



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária / Instituto Superior de Agronomia

EFEITO DA PRESSURIZAÇÃO DA SEMENTE DE SOJA NO METABOLISMO RUMINAL DOS ÁCIDOS GORDOS

Andreia Alexandra Amora da Graça

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor José António Mestre Prates

VOGAIS

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e
Cunha

Doutora Susana Paula Almeida Alves

ORIENTADOR

Doutora Susana Paula Almeida Alves

CO-ORIENTADOR

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

2015

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária / Instituto Superior de Agronomia

EFEITO DA PRESSURIZAÇÃO DA SEMENTE DE SOJA NO METABOLISMO RUMINAL DOS ÁCIDOS GORDOS

Andreia Alexandra Amora da Graça

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA ZOOTÉCNICA – PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor José António Mestre Prates

ORIENTADOR

Doutora Susana Paula Almeida Alves

VOGAIS

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e

CO-ORIENTADOR

Cunha

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutora Susana Paula Almeida Alves

2015

Lisboa

*Aos meus pais, Idalina e António,
por toda a confiança e ajuda que sempre me
deram, e por tudo o que me têm
proporcionado.*

*Aos meus avós, in memoriam, por toda a
sabedoria da vida que me deixaram, pela
educação e pelo abraço sempre amigo e
orgulhoso.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem o contributo de diversas pessoas, às quais quero agradecer por toda a sua confiança e cooperação no meu percurso académico:

- À Doutora Susana Almeida Alves, minha orientadora, por todo o seu empenho e ensinamento prestados, pela sua disponibilidade, confiança e paciência. Foi para mim um suporte essencial no desenvolvimento desta dissertação, que sempre irei recordar. Um obrigado muito especial.
- Ao Professor Rui Branquinho de Bessa, meu co-orientador, pelo seu apoio e disponibilidade, pelos conselhos e chamadas de atenção durante o desenvolvimento de todo o trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Metabolismo Lipídico de Ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária, obrigada por toda a disponibilidade, esclarecimento e auxílio nas atividades laboratoriais.
- À Universidade de Aveiro pela responsabilidade do tratamento das sementes de soja por aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática.
- Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, independentemente do caminho que escolho seguir, apoiando-me em todas as minhas decisões. Por todo o seu amor e carinho, mesmo estando neste momento, fisicamente, mais longe do que o desejado. Por toda a sua paciência, confiança e apoio. Também ao meu irmão por todas as suas opiniões, sempre encorajando tendo em conta as consequências das escolhas.
- Aos meus verdadeiros amigos, por estarem sempre ao meu lado, confiando a amizade, ainda que os quilómetros nos possam separar fisicamente, nunca me esqueço de vocês.

A todos o meu muito obrigado.

EFEITO DA PRESSURIZAÇÃO DA SEMENTE DE SOJA NO METABOLISMO RUMINAL DOS ÁCIDOS GORDOS

RESUMO

Os ruminantes representam uma importante fração na dieta da população, através dos seus produtos comestíveis: a carne e o leite. Estes produtos contém ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans*, que são produzidos pela biohidrogenação que ocorre no rúmen. Interessa portanto estudar sistemas que possam contornar esta ocorrência, de forma a melhorar a qualidade da carne e do leite, melhorando a nutrição humana.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da tecnologia de alta pressão, de acordo com diferentes níveis de pressão (P), tempo (T) e água (A), sobre a biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados de uma semente oleaginosa, a soja, durante a digestão ruminal.

Os resultados obtidos, através da simulação *in vitro* da digestão fermentativa com fluido ruminal e posterior análise de ácidos gordos por técnicas de cromatografia gasosa, são bastante promissores e sugerem que o tratamento das sementes sem adição de água e com pressões mais baixas, aumenta a proteção dos ácidos gordos polinsaturados da biohidrogenação, o que potenciará um aumento destes ácidos gordos nos produtos de ruminantes.

Estes resultados provam o interesse em continuar a investigar este tema, avaliando o comportamento de outras sementes oleaginosas usadas em alimentação animal, para poder chegar a conclusões sustentadas.

Palavras-chave: Ácidos Gordos, Biohidrogenação, Metabolismo Lipídico, Soja, Tecnologia de Alta Pressão

EFFECT OF SOYBEAN SEEDS PRESSURIZATION IN RUMINAL METABOLISM OF FATTY ACIDS

ABSTRACT

Ruminants represent an important piece in diet of the population, through its food products: meat and milk. These products contain saturated and *trans*-fatty acids, which are produced by biohydrogenation occurring in the rumen. In a way to improve quality of meat and milk, the study of these systems can change these occurrences, and therefore improving human nutrition.

The aim of this work was to study the effect of high-pressure technology, in biohydrogenation of the unsaturated fatty acids of an oilseed, in this case soybean, during the ruminal digestion, according to different levels of pressure (P), time (H) and water (A).

The obtained results, through in vitro simulation of fermentation digestion with ruminal fluid and posterior analysis of fatty acids, using gas chromatography techniques, are very promising and suggest that, the treatment of seeds without adding water and with low pressure, increases the protection of polyunsaturated fatty acids from biohydrogenation, which will enhance an increase of these fatty acids in ruminants products.

These results prove the interest on continuing to study this theme, assessing the behavior of other oilseeds used in animal feed, to get to sustained conclusions.

Keywords: Fatty Acids, Biohydrogenation, Lipid Metabolism, Soybean, High Pressure Technology

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	2
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	3
1. Lípidos: o que são?	4
1.1. Classificação dos lípidos	4
1.2. Ácidos Gordos.....	5
1.2.1. Ácidos Gordos Saturados	6
1.2.2. Ácidos Gordos Insaturados.....	7
1.2.3. Ácidos Gordos <i>Trans</i>	9
2. Sementes Oleaginosas na alimentação animal.....	10
2.1. Soja.....	11
3. Processamento de sementes na alimentação animal	13
3.1. Tratamentos Térmicos da Soja	14
3.1.1. Tratamentos sem extração do óleo	14
3.1.2. Tratamentos com extração do óleo	16
3.2. Tratamento de Alta Pressão Hidrostática.....	17
3.2.1. Mecanismo do Tratamento de Alta Pressão Hidrostática	18
3.2.2. Efeito do tratamento de Alta Pressão Hidrostática sobre a Soja	19
4. Metabolismo Lipídico Ruminal.....	21
4.1. Lipólise	22
4.2. Biohidrogenação.....	22
4.3. Síntese de novo.....	26
Capítulo 2: Materiais e Métodos	29
1. Sementes de Soja	30

