter de petróleo foi lavada outras duas vezes com 20mL de água destilada. As quantidades de todos reagentes utilizados para o preparo dos ésteres metílicos foram ajustadas conforme a quantidade disponível de amostra de óleo.

A camada de éter de petróleo, contendo os ésteres metílicos, foi transferida para um tubo de vidro com tampa de rosca, e o solvente foi evaporado em banho-maria a 40°C sob corrente de nitrogênio. Adicionou-se hexano como solvente para a realização das análises. As soluções foram armazenadas a -20°C para utilização posterior.

3.3.6 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

O perfil de AGs foi determinado por CG, mediante a injeção dos ésteres metílicos dos AGs, dissolvidos em hexano. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo 17A (Shimadzu Co., Japão), equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida SP 2340 (Supelco), com 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e contendo 0,2µm de polietilenoglicol. As condições de análise foram: gás de arraste: hélio, numa vazão de 17mL.min⁻¹; temperatura do injetor: 240°C; temperatura do detector: 260°C; temperatura da coluna: 140°C por 5 minutos, com aumento de 4°C/min até 240°C, na qual permaneceu por 5min. A identificação dos picos foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U). A composição quantitativa foi realizada por normalização de área do pico do éster metílico de interesse em relação à área total dos

picos identificados, sendo expressa como porcentagem em massa. Esta análise foi realizada na Estação Experimental da EPAGRI de Itajaí (SC).

3.3.7 ÍNDICE DE IODO CALCULADO

A literatura cita o Método AOCS Cd 1b-87 como oficial para a determinação do I.I. de óleos e gorduras, no qual é necessário o consumo de 5g de amostra. Neste trabalho, devido à limitação de substrato e à economia de reagentes, optou-se por determinar o I.I. por cálculo, a partir da composição em AGs das amostras (obtida por CG), com base na fórmula expandida do Método Cd 1c-85 da American Oil Chemists' Society (AOCS 1990). A literatura indica uma boa correlação (0,99) entre o I.I. obtido por cálculo e por análise (Nassu 1994).

3.3.8 CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

Na técnica de calorimetria de varredura diferencial (DSC), a amostra e um material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Se uma transição ocorre na amostra, uma quantidade de energia térmica é adicionada ou retirada do compartimento da amostra ou da referência de forma a mantê-las na mesma temperatura. Este balanço de energia é equivalente à energia de transição. Na área de óleos e gorduras, a técnica de DSC pode ser utilizada para verificar os diferentes comportamentos de fusão e cristalização das amostras como decorrência, por exemplo, do processamento (Pomeranz e Meloan 1994).

Entre os métodos de obtenção de curvas de DSC, tem-se o “power compensation” DSC, cujo sistema apresenta uma célula com dois fornos independentes de platina-irídio, com aquecedores e sensores de platina individuais (Nassu 1994).

O registro da curva de DSC é expresso em termos de fluxo de calor *versus* temperatura (°C) ou tempo (min) (Lucas et al. 2001). Os fenômenos térmicos sofridos pela amostra apresentam-se na forma de desvios da linha base na direção exo ou endotérmica. No “power compensation” DSC, as respostas endotérmicas são apresentadas como sendo positivas, isto é, acima da linha base, correspondendo a um aumento de transferência de calor à amostra em relação à referência (Nassu 1994).

Quando há pouca variação na capacidade calorífica da amostra antes e depois da transição, o traçado da linha base é exato, fato que nem sempre acontece, o que dificulta a determinação da linha base (Nassu 1994).

A partir da curva obtida para cada amostra a uma determinada velocidade de aquecimento/resfriamento, e uma vez estabelecida uma linha base satisfatória, mede-se a área A abaixo do pico, preferencialmente por integração numérica. Esta área é proporcional à mudança de entalpia ΔH para o evento térmico em estudo, representado pela equação (1) a seguir (Nassu 1994):

$$(1) \Delta H = A \times K/m$$

onde:

m = massa da amostra

K = constante de calibração, determinado relacionando-se uma mudança de entalpia conhecida com uma área de pico de medida.

As temperaturas de transição, determinadas a partir da curva de DSC, são definidas da seguinte maneira (Nassu 1994):

- Temperatura “onset”: temperatura correspondente ao ponto no qual a curva começa a se desviar da linha base. Quando ocorre mais de um pico, a temperatura “onset” calculada corresponde ao pico de maior magnitude. É o ponto de início da transição.
- Temperatura (máxima) de pico: corresponde à evolução máxima do pico, sendo fortemente influenciada pela velocidade de aquecimento/resfriamento utilizada na análise. É a temperatura onde o efeito é máximo.
- Temperatura de conclusão do fenômeno térmico: é a temperatura na qual a curva volta à linha base após o fenômeno térmico ter sido concluído.

Na Figura 8, é apresentada uma curva típica de fusão de óleo, com a indicação das temperaturas características.

Neste estudo, os equipamentos utilizados para esta análise foram calorímetro de varredura diferencial (“Differential Scanning Calorimeter”) tipo “power compensation” modelo Delta Series DSC 7 (PERKIN ELMER); “Thermal Analysis Controller” modelo TAC 7/DX (PERKIN ELMER) e resfriador. A calibração do equipamento foi realizada com índio e zinco, e a confirmação da calibração foi feita com água Milli-Q. A análise foi realizada segundo Método AOCS Cj 1-94 (AOCS 1997), obtendo-se uma curva para a fusão e outra para a cristalização de uma mesma amostra. O gás de arraste utilizado na análise foi nitrogênio puro (99,9%), tomando-se o ar como referência. As cápsulas utilizadas eram de alumínio, e a massa das amostras ficou entre 8 e 12mg.

A partir dos termogramas de fusão das amostras, foram obtidos os seguintes parâmetros: entalpia de fusão (J/g), temperatura de início de fusão (°C), temperatura de término de fusão (°C), temperatura “onset” de fusão (°C), temperatura de pico (°C). A linha de base foi traçada do início da curva até o seu término. As áreas foram obtidas por integração e as temperaturas, com análise de pico. Esta análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

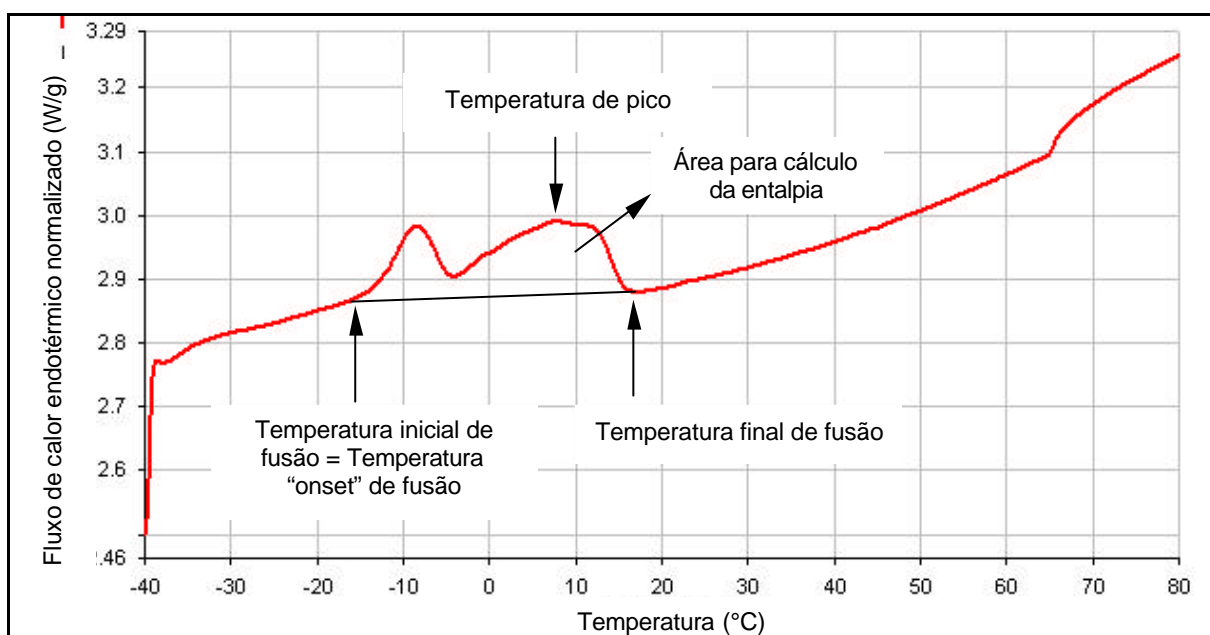


Figura 8 Exemplo de curva obtida pela análise por calorimetria de varredura diferencial

4 ESTUDO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE PEIXE

Neste capítulo, serão apresentados, sob a forma de artigo, os resultados experimentais e a discussão do trabalho intitulado “Estudo de diferentes estratégias para a síntese de triglicerídios estruturados a partir de óleo de peixe”.

Neste estudo, foram avaliados diferentes doadores acila e catalisadores para a interesterificação de óleo de peixe, tendo por objetivo a síntese de triglicerídios estruturados de interesse nutricional, ricos nos AGs $n-3$ eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) e contendo ácidos graxos de cadeia média.

RESUMO

Lipídios estruturados (LEs) que contêm ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e poliinsaturados (AGPI) na mesma molécula de triglicerídeo (TAG) oferecem vantagens nutricionais e terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi o estudo de diferentes estratégias para a modificação da composição em AGs de óleo de peixe, rico nos ácidos docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3) e eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3), mediante a incorporação de AGCMs aos TAGs. Avaliou-se a interesterificação utilizando-se diferentes substratos (éster metílico de ácido cáprico/MeC₁₀ e TCM) e diferentes catalisadores (químico e enzimático). A interesterificação química foi conduzida na presença de NaOCH₃ (0,4% m/m dos substratos), durante 1 hora. A interesterificação enzimática ocorreu na presença da lipase Lipozyme RM IM (5% m/m dos substratos), durante 6 horas. Nos dois casos, a reação ocorreu a 60°C, sob pressão reduzida, sendo que o MeC₁₀ e o óleo de peixe foram utilizados na proporção molar de 2:1, e o TCM e o óleo de peixe foram aplicados na proporção em massa de 1:1. Os óleos interesterificados apresentaram perfil lipídico diferente das misturas originais, conforme verificado por cromatografia em camada delgada. A composição em AGs dos TAGs dos óleos modificados, determinada por cromatografia gasosa, indicou a presença de AGCMs, comprovando a troca de radicais acila entre os substratos, ao mesmo tempo em que se obteve uma considerável proporção de EPA e DHA, em especial na interesterificação enzimática com MeC₁₀. A análise por calorimetria de varredura diferencial (DSC) indicou que a interesterificação, tanto química quanto enzimática, produziu modificações notáveis no perfil de fusão das amostras, quando em comparação com a simples mistura dos substratos, indicando mudanças estruturais nos óleos de partida. O substrato (MeC₁₀ ou TCM) também foi determinante para o perfil de fusão dos óleos interesterificados. A partir das análises realizadas, confirmou-se a eficácia das estratégias estudadas neste trabalho para a síntese de LE com uma composição variada em ácidos graxos.

Palavras-chave: lipídio estruturado, óleo de peixe, interesterificação, lipase, ácido graxo de cadeia média

4.1 INTRODUÇÃO

Recentemente, diversos artigos na área de óleos e gorduras têm se focado na obtenção de triglicerídios (TAGs), conhecidos como lipídios estruturados (LEs), com propriedades tecnológicas e nutricionais otimizadas. Estas novas propriedades conferidas

às moléculas são decorrentes de modificações na composição em AGs e ou de sua distribuição nas moléculas originais, o que é possível mediante reações de interesterificação (Akoh 1995; Willis et al. 1998; Xu 2004).

Estas reações promovem a troca de ácidos graxos inter ou intramoléculas (rearranjo), podendo ocorrer ao acaso ou de forma específica, dependendo do catalisador utilizado (Macrae 1983; Willis et al. 1998; Castro et al. 2004).

Os LEs podem ser construídos para apresentarem, na mesma molécula, ácidos graxos saturados de cadeia média (AGCM) – C6:0 a C12:0 – e ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (AGPI). Podem ser obtidos para potencializar o aproveitamento metabólico de cada um destes AGs: os AGCM apresentam mobilidade e solubilidade inerentes e são facilmente metabolizados, enquanto os AGPI contribuem para a manutenção da saúde e apresentam efeitos positivos sobre determinados estados metabólicos (Bell e Bradley 1997; Stein 1999; Osborn e Akoh 2002). Além disso, a interesterificação também permite a modificação das propriedades físicas e químicas das moléculas originais, produzindo gorduras, por exemplo, com diferentes pontos de fusão e curvas de sólidos (Clauss 1996; Vieira et al. 1997).

Os AGPI presentes no LE podem ser provenientes de óleo de peixe, rico nos ácidos docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3) e eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3), conhecidos por suas excelentes propriedades nutricionais e funcionais. Estes AGs da série n-3 são essenciais no crescimento e no desenvolvimento. Pessoas saudáveis sintetizam estes n-3 a partir do ácido α -linolênico, embora com pouca eficácia, e sua síntese pode ser acentuadamente prejudicada em indivíduos com alterações metabólicas, provocando alterações nas membranas celulares. Entre os benefícios à saúde proporcionados por estes AGs, estão a prevenção e o combate a doenças coronarianas, cerebrais, inflamatórias e alguns tipos de câncer (Pigott e Tucker 1990; Hasselmann e Kummerlen 1998; Kris-Etherton et al. 2002; Osborn e Akoh 2002; Soccol e Oetterer 2003).

A aplicação de catalisadores químicos para a síntese de LE é bastante estudada. Trata-se de um processo bastante atrativo, principalmente devido ao baixo custo e à eficácia do catalisador em baixas concentrações (geralmente de 0,1 a 0,5% em massa dos substratos) (Marangoni e Rousseau 1995; Klinkesorn et al. 2004). Os catalisadores utilizados na interesterificação química podem ser o sódio metálico, potássio metálico e suas ligas, metoxilato ou etoxilato de sódio ou de potássio (Carvalho et al. 2003).

A catálise química, entretanto, não ocorre em meio ácido (Christie 1982), exigindo a busca de alternativas para superar o problema da presença do ácido graxo na forma livre

no meio reacional. A solução é a conversão do AGL a alquil-éster, como o éster metílico (Klinkesorn et al. 2004), ou a utilização de TAG como doador acila (D'Agostini 2001; Rodrigues 2002; Rodrigues e Gioielli 2003). Além disso, a distribuição dos ácidos graxos nas moléculas ocorre de forma aleatória, não permitindo o controle da estrutura do produto obtido (Akoh 1995; Willis et al. 1998; Carvalho et al. 2003).

A transformação de óleos e gorduras mediada por lipases tem sido uma área amplamente estudada em biocatálise, devido à versatilidade catalítica apresentada por estas enzimas. As lipases são hidrolases que apresentam a função de hidrólise de TAGs, podendo também promover a síntese de moléculas, desde que o meio proporcione condições favoráveis, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de água (Macrae 1983; Castro et al. 2004).

A aplicação de lipases para catalisar as reações de interesterificação tem a vantagem da especificidade apresentada por muitas destas enzimas, o que permite flexibilidade na manipulação da estrutura dos lipídios, com a pré-definição da posição dos AGs no esqueleto do glicerol, o que não é possível na interesterificação química (Akoh 1995; Marangoni e Rousseau 1995; Castro et al. 2004).

As lipases *sn*-1,3-específicas, como a Lipozyme RM IM[®] (Novozymes), têm sido muito empregadas em reações de interesterificação, principalmente na faixa de 5 a 10% em massa dos substratos. Estas lipases podem promover a incorporação, por exemplo, de ácido cáprico (C10:0, na forma livre ou esterificada) às posições terminais de um óleo ou gordura que contenha ácidos graxos de interesse nutricional – como o EPA e o DHA – na posição central. Para se obter tal estrutura, a qual apresenta vantagens metabólicas, estes substratos são aplicados principalmente na proporção molar de 2:1 (doador acila:triacilgliceróis do óleo ou gordura) (Jennings e Akoh 1999; Jennings e Akoh 2001).

Para a síntese de LE, costuma-se observar a aplicação de temperaturas compreendidas entre 55 e 65°C, em um sistema de reação sob vácuo. Os tempos de reação são bastante variáveis, sendo que o equilíbrio pode ser atingido em poucos minutos no caso da catálise química (Jennings e Akoh 1999; Jennings e Akoh 2001; Díaz Gamboa e Gioielli 2003b; Moura et al. 2005).

Tendo em vista estas considerações, este trabalho verifica a possibilidade de obtenção de LE de interesse nutricional, contendo EPA, DHA e AGCMs. Tem caráter exploratório, de forma a avaliar o efeito da síntese tanto química (utilizando-se o catalisador NaOCH₃) quanto enzimática (utilizando-se lipase comercial imobilizada *sn*-1,3-específica) sobre a composição em AGs dos TAGs dos produtos obtidos. Na interesterificação, utilizou-

se óleo de peixe e foram testados diferentes doadores acila (éster metílico do ácido cáprico/MeC₁₀ e triglicerídios de cadeia média/TCM). Foram realizadas análises das misturas originais e interesterificadas por calorimetria de varredura diferencial (DSC) para a verificação das diferenças no comportamento térmico, promovidas pelas reações.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL

O ácido cáprico, na forma livre, foi obtido da Sigma. O óleo de peixe ROPUFA n-3 '30' Food Oil[®] foi cedido pela Roche Brasil. Os triglicerídios de cadeia média (Trigliceril CM[®]) foram cedidos pela Support Produtos Alimentícios Ltda e estão indicados nas próximas seções como TCM.

Para a reação enzimática, utilizou-se a lipase imobilizada *sn*-1,3-específica Lipozyme[®] RM IM (gentilmente fornecida pela Novozymes Brasil).

Todos reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2 OBTENÇÃO DO METÓXIDO DE SÓDIO

Utilizou-se NaOCH₃ como catalisador para as reações de interesterificação química (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a), obtido conforme descrito em 3.1.2.

4.2.3 SÍNTESE DO ÉSTER METÍLICO DE ÁCIDO CÁPRICO

O MeC₁₀ foi sintetizado, em triplicata, mediante a esterificação do ácido cáprico (C10:0 na forma livre), baseado em metodologia descrita na literatura (Klinkesorn et al. 2004). O MeC₁₀ foi armazenado a -20°C sob atmosfera de nitrogênio até a utilização.

Retirou-se uma alíquota de 50µL do MeC₁₀ obtido a cada experimento, para a confirmação de sua pureza por CG. As técnicas utilizadas estão descritas no item 3.1.3.

A análise por CG (cromatograma apresentado na Figura 12 dos Anexos) e o estado físico do MeC₁₀ (líquido, inclusive sob refrigeração) confirmaram sua pureza.

4.2.4 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS PARA AS REAÇÕES

Realizou-se a mistura dos substratos nas proporções seguintes: ROPUFA[®]:MeC₁₀ (1:2, em mol) e ROPUFA[®]:TCM (1:1, em massa). As misturas foram mantidas em frasco

âmbar a -20°C , sob atmosfera de nitrogênio, até o momento do uso. Antes da reação, traços de umidade foram removidos das misturas em evaporador rotativo a vácuo a $90-95^{\circ}\text{C}$ durante 1h.

Para as reações a seguir, a temperatura de trabalho (60°C) foi escolhida de forma a garantir a dissolução homogênea dos substratos e a manutenção da atividade da lipase.

4.2.5 INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

Para a reação de interesterificação química, foi utilizada metodologia descrita na literatura (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a). Adicionou-se NaOCH_3 na proporção de 0,4% (m/m) dos reagentes. Após 1 hora sob agitação a 60°C e 56mmHg, a reação foi interrompida através da adição de 0,5mL de solução aquosa 4% (m/v) de ácido cítrico (Klinkesorn et al. 2004). O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, e mantido a -20°C até o momento das análises.

4.2.6 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a interesterificação enzimática, foi utilizada metodologia descrita na literatura (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a). Adicionou-se 5% (m/m dos reagentes) da lipase Lipozyme RM IM[®]. Após 6 horas sob agitação a 60°C e 56mmHg, a reação foi interrompida através da centrifugação (3.000rpm por 15 minutos) e filtração a vácuo da enzima remanescente no líquido sobrenadante. O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, a -20°C .

4.2.7 COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS

Foram realizadas análises de caracterização dos óleos, que incluíram composição em AGs, obtida por cromatografia gasosa (CG); índice de iodo (I.I.); perfil lipídico (por cromatografia em camada delgada, CCD); índice de acidez (I.A.); índice de peróxido (I.P.); comportamento térmico por DSC. As análises realizadas em cada óleo estão apresentadas nos próximos itens.

4.2.8 PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico foi verificado por CCD: as amostras foram aplicadas em cromatofolhas de alumínio com 20cm de comprimento, contendo sílica gel 60G e revelador de fluorescência (Macherey-Nagel, Alemanha). O sistema de solventes utilizado para a

separação das frações lipídicas da amostra foi hexano/éter etílico/ácido fórmico nas proporções, em volume, 80:20:2 (Christie 1982), no qual as amostras foram eluídas duas vezes. As bandas foram visualizadas a 254nm (Christie 1982).

Este sistema de solventes permite a separação das frações lipídicas na seguinte ordem de eluição (a partir da frente do solvente): alquil-ésteres, ésteres de colesterol; TAGs; AGLs; colesterol; 1,3-DAGs; 1,2-DAGs; MAGs; e lipídios complexos (Christie 1982).

4.2.9 *ÍNDICE DE ACIDEZ*

A determinação de AGLs foi realizada em duplicata, em todas amostras, segundo descrito na literatura (Aro et al. 2000), com as modificações descritas no item 3.3.2, utilizando-se solução etanólica de KOH 0,01M para a titulação. Os resultados de I.A. foram expressos como porcentagem de ácido oléico.

4.2.10 *ÍNDICE DE PERÓXIDO*

O I.P. foi determinado, em duplicata, na amostra do ROPUFA[®], segundo o método AOCS Cd 853 (AOCS 1990), descrito no item 3.3.3. A concentração de peróxidos foi expressa como meq de O₂/kg de óleo.

4.2.11 *ISOLAMENTO DOS TAGS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA*

Após as reações de interesterificação, as amostras de óleo, dissolvidas em hexano (500mg de óleo/mL de solvente), foram aplicadas em placas de CCD para isolamento dos TAGs, conforme descrito no item 4.2.8. Os TAGs isolados foram recuperados conforme descrito no item 3.3.4, e preparados conforme descrito no item 4.2.12, para a determinação da composição em AGs (Christie 1982).

4.2.12 *PREPARO DOS ÉSTERES METÍLICOS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA*

Os ésteres metílicos dos AGs para análise por CG foram obtidos conforme descrito na literatura (Hartman e Lago 1973) e detalhado no item 3.3.5. Adicionou-se hexano como solvente para a realização das análises. As soluções foram armazenadas a -20°C para utilização posterior.

4.2.13 *COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS*

O perfil de AGs foi determinado por CG, mediante a injeção dos ésteres metílicos dos AGs, dissolvidos em hexano. As condições da análise estão indicadas no item 3.3.6. A composição quantitativa foi expressa como porcentagem em massa. Esta determinação foi feita no TCM, no ROPUFA[®] e nos TAGs dos óleos interesterificados.

4.2.14 *ÍNDICE DE IODO CALCULADO*

O I.I. foi obtido por cálculo, a partir da composição em AGs das amostras (óleo de peixe ROPUFA[®] e TAGs dos óleos interesterificados), com base na fórmula expandida do Método Cd 1c-85 da American Oil Chemists' Society (AOCS 1997).

4.2.15 *CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL*

Os equipamentos utilizados para a análise foram calorímetro de varredura diferencial ("Differential Scanning Calorimeter") tipo "power compensation" modelo Delta Series DSC 7 (PERKIN ELMER), "Thermal Analysis Controller" modelo TAC 7/DX (PERKIN ELMER) e resfriador. A análise foi realizada segundo Método AOCS Cj 1-94 (AOCS 1997), conforme descrito no item 3.3.8. Esta análise foi realizada nas misturas dos óleos antes e depois da interesterificação.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O I.A. encontrado para o óleo de peixe ROPUFA[®] foi de 0,44% (em ácido oleico), condizente com as especificações do fornecedor. O resultado para I.P. está apresentado na Tabela 5, na qual também é indicado o limite das legislações vigentes. O I.P. encontrado atende os padrões das regulamentações nacionais e internacionais (FAO-WHO 1981, revisão 1999; FDA 1995, revisão 2003; Brasil 2005).

Na Tabela 6, está apresentada a composição em ácidos graxos das amostras originais e dos TAGs dos óleos interesterificados, determinadas por CG (cromatogramas apresentados nas Figuras 13 a 16 dos Anexos). No óleo de peixe ROPUFA[®] original, a concentração em AGs da família n-3 está de acordo com aquela declarada pelo fornecedor, a saber, 31,92% de EPA, DHA e ácido docosapentaenóico (DPA, C22:5n-3). Verifica-se também que o óleo original não apresentou AGCMs em sua composição, fato já esperado, segundo registros da bibliografia (Pigott e Tucker 1990; Jennings e Akoh 1999), o que o torna um substrato em potencial para a síntese de LE contendo AGs n-3 e AGCM.

Tabela 5 Índice de peróxido (meq O₂/kg de óleo) do óleo de peixe ROPUFA® e limites máximos estipulados pela legislação

Parâmetro de qualidade	ROPUFA®	Codex Alimentarius ⁽¹⁾	FDA ⁽²⁾	Brasil ⁽³⁾
I.P. (meq O ₂ /kg de óleo)	1,46	10	5	10

- (1) Padrão para óleos refinados (FAO-WHO 1981, revisão 1999);
 (2) Padrão para óleo extraído de arenque (FDA 1995, revisão 2003);
 (3) Padrão para óleos e gorduras vegetais refinados (Brasil 2005) – não há valor máximo estabelecido para índice de peróxido de óleos marinhos.

Conforme resultados apresentados na Tabela 6, verificou-se a presença de AGCMs nos TAGs em todas amostras de óleo de peixe interesterificado. Esta constatação indica a troca de radicais acila entre os substratos durante a interesterificação, o que leva a uma modificação na composição em AGs e na estrutura dos TAGs dos óleos após a reação (Reyes e Hill 1994; Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002; Xu 2004).

Os teores de AGCM nos óleos sofreram influência das condições da reação e proporcionaram a obtenção de óleos com uma mistura de ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia alquila.

Especificamente na mistura do óleo de peixe com o MeC₁₀, o teor de AGs saturados sofreu um ligeiro aumento após a reação enzimática, e o teor de EPA e DHA não apresentou mudanças significativas em relação ao óleo de peixe de partida. A proporção relativa nesta amostra foi de 9,74% de AGCM, 11,85% de EPA e 17,52% de DHA.

No presente estudo, como se observa na Tabela 6, tanto o óleo original quanto os óleos interesterificados, em todos experimentos realizados, apresentaram um teor de DHA maior que o de EPA, o que resultou em uma fração EPA/DHA menor do que 1, e as amostras caracterizaram-se como fonte de AGs n-3 (alta proporção n3:n6). O I.I. encontrado para o óleo de peixe original (187g de iodo/100g de óleo) era esperado para a amostra em questão, a qual apresenta um alto grau de insaturação, fato característico para óleos provenientes de peixe, como ocorre, por exemplo, para óleo de fígado de tubarão (Pacheco e Barrera-Arellano 1994) e de arenque (Wanasundara e Shahidi 1998). A incorporação de AGCMs ao óleo de peixe provocou uma redução no I.I. dos óleos interesterificados, mais acentuada no caso da aplicação do TCM como substrato, comportamento já observado anteriormente na literatura (Nassu 1994).

A análise da composição em AGs das amostras também indica que, independente do substrato, a interesterificação enzimática resultou em LEs com maior teor em AGCMs do que aqueles obtidos via química, embora a proporção relativa de EPA e DHA tenha se mantido praticamente inalterada quando se aplicou a lipase. Estes resultados confirmam informações da literatura sobre a maior especificidade apresentada pelas lipases frente a AGCMs, quando comparadas a AGCL, como os da série n-3 (Akoh 1995; Kubow 1996; Bell e Bradley 1997; Osborn e Akoh 2002).

Quanto às amostras resultantes da transesterificação do TCM com o ROPUFA[®], a constatação de AGCM nos TAGs do produto não é garantia da troca de radicais acila entre os substratos. Os TCM são compostos por estes AGs e a reação promove a modificação das posições dos AGs nas moléculas, e não de sua composição. Frente a este conhecimento, análises estruturais ou físicas poderiam confirmar a eficácia da reação, conforme estudos já realizados na literatura (D'Agostini e Gioielli 2002).

Em relação ao óleo interesterificado obtido da reação tanto química quanto enzimática entre o MeC₁₀ e o ROPUFA[®], foram detectados AGCM em sua composição, comprovando sua incorporação ao óleo original. A eficácia da utilização de ésteres metílicos como substrato em reação de interesterificação química já foi verificada em estudo que visou ao enriquecimento de óleo de atum com AGs n-3 EPA e DHA, incorporados sob a forma de ésteres metílicos (Klinkesorn et al. 2004).

Dados da literatura (Moura et al. 2005) também apontaram a eficácia da incorporação de ésteres (etílicos) de AGCL, provenientes de óleo de peixe, a TCM (1:2,5 em mol), utilizando-se uma lipase *sn*-1,3-específica (5% em massa dos substratos), sem condicionamento prévio. No estudo citado, após 30 horas de reação a 60°C, com agitação de 1000rpm sob vácuo, houve incorporação máxima (66,66%) de ésteres aos TAGs, obtendo-se LE específico de interesse nutricional. Neste caso, os AGCL foram incorporados às posições terminais das moléculas.

Em outro estudo, verificou-se a incorporação média de 28,8% (molar) de C10:0, na forma livre, às posições terminais dos TAGs de óleo de savelha (National Marine Fisheries Service, EUA) (2:1, em mol), após 24 horas de reação a 55°C e 200rpm, utilizando-se a lipase imobilizada *sn*-1,3-específica IM60[®] (10%, m/m dos reagentes) (Jennings e Akoh 2001).

Tabela 6 Composição em ácidos graxos (% em massa), teores de ácidos graxos saturados e insaturados (%), relação EPA/DHA e n3:n6, e índice de iodo (g de iodo/100g) das amostras

Ácido graxo	ROPUFA®	TCM	TCM + ROPUFA®		MeC ₁₀ + ROPUFA®	
			Após I.Q.*	Após I.E.*	Após I.Q.	Após I.E.
C6:0	-	1,23	-	-	-	-
C8:0	-	63,13	14,04	18,68	0,10	0,70
C10:0 (Cáprico)	-	34,99	10,35	11,22	4,44	9,04
C12:0	-	0,61	-	-	-	-
C14:0	6,49	-	5,56	4,75	6,22	6,05
C14:1	0,30	-	-	-	-	-
C15:0	1,05	-	-	-	0,68	0,66
C16:0	19,58	-	19,42	15,50	18,98	17,44
C16:1	5,97	-	4,39	3,59	6,75	6,52
C17:0	0,72	-	-	-	0,55	0,61
C17:1	0,54	-	-	-	-	-
C18:0	3,65	-	3,42	2,80	3,66	3,26
C18:1n9t	2,36	-	-	-	-	-
C18:1n9c	17,38	-	19,38	15,83	20,01	18,03
C18:2n6c	2,99	-	2,51	2,15	3,39	0,12
C20:0	0,62	-	-	-	1,91	0,40
C18:3n6	0,25	-	-	-	-	-
C18:4n3	1,94	-	-	-	-	-
C20:1	1,10	-	-	-	1,86	1,95
C18:3n3	1,26	-	-	-	1,78	2,11
C20:2	0,39	-	-	-	0,45	0,39
C22:0	0,27	-	-	-	-	0,18
C20:3n6	-	-	-	-	1,51	1,21
C20:3n3	-	-	-	-	0,78	0,71
C22:2	0,24	-	-	-	-	-
C20:4n6	0,97	-	-	-	-	0,74
C20:5n3 (EPA)	11,17	-	7,51	12,33	11,06	11,85
C22:5n3	1,07	-	-	-	0,68	0,53
C22:6n3 (DHA)	19,68	-	13,42	13,17	15,19	17,52
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Saturados	32,38	100,00	52,79	52,95	36,54	38,34
Monoinsaturados	27,65	-	23,77	19,42	28,62	26,50
Poliinsaturados	39,96	-	23,44	27,65	34,84	35,18
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
EPA+DHA	30,85	-	20,93	25,50	26,25	29,37
EPA/DHA	0,57	-	0,56	0,94	0,73	0,68
n3:n6	8,34	-	8,34	11,86	6,02	15,81
Índice de iodo	187	-	120	134	157	166

* Após I.Q. = Após interesterificação química. Após I.E. = Após interesterificação enzimática.