2. Tratamento de Alta Pressão Hidrostática	30
3. Incubação <i>in vitro</i>	31
4. Análise dos Ácidos Gordos	33
4.1. Ácidos Gordos de Cadeia Longa	34
4.2. Ácidos Gordos Voláteis	36
5. Análise Estatística	38
 Capítulo 3: Resultados e Discussão	 41
1. Parâmetros da Fermentação Ruminal	42
1.1. pH.....	42
1.2. Ácidos Gordos Voláteis	43
2. Biohidrogenação	46
2.1. Ácidos Gordos de Cadeia Longa C18.....	46
2.2. Outros Ácidos Gordos de Cadeia Longa	50
 CONCLUSÃO e PERSPETIVAS FUTURAS	 53
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 55
 ANEXOS.....	 63
Anexo 1 – Nomenclatura dos ácidos gordos saturados e insaturados.....	64
Anexo 2 – Bactérias intervenientes na BH do Grupo A e do Grupo B.....	66
Anexo 3 – Procedimento para incubações <i>in vitro</i> com suco de rúmen.....	67
Anexo 4 – Identificação dos códigos das amostras do ensaio	68
Anexo 5 – Transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal	69
Anexo 6 – Determinação de AGV em incubações com suco de rúmen.....	71
Anexo 7 – Exemplo do Cromatograma dos AG de cadeia longa	73
Anexo 8 – Equações das Retas de Regressão dos AGV.....	78
Anexo 9 – Exemplo do Cromatograma dos AG voláteis.....	79

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - NOMENCLATURA IUPAC DOS ÁCIDOS GORDOS (EXEMPLOS)	6
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS DE ÓLEOS VEGETAIS.....	11
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEMENTE DE SOJA (%).....	12
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%MS) DA CASCA DE SOJA, FARELO DE SOJA E MILHO	12
TABELA 5 - PRINCIPAIS AG SINTETIZADOS PELO PROCESSO SÍNTESE DE NOVO.	26
TABELA 6 - AMOSTRAS ENVIADAS PELA UNIVERSIDADE DE AVEIRO PARA O ENSAIO	30
TABELA 7 – EFEITO DA ÁGUA (A), DA PRESSÃO (P) E DO TEMPO (T) NA CONCENTRAÇÃO DE AGV (EM MMOL/L) PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	45
TABELA 8 - EFEITO DA ÁGUA (A), DA PRESSÃO (P) E DO TEMPO (T) NA PROPORÇÃO DE AG DE CADEIA C18 DURANTE A DIGESTÃO FERMENTATIVA (% DO TOTAL DE C18).....	47
TABELA 9 – EFEITO DA ÁGUA (A) E DA PRESSÃO (P) NA SEMENTE DE SOJA POR ESTIMATIVA DA BIOHIDROGENAÇÃO E PRODUTOS BIOHIDROGENADOS	49
TABELA 10 - EFEITO DA ÁGUA (A), DA PRESSÃO (P) E DO TEMPO (T) NA CONCENTRAÇÃO DE AG DE ORIGEM MICROBIANA DURANTE A DIGESTÃO FERMENTATIVA (MG/G MS).....	51
TABELA 11 - NOMENCLATURA DOS AG SATURADOS	64
TABELA 12 - NOMENCLATURA DOS AG INSATURADOS.....	65
TABELA 13 - BACTÉRIAS RUMINAIS CAPAZES DE HIDROGENAR OS AGI EM C18 E PADRÕES DE BH OBSERVADOS	66
TABELA 14 - CÓDIGOS DAS AMOSTRAS DO ENSAIO	68

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PH DAS AMOSTRAS A1 (0H) E A19 (6H).....	42
GRÁFICO 2 - PH DAS AMOSTRAS D4 (0H) E D22 (6H)	42
GRÁFICO 3 - PH DAS AMOSTRAS J10 (0H) E J28 (6H).....	43
GRÁFICO 4 - PH DAS AMOSTRAS G7 (0H) E G25 (6H).....	43
GRÁFICO 5 - PH DAS AMOSTRAS P16 (0H) E P34 (6H).....	43
GRÁFICO 6 - PH DAS AMOSTRAS M13 (0H) E M31 (6H)	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO LÍPIDO.....	4
FIGURA 2 - EXEMPLOS DE ÁCIDOS GORDOS: C4:0 E C18:0	5
FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GORDOS SATURADOS, MONOINSATURADOS E POLINSATURADOS	7
FIGURA 4 - ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS OMEGA 3 E OMEGA 6.....	8
FIGURA 5 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÁCIDOS GORDOS - AGS, AGCIS E AGTRANS	9
FIGURA 6 - ESQUEMA GENÉRICO DO PROCESSAMENTO DE SEMENTES	13
FIGURA 7 - ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM <i>EXPPELLER</i>	16
FIGURA 8 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO POR SOLVENTE.....	17
FIGURA 9 – ESQUEMA DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA DESCONTINUO	19
FIGURA 10 - METABOLISMO LIPÍDICO RUMINAL	21
FIGURA 11 - PRIMEIRA ETAPA DA VIA PRINCIPAL DA BIOHIDROGENAÇÃO DO C18:2N-6 E C18:3N-3: ISOMERIZAÇÃO	23

FIGURA 12 - SEGUNDA ETAPA DA VIA PRINCIPAL DA BIOHIDROGENAÇÃO DO C18:2N-6 E C18:3N-3: HIDROGENAÇÃO	24
FIGURA 13 - VIAS DE BIOHIDROGENAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO E DO ÁCIDO LINOLÉNICO	25
FIGURA 14 - FORMULA GERAL DOS AG RAMIFICADOS: ISO E ANTEISO	26
FIGURA 15 - SÍNTESE DOS ÁCIDOS GORDOS DE CADEIA RAMIFICADA	27
FIGURA 16 - AMOSTRAS DE SOJA PRESSURIZADAS	31
FIGURA 17 – IDENTIFICAÇÃO DOS TUBOS	31
FIGURA 18 – PESAGEM DO ALIMENTO E DO SUBSTRATO	31
FIGURA 19 - PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO E MEDIÇÃO DE PH	32
FIGURA 20 - RECOLHA DO SOBRENADANTE	35
FIGURA 21- TRANSFERÊNCIA DA AMOSTRA PARA UM VIAL DE CG	35
FIGURA 22 - VIAIS DE CG ACONDICIONADOS	35
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DOS AG CADEIA LONGA DA AMOSTRA DE SOJA	35
FIGURA 24 - EQUIPAMENTO DE CG SHIMADZU	36
FIGURA 25 - VIAIS DE CG EM ANÁLISE	36
FIGURA 26 - AMOSTRAS PARA ANÁLISE DOS AGV	36
FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DOS AGV DA AMOSTRA DE SOJA	36