Já em outra pesquisa realizada pelos mesmos autores, foi avaliada a incorporação de C10:0 aos TAGs de outra amostra de óleo de peixe (Pronova Biocare, Noruega), nas mesmas condições descritas acima. Obteve-se a incorporação média de 43% (molar) de C10:0 aos TAGs no caso da reação com hexano, e de 31,8% (molar) na reação sem solvente. No estudo conduzido pelos autores, observou-se predominância de EPA e DHA na posição central dos TAGs, confirmando a síntese de LE, embora tenha sido detectada certa migração acila durante o processo (Jennings e Akoh 1999).

Trabalhos de 2003 indicaram a possibilidade de obtenção de LE contendo AGCM, EPA e DHA a partir de misturas binárias de óleo de pescado comercial e gordura de palmiste (rica em ácido láurico). A interesterificação destes substratos durante 1 hora a 60°C com agitação e pressão reduzida, na presença de metóxido de sódio (0,4%, em massa), promove a obtenção de um produto com comportamento físico plástico e teor de 5,0 a 23,4% de AGPIs n-3 (Díaz Gamboa e Gioielli 2003a).

Em outro trabalho, os mesmos autores (Díaz Gamboa e Gioielli 2003b) observaram que tanto a mistura física, quanto a interesterificação química ou enzimática (6h a 65°C e lipase de *Rhizomucor miehei* na proporção de 5% em massa dos substratos) permitem a obtenção de um produto com comportamento físico plástico. Observaram que o conteúdo de gordura sólida dos produtos não diferiu significativamente para os produtos obtidos pelas diferentes tecnologias.

Foi monitorado o I.A. das amostras antes e depois da interesterificação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Índice de acidez (% em ácido oléico) das amostras de óleo antes e depois das interesterificações química e enzimática

TCM + ROPUFA®	I.A. (% em ácido oléico)*	MeC ₁₀ + ROPUFA®	I.A. (% em ácido oléico)*
Antes da interesterificação	0,3745 ± 0,0235 ^a	Antes da interesterificação	29,1375 ± 0,1505 ^a
Após a interesterificação química	0,5330 ± 0,1200 ^a	Após a interesterificação química	39,5120 ± 0,1620 ^b
Após a interesterificação enzimática	4,6545 ± 0,0315 ^b	Após a interesterificação enzimática	37,5530 ± 1,4530 ^b

* Média de duas determinações ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam amostras sem diferença estatística significativa entre si ($\alpha = 5\%$), verificadas segundo teste de Tukey.

No caso da mistura do Trigliceril CM[®] com o ROPUFA[®], não foi observada diferença estatística, em um nível de significância de 5%, entre as amostras antes e após a interesterificação química. Já a mistura interesterificada enzimaticamente apresentou I.A. maior do que as demais amostras. No caso do éster metílico com o ROPUFA[®], a simples mistura dos substratos apresentou I.A. inferior aos produtos da interesterificação tanto química quanto enzimática. Estes, por sua vez, não apresentaram diferença estatística significativa entre si ($\alpha=5\%$).

O aumento no I.A. de algumas amostras após as reações pode indicar que parte dos AGLs liberados durante a interesterificação não foram reesterificados para a formação dos LEs (Reyes e Hill 1994; Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002; Xu 2004).

Os valores extremamente altos para a acidez das misturas entre o MeC₁₀ e o óleo de peixe não eram esperados, já que a síntese do éster havia sido confirmada. Uma verificação realizada paralelamente indicou que a mistura de ácido cáprico na forma livre com o óleo ROPUFA[®] leva a uma acidez mais elevada, em média de 57% em ácido oléico (ensaio em triplicata).

Apesar da acidez alta destas amostras, as condições da reação favoreceram a ocorrência de interesterificação entre os substratos: utilizou-se um excesso de catalisador (0,4% em massa de NaOCH₃, em relação aos reagentes, ao invés das proporções de 0,1-0,2%, geralmente recomendadas), e o fato de o meio ser extremamente apolar e não ter sido utilizado solvente permitiu a redução da troca de íons hidrogênio provenientes dos AGLs presentes no meio, minimizando a dissociação do catalisador. O refino prévio dos substratos poderia aumentar o rendimento da reação de interesterificação.

Sabe-se que a composição e a estrutura dos TAGs são fatores que afetam o perfil de fusão de óleos e gorduras (Rousseau et al. 1996a; Nassu e Gonçalves 1999; Grimaldi et al. 2001), sendo que a análise das amostras por DSC indicou as mudanças promovidas pela interesterificação. Os termogramas de fusão das amostras, correlacionando temperatura e fluxo de calor normalizado (W/g), estão indicados nas Figuras 9 e 10.

Os termogramas indicam que as reações de interesterificação tanto química quanto enzimática promoveram mudanças notáveis no perfil de fusão, quando comparadas com a simples mistura física dos substratos, fato já constatado em outros estudos (Rousseau e Marangoni 2002). As amostras, quando apresentadas sob a forma de uma simples mistura, mostraram-se líquidas durante a análise, passando a apresentar picos endotérmicos após a interesterificação, caracterizando uma mudança na composição dos TAGs devido à reação,

já que AGCMs foram incorporados aos TAGs que originalmente apresentavam principalmente AGs insaturados. Este comportamento foi observado quando se utilizou como substrato tanto o éster metílico quanto o TCM.

O perfil das curvas de fusão das misturas interesterificadas dos óleos Trigliceril CM[®] e ROPUFA[®] (Figura 9) foram bastante similares, tendo apresentado somente um pico com formato e tamanho similares, sugerindo pouca diferença entre os TAGs obtidos tanto pela reação química quanto enzimática destes substratos.

A análise dos termogramas indica que a interesterificação do óleo de peixe com o MeC₁₀ (Figura 10) provocou um deslocamento das temperaturas de fusão para valores maiores do que no caso da interesterificação com o Trigliceril CM[®] (Figura 9). Além disso, o MeC₁₀ também provocou uma maior complexidade na composição dos LEs e provavelmente a formação de TAGs que não se intersolubilizam (Nassu 1994; Rousseau et al. 1996a; Nassu e Gonçalves 1999), denotado pela maior faixa de fusão do produto da interesterificação química deste substrato com o óleo de peixe ROPUFA[®] (com a presença de dois picos), quando em comparação às demais amostras.

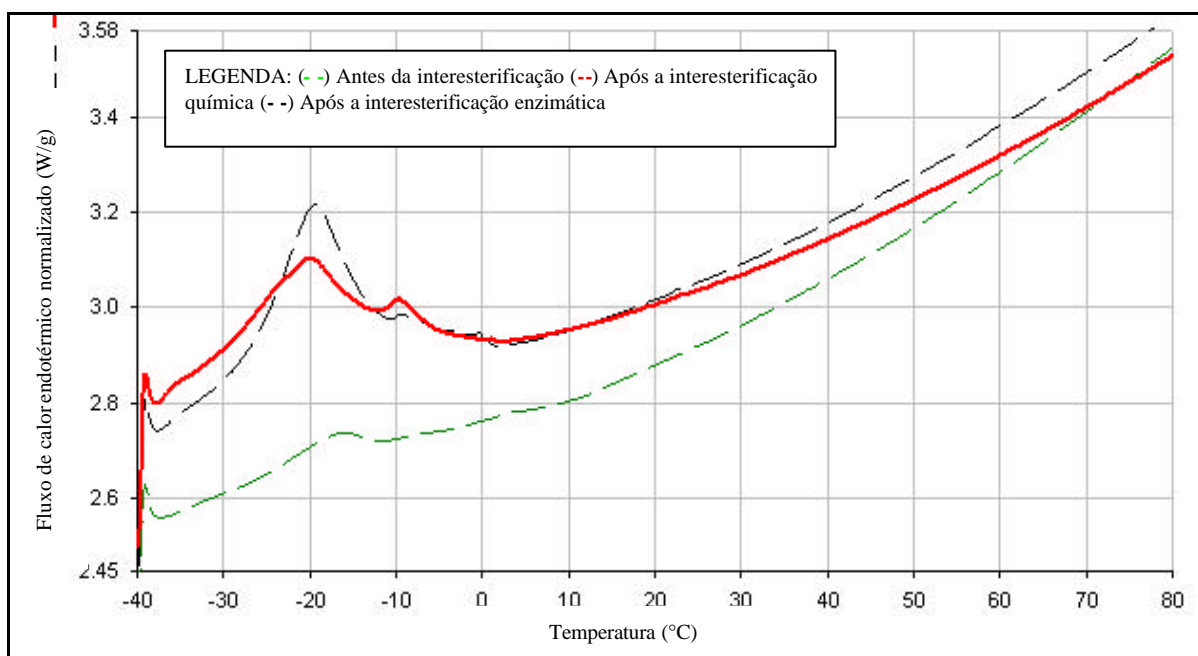


Figura 9 Curvas de fusão obtidas por DSC da mistura Trigliceril CM[®] e óleo de peixe ROPUFA[®].

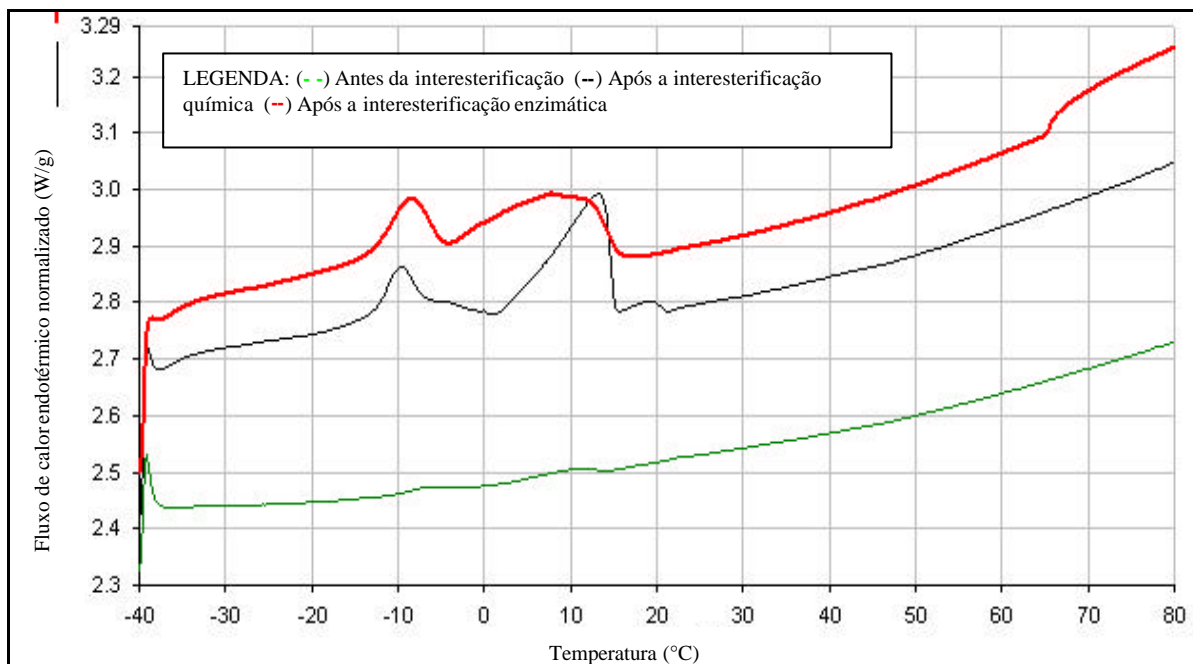


Figura 10 Curvas de fusão obtidas por DSC da mistura do éster metílico do ácido cáprico com o óleo de peixe ROPUFA®.

Apesar de o MeC₁₀ ser líquido à temperatura ambiente, seu ácido apresenta um ponto de fusão maior, o que implica em TAGs com maior de ponto de fusão. Além disso, o ponto de fusão do ácido cáprico é maior do que o do ácido caprílico, que por sua vez é o principal constituinte do TCM (Bailey 1979; ISEO 2006), o que explica o deslocamento das curvas de fusão para a direita no primeiro caso.

A partir dos termogramas de fusão das amostras, foram obtidas as temperaturas características das amostras, apresentadas na Tabela 8. As temperaturas negativas de fusão das amostras estão relacionadas à presença de AGs insaturados, característicos de óleos marinhos, conforme já se observou em outro estudo com óleo de salmão (Sathivel 2005).

Apesar de não ter havido diferenças perceptíveis a olho nu entre o estado físico das amostras antes e depois da interesterificação, os dados obtidos dos termogramas indicam que, em todos casos, as amostras interesterificadas apresentaram uma faixa de fusão maior do que suas simples misturas. Isto caracteriza um rearranjo dos TAGs após a reação,

levando a uma composição em AGs mais complexa das amostras interesterificadas, fato geralmente relatado na literatura (Rousseau et al. 1996a; Grimaldi et al. 1998).

Tabela 8 Dados obtidos das curvas de fusão das amostras analisadas por DSC

Dados	Pico	Trigliceril CM [®] + Óleo de peixe ROPUFA [®]			MeC ₁₀ + Óleo de peixe ROPUFA [®]		
		Antes	Após I.Q.	Após I.E.	Antes	Após I.Q.	Após I.E.
Temperatura de pico (°C)	1	-17,3	-19,5	-20,3	-	-9,7	7,7
	2	-	-	-	-	13,3	-
Temperatura "onset" (°C)	1	-25,7	-37,1	-37,5	-	-13,1	-15,6
	2	-	-	-	-	1,3	-
Temperatura inicial de fusão (°C)	1	-27,0	-37,1	-37,7	-	-19,5	-15,6
	2	-	-	-	-	1,3	-
Temperatura final de fusão (°C)	1	-9,4	2,1	2,1	13,5	0,8	16,1
	2	-	-	-	-	20,8	-
Entalpia de fusão (J/g)	1	5,1	65,1	52,4	~0	7,9	26,6
	2	-	-	-	-	17,8	-
Entalpia total de fusão (J/g)	-	5,1	65,1	52,4	~0	25,7	26,6
Índice de iodo (g de iodo/100g de gordura)*	-	-	120	134	-	157	166

* Informações transcritas da Tabela 6, para fins de comparação.

A entalpia de fusão é a energia necessária para a fusão completa da amostra (Nassu 1994; Grimaldi et al. 1998). De maneira geral, a entalpia de fusão das amostras aumentou à medida que o I.I. diminuiu (valores já apresentados na Tabela 6 e transcritos para a Tabela 8, para facilitar a comparação), o qual está relacionado a um maior grau de saturação do óleo, fato já verificado na literatura para outros substratos (Nassu 1994). Esta observação foi evidente no caso dos produtos da interesterificação química e enzimática do Trigliceril CM[®] com o óleo de peixe ROPUFA[®], embora a composição variada em AGs dos TAGs das amostras provoque pequenos desvios desta regra.

A partir dos termogramas apresentados nas Figuras 9 e 10 e dos dados presentes na Tabela 8, pode-se concluir que as diferenças observadas entre as amostras devem-se às variações nos tratamentos aplicados, no que diz respeito tanto ao substrato quanto ao tipo de catalisador.

4.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificou-se a possibilidade de síntese de LE tanto por catálise química quanto enzimática, sendo que a composição dos óleos de partida e as condições da interesterificação foram determinantes para a composição do produto final.

Em todas estratégias adotadas na presente pesquisa, a análise dos óleos interesterificados, por CG, indicou que foram obtidos TAGs de interesse nutricional, contendo AGCM, EPA e DHA.

O maior controle que as lipases regioespecíficas permitem sobre a composição do produto da reação coloca estas enzimas em posição de destaque para catalisar as reações de interesterificação, de maneira a fornecer produtos com funcionalidade otimizada no que diz respeito principalmente às atividades metabólicas e também quanto às propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras obtidos.

Esta pesquisa indicou a possibilidade da utilização tanto de MeC₁₀ quanto de um óleo rico em AGCM (Trigliceril CM[®]) como doador acila nas reações de interesterificação. Entretanto, a utilização do Trigliceril CM[®] mostrou-se mais prática devido à sua disponibilidade comercial – sem necessidade de síntese, como no caso do MeC₁₀ utilizado nos experimentos – e sua facilidade de aplicação na mistura (proporção em massa em relação ao óleo de peixe). Deve-se considerar ainda que a aplicação deste substrato não exigirá etapas posteriores de purificação do meio reacional para o isolamento dos triglicerídios estruturados de interesse.

Neste estudo, verificou-se que a técnica de DSC pode ser uma ferramenta para a detecção de modificações promovidas pelo processo de interesterificação. Esta análise permitiu a visualização das diferenças ocorridas nas amostras após as reações, decorrentes tanto do substrato utilizado quanto do tipo de catalisador.

4.5 AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida. À Novozymes Brasil, Roche Brasil e Support Produtos Alimentícios Ltda. pelas doações. À Profa. Dra. Jane M. Block (UFSC, Florianópolis, SC), ao Prof. Dr. Renato Grimaldi (UNICAMP, Campinas, SP), ao Prof. Francisco C. Deschamps (Estação Experimental da EPAGRI/UNIVALI, Itajaí, SC) e ao Prof. Luiz A. Gioielli (USP, São Paulo, SP), pelas sugestões, discussão dos resultados e auxílio nas técnicas utilizadas neste trabalho.

5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE RESÍDUOS DE SARDINHA (SARDINELLA BRASILIENSIS) PARA UTILIZAÇÃO COMO SUBSTRATO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE TRIGLICERÍDIOS ESTRUTURADOS: ESTUDOS PRELIMINARES

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos, sob a forma de artigo, os resultados experimentais, a discussão e conclusões do trabalho intitulado “Extração de óleo de resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) para utilização como substrato na síntese enzimática de triglicerídios estruturados: estudos preliminares”.

Nesta pesquisa, realizou-se a extração e caracterização de óleo de resíduos de sardinha. Avaliou-se a possibilidade de utilização deste óleo como substrato em reação de transesterificação enzimática, visando a obtenção de triglicerídios estruturados ricos nos ácidos graxos n-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) e em ácidos graxos de cadeia média. O produto da reação foi analisado qualitativamente por cromatografia em camada delgada e sua composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa.

RESUMO

Os AGs n-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), importantes no combate e prevenção de várias doenças, são encontrados em alimentos marinhos. Lipídios com adequado balanço em AGs podem ser obtidos mediante a incorporação de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) a óleo de peixe, cujo produto é conhecido como lipídio estruturado (LE). O objetivo deste trabalho foi a verificação da possibilidade de utilização de óleo extraído de resíduos de sardinha como substrato na interesterificação enzimática com triglicerídios de cadeia média (reação conhecida como transesterificação), visando a síntese de triglicerídios estruturados ricos em EPA e DHA. As análises físico-químicas da matéria-prima indicaram umidade média de 71,30% e teores médios, em base úmida, de 4,24% de lipídios totais (determinado por Soxhlet) e 13,67% de proteínas. Para a obtenção de substrato para a reação, realizou-se a extração a frio do óleo dos resíduos de peixe, utilizando o sistema ternário de solventes clorofórmio, metanol e água, o que permitiu um rendimento de 5,43% (b.u.). O perfil lipídico do óleo bruto indicou a predominância de TAGs em sua composição, além da presença de frações polares no produto. O óleo bruto da sardinha apresentou índice de peróxido de 7,97 mEq O₂ kg⁻¹ de gordura e um índice de acidez extremamente alto (20,77% em ácido oléico). Quanto ao perfil de AGs, o óleo original apresentou 49,4% de saturados, sem terem sido detectados AGCM, e 28,6% de EPA e de DHA. Após a transesterificação, o teor de saturados aumentou para 71,4%; os valores observados no produto foram de 38,7% de AGCM e 17,5% da somatória de EPA e DHA. O índice de iodo, em g iodo/100g de gordura, passou de 152,6 no óleo original para 88,1 após a reação enzimática. Foram observadas diferenças no perfil lipídico das amostras, analisadas por cromatografia em camada delgada, antes e depois da interesterificação, o que indica mudanças na composição do óleo após a reação. Este estudo indica que os resíduos de sardinha constituem-se em um substrato em potencial para a obtenção de óleo rico em AGs n-3, o qual poderá ser utilizado para a síntese de triglicerídios estruturados.

5.1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (AGPI) da série n-3 docosahexaenóico (DHA, C22:6) e eicosapentaenóico (EPA, C20:5) têm grande importância na dieta. O consumo destes AGPIs está relacionado a um reduzido risco de mortalidade por doenças cardiovasculares e apresentam efeitos benéficos também sobre distúrbios cerebrais e câncer, além de fazerem parte da composição do cérebro e do sistema visual

(FAO-WHO 1981, revisão 1999; Pigott e Tucker 1990; Kris-Etherton et al. 2002; Soccol e Oetterer 2003).

O organismo humano realiza com pouca eficiência a conversão do ácido α -linolênico, obtido principalmente de óleo de soja e de canola, a EPA e DHA (Pigott e Tucker 1990; BNF 2000; Kris-Etherton et al. 2002). Portanto, para promover o efeito fisiológico desejado, a dieta deve fornecer quantidades suficientes destes AGs n-3 (Sgarbieri e Pacheco 1999), cuja ingestão recomendada é de 1 a 3g por semana. Desta maneira, é fundamental recorrer a fontes dietéticas, principalmente ao consumo de alimentos marinhos, em especial de peixes como salmão, arenque e sardinha (Pigott e Tucker 1990; Kris-Etherton et al. 2002; Soccol e Oetterer 2003).

A projeção da indústria pesqueira mundial para 2010 é da disponibilidade de 107 a cento e quarenta e quatro milhões de toneladas de peixes, dos quais setenta e quatro a cento e quatorze milhões devem ser destinados para consumo humano, principalmente para a produção de carne de peixe e de óleo (FAO-WHO 1981, revisão 1999). Em 2004, a produção brasileira de pescado atingiu um volume de mais de um milhão de toneladas, das quais metade foram devidas à produção da pesca extrativa marinha, cujo maior produtor foi o Estado de Santa Catarina (IBAMA 2005).

O processamento de pescados gera aproximadamente 50% de resíduos, compostos majoritariamente por cabeça, vísceras, nadadeira caudal, coluna vertebral, embora haja variações entre as espécies e conforme o processamento a que os peixes foram submetidos. Devido ao expressivo volume gerado de resíduos, é fundamental que as indústrias avaliem alternativas de aproveitamento para se enquadrarem nas propostas de emissão zero de resíduos (*ZERI*, "Zero Emission Research Initiative"), sustentabilidade e responsabilidade sócio-ambiental. Os resíduos de pescado costumam ser destinados principalmente para alimentação animal, já que apresentam um elevado conteúdo protéico, caso da sardinha (Lee 1963; FAO-WHO 1981, revisão 1999; Morales-Ulloa e Oetterer 1995; Seibel e Souza-Soares 2003; Arruda 2004).

A *Sardinella brasiliensis*, também conhecida como sardinha-verdadeira ou Maromba, pertencente à família *Clupeidae*, é um dos peixes de maior consumo no Brasil. É uma espécie pelágica, costeira, tropical, planctófaga, alimentando-se de copépodos e algas diatomáceas, e é classificada como um peixe oleoso. É o mais tradicional recurso pesqueiro da Região Sudeste-Sul do Brasil, sendo a cadeia produtiva do setor que mais emprega mão-de-obra (IBAMA 2005; MAA 2005).

A produção total nacional de sardinha-verdadeira em 2004 foi de mais de cinquenta e três mil toneladas, das quais 53,49% foram devidas ao Estado de Santa Catarina, maior produtor nacional. Neste período, a sardinha representou 25% das espécies capturadas pela pesca extrativa marinha neste Estado, constituindo-se a espécie predominante (IBAMA 2005).

Além do mercado de pescado fresco, a sardinha capturada é apropriada para a industrialização, sendo direcionada para a produção de pescado congelado (em bloco ou individualmente), conservas em lata e pescado salgado, seco e prensado (MAA 2005). A industrialização da sardinha gera em média 35% e 47,8% de resíduos nas linhas de eviscerados e de espalmados, respectivamente (Pessatti 2001).

Os lipídios da sardinha concentram-se na carne deste peixe, e sua composição é rica nos AGs da série $n-3$ EPA e DHA (Soccol e Oetterer 2003). Estudos realizados com diferentes peixes da costa brasileira indicaram que a *Sardinella brasiliensis* foi uma das espécies com as maiores somatórias de EPA e DHA nas partes analisadas (olho e filé) (Visentainer et al. 2000).

Estas características tornam esta espécie promissora para a obtenção de óleo (Soccol e Oetterer 2003), apresentando ainda a vantagem da baixa concentração de contaminantes inorgânicos (em especial metilmercúrio), que podem representar um risco para a saúde, principalmente para fetos e recém-nascidos (FDA 1995, revisão 2003; Kris-Etherton et al. 2002; BNF 2004b; Brasil 2005).

A extração do óleo de resíduos de sardinha constitui-se, portanto, em uma solução atrativa para a valorização deste material. Deve-se dar preferência para a utilização de matéria-prima de qualidade, a qual deve ser prontamente processada e imediatamente destinada para a extração do óleo (Lee 1963; Arruda 2004). Na obtenção do óleo, é importante que a técnica escolhida permita uma alta recuperação do produto e que possibilite, principalmente, a preservação de sua qualidade nutritiva, funcional e organoléptica (Barthet e Daun 2005).

A extração do óleo de pescado, visando sua utilização principalmente em experimentos de bancada e em análises (Christie 1982; Undeland et al. 1998; Brum 2004; Brum et al. 2005), pode ser realizada com solventes, sendo que a metodologia mais utilizada é a que emprega o sistema ternário de solventes clorofórmio/metanol/água (Bligh e Dyer 1959).

Além do EPA e do DHA, é importante que a dieta forneça outros AGs, de maneira a garantir uma composição adequada, os quais devem estar presentes nas moléculas de TAGs em posições que favoreçam seu aproveitamento metabólico e permitam otimizar as propriedades tecnológicas do produto (Bell e Bradley 1997; Stein 1999; Osborn e Akoh 2002).

Estas moléculas, chamadas de LEs, podem ser construídas a partir da reação entre TAGs de óleo de pescado, garantindo o fornecimento de AGs essenciais, e triglicerídeos de cadeia média (TCM), contendo AGCMs (6 a 12 átomos de carbono), os quais proporcionam um rápido provimento de energia. A síntese de TAGs contendo AG essenciais na posição *sn*-2 das moléculas, e AGCM nas posições *sn*-1,3 permite a potencialização do aproveitamento metabólico de cada um destes ácidos (Bell e Bradley 1997; Stein 1999; Osborn e Akoh 2002).

Os LEs são sintetizados através de reações de interesterificação, que permitem a troca de radicais acila intra ou intermoléculas, rearranjando ou modificando os AGs nas moléculas de TAGs. Esta mudança na composição e ou na estrutura das moléculas confere ao produto propriedades (nutricionais, funcionais) diferentes daquelas apresentadas pelos substratos originais (Kubow 1996; Kodali e List 2005; ISEO 2006).

A interesterificação, especificamente chamada de transesterificação quando a troca de radicais acila ocorre entre dois ésteres, é um processo que ocorre na presença de um catalisador, a temperaturas relativamente baixas (ISEO 2006). A reação pode ser química, processo caracterizado pela simplicidade e pelo baixo custo, embora a distribuição dos AGs nas moléculas seja ao acaso. Outra alternativa é a reação enzimática, que tem um grande potencial de se tornar mais econômica do que a catálise química, por exemplo, mediante a reutilização de lipases imobilizadas, oferecendo ainda a possibilidade de a distribuição dos AGs nos TAGs ser em posições específicas (Kodali e List 2005).

Tendo em vista estas considerações iniciais, os objetivos deste trabalho foram a) a avaliação da viabilidade de utilização de resíduos de sardinha-verdadeira para a obtenção de óleo rico nos AGs n-3 EPA e DHA, e b) a verificação da composição em AGs dos TAGs obtidos a partir da reação de transesterificação enzimática do óleo obtido de resíduos de sardinha com TCM, visando a síntese de LE de interesse nutricional, contendo AGCM, EPA e DHA.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 MATÉRIA-PRIMA

O óleo foi extraído de resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), compostos por cabeças, vísceras, cauda, pele, espinha e escamas (Pesqueira Oceânica, Florianópolis, SC). Detalhes sobre a coleta, armazenamento e tratamento da matéria-prima estão apresentadas no item 3.2.1.

Para a reação de interesterificação, foram utilizados triglicerídios de cadeia média (Trigliceril CM[®], Support Produtos Alimentícios), indicados nas seções a seguir como TCM.

5.2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO DO PESCADO

A extração do óleo dos resíduos de sardinha foi realizada segundo metodologia de Bligh & Dyer (1959) modificada, conforme descrito na literatura (Christie 1982) e detalhado no item 3.2.2. O óleo obtido foi armazenado em frasco âmbar e mantido congelado a -20°C, sob atmosfera de nitrogênio, para utilização posterior (análises e interesterificação) sem nenhum tratamento adicional.

5.2.3 ANÁLISE DO RENDIMENTO EM ÓLEO

Após a evaporação do solvente, a fração do óleo bruto foi pesada para o cálculo do rendimento em óleo, em relação ao material de origem. Os resultados foram expressos como g/100g de matéria úmida.

5.2.4 INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A interesterificação foi realizada conforme descrito no item 3.2.4. O óleo interesterificado foi armazenado em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, e mantido a -20°C até o momento das análises.

5.2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas realizadas nos resíduos de sardinha seguiram metodologia oficial (AOAC 1990; AOAC 2002), citadas no item 3.2.5. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média, em g/100g de matéria úmida.

5.2.6 COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS

As análises realizadas nos óleos consistiram na verificação do perfil lipídico por cromatografia em camada delgada (CCD), na determinação da composição em AGs por cromatografia gasosa (CG), e nas determinações de índice de peróxido (I.P.), índice de iodo (I.I.) e índice de acidez (I.A.), conforme detalhado nos itens a seguir.

5.2.7 PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico das amostras (óleo bruto dos resíduos de sardinha, mistura do óleo de peixe com o TCM antes e depois da reação) foi verificado por CCD: as amostras foram aplicadas em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60G com 20cm de comprimento (Macherey-Nagel, Alemanha). As amostras foram eluídas duas vezes com o mesmo sistema de solventes (hexano/éter etílico/ácido fórmico, 80:20:2, v/v/v) (Christie 1982). Utilizou-se como revelador das bandas uma solução de ácido fosfotúngstico 20% (m/v) em etanol 99,5%. Aplicou-se o revelador sobre as placas e procedeu-se ao aquecimento das mesmas em estufa a 105°C durante 20 minutos, para a visualização das bandas. Se necessário, repetiram-se as operações de aplicação do revelador e aquecimento da placa. Na fase eluente utilizada, as frações lipídicas foram separadas na seguinte ordem de eluição (a partir da frente do solvente): ésteres de colesterol; TAGs; AGLs; colesterol; 1,3-DAGs; 1,2-DAGs; MAGs; e lipídios complexos. Utilizou-se uma amostra comercial de óleo de peixe (ROPUFA n-3 '30' Food Oil[®], Roche Brasil) para a identificação da banda referentes aos TAGs.

5.2.8 ÍNDICE DE ACIDEZ

A determinação de AGLs foi realizada em duplicata no óleo bruto extraído dos resíduos de sardinha, segundo descrito na literatura (Aro et al. 2000) e indicado no item 3.3.2 (solução etanólica de KOH 0,0358M para a titulação). Os resultados de I.A. foram expressos como porcentagem de ácido oléico.

5.2.9 ÍNDICE DE PERÓXIDO

O I.P. foi determinado (em duplicata) no óleo bruto de sardinha segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS 1990), modificado conforme procedimentos detalhados no item 3.3.3. A concentração de peróxidos foi expressa como meq de O₂/kg de óleo.

5.2.10 *ISOLAMENTO DOS TAGS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA*

Antes e depois da interesterificação enzimática, a mistura do óleo bruto da sardinha com TCM, dissolvida em hexano (500mg de óleo/mL de solvente), foi aplicada em placas de CCD para isolamento dos TAGs, conforme descrito no item 5.2.7. Os TAGs isolados foram recuperados conforme descrito no item 3.3.4, e preparados para a determinação da composição em AGs, de acordo com os procedimentos relatados nos itens 5.2.11 e 5.2.12 (Christie 1982).

5.2.11 *PREPARO DOS ÉSTERES METÍLICOS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA*

Os ésteres metílicos dos AGs para análise por CG foram obtidos conforme descrito na literatura (Hartman e Lago 1973) e detalhado no item 3.3.5. Adicionou-se hexano como solvente para a realização das análises. As soluções foram armazenadas a -20°C para utilização posterior.