LISTA DE ABREVIATURAS

% – percentagem

°C – graus centígrados

μ – micro

a- – anteiso-

AG – ácido(s) gordo(s)

AGI – ácido(s) gordo(s) insaturado(s)

AGMI – ácido(s) gordo(s) monoinsaturado(s)

AGPI – ácido(s) gordo(s) polinsaturado(s)

AGS – ácido(s) gordo(s) saturado(s)

AGV – ácidos gordos voláteis

BH – biohidrogenação

BHP – produtos da biohidrogenação

BHT – butil-hidroxitolueno

C – carbono

c- – *cis*-

C18 – somatório de todos os ácidos gordos formados por cadeias com 18 carbonos

C18:1 – somatório de todos os isómeros octadecenóico, exceto o isómero *cis*-9

C18:2 – somatório de todos os isómeros octadecadienóico, exceto o isómero *cis*-9,*cis*-12

CG – cromatografia gasosa

CLA – *Conjugated Linoleic Acids* (isómeros conjugados do ácido linoleico)

CoA – coenzima A

DMA - dimetilacetais

EPM – erro padrão da média
g – grama
GB – gordura bruta
GL – glicerolípidos
GP – glicerofosfolípidos
h – hora
H – hidrogénio
i – iso-
ILCNC – *International Lipid Classification and Nomenclature*
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
IV – radiação infravermelha
kcal – quilocalorias
kg – quilograma
L – litro
LDL – *Low density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)
LMLR – Laboratório de Metabolismo Lipídico em Ruminantes
m – metro
mg – miligrama
min – minuto
ml – mililitro
mm – milímetro
mmol – milimole
MPa – mega Pascal
MS – matéria seca
N – azoto
O – oxigénio
P – fósforo
PK – poliquétidos
PR – prenóides
R² – coeficiente de determinação
rcf – *relative centrifugal force*
SL - Sacarolípidos
SP – esfingolípidos
ST – esteróis
t- – *trans-*
T – tempo
UI – unidade internacional
v/v – volume/volume

INTRODUÇÃO

Hoje em dia, existe uma grande preocupação por parte da sociedade com a qualidade dos produtos que consomem no seu dia-a-dia, nomeadamente com os produtos que podem trazer, a longo prazo, problemas de saúde, como por exemplo as gorduras de origem animal.

Os lípidos, conceito pouco consensual, integram uma variedade enorme de moléculas com comportamentos bastante diferenciados – os ácidos gordos. Estes, consoante a sua composição, podem ter efeitos benéficos na saúde, como é o caso dos ácidos gordos da família ómega-3 que têm um efeito benéfico sobre as doenças cardiovasculares, ou afetarem negativamente a saúde, por exemplo, o elevado consumo de alimentos ricos em ácidos gordos saturados pode prejudicar os níveis de colesterol das LDL.

Neste sentido, há um interesse crescente em modificar a estrutura dos ácidos gordos presentes nos alimentos de origem animal, nomeadamente na carne e no leite com origem em animais ruminantes, de forma a que através da alteração da alimentação destes animais poder alterar os compostos presentes nos seus produtos alimentares.

Estas alterações estão diretamente associadas a processos metabólicos que ocorrem nos ruminantes, nomeadamente ao metabolismo ruminal, onde por ação dos microrganismos presentes no rúmen, o alimento sofre digestão e conseqüentemente alteração das suas propriedades nutritivas. Este processo é designado de biohidrogenação. Quando a biohidrogenação ocorre, os ácidos gordos da dieta são modificados, tornando os ácidos gordos polinsaturados em ácidos gordos saturados. Contudo, quando o processo ocorre parcialmente, podem ser originados ácidos gordos monoinsaturados benéficos para a saúde humana. Desta forma, pretende-se que através de métodos de processamento alimentares se consiga proteger os ácidos gordos da biohidrogenação, ou que esta não ocorra na totalidade, para que sejam absorvidos no intestino delgado, maioritariamente, ácidos gordos que depois de depositados nos tecidos possam melhorar a qualidade da carne e do leite dos ruminantes.

Uma das matérias-primas bastante utilizada em alimentação animal, por ser rica em proteína e em ácidos gordos polinsaturados, é a semente oleaginosa de soja. Contudo, a soja requer um processamento antes de ser fornecida aos animais e, nesta dissertação, será estudada a semente de soja que foi sujeita a um tratamento de alta pressão hidrostática.

A aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática é uma técnica recente, mas já com resultados promissores na indústria alimentar, nomeadamente nos sumos de fruta. Este processamento tem merecido destaque por ser um processo atérmico, e portanto não alterar os nutrientes e as características sensoriais do produto, bem como prolongar a vida útil dos alimentos com segurança.

A estrutura desta dissertação inicia-se com a Revisão Bibliográfica, onde foi efetuada a contextualização teórica dos temas abordados, com ênfase na biohidrogenação e no processamento de sementes. A parte experimental foi dividida em Materiais e Métodos, onde foram descritas as metodologias utilizadas na execução do trabalho laboratorial, e em Resultados e Discussão, onde foram analisados os resultados, e tentou-se encontrar relações para os explicar, dado que este é um estudo preliminar e ainda são raros os trabalhos publicados deste tema. Por fim, nas Conclusões reuniram-se as principais ilações que foram retiradas dos resultados obtidos, e sugere-se uma continuidade na investigação deste tema, visto ser um assunto de interesse global (a carne e o leite são alimentos com elevado consumo em Portugal, e poder melhorá-los poderia levar a uma diminuição da incidência de doenças cardiovasculares que são uma das principais causas de morte).

OBJETIVO

Com o intuito de perceber a influência da pressão nos processos metabólicos dos ruminantes, é objetivo desta dissertação perceber qual o comportamento do metabolismo ruminal dos ácidos gordos perante um alimento que foi tratado por aplicação de alta pressão, concretamente, perceber de que forma os ácidos gordos se alteram, através da biohidrogenação.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1. Lípidos: o que são?