5.2.12 *COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS*

O perfil de AGs foi determinado por CG, mediante a injeção dos ésteres metílicos dos AGs, dissolvidos em hexano, nas condições de análise descritas no item 3.3.6. A composição quantitativa foi expressa como porcentagem em massa. Esta determinação foi realizada no óleo bruto dos resíduos de sardinha, bem como nos TAGs da mistura deste óleo com o TCM antes e depois da reação.

5.2.13 *ÍNDICE DE IODO CALCULADO*

O I.I. foi obtido por cálculo, a partir da composição em AGs das amostras, com base na fórmula expandida do Método Cd 1c-85 da American Oil Chemists' Society (AOCS 1997). A literatura indica uma boa correlação (0,99) entre o índice de iodo obtido por cálculo e por análise (Nassu 1994).

O cálculo foi realizado para as amostras do óleo bruto extraído dos resíduos de sardinha, e para os TAGs da mistura do óleo bruto de sardinha com o TCM antes e depois da reação enzimática.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da composição bromatológica dos resíduos de sardinha estão indicados na Tabela 9. A amostra caracterizou-se pelo alto conteúdo de proteínas, fato comum para peixes em geral, em especial para resíduos desta espécie, conforme estudos realizados com vísceras, cabeça, cauda, escamas, coluna vertebral e nadadeiras (Morales-Ulloa e Oetterer 1995) e com cabeça e cauda (Pessatti 2001).

A composição da sardinha, rica em proteínas, leva as indústrias pesqueiras a destinarem os resíduos do processamento principalmente para a produção de farinha de pescado ou silagem, produtos posteriormente adicionados a rações animais (Arruda 2004).

Tabela 9 Análises físico-químicas de resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) (valores expressos em g/100g de matéria úmida e de matéria seca)*

Componente	Matéria úmida (g/100g)	Matéria seca (g/100g)
Matéria seca	-	28,7 ± 0,26
Umidade	71,30 ± 0,26	-
Proteína bruta	13,67 ± 0,30	47,64 ± 1,41
Extrato etéreo	4,24 ± 0,11	14,76 ± 0,34

* média de 3 repetições ± desvio padrão da média.

Para a realização dos experimentos, o óleo foi extraído dos resíduos de sardinha segundo metodologia de Bligh & Dyer (1959). Conforme indicado na Tabela 10, esta técnica proporcionou a recuperação de 5,43g de lipídios totais por 100g de matéria úmida, rendimento superior àquele obtido por Soxhlet. A maior eficiência apresentada pela metodologia de Bligh & Dyer para a extração da fração lipídica já era esperada, devido às características dos solventes utilizados nesta técnica (sistema ternário clorofórmio/metanol/água) (Christie 1982; Barthet e Daun 2005). Apesar da toxicidade do clorofórmio e do metanol, o maior rendimento em lipídios totais por esta técnica a torna uma das mais utilizadas para a obtenção de óleo para aplicações subseqüentes, sendo bastante útil na determinação do conteúdo de gordura total de amostras (Undeland et al. 1998).

Conforme apresentado na Tabela 10, o I.P. encontrado para o óleo extraído da sardinha foi de 7,97±0,02 mEq O₂/kg de óleo, inferior ao limite máximo de 15 mEq O₂/kg de óleo estabelecido pelo Codex Alimentarius para óleos brutos. Este resultado pode ser explicado pelas condições da matéria-prima (resíduos do beneficiamento do pescado,

processados à temperatura ambiente na indústria de beneficiamento, transportados até o laboratório em contato com oxigênio, triturados), e pelo alto grau de insaturação do óleo de sardinha, rico em AGPI, fatores que tornam esta amostra extremamente suscetível à oxidação (Hultin, 1994, *apud* (Aro et al. 2000)).

Como se observa na Tabela 10, foi encontrado um teor de AGLs extremamente alto para o óleo de sardinha ($20,87 \pm 0,16$, % em ácido oléico), bastante superior ao limite máximo estipulado pelo Codex Alimentarius para óleos brutos, que fica em 2% (Turon et al. 2005). Este valor de acidez elevado também pode ser devido às condições adversas da matéria-prima, inclusive como decorrência da ação das enzimas endógenas presentes nas vísceras. Este resultado indica que seria conveniente submeter o material a um processo de refino (pré-neutralização) para a redução desta fração lipídica (Lee 1963) e realizar a separação das vísceras do restante dos resíduos.

Tabela 10 Rendimento e parâmetros de qualidade do óleo bruto de resíduos de sardinha extraído por Bligh & Dyer

Amostra	Óleo
Rendimento (% de matéria úmida)*	$5,43 \pm 0,27$
I.A. (% em ácido oléico)**	$20,87 \pm 0,16$
I.P. (mEq O ₂ /kg de óleo)**	$7,97 \pm 0,02$

* Média de 3 repetições \pm desvio padrão da média. ** Média de 2 repetições \pm desvio padrão da média.

Pesquisas relatam que para óleo de fígado de tubarão obtido por trituração, cozimento e centrifugação da matéria-prima (Pacheco e Barrera-Arellano 1994) e óleo de arenque comercial desodorizado (Wanasundara e Shahidi 1998), o I.P. foi de 0,95 e 3,05 (em mEq O₂/kg de óleo); e o I.A. foi de 0,15 e 0,07 (% em ácido oléico), respectivamente. Em estudo com óleo de arenque, obteve-se o valor de 4,6 mEq O₂/kg de óleo extraído segundo metodologia de Bligh & Dyer (Undeland et al. 1998). Óleo bruto extraído de cabeças de perca mediante cozimento, filtração e centrifugação apresentou valor médio de 1% (em ácido oléico) para acidez e de 5,2 mEq O₂/kg de óleo para I.P. (Turon et al. 2005). Óleos recuperados de silagem química de pescado costumam apresentar valores bastante altos para acidez, devido à solução ácida utilizada no processamento (Seibel e Souza-Soares 2003; Arruda 2004). Os resultados geralmente relatados na literatura são referentes

a amostras fileteadas no próprio laboratório e cujos resíduos foram submetidos a análise, o que pode explicar as diferenças encontradas no presente estudo para I.A. e I.P.

Os resultados deste estudo apontam a importância de cuidados na conservação do pescado no momento da captura, e também na recepção, armazenamento, processamento e manipulação da matéria-prima na indústria de beneficiamento, como uma forma de preservar a integridade de sua fração lipídica, constituindo-se em requisito imprescindível para a garantia da qualidade do produto.

Na Figura 11, está apresentado o perfil lipídico do óleo bruto extraído dos resíduos de sardinha pela técnica de Bligh & Dyer (1959), conforme verificado pela análise por CCD, na qual também se analisou o perfil do óleo comercial ROPUFA® para fins de comparação. Observa-se a predominância de TAGs em ambas amostras. Isto já era esperado, pois os TAGs tradicionalmente constituem a fração lipídica principal de tecidos animais (Christie 1982; Pigott e Tucker 1990). Foram também observadas frações polares na amostra do óleo de sardinha, as quais não foram detectadas no óleo de peixe comercial, já que este foi submetido a refino, processo que remove os lipídios polares presentes originalmente na amostra (Lee 1963). Esta análise aponta a eficiência da metodologia de Bligh & Dyer (1959) em extrair os lipídios polares do tecido do peixe. Além disso, este perfil lipídico é característico de amostras de óleo na forma bruta (Brum 2004; Brum et al. 2005).

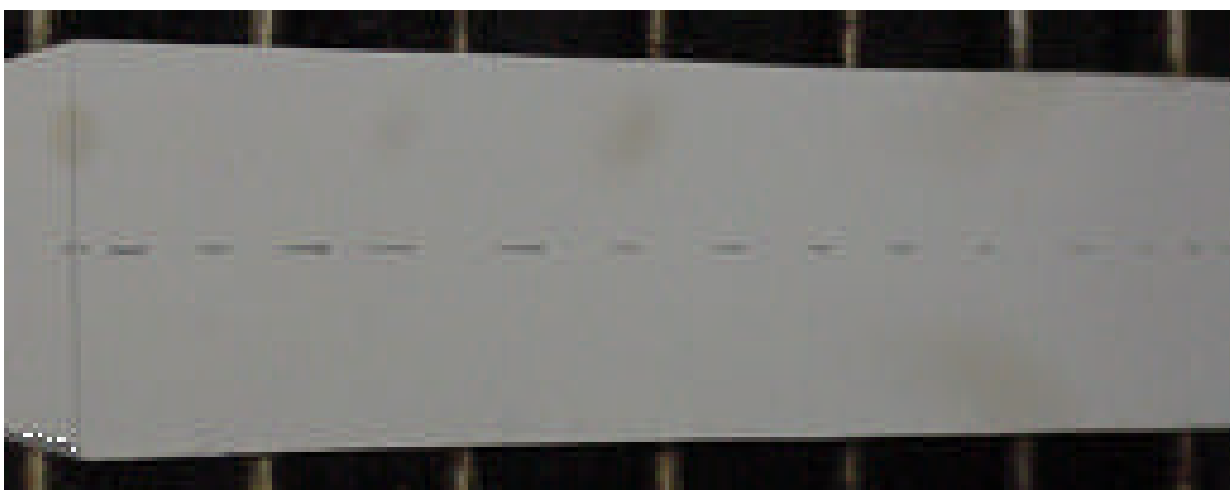


Figura 11 Perfil lipídico do óleo bruto de resíduos de sardinha (amostra superior) extraído pelo método de Bligh & Dyer, comparado com óleo de peixe comercial (amostra inferior), conforme análise por cromatografia em camada delgada.

Na Tabela 11, está apresentada a composição em AGs das amostras (cromatogramas nas Figuras 17 a 19 dos Anexos). No óleo bruto de resíduos de sardinha, os AGs encontrados em maior proporção foram palmítico (C16:0), EPA (C20:5) e DHA (C22:6), junto a quantidades apreciáveis de outros AGs (C14:0, C16:1, C18:0, C18:1), não tendo sido identificado ácido araquidônico (C20:4n6). Esta composição em AGs é característica de óleos marinhos e confirma dados da literatura para a espécie em estudo (Pigott e Tucker 1990; Stansby 1990; Gunstone et al. 1994; Pessatti 2001), inclusive para a fração lipídica de sardinha capturada na costa brasileira (Badolato et al. 1994).

O perfil de AGs encontrado para o óleo dos resíduos de sardinha-verdadeira também foi semelhante ao citado na literatura para óleos de sardinha de outras espécies (Californiana e Japonesa), sendo que as diferenças detectadas foram principalmente quanto ao teor de ácido palmítico e ácido esteárico (C18:0), maiores no presente estudo (Gunstone et al. 1994).

Segundo os resultados apresentados na Tabela 11, no óleo de sardinha desta pesquisa, a concentração total de AGs n-3, os mais representativos de óleos marinhos, foi de 30,4%, tendo sido detectada a presença de 12,1% de EPA e de 16,5% de DHA, em uma proporção relativa de 0,7, valores que também são similares aos encontrados na literatura.

O baixo teor de AGs n-6 encontrada no óleo de sardinha deste estudo implicou em uma baixa proporção n3:n6 (1:15). Este resultado caracteriza a amostra como uma importante fonte dietética de AGs n3, fato extremamente vantajoso do ponto de vista nutricional, considerando-se a desproporção entre os AGs da série n3 e da série n6 observados na dieta atual.

Ao contrário dos resultados encontrados no presente estudo e em outras referências bibliográficas, em pesquisa realizada com sardinha-verdadeira (Visentainer et al. 2000), foram encontrados valores de EPA superiores aos de DHA, sendo que a relação EPA/DHA foi de 1,36 no olho de sardinha e de 1,35 no filé. Quanto ao EPA, a pesquisa indicou teores médios de 20,16% e 18,68% no olho e no filé, respectivamente (% em relação ao total dos AGs presentes nos lipídios). Quanto ao DHA, os teores encontrados foram de 14,81% no olho e 13,77% no filé.

A composição em AGs dos TCM utilizados como substrato na interesterificação enzimática (1,23% de ácido caprónico, 63,13% de ácido caprílico, 34,99% de ácido cáprico e 0,61% de ácido láurico) está de acordo com a especificação comercial do fabricante.

Tabela 11 Composição em ácidos graxos (% em massa), teores de ácidos graxos (%), relação EPA/DHA e n3:n6, e índice de iodo (g de iodo/100g) das amostras

Ácido graxo	Óleo original ⁽¹⁾	Mistura antes da interesterificação ⁽²⁾	Mistura após a interesterificação ⁽²⁾
C6:0	-	0,4	-
C8:0	-	27,9	20,4
C10:0	-	19,1	17,8
C12:0	-	0,4	0,5
C14:0	8,0	5,1	6,0
C15:0	1,2	0,8	0,9
C16:0	30,4	17,7	20,3
C16:1	7,0	3,9	4,9
C17:0	1,6	0,8	0,8
C17:1	0,8	-	-
C18:0	8,1	4,4	4,8
C18:1n9t	0,7	-	-
C18:1n9c	8,6	4,3	5,3
C18:2n6c	1,9	1,1	0,1
C18:3n6	0,1	-	-
C20:1	0,6	-	0,7
C18:3n3	1,0	0,5	-
C20:2	0,5	0,2	-
C20:5n3 (EPA)	12,1	5,8	7,9
C22:5n3	0,8	0,3	-
C22:6n3 (DHA)	16,5	7,2	9,6
Total	100,0	100,0	100,0
Saturados	49,4	76,5	71,4
Monoinsaturados	17,8	8,3	10,9
Poliinsaturados	32,9	15,2	17,7
EPA+DHA	28,6	13,1	17,5
EPA/DHA	0,7	0,8	0,8
I.I. (g iodo/100g de gordura)	152,6	68,6	88,1
n3:n6	15,0	12,5	27,1

⁽¹⁾ Óleo bruto de resíduos de sardinha, ⁽²⁾ Análise nos TAGs da amostra (óleo bruto de sardinha + TCM).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, nota-se que houve diferença na proporção relativa de AGs presentes nos TAGs da mistura antes e depois da interesterificação. As diferenças observadas neste estudo quanto à composição das misturas antes e depois da transesterificação podem ser explicadas pelo fato de haver AGs na forma livre no meio, provenientes do óleo bruto de sardinha, os quais também servem como substrato durante a reação enzimática, sendo incorporados aos TAGs (Reyes e Hill 1994; Marangoni e Rousseau 1995; Rousseau e Marangoni 2002; Xu 2004).

A interesterificação enzimática do óleo bruto extraído da sardinha modificou o perfil de AGs do produto: o óleo originalmente não continha AGCMs em sua composição, os quais passaram a estar presentes nos TAGs do óleo interesterificado em teores de 38,7%. A proporção de AGs saturados após a reação foi de 71,4%.

Apesar de ter havido um aumento acentuado de 45% nos AGs saturados do óleo de peixe após a interesterificação com o TCM, quando comparado ao óleo bruto de sardinha, pode-se considerar que o teor de EPA e DHA se manteve alto no produto (17,5%), mantendo-se praticamente inalterada a proporção original de EPA/DHA. A avaliação de diferentes proporções na mistura do óleo de pescado e do TCM poderia fornecer um produto com menor teor de AGs saturados e com um aumento nos poliinsaturados n-3, de forma a promover mais benefícios à saúde.

Conforme se observa na Tabela 11, o I.I. foi de 152,6 g iodo/100g de gordura para o óleo de sardinha original, indicando a presença de grande quantidade de AGs de cadeia longa poliinsaturados, constatação comum para óleos de origem marinha, como provenientes de fígado de tubarão (Pacheco e Barrera-Arellano 1994) e arenque (Wanasundara e Shahidi 1998). A interesterificação promoveu uma redução de 42% no I.I. do óleo de sardinha, já que a inclusão de AGCM ao óleo de peixe promoveu uma redução relativa dos AGs insaturados.

A modificação da disposição dos AGs nos TAGs dos óleos de partida poderia ser confirmada mediante a análise estrutural dos TAGs dos óleos antes e depois das reações.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o material de descarte da linha de beneficiamento de sardinha é uma fonte bastante interessante para a obtenção de óleo rico nos AGs EPA e DHA.

O estudo indicou, através da determinação do perfil de AGs do produto, a possibilidade da aplicação da interesterificação enzimática para a modificação da composição do óleo de resíduos de sardinha.

A aplicação da interesterificação para a modificação da composição em AGs e conseqüente melhoria do aproveitamento metabólico do óleo extraído de resíduos de sardinha permite um melhor gerenciamento do material não aproveitado nas linhas de beneficiamento de pescado. Esta tecnologia de modificação torna-se atrativa para as indústrias sob os pontos de vista econômico, ambiental e nutricional.

Pesquisas mais detalhadas podem ser feitas para assegurar a qualidade do óleo obtido e para otimizar as condições da reação de interesterificação, visando futuras aplicações do produto em dietas de animais, para a obtenção de derivados (carnes, ovos, leite e derivados) ricos em AGs da série n-3.

A aplicação de tecnologias para o aproveitamento de resíduos da indústria pesqueira, como a que foi objeto do presente estudo, visando a obtenção de óleo de peixe rico em AGs n-3, constitui-se em uma alternativa interessante não apenas do ponto de vista nutricional. O estudo de possibilidades para a aplicação deste material permite uma melhor administração deste recurso ambiental e o desenvolvimento da sociedade de uma forma sustentável.

5.5 AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida. À Novozymes Brasil e à Pesqueira Oceânica pelas doações. À Profa. Dra. Jane M. Block (UFSC, Florianópolis, SC), ao Prof. Francisco C. Deschamps (Estação Experimental da EPAGRI/UNIVALI, Itajaí, SC) e ao Prof. Luiz A. Gioielli (USP, São Paulo, SP), pelo auxílio nas técnicas e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados mostraram que tanto a interesterificação química quanto enzimática foram eficazes para a obtenção de lipídios estruturados ricos nos AGs DHA e EPA, provenientes de óleo de peixe, e em AGCM, provenientes tanto de triglicerídeo de cadeia média quanto de éster metílico de ácido cáprico.

A análise dos produtos por DSC indicou que a interesterificação promoveu uma mudança no perfil de fusão das amostras, e que tanto o substrato quanto o tipo de reação exercem influência sobre esta propriedade física.

Entre os produtos obtidos, o óleo de peixe interesterificado enzimaticamente com o éster metílico de ácido cáprico proporcionou um lipídio estruturado com uma composição mais balanceada em AGs do que os demais tratamentos avaliados. A análise deste óleo por CG indicou a incorporação de AGCM aos triglicerídios (9,74%), com a manutenção de um alto teor dos AGPI n-3 EPA (11,85%) e DHA (17,52%).

A extração do óleo de resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) segundo metodologia de Bligh & Dyer proporcionou um rendimento de 5,43%. O óleo obtido apresentou triglicerídios em sua fração lipídica, juntamente a outras frações polares, típicas de óleo na forma bruta. Sua composição em AGs indicou a predominância de ácido palmítico (30,4%) e de altos teores de EPA (12,1%) e DHA (16,5%).

Considerando-se os benefícios à saúde proporcionados por estes AGs n-3, estes resultados indicam que o aproveitamento de resíduos de sardinha para extração de óleo constitui-se em uma alternativa para a valorização desta matéria-prima.

A transesterificação enzimática do óleo de sardinha com triglicerídios de cadeia média resultou em um óleo cujos triglicerídios apresentaram uma composição variada em AGs, com 38,2% de AGCM, 7,9% de EPA e 9,6% de DHA.

Houve predominância de AGs saturados (71,4%) no óleo modificado, o que pode ser ajustado mediante a redução na proporção de triglicerídios de cadeia média utilizados como substrato.

Análises qualitativas, por cromatografia em camada delgada, indicaram a troca de radicais acila entre os substratos antes e depois da interesterificação catalisada por lipase, o que comprova a eficácia da reação.

Nesta pesquisa, as estratégias estudadas foram eficazes para a síntese de lipídios estruturados contendo AGCM e AGPI n-3 provenientes de óleo de peixe.

7 SUGESTÕES

- Otimizar o processo em termos de condições experimentais, aplicando planejamento de experimentos;
- Realizar o estudo cinético da incorporação do doador acila ao óleo de interesse, estudando a influência de variáveis (temperatura, tempo de reação, concentração do catalisador e concentração de substratos) sobre o rendimento do lipídio estruturado de interesse;
- Testar diferentes reatores para a síntese de lipídios estruturados;
- Avaliar a síntese de éster etílico de ácidos graxos de cadeia média para utilização como doador acila para a obtenção de lipídio estruturado, devido à menor toxicidade apresentada pelo etanol frente ao metanol, o qual foi utilizado neste trabalho;
- Avaliar a aplicação de enzimas não comerciais e a reutilização da enzima imobilizada em subseqüentes reações para a síntese de lipídios estruturados, visando a redução dos custos do processo;
- Realizar uma caracterização completa do lipídio estruturado obtido (estrutura dos triglicerídios, estabilidade oxidativa, consistência, estrutura cristalina) segundo as diferentes estratégias, de forma a verificar a influência do tratamento sobre as propriedades (físicas, químicas) e o potencial metabólico do produto;
- Extrair o óleo dos resíduos de peixe em escala industrial, para utilização posterior, seja através do método tradicional (cozimento, prensagem e centrifugação) ou via aplicação de enzimas;
- Realizar o refino do óleo de sardinha, de forma a aumentar sua estabilidade à oxidação e aumentar o rendimento da interesterificação;
- Analisar o óleo de sardinha interesterificado por DSC, para a confirmação da ocorrência da reação mediante esta técnica termoanalítica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOH, C.C. Structured Lipids - Enzymatic Approach. *Inform*, v.6, n.9, p.1055-1061. 1995.
- AKOH, C.C. Fat replacers. *Food Technology*, v.52, n.3, p.47-53. 1998.
- AKOH, C.C.; JENNINGS, B.H. e LILLARD, D.A. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of American Oil Chemist's Society*, v.73, n.8, p.1059-1062. 1996.
- ANTHONSEN, T. Biocatalysis as a tool in synthetic organic synthesis. 2003. Disponível em: <http://bendik.chembio.ntnu.no/biocatalysis.html> Acesso em: 24 de setembro de 2005.
- AOAC. *Official methods of analysis*. 14.ed. Washington: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990. 1141p.
- AOAC. Oils and Fats. In: Hoewitz, W. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2002.
- AOCS. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4.ed. Champaign: AOCS Press, 1990.
- AOCS. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 5.ed. Champaign: AOCS Press, 1997.
- ARO, T.; TAHVONEN, R.; MATTILA, T.; NURMI, J.; SIVONEN, T. e KALLIO, H. Effects of season and processing on oil content and fatty acids of baltic herring (*Clupea harengus membras*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.48, n.12, p.6085-6093. 2000.
- ARRUDA, L.F. DE. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. Piracicaba, 2004. 78p. [Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo]
- BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. DE; AMARAL MELLO, M.R.P. DO; TAVARES, M.; CAMPOS, N.C.; AUED-PIMENTEL, S. e MORAIS, C. DE. . Composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.54, n.1, p.27-35. 1994.
- BAILEY, A.E. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.
- BARTHET, V.J. e DAUN, J.K. Oil content analysis: myths and reality. In: Luthria, D. L. *Oil extraction and analysis*, Champaign: AOCS Press, 2005. 100-117p.
- BECKER, C.C.; ROSENQUIST, A. e HOLMER, G. Regiospecific analysis of triacylglycerols using allyl magnesium bromide. *Lipids*, v.28, n.2, p.147-149. 1993.
- BELL, J.D.; BARNARD, M.L.; PARKES, H.G.; THOMAS, E.L.; BRENNAN, C.H.; CUNNANE, S.C. e DAGNELIE, P.C. Effects of n-3 fatty acids on the NMR profile of plasma lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v.37, p.1664-1674. 1996.
- BELL, S.J. e BRADLEY, D. The new dietary fats in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, v.97, n.3, p.280-286. 1997.

- BLIGH, E.G. e DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917. 1959.
- BNF. Conference reports: n-3 fatty acids and health. 2000. Disponível em: www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html. Acesso em: 13 de janeiro de 2006.
- BNF. Energy and nutrients: fat. 2004a. Disponível em: www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html. Acesso em: 13 de janeiro de 2006.
- BNF. Fish. 2004b. Disponível em: www.nutrition.org.uk. Acesso em: 13 de janeiro de 2006.
- BOCKISCH, M. Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. **Fats and Oils Handbook**, Champaign: AOCS Press, 1993. 53-120p.
- BORGHESI, R. Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). Piracicaba, 2004. 96p. [Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo]
- BRASIL, LEIS, DECRETOS, ETC. Resolução RDC n. 270 de 22 de setembro de 2005. 2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.
- BRENGARTNER, D.A. Analysis of Common Fatty Acid Glycerides by Gas Chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.173, p.177-183. 1985.
- BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R.J. e WOLMARK, N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. **Biochimica et biophysica acta**, v.116, p.67-72. 1966.
- BRUM, A.A.S. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. Piracicaba, 2004. 66p. [Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo]
- BRUM, A.A.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; FERRARI, R.A. e BENEDETTI, T. **Avaliação de quatro métodos de extração de lipídios em aveia em flocos e peito de frango: eficiência e qualidade da fração lipídica**. In: II Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, Florianópolis, SBOG. 2005.
- CABONI, M.F.; CONTE, L.S. e LERCKER, G. Rapid HPLC analysis of triacylglycerols by isocratic elution and light scattering detection. **Italian Journal of Food Science**, n.2, p.125-132. 1992.
- CAMACHO PÁEZ, B.; ROBLES MEDINA, A.; CAMACHO RUBIO, F.; GONZÁLEZ MORENO, P. e MOLINA GRIMA, E. Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. **Chemical Engineering Science**, v.57, p.1237-1249. 2002.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D'A.; OLIVEIRA, J.G.DE; SHIMIZU, M.T. e SILVA, D.M.DA. Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80. 2003.
- CASTRO, H.F. DE e ANDERSON, W.A. Fine Chemicals by Biotransformation using Lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554. 1995.

- CASTRO, H.F. DE; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.DOS e AGUIAR, C.L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156. 2004.
- CHAPMAN, K.W. e REGENSTEIN, J.M. Use of fish oil in food products. In: Shahidi, F., Jones, Y. e Kitts, D. D. **Seafood safety, processing, and biotechnology**., Lancaster: Technomic, 1997. 151-159p.
- CHEETHAM, P.S.J. Principles of Industrial Biocatalysis and Bioprocessing. In: Wiseman, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**, Cornwall: Ellis Horwood Limited, 1995. 83-234p.
- CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**. 2 ed.ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207p.
- CLAUSS, J. Interesterificação de Óleo de Palma. **Óleos & Grãos**, v.Jan/Fev, p.31-37. 1996.
- COSTA NETO, P.R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Florianópolis, 2002. 118p. [Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina]
- D'AGOSTINI, D. Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. São Paulo, 2001. 167p. [Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo]
- D'AGOSTINI, D. e GIOIELLI, L.A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.3, p.345-354. 2002.
- DÍAZ GAMBOA, O. e GIOIELLI, L.A. Consistencia de lípidos estructurados a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. **Grasas y Aceites**, v.54, n.2, p.122-129. 2003a.
- DÍAZ GAMBOA, O. e GIOIELLI, L.A. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación química y enzimática a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. **Grasas y Aceites**, v.54, n.2, p.161-168. 2003b.
- DUNFORD, N.T. Oil- and oilseed-based bioactive compounds and their health effects. In: Dunford, N. T. e Dunford, H. B. **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**, Champaign: AOCS Press, 2004. 18p.
- FACIOLI, N.L. e GONÇALVES, L.A.G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v.21, n.1, p.16-19. 1998.
- FADILUĞLU, S.; ÇİFTÇİ, O.N. e GÖĞÜS, F. Reduction of Free Fatty Acid Content of Olive-pomace Oil By Enzymatic Glycerolysis. **Food Science and Technology International**, v.9, n.1, p.11-15. 2003.
- FAO-WHO. **Fats and oils in human nutrition: report of a Joint expert consultation. FAO food and nutrition paper no. 57**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1994.
- FAO-WHO, CODEX ALIMENTARIUS. Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards, CODEX-STAN 19. 1981, revisão 1999. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.
- FDA. Code of Federal Regulations: 21 CFR 184 - Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. 1995, revisão 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF184.html>. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.
- FOMUSO, L.B. e AKOH, C.C. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. **Food Research International**, v.35, p.15-21. 2002.

- GAIS, H.J. e THEIL, F. Hydrolysis and formation of carboxylic acid esters. In: Drauz, K. e Waldmann, H. **Enzyme catalysis in organic synthesis**, v.2. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 335-578p.
- GARCIA, H.S.; STORKSON, J.M. e AL., ET. Enrichment of Butteroil with Conjugated Linoleic Acid via Enzymatic Interesterification (Acidolysis) Reactions. **Biotechnology Letters**, v.20, n.4, p.393-395. 1998.
- GILMAN, H. e MCGLUMPHY, J.H. La préparation indépendante du bromure d'allylmagnésium. **Bulletin de la Société Chimique de France**, v.43, p.1322-1328. 1928.
- GOLDBERG, I., Ed. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Chapman & Hall, 1994. 571p.
- GORDON, D.T. e RATLIFF, V. The implications of omega 3 fatty acids in human health. In: Flick, J., G.J. e Martin, R. E. **Advances in seafoods biochemistry: composition and quality**, Lancaster: Technomic Publishing Company, 1992. 69-91p.
- GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G. e ANDO, M.Y. Otimização da reação de interesterificação química do óleo de palma. **Química Nova**, v.28, n.4, p.633-636. 2005.
- GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; GIOIELLI, L.A. e SIMÕES, I.S. Interactions in interesterified palm and palm kernel oils mixtures. II - Microscopy and differential scanning calorimetry. **Grasas y Aceites**, v.52, n.6, p.363-368. 2001.
- GRIMALDI, R.; NASSU, R.T.; GONÇALVES, L.A.G. e MOREIRA, R.N.C. Characterization of hydrogenated fats for margarine manufacturing purposes. **Grasas y Aceites**, v.49, n.1, p.1-8. 1998.
- GUERARD, F.; GUIMAS, L. e BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19-20, p.489-498. 2002.
- GUNSTONE, F.D. **An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides**. 2.ed. New York: Chapman & Hall, 1967. 209p.
- GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1535-1549. 1999.
- GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. e PADLEY, F.B. Marine oils: fish and whale oils. **The lipid handbook**, London: Chapman & Hall, 1994. 167-p.
- HALLDORSSON, A.; MAGNUSSON, C.D. e HARALDSSON, G.G. Chemoenzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.7675-7677. 2001.
- HAMAM, F. e SHAHIDI, F. Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. **Food Chemistry**, v.91, p.583-591. 2005.
- HARALDSSON, G.G. Short Review. Production of Novel Fats and Oils Comprising Omega-3 Fatty Acids by Lipase. 2001. Disponível em. Acesso em, http://www.lipidforum.org/newsletter-nr62-oct-2001/short_review.htm.
- HARALDSSON, G.G.; HÖSKULDSSON, P.A.; SIGURDSSON, S.T.; THORSTEINSSON, F. e GUDBJARNASON, S. The Preparation of Triglycerides Highly Enriched with ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids via Lipase Catalyzed Interesterification. **Tetrahedron Letters**, v.30, n.13, p.1671-1674. 1989.

- HARALDSSON, G.G. e THORARENSEN, A. The Generation of Glyceryl Ether Lipids Highly Enriched with Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase. **Tetrahedron Letters**, v.35, n.41, p.7681-7684. 1994.
- HARTMAN, L. e LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practices**, v.22, p.475-477. 1973.
- HARTVIGSEN, M.S.; MU, H. e HOY, C.-E. Influence of Maternal Dietary n-3 Fatty Acids on Breast Milk and Liver Lipids of Rat Dams and Offspring - A Preliminary Study. **Nutrition Research**, v.23, p.747-760. 2003.
- HASSELMANN, M. e KUMMERLEN, C. Les lipides intraveineux: aspects qualitatifs. **Nutrition Clinical Métabolisme**, v.12, n.1, p.117-126. 1998.
- HHS e USDA. Dietary Guidelines for Americans 2005, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture. 2005.
- HUANG, K-H. e AKOH, C.C. Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using RSM. **Journal of Food Science**, v.61, n.1, p.137-141. 1996.
- IBAMA. Estatística da Pesca 2004: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Ambiente, M. d. M., Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA): 136. 2005.
- IBGE. **Tabelas de composição de alimentos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. 137p.
- ISEO. Food fats and oils. Nova York, Institute of Shortening and Edible Oils. 2006.
- JANDACEK, R.J.; WHITESIDE, J.A.; HOLCOMBE, B.N.; VOLPENHEIN, R.A. e TAULBEE, J.D. The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.45, p.940-945. 1987.
- JENNINGS, B.H. e AKOH, C.C. Enzymatic Modification of Triacylglycerols of High Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids Content to Produce Structured Lipids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.76, n.10, p.1133-1137. 1999.
- JENNINGS, B.H. e AKOH, C.C. Lipase Catalyzed Modification of Fish Oil to Incorporate Capric Acid. **Food Chemistry**, v.72, p.273-278. 2001.
- KHARE, S.K. e NAKAJIMA, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* Lipase on Celite and its Application for Enrichment of Docosahexaenoic Acid in Soybean Oil. **Food Chemistry**, v.68, p.153-157. 2000.
- KLINKESORN, U.; H-KITTIKUN, A.; CHINACHOTI, P. e SOPHANODORA, P. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Chemistry**, v.87, p.415-421. 2004.
- KODALI, D.R. e LIST, G.R., Eds. **Trans fats alternatives**. Champaign: AOCS Press, 2005. 133p.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W.S. e AL., ET. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v.106, p.2747-2757. 2002.
- KUBOW, S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. Review. **Nutritional Biochemistry**, v.7, n.530-541. 1996.
- KULAS, E.; OLSEN, E. e ACKMAN, R.G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: Kamal-Eldin, A. **Lipid oxidation pathways**, Champaign: AOCS Press, 2003. 37-69p.