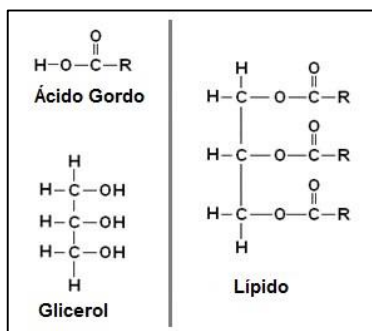
Não há ainda um consenso relativamente ao conceito de “lípidos”. Na verdade, os lípidos são biomoléculas formadas basicamente por Carbono (C), Hidrogénio (H) e Oxigénio (O), com uma vasta diversidade estrutural (Mota, 2009), o que dificulta a sua definição. Christie (1989), numa visão mais química, defende que os “lípidos são os ácidos gordos e os seus derivados, e substâncias relacionadas, funcional ou biossinteticamente, a estes compostos”. Numa perspetiva mais física, Kates (1986) afirma que os lípidos são “substâncias que são: (a) insolúveis na água; (b) solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, éter ou benzeno; (c) contém grupos de hidrocarbonetos de cadeia longa nas suas moléculas; e (d) estão presentes ou derivam de organismos vivos”.

Basicamente, os lípidos constituem um grupo heterogêneo de compostos, que desempenham funções biológicas de extrema importância, quer a nível estrutural – lípidos estruturais (exemplo: fosfolípidos na membrana celular) – quer como reserva energética – lípidos de reserva (exemplo: triglicéridos) (Albuquerque, 2009).

1.1. Classificação dos lípidos

Inicialmente, a classificação dos lípidos era baseada: nas propriedades físicas à temperatura ambiente, caracterizando os lípidos como líquidos (óleos) ou sólidos (gorduras); na sua polaridade – lípidos polares ou neutros. Nos lípidos neutros incluem-se os ácidos gordos (AG),

Figura 1-Estrutura do Lípido



ácilgliceróis, álcoois e esteróis, e nos lípidos polares têm-se os fosfolípidos e glicolípidos; e na sua estrutura, que parece ser a classificação mais indicada, onde os lípidos são categorizados como: lípidos simples ou complexos (Akoh & Min, 2008). Os lípidos simples contém apenas átomos de C, H e O, e da sua hidrólise resulta, geralmente, um ácido e um álcool – são exemplos, os AG e o glicerol (Figura 1) (Akoh & Min, 2008). Os lípidos complexos incluem os fosfolípidos e os glicolípidos, e

contém outros elementos na sua estrutura, como por exemplo, o Fósforo (P) ou Azoto (N). Na hidrólise de um lípido complexo podem produzir-se três ou mais compostos diferentes (Akoh & Min, 2008).

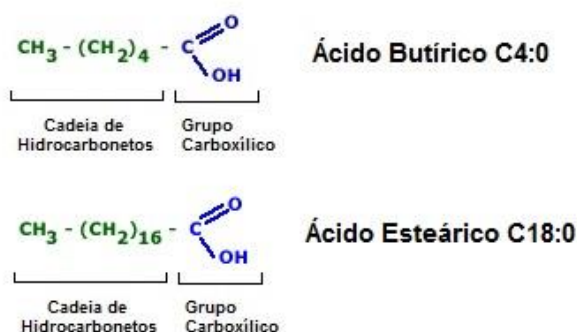
Posteriormente, em 2005, a International Lipid Classification and Nomenclature Committee (ILCNC) desenvolve um sistema de classificação de lípidos, denominado por “*Comprehensive classification system for lipids*”, baseado em princípios químicos e bioquímicos, usando uma ontologia extensível e flexível (Fahy *et al*, 2009). Esta classificação tem vindo a ser amplamente aceite e, basicamente, divide os lípidos em oito classes diferentes: Ácidos

Gordos (AG), Glicerolípidos (GL), Glicerofosfolípidos (GP), Esfingolípidos (SP), Esteróis (ST), Prenóides (PR), Sacarolípidos (SL) e Poliquétidos (PK) (Fahy *et al*, 2009). Dentro de cada uma destas classes, os lípidos estão organizados em subclasses de acordo com a sua composição.

1.2. Ácidos Gordos

Através dos métodos utilizados para classificação dos lípidos, abordados anteriormente, percebe-se que os ácidos gordos são o ponto de partida de qualquer estrutura lipídica.

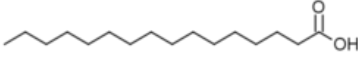
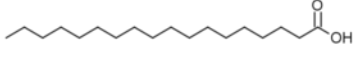
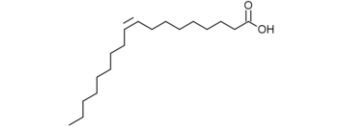
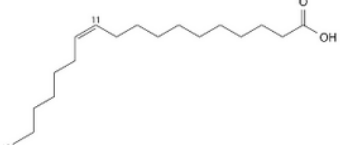
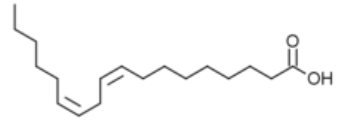
Figura 2 - Exemplos de Ácidos Gordos: C4:0 e C18:0



Os AG são ácidos monocarboxílicos, e como tal, caracterizam-se por possuírem uma cadeia de hidrocarbonetos com terminação num ácido carboxílico (Figura 2) e, dependendo do tamanho da cadeia, da posição das duplas ligações (AG saturados ou Insaturados) e da linearidade (cadeia linear ou ramificada), têm diferentes propriedades físicas e químicas e são classificados a partir delas (Moreira, Curi & Mancini, 2002). Em tecidos animais, o comprimento da cadeia pode ir dos 4 aos 24 átomos de C (Alves, 2011), mas o comprimento mais comum é de 16 e 18 (Albuquerque, 2009).

Relativamente à nomenclatura dos AG, existem diversos sistemas, contudo, qualquer designação deve identificar e descrever a estrutura química de forma clara, o que apenas é possível em nomenclaturas sistemáticas (Casal, 2010). A nomenclatura padrão foi definida pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), e nela são indicados o comprimento da cadeia hidrocarbonada, o número de ligações duplas existentes, a posição destas na cadeia (a contar do grupo carboxílico) e a sua configuração geométrica (*cis* (*c-*) ou *trans* (*t-*)) (Casal, 2010) (Tabela 1, página 6).