- LANDS, W.E.M. **Fish, omega-3 and human health**. 2.ed. Champaign: AOCS Press, 2005. 220p.
- LANGONE, M. e SANT'ANNA, G.L. Enzymatic synthesis of medium chain triglycerides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77, n.79, p.759-770. 2002.
- LEAF, A. e WEBER, P.C. A new era for science in nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.45, p.1048-1053. 1987.
- LEE, C.F. Processing fish meal and oil. In: Stansby, E. M. **Industrial fishery technology**, New York Reinhold Publishing Corporation, 1963. 219-235p.
- LEE, J.-H.; SHIN, J.-A. e AL., ET. Production of Lipase-Catalyzed Structured Lipids from Safflower Oil with Conjugated Linoleic Acid and Oxidation Studies with Rosemary Extracts. **Food Research International**, v.37, n.10, p.967-974. 2004.
- LEE, K-T. e AKOH, C.C. Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.75, n.11, p.1533-1537. 1998.
- LEE, K-T. e AKOH, C.C. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.73, n.5, p.611-615. 1996.
- LEE, K.-T. e FOGLIA, T.A. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.77, n.10, p.1027-1034. 2000.
- LEPAGE, G. e ROY, C.C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **Journal of Lipid Research**, v.25, p.1391-1396. 1984.
- LIST, G.R.; MOUNTS, T.L.; ORTHOEFER, F. e NEFF, W.E. Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.72, n.3, p.379-382. 1995.
- LIST, G.R. e REEVES, R. Dietary guidelines, processing, and reformulation for *trans* reduction. In: Kodali, D. R. e List, G. R. **Trans fats alternatives**, Champaign: AOCS Press, 2005. 71-86p.
- LUCAS, E.F.; SOARES, B.G. e MONTEIRO, E.E.C. Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). **Caracterização de polímeros**, Rio de Janeiro: E-Papers, 2001. 247-285p.
- MAA. Cadeia produtiva da sardinha. 2005. Disponível em: www.mercadodapesca.com.br/cadeias_sardinha.php. Acesso em: 10 de setembro de 2005.
- MACRAE, A.R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.60, n.2, p.243-246. 1983.
- MANCINI-FILHO, J. e CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos trans. **Óleos & Grãos**, v.Jul/Ago, p.41-45. 1996.
- MARANGONI, A.G. e ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.329-335. 1995.
- MARANGONI, A.G. e ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. **Food Research International**, v.31, n.8, p.595-599. 1998.

- MEDICINE, INSTITUTE OF. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids**. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2002.
- MING, C.C. Caracterização, fracionamento e aproveitamento da gordura abdominal de frango. São Paulo, 2001. 113p. [Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo]
- MING, C.C. e GIOIELLI, L.A. Conteúdo de gordura sólida da gordura abdominal de frango, de suas estearinas e de suas misturas binárias com toucinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.151-157. 2002.
- MONTEIRO, J.B.; NASCIMENTO, M.G. e J.L.NINOW. Lipase-catalyzed Synthesis of Monoacylglycerol in a Homogeneous System. **Biotechnology Letters**, v.25, p.641-644. 2003.
- MORALES-ULLOA, D.F. e OETTERER, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.3, p.206-214. 1995.
- MORALES-ULLOA, D.F. e OETTERER, M. Composição em aminoácidos de silagens químicas, biológicas e enzimáticas preparadas com resíduos de sardinha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.252-258. 1997.
- MORRISON, W.R. e SMITH, L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. **Journal of Lipid Research**, v.5, p.600-608. 1964.
- MOURA, J. M.L.N. DE ; GONÇALVES, L.A.G. e GRIMALDI, R. **Produção de lipídios estruturados específicos contendo ácidos graxos essenciais através de interesterificação enzimática em reator piloto**. In: Anais do II Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, Florianópolis, SBOG. 2005.
- MU, H. e HOY, C.-E. Effects of different medium-chain fatty acids on intestinal absorption of structured triacylglycerols. **Lipids**, v.35, n.1, p.83-89. 2000.
- MU, H. e HOY, C.-E. Intestinal absorption of specific structured triacylglycerols. **Journal of Lipid Research**, v.42, p.792-798. 2001.
- MU, H.; KALO, O.; XU, X. e HOY, C.-E. Chromatographic Methods in the Monitoring of Lipase-catalyzed Interesterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, p.202-211. 2000.
- NASSU, R.T. Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC). Campinas, 1994. [Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas]
- NASSU, R.T. e GONÇALVES, L.A.G. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique. **Grasas y Aceites**, v.50, n.1, p.16-22. 1999.
- NG, S. Analysis of positional distribution of fatty acids in palm oil by ¹³C NMR spectroscopy. **Lipids**, v.20, n.11, p.778-782. 1985.
- OLIVEIRA, J.T.G.S.B. DE. Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola. Piracicaba, 2003. 75p. [Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo]

- OSBORN, H.T. e AKOH, C.C. Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.1, p.93-103. 2002.
- OSBORN, H.T. e AKOH, C.C. Effect of Emulsifier Type, Droplet Size, and Oil Concentration on Lipid Oxidation in Structured Lipid-Based Oil-in-Water Emulsions. **Food Chemistry**, v.84, p.451-456. 2004.
- PACHECO, M.T.B e BARRERA-ARELLANO, D. Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización con antioxidantes. **Grasas y Aceites**, v.45, n.3, p.155-160. 1994.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H. e CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA**, v.31, n.2, p.200-206. 1997.
- PESSATTI, M.L. (COORD.). Aproveitamento dos sub-produtos do pescado. Itajaí, MAPA/UNIVALI: 130. 2001.
- PIGOTT, G.M. e TUCKER, B.W. **Seafood: effects of technology on nutrition**. Nova lorque: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- POMERANZ, Y. e MELOAN, C.E. Thermal analysis of foods. **Food analysis: theory and practice**
Nova lorque: Chapman & Hill, 1994. 555-563p.
- RAY, S. e BHATTACHARYYA, D.K. Comparative nutritional study of enzymatically and chemically interesterified palm oil products. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.72, n.3, p.327-330. 1995.
- REYES, H.R. e HILL, JR., C.G. Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.43, p.171-182. 1994.
- ROBLES MEDINA, A.; ESTEBAN CERDÁN, L.; GIMÉNEZ GIMÉNEZ, A.; CAMACHO PÁEZ, B.; IBÁÑEZ GONZÁLEZ, M.J. e MOLINA GRIMA, E. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.379-391. 1999.
- RODRIGUES, J.N. Reestruturação por mistura e interesterificação da gordura do leite com óleo de milho. São Paulo, 2002. 119p. [Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo]
- RODRIGUES, J.N. e GIOIELLI, L.A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. **Food Research International**, v.36, p.149-159. 2003.
- ROUSSEAU, D.; FORESTIÈRE, K.; HILL, A.R. e MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting Behavior and triacylglycerol modifications. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.73, n.8, p.963-972. 1996a.
- ROUSSEAU, D.; HILL, A.R. e MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 2. Microstructure and polymorphism. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.73, n.8, p.973-981. 1996b.
- ROUSSEAU, D.; HILL, A.R. e MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 3. Rheology. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.73, n.8, p.983-989. 1996c.
- ROUSSEAU, D. e MARANGONI, A.G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. **Food Research International**, v.31, n.5, p.381-388. 1999.

- ROUSSEAU, D. e MARANGONI, A.G. The effects of interesterification on the physical properties of fats. In: Marangoni, A. G. e Narine, S. S. **Physical properties of lipids**, New York: Marcel Dekker, 2002. 479-527p.
- SACCHI, R.; ADDEO, F.; GIUDICIANNI, I. e PAOLILLO, L. Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high resolution ¹³C-NMR of the carbonyl region. **Italian Journal of Food Science**, n.2, p.117-123. 1992.
- SATHIVEL, S. Thermal and flow properties of oils from salmon heads. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.82, n.2, p.147-152. 2005.
- SCHMID, U.; BORNSCHEUER, U.T.; SOUMANOU, M.M.; MCNEILL, G.P. e SCHMID, R.D. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.75, n.11, p.1527-1531. 1998.
- SCHMID, U.; BORNSCHEUER, U.T.; SOUMANOU, M.M.; MCNEILL, G.P. e SCHMID, R.D. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.64, n.6, p.678-684. 1999.
- SEIBEL, N.F. e SOUZA-SOARES, L.A.DE. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p.333-337. 2003.
- SGARBIERI, V.C. e PACHECO, M.T.B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1,2, p.7-19. 1999.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q. e SYNOWIECKI, J. Functional fish protein hydrolysates. In: Shahidi, F., Jones, Y. e Kitts, D. D. **Seafood safety, processing, and biotechnology**, Lancaster: Technomic, 1997. 243-248p.
- SHAHIDI, F. e SHUKLA, V.K.S. Nontriacylglycerol constituents of fats, oils. **INFORM**, v.7, n.11, p.1227-1232. 1996.
- SHIMADA, Y.; A.SUGIHARA; NAKANO, H.; NAGAO, T.; SUENAGA, M.; NAKAI, S. e TOMINAGA, Y. Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.83, n.4, p.321-327. 1997.
- SHREVE, R.N. e BRINK JR., J.A. **Indústrias de Processos Químicos**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980.
- SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and growth and development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.438-463. 1991.
- SIQUEIRA, F.M.; OETTERER, M. e REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Nutrientes antioxidantes. **Boletim da SBCTA**, v.31, n.2, p.192-199. 1997.
- SOCCOL, M.C.H. e OETTERER, M. Seafood as functional food. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.3, p.443-454. 2003.
- SOLOMONS, G. e FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.
- STANSBY, E.M. **Fish Oils in Nutrition**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990.
- STEIN, J. Chemically Defined Structured Lipids - Current Status and Future Directions in Gastrointestinal Diseases. **International Journal of Colorectal Disease**, v.14, p.79-85. 1999.
- TORRES, C.; LIN, B. e HILL, JR., C.G. Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues. **Biotechnology Letters**, v.24, p.667-673. 2002.

- TURATTI, J.M. Os lipídios na alimentação humana. **Engenharia de Alimentos**, n.33, p.23-26. 2000.
- TURON, F.; BACHAIN, P.; CARO, Y.; PINA, M. e GRAILLE, J. A direct method for regiospecific analysis of TAG using α -MAG. **Lipids**, v.37, n.8, p.817-821. 2002.
- TURON, F.; RWABWOGO, B.; BARÉA, B.; PINA, M. e GRAILLE, J. Fatty acid composition of oil extracted from Nile perch (*Lates niloticus*) head. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.717-722. 2005.
- UNDELAND, I.; HÄRRÖD, M. e LINGNERT, H. Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). **Food Chemistry**, v.61, n.3, p.355-365. 1998.
- USP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - USP. Versão 4.1. 1998. Disponível em: www.fcf.usp.br/tabela. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.
- VERSLEIJEN, M.; ROELOFS, H.; PREIJERS, F.; ROOS, D. e WANTEN, G. Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. **Clinical Nutrition**, v.24, p.822-829. 2005.
- VESSBY, B. Implications of Long-Chain Fatty Acid Studies. **Inform**, v.5, n.2, p.182-185. 1994.
- VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. e OETTERER, M. Uso do óleo de palma em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.31, n.2, p.186-191. 1997.
- VISENTAINER, J.V.; CARVALHO, P.O.; IKEGAKI, M. e PARK, Y.K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.90-93. 2000.
- WANASUNDARA, U.N. e SHAHIDI, F. Biotechnological methods for concentrating omega-3 fatty acids from marine oils. In: Shahidi, F., Jones, Y. e Kitts, D. D. **Seafood safety, processing, and biotechnology**, Lancaster: Technomic, 1997. 225-233p.
- WANASUNDARA, U.N. e SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v.63, n.3, p.335-342. 1998.
- WARD, O.P. Microbial Production of Long-chain PUFAs. **Inform**, v.6, n.6, p.683-688. 1995.
- WILLIS, W.; LENCKI, R.W. e MARANGONI, A.G. Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.8, p.639-674. 1998.
- WONGKASUL, S.; HKITTIKUN, A. e BORNSCHEUER, U.T. Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Triacylglycerides from 1,3-Diacylglycerides. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.81, p.151-155. 2004.
- WONGSAKUL, S.; HKITTIKUN, A. e BORNSCHEUER, U.T. Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerides from 1,3-diacylglycerides. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.81, n.2, p.151-155. 2004.
- XU, X. Biocatalysis for lipid modifications. In: Dunford, N. T. e Dunford, H. B. **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**, Champaign: AOCS Press, 2004. 239-263p.
- XU, X.; BALCHEN, S.; HOY, C.-E. e ADLER-NISSEN, J. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.75, n.2, p.301-308. 1998.

- XU, X.; SKANDS, A. e AL., ET. Production of Structured Lipids by Lipase-Catalysed Interesterification in an Ultrafiltration Membrane Reactor. ***Biotechnology Letters***, v.22, p.1667-1671. 2000.
- YANG, T.; FRUEKILDE, M.-B. e XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. ***Food Chemistry***, v.92, p.101-107. 2005.
- YANG, Y.-C.; VALI, S.R. e JU, Y.-H. A Process for Synthesizing High Purity Monoglyceride. ***Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers***, v.34, n.6, p.617-623. 2003.

ADDIN

9 ANEXOS

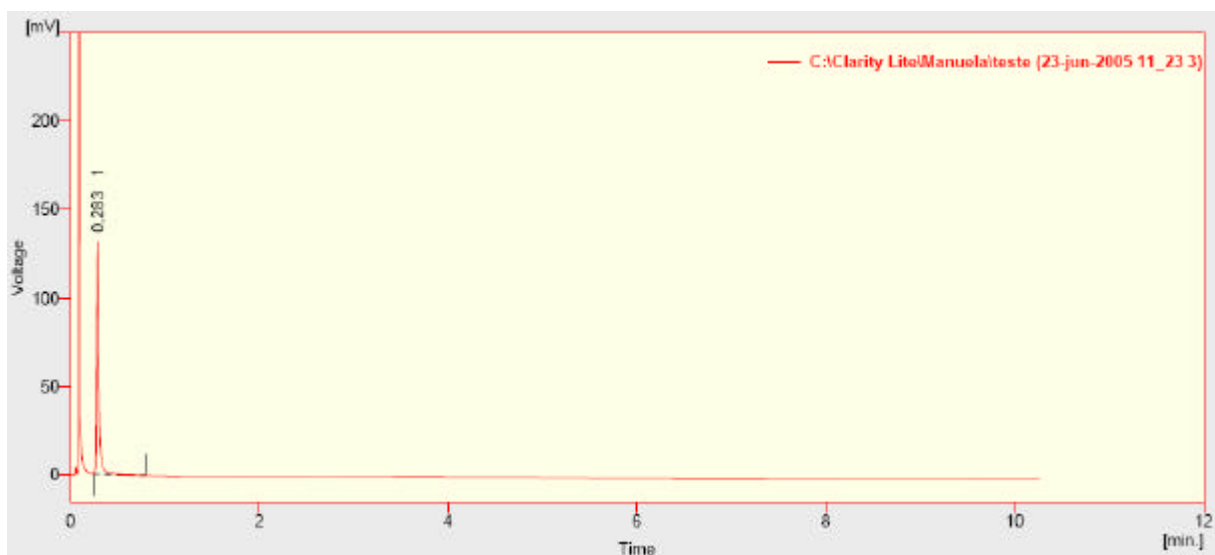


Figura 12 Cromatograma do éster metílico do ácido cáprico sintetizado conforme descrito no item 3.1.3.