Tabela 1 - Nomenclatura IUPAC dos Ácidos Gordos (exemplos) (adaptado de Albuquerque, 2009).

Nome Comum	Estrutura	Nome IUPAC	Composição Química
Ácido Palmítico (C16:0)		Hexadecanóico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
Ácido Esteárico (C18:0)		Octadecanóico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
Ácido Oleico (C18:1 c9 ou C18:1n-9)		<i>cis</i> -9 octadecenóico	C ₁₇ H ₃₃ COOH
Ácido <i>cis</i> -Vacénico (C18:1 c11)		<i>cis</i> -11 octadecenóico	C ₁₈ H ₃₃ O ₂
Ácido Linoleico (C18:2 c9,c12 ou C18:2n-6)		<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 octadecadienóico	C ₁₇ H ₃₁ COOH

1.2.1. Ácidos Gordos Saturados

Os AG saturados (AGS) (ver anexo 1) apresentam uma estrutura onde todos os átomos de C se ligam apenas por ligações simples – C_x:0, onde x é o número de C existente na cadeia.

Os AGS obtêm-se, principalmente, na gordura de origem animal e produtos derivados, como por exemplo: gordura da carne, leite, manteiga, queijo e natas. Os alimentos de origem vegetal costumam ter uma menor quantidade de AGS, no entanto, as margarinas e manteigas produzidas com óleos vegetais, apresentam também quantidades significativas de AGS (Albuquerque, 2009). Os AGS presentes em maior quantidade na dieta são o ácido láurico (C12:0), o ácido mirístico (C14:0) e o ácido palmítico (C16:0), que perfazem entre 60% a 70% da totalidade dos AGS presentes (UNL, 2002).

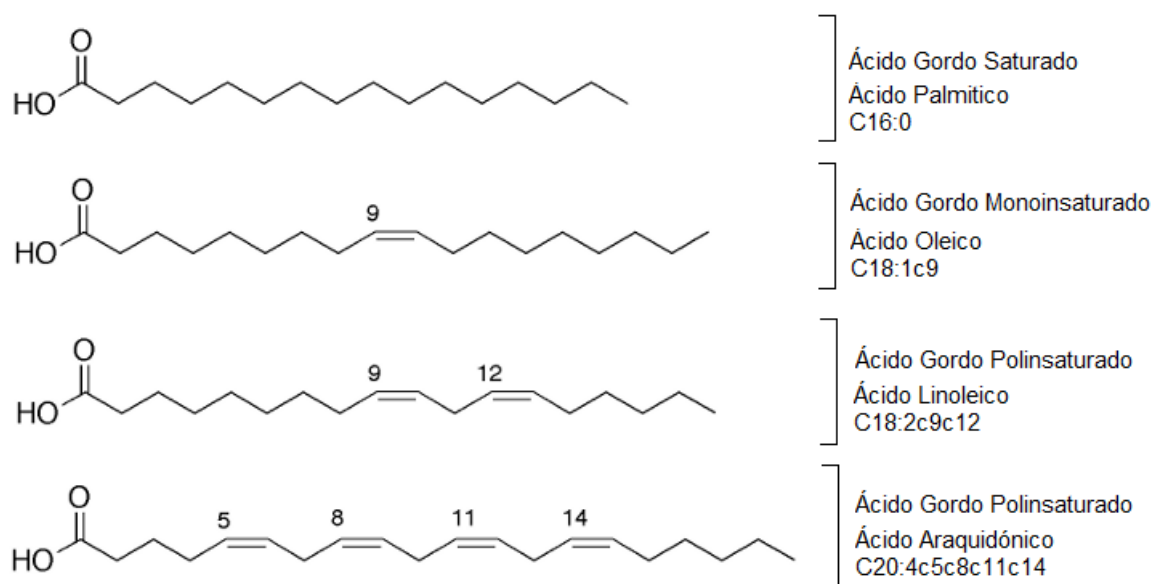
Os AGS requerem uma especial atenção porque influenciam negativamente o colesterol das LDL, o que contribui para o aumento do risco de doença cardiovascular – esta doença é responsável por uma grande percentagem da taxa de mortalidade em Portugal. As LDL são lipoproteínas de baixa densidade que são responsáveis pelo transporte do colesterol do fígado às células dos tecidos, e favorece a sua acumulação nas paredes internas das artérias,

diminuindo o fluxo do sangue, estando assim a influenciar negativamente a incidência de doenças cardíacas (Carrageta, 2008).

1.2.2. Ácidos Gordos Insaturados

Os AG insaturados (AGI) caracterizam-se por ter, pelo menos, uma ligação dupla na sua cadeia hidrocarbonada (Figura 3), e estas ligações podem ser *cis*, se os H estiverem do mesmo lado, ou *trans*, se os H se encontrarem em lados opostos. Os AG *trans* estão presentes em produtos industrializados, como por exemplo na margarina, e em excesso são tão ou mais prejudiciais que os AGS (Mendonça, 2012).

Figura 3 – Estrutura dos Ácidos Gordos Saturados, Monoinsaturados e Polinsaturados.



Os AGI podem ser divididos em dois grupos – os AG monoinsaturados (AGMI) e os AG polinsaturados (AGPI).

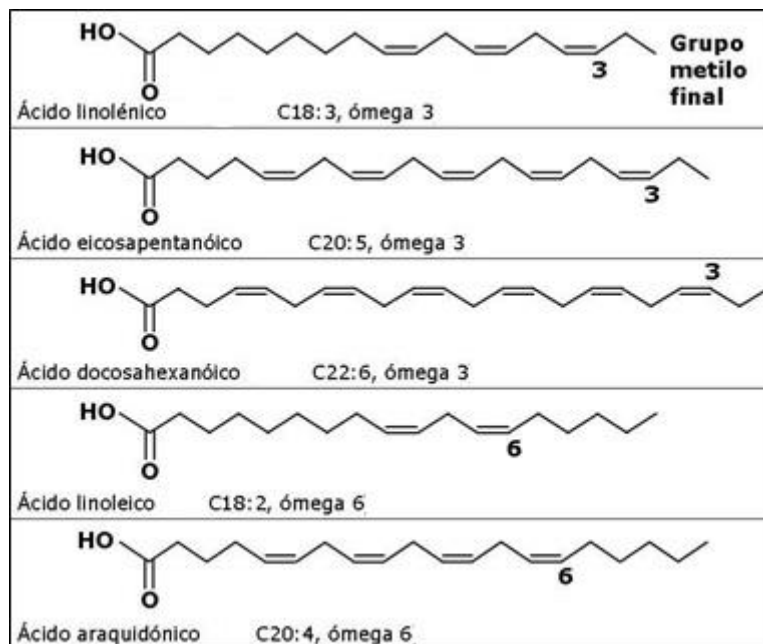
Os AGMI têm uma ligação dupla, logo representam-se por Cx:1, onde x representa o número de C existentes na cadeia. As principais fontes alimentares destes AG são o azeite e o óleo de colza. Os AGMI representam cerca de um terço dos AG da gordura da carne, e são a maior parte da gordura presente nos frutos secos e sementes (Albuquerque, 2009).

Os AGPI, estruturalmente, caracterizam-se por terem duas ou mais ligações duplas, e desempenham um papel muito importante em vários processos metabólicos do corpo humano. Dentro dos AGPI, existem AG essenciais (ácido linoleico e ácido linolénico) que têm

de ser ingeridos através da alimentação, uma vez que não conseguem ser sintetizados a partir de outras substâncias. Dentro dos AGPI existem duas grandes famílias metabólicas: AGPI Omega 3 e AGPI Omega 6 (Candeias *et al*, 2005; Albuquerque, 2009).

Os AGPI Omega 3, quimicamente, caracterizam-se por ter uma dupla ligação no terceiro átomo de C, a contar do radical metilo, como é o caso do Ácido Linolénico, Ácido Eicosapentanóico e Ácido Docosahexanóico (Figura 4).

Figura 4 - Ácidos Gordos Polinsaturados Omega 3 e Omega 6
(adaptado de EFIC, 2008)



Ao consumo adequado destes AG associa-se um melhor funcionamento do sistema cardiovascular, atuando na prevenção de doenças cardíacas e vasculares. Os AG ómega 3 estão também associados ao desenvolvimento do cérebro e das capacidades cognitivas da criança (Candeias, 2005; Martins, Suaiden, Piotto & Barbosa, 2008). Como fontes de Omega 3 tem-se, os óleos de peixes (salmão, arenque, sardinha, entre outros), as hortícolas de cor escura (brócolos, espinafres) (Candeias, 2005) e o óleo de linhaça (fonte rica em ácido linolénico) (Martins *et al*, 2008). É de referir que, embora seja raro, a ingestão de uma quantidade excessiva destes AG tem efeitos indesejáveis, como por exemplo, a alteração da coagulação sanguínea com possibilidade de hemorragias (Candeias, 2005).

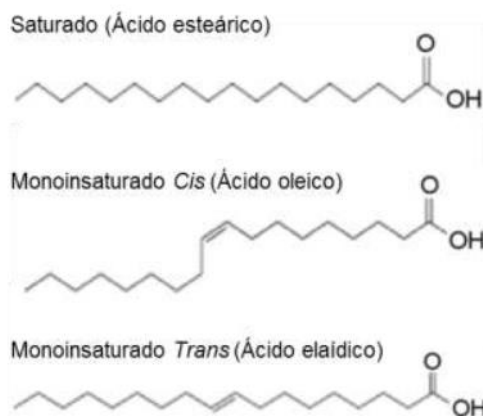
Os AGPI Omega 6, possuem a ligação dupla no sexto carbono a contar do grupo metilo (Figura 5), e são exemplos o Ácido Linoleico e o Ácido Araquidónico. Estes AG têm funções importantes no desenvolvimento cerebral, na estrutura das células, na proteção da pele, entre outras. As principais fontes de Omega 6 são os óleos vegetais (amendoim, soja, girassol,

entre outros), frutos oleaginosos, cereais integrais, sementes; e quando ingeridos em excesso, podem provocar o envelhecimento precoce da pele, indução do aparecimento de carcinomas, anomalias na multiplicação celular, entre outros (Candeias, 2005).

1.2.3. Ácidos Gordos *Trans*

As duplas ligações dos AGI podem ter uma configuração *cis* (é a forma mais comum na natureza) ou uma configuração *trans* (Albuquerque, 2009; Costa, 2014). Estruturalmente, os AG *trans* têm a cadeia mais linear do que os *cis*, resultando uma molécula mais rígida, à semelhança dos AGS (Figura 5).

Figura 5 - Comparação estrutural dos Ácidos Gordos - AGS, AG*cis* e AG*trans*
(Adaptado de Costa, 2014)



Os AG *trans* resultam de um processo designado de hidrogenação. A hidrogenação resulta de um processo onde são adicionados átomos de H nas duplas ligações dos AG, eliminando-as. Contudo, quando a hidrogenação é parcial, há conservação de algumas duplas ligações, e há formação de isômeros, por alteração da configuração *cis* para *trans* (Dijkstra, 2006).

Relativamente à origem, a hidrogenação pode ser natural ou industrial. Os AG *trans* de origem natural provém de animais ruminantes, que sofrem um processo de biohidrogenação durante a sua digestão, como veremos no ponto 4 (Metabolismo Lipídico), e que retêm os AG *trans* na sua carne e leite, posteriormente consumidos pelo Homem. Os de origem industrial (indústria alimentar) sofrem uma hidrogenação parcial forçada, com o objetivo transformar os óleos em gorduras com características de consistência e de manuseio necessárias para a função a desempenhar e aumentar a estabilidade oxidativa dos mesmos. Este processo torna os produtos mais rentáveis essencialmente porque, permite alterar a sua textura e consistência, melhorando as características físicas e sensoriais dos alimentos, e aumenta a vida útil dos produtos [Albuquerque, 2009; Costa, 2014].

Contudo, o consumo de AG *trans* está associado a efeitos prejudiciais à saúde, como por exemplo, estão associados ao aumento da inflamação sistêmica, aumento a trombogênese e redução da função endotelial – fatores que contribuem para o aumento do risco cardiovascular. Estudos científicos indicam que a um consumo de 4-5 gramas por dia de AG *trans* associa-se um aumento no risco de desenvolver doenças cardiovasculares de 23% a 25% (Mozaffarian *et al*, 2006).