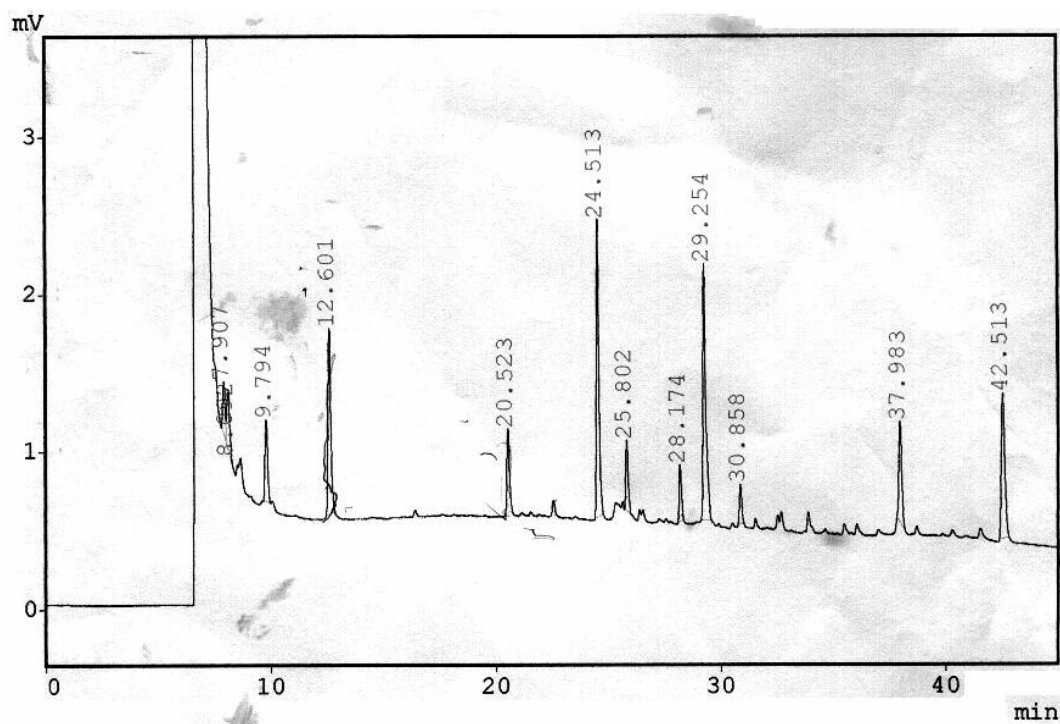


Figura 13 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com os triglicerídios de cadeia média Trigliceril® CM após a interesterificação química.

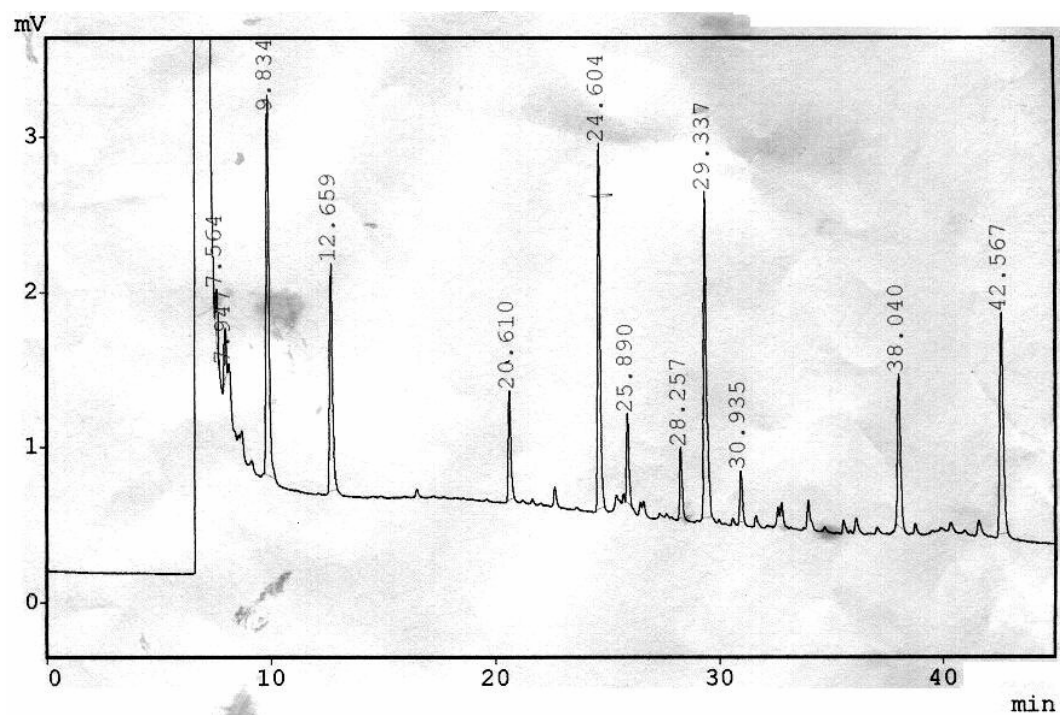


Figura 14 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com os triglicerídios de cadeia média Trigliceril® CM após a interesterificação enzimática.

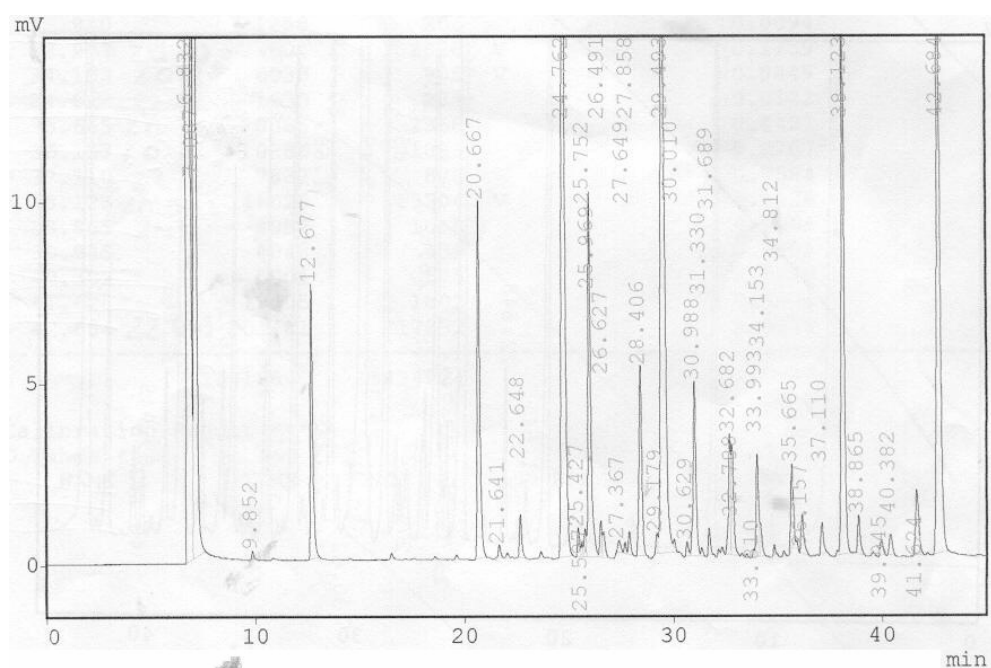


Figura 15 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com o éster metílico do ácido cáprico após a interesterificação química.

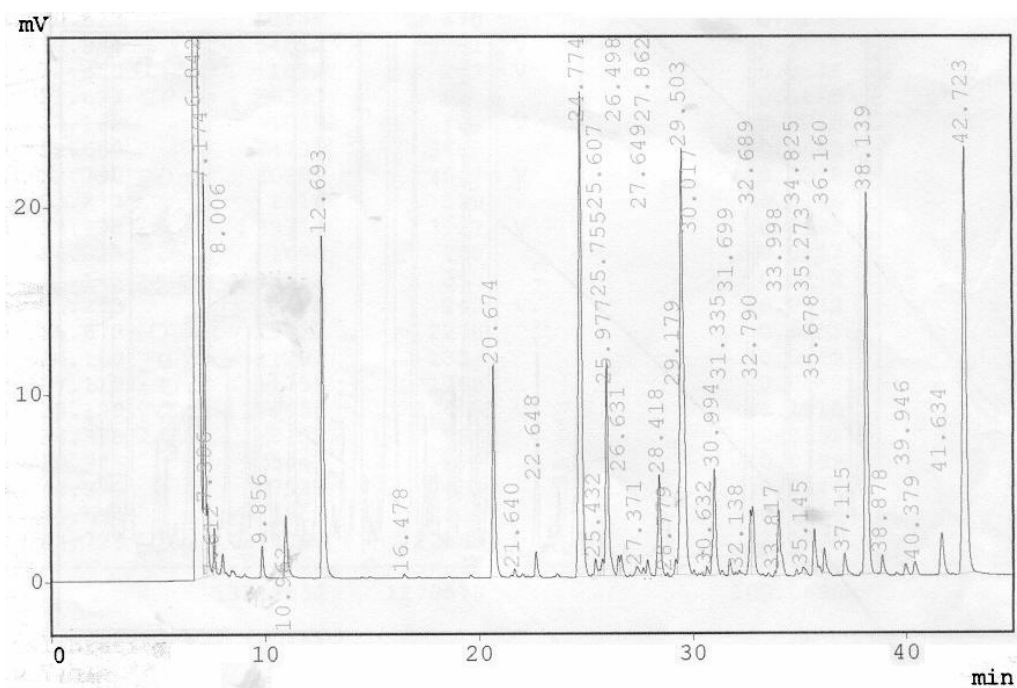


Figura 16 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de peixe ROPUFA® com o éster metílico do ácido cáprico após a interesterificação enzimática.

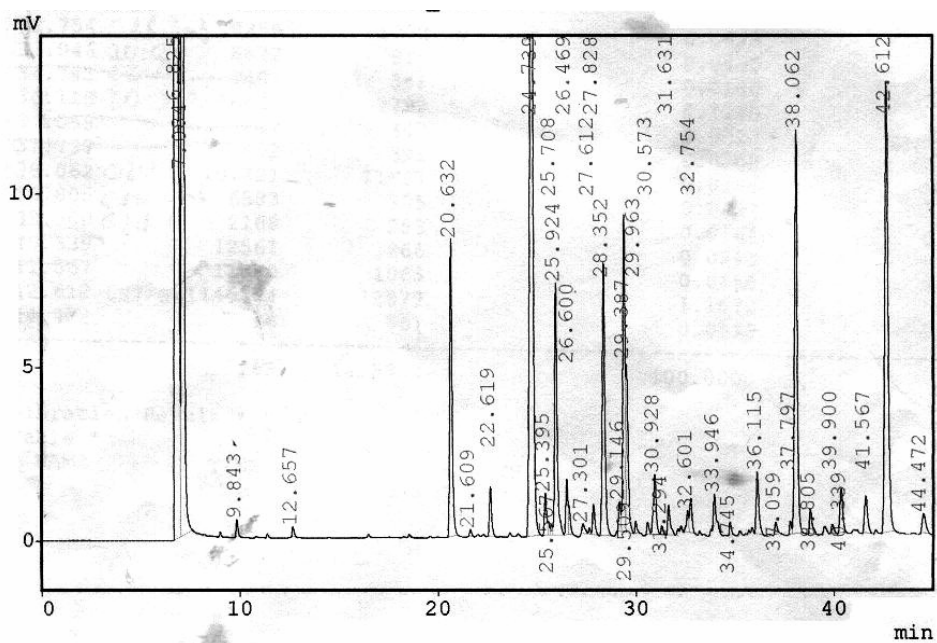


Figura 17 Cromatograma do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira extraído pela técnica de Bligh & Dyer.

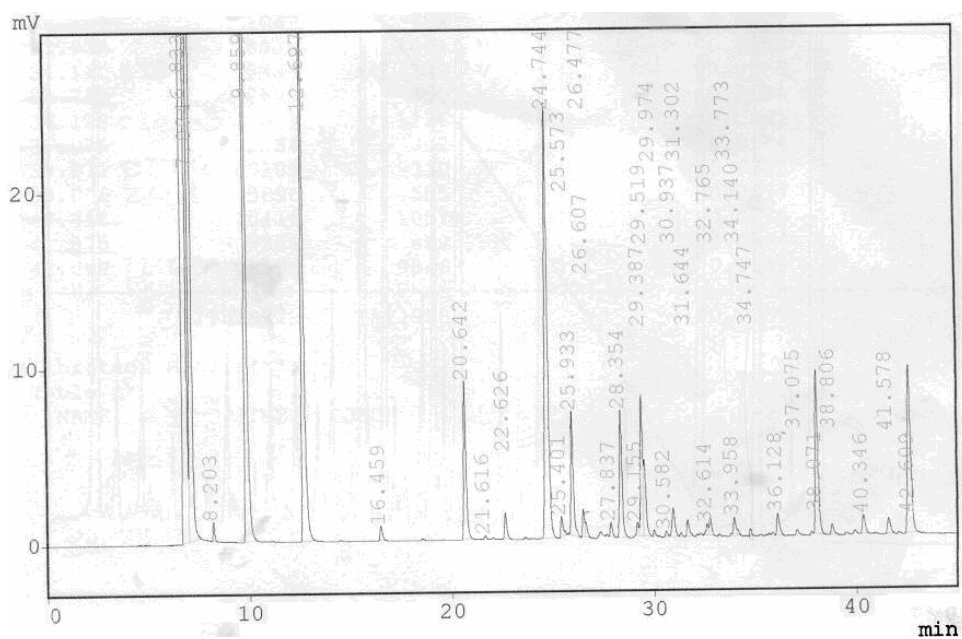


Figura 18 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira com os triglicerídios de cadeia média antes da interesterificação enzimática.

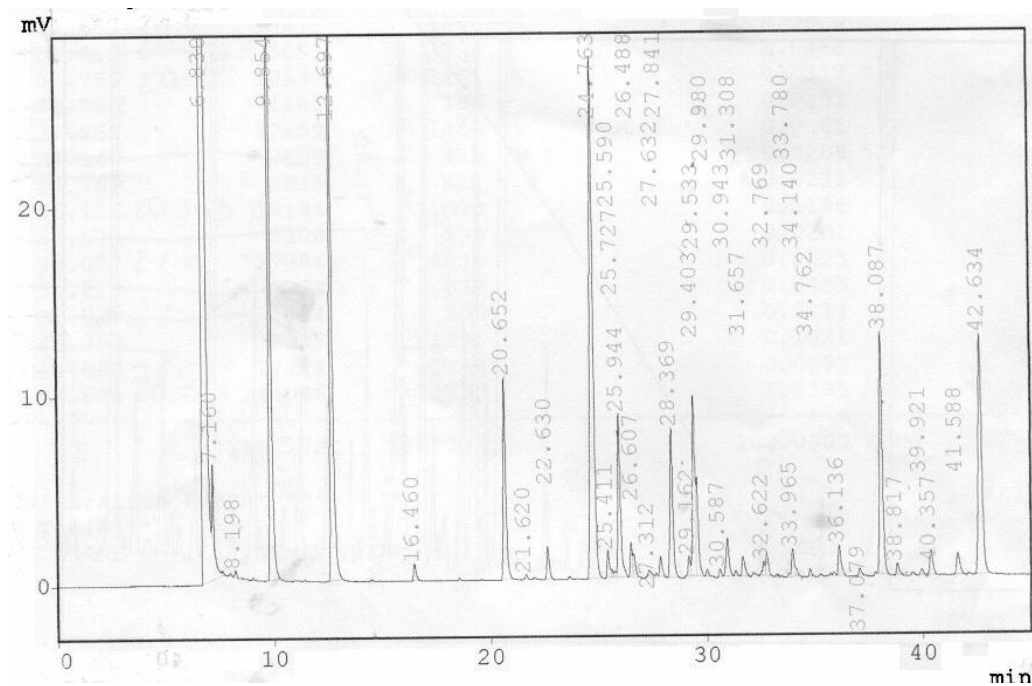


Figura 19 Cromatograma dos triglicerídios isolados da mistura do óleo de resíduos de sardinha-verdadeira com os triglicerídios de cadeia média após a interesterificação enzimática.