No entanto, os AG *trans* de origem animal, derivados dos ruminantes, podem ser precursores de AG benéficos para a saúde, como por exemplo, o C18:1-*trans*11, que é precursor do ácido rumênico, comumente conhecido por CLA (ácido linoleico conjugado) – C18:2-c9,t11. Os CLA têm efeitos biológicos benéficos, como por exemplo, a sua ação anticarcinogénica e a sua ação reguladora do metabolismo lipídico (controlo de obesidade) e do sistema imunitário (Bessa, 2001; Silva, 2013; Figueiredo & Santos, 2003). Uma das formas de conseguir aumentar a concentração de CLA no leite ou carne de ruminantes passa por modificar a dieta dos animais (através da suplementação com óleos ricos em ácido linoleico, por exemplo o óleo de soja) e/ou alterar o metabolismo retículo-ruminal (Bessa, 2001; Bessa, 2002; Bessa, 2005).

2. Sementes Oleaginosas na alimentação animal

Já é de conhecimento que as dietas constituídas apenas por grãos de cereais e os seus subprodutos, não garantem a satisfação de todas as necessidades nutritivas dos animais (Andrighetto *et al*, 2002). Assim, houve necessidade de incrementar no alimento, matérias-primas diferentes para combater as carências energéticas. Essas matérias-primas podem ser de origem animal ou de origem vegetal, contudo, ambas nutricionalmente bastante ricas, como por exemplo, as sementes oleaginosas.

As sementes oleaginosas e os seus subprodutos são uma matéria-prima de origem vegetal comumente usada na formulação de rações, e desempenham um papel fulcral na alimentação de animais, visto que são ótimas fontes proteicas e lipídicas (Andrighetto *et al*, 2002) – estas sementes contêm geralmente teores de lípidos entre 20 e 45% da matéria seca (Bessa, 2001). Na maioria dos casos, esta suplementação é feita através da inclusão do óleo destas sementes no alimento concentrado, e são exemplos a soja, o algodão, o girassol, a linhaça, entre outros (Tabela 2, página 11).

Tabela 2 - Composição de ácidos gordos de óleos vegetais

Semente	Ácidos Gordos Saturados		Ácidos Gordos Polinsaturados			Referência
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
Soja	11,35	4,15	25,30	50,60	8,20	Andriquetto <i>et al</i> , 2002
	9,63	4,38	23,44	52,92	7,60	Zambiasi <i>et al</i> , 2007
	11,60	2,50	21,10	52,40	7,10	Berk, 1992
	7,0 - 11,0	2,0 - 6,0	22,0 - 34,0	43,0 - 56,0	5,0 - 11,0	Chempro, 2014
Girassol	8,36	5,03	27,65	56,30	2,06	Andriquetto <i>et al</i> , 2002
	5,76	4,76	16,86	70,69	0,28	Zambiasi <i>et al</i> , 2007
	3,0 - 6,0	1,0 - 3,0	14,0 - 35,0	44,0 - 75,0	S/I	Chempro, 2014
Algodão	20,13	3,10	22,86	50,16	1,32	Andriquetto <i>et al</i> , 2002
	25,60	2,80	17,10	53,20	0,10	Bessa, 2001
	21,87	2,27	16,61	56,35	0,33	Zambiasi <i>et al</i> , 2007
	20,0	2,0	35,0	42,0	S/I	Chempro, 2014
Linhaça	7,23	3,69	17,20	10,00	36,61	Marques, 2008
	6,58	4,43	18,51	17,25	53,21	Popa <i>et al</i> , 2012
	4,0 - 7,0	2,0 - 5,0	12,0 - 34,0	17,0 - 24,0	35,0 - 60,0	Chempro, 2014
Amendoim	11,42	2,82	41,69	38,46	1,17	Fonseca & Gutierrez, 1974
	9,40	2,65	48,71	31,06	0,23	Zambiasi <i>et al</i> , 2007

Unidades dos AG: % do total AG

Nota: C16:0 – Ác.Palmitico; C18:0 – Ác.Esteárico; C18:1 – Ácido Oleico; C18:2 – Ác.Linoleico; C18:3 – Ác.Linolénico; S/I – Sem informação

2.1. Soja

A soja (*Glycine max*) é a planta, da família das leguminosas, mais cultivada a nível mundial (Silva *et al*, 2011), sendo os Estados Unidos da América o maior produtor (45%) (Berk, 1992; Siva, 2004), e é das sementes oleaginosas mais utilizadas na alimentação animal (Andriquetto, 2002).

Em termos de composição química (Tabela 3, página 12), é uma planta bastante rica em proteína de alto valor biológico (tem um excelente equilíbrio em aminoácidos), e possui elevada quantidade de lípidos, nomeadamente AGPI (Tabela 2) (Ibramugy & Chibale, 2013). Relativamente à composição mineral, os presentes em maior quantidade são potássio, cálcio e magnésio, e em menor quantidade são ferro, zinco e cobre (Berk, 1992).

Tabela 3 – Composição química da semente de Soja (%)

Semente	Proteína	Lípidos	Hidratos de Carbono	Cinza	Referência
Soja	40,00	20,00	35,00	4,9	Berk, 1992
	36,39	19,51	20,48	3,70	Patel <i>et al</i> , 2004
	36,49	19,94	30,16	4,87	Ibramugy &Chibale, 2013
	34,70	21,30	29,30	4,85	Silva, 2006

A soja tem diversas utilizações: da sua produção resulta cerca de 39% de grão, sendo a restante produção usada para a formação de palhas com potencial para alimentação de ruminantes. Da secagem do grão resulta o resíduo de limpeza de soja, um subproduto com um teor médio de 20% de proteína bruta, e da extração do óleo resulta a casca e o bagaço de soja, subprodutos capazes de substituir os grãos de milho (Tabela 4) (S.Thiago & Silva, 2003; Silva, 2004). Na maioria das vezes é aconselhado o tratamento térmico da soja porque reduz a degradação ruminal da proteína, aumentando a sua eficiência metabólica, visto que a proteína que não é degradada no rúmen é digestível no intestino (S.Thiago & Silva, 2003). No caso dos ruminantes, o uso da soja pode ser uma excelente alternativa para redução de custos de alimentação (Andrighetto, 2002), uma vez que conseguem ter um bom aproveitamento energético da casca de soja (Silva, 2004). Em animais monogástricos, é sempre aconselhado fazer-se o tratamento térmico da soja para inativar inibidores enzimáticos, que podem interferir na eficiência alimentar e bem-estar animal (Andrighetto, 2002; S.Thiago & Silva, 2003).

Tabela 4 - Composição química (%MS) da casca de soja, bagaço de soja e milho (adaptado de Silva, 2004).

	Casca de Soja	Bagaço de Soja	Milho
Matéria Seca	90,70	88,87	88,63
Proteína Bruta	9,99	51,41	8,87
Fibra Bruta	42,76	6,18	2,06
Cinza	4,47	6,39	1,15
Energia Bruta	4,03	4,64	4,36

É ainda de referir que a soja é uma ótima solução como matéria-prima em alimentação animal, principalmente desde que foi proibido o uso de suplementos proteicos de origem animal (S.Thiago & Silva, 2003). Estudos científicos têm vindo a demonstrar que a incorporação de óleo de soja pode ser uma excelente alternativa para produção de AG benéficos para a saúde, nomeadamente o ácido linoleico conjugado C18:2-c9t11, que é armazenado na carne e no leite dos ruminantes, e posteriormente consumido pelo Homem.

3. Processamento de sementes na alimentação animal

O processamento é uma etapa de transformação que ocorre após a colheita das sementes e tem como objetivos: manter a qualidade do produto (Vilela, s/d), controlar pragas ou doenças a que este possa estar sujeito durante o armazenamento (Machado, Waquil, Santos & Reichenbach, 2006) e efetuar alguma alteração das características da semente para torna-la mais benéfica na utilização na alimentação animal (Brasil, Vasconcelos, Morais *et al*, 2004). Focando nas sementes de soja, objeto de estudo desta dissertação, o seu processamento é imprescindível. No caso dos monogástricos (aves e suínos), a soja tem características anti-nutricionais que necessitam de ser alteradas, para não prejudicar a digestibilidade, nomeadamente a inibição da tripsina e das lectinas (Brasil *et al*, 2004; Newkirk, 2010; Moura, Canniatti, Souza & Dias, 2007). No caso dos ruminantes, o processamento da soja é efetuado com outro objetivo: reduzir a degradação da proteína no rúmen, para aumentar a proporção de proteína absorvida pelo intestino delgado, existindo um maior aproveitamento do alto valor proteico da soja (Newkirk, 2010; Jeremias, 2009). Estudos têm demonstrado que, níveis excessivos de proteína solúvel no rúmen geram um aumento de amoníaco e eleva o pH, favorecendo a formação de complexos insolúveis de cálcio e magnésio, o que leva a problemas de deficiência desses minerais (Jeremias, 2009). Outro processamento possível, para a semente de soja, é a extração do óleo para posterior incorporação em rações de animais (Newkirk, 2010).

Figura 6 - Esquema genérico do processamento de sementes

Colheita → Receção → Pré-Limpeza → Secagem → Limpeza → Calibração → Tratamento → Armazenamento

Regra geral, o processamento de sementes segue o esquema da Figura 6. A colheita é uma fase crítica do processo de transformação da semente, não só porque esta deve ser colhida no momento ideal (no caso da semente de soja deve ser colhida quando tem entre 14% e 16% de humidade) mas também devido aos danos mecânicos a que está sujeita (colheita automática) (Puignau, 1992). De seguida, as sementes são transportadas até à unidade de processamento onde se dá a receção e a pré-limpeza: nesta etapa, são removidas as impurezas grosseiras, através de peneiras de separação. Posteriormente, ocorre a secagem da semente: quando tem mais de 12,5% de humidade aconselha-se a secagem até atingir os 12% - em época de chuvas, as sementes de soja chegam a ser colhidas com 18% a 19% de humidade, sendo imprescindível a secagem (Vilela *et al*, s/d). Depois é feita uma nova limpeza, onde são removidas todas as impurezas leves, seguindo as sementes a uma etapa de calibração, onde são classificadas por tamanho (Neto *et al*, 2007). Por fim, efetua-se o

tratamento, se necessário (depende do fim a que se destina a semente) e finaliza-se com o armazenamento: este deve ser efetuado em ambiente controlado, onde a temperatura não deve ser superior a 25°C e a humidade relativa deve ser abaixo dos 70%, para diminuir a possibilidade de deterioração das sementes (Neto *et al*, 2007).

3.1. Tratamentos Térmicos da Soja

Os tratamentos térmicos são ótimas soluções para combater os inibidores de tripsina (proteínas que inibem as enzimas *proteases* do trato digestivo), favorecendo assim a digestão das proteínas em animais monogástricos, evitando a redução da eficiência alimentar, hipertrofia pancreática ou crescimento atrofiado (Newkirk, 2010; Moura *et al*, 2007). Tal como os inibidores da tripsina, também as lectinas têm uma resposta positiva aos tratamentos térmicos, reduzindo ou eliminando o efeito negativo na performance animal e utilização dos nutrientes: Mancini Filho *et al* (1979) obtiveram a inativação total da lectina de uma solução purificada de 475 miligramas de proteína por mililitro, quando esta foi submetida a uma temperatura de 90°C durante 5 minutos. Vários métodos para combater estes fatores anti-nutricionais têm sido desenvolvidos e testados. O tratamento a aplicar à semente de soja dependerá do uso a que esta se destina, da escala de produção e do custo de processamento (Newkirk, 2010).

Por outro lado, os tratamentos térmicos podem também induzir efeitos negativos sobre o alimento, nomeadamente a perda de nutrientes benéficos (Sucupira, Xerez & Souza, 2012). A temperatura elevada dos tratamentos térmicos provoca alterações físico-químicas, alterando a composição lipídica dos alimentos, como por exemplo a formação de isómeros de ácidos gordos insaturados ou da forma *trans*. Estas alterações vão influenciar a estabilidade oxidativa dos alimentos (Dias Filho, 2004). Concretamente, o tratamento térmico pode provocar a ativação da enzima *lipoxigenase* (enzima que catalisa a adição de oxigénio molecular aos AG), que origina a oxidação dos AGPI, nomeadamente o ácido linolénico, levando à produção de hiperóxidos lipídicos, que conferem sabor e odor desagradáveis (Sawazaki, Teixeira & Miranda, 1987; Oliveira, Piovesan, José, Barros, Dias & Moreira, 2006).

3.1.1. Tratamentos sem extração do óleo

Este método de tratamento é mais utilizado em unidades de transformação médias ou pequenas, devido aos elevados custos das etapas de produção do óleo de soja. Dentro deste

parâmetro, os principais tratamentos térmicos usados são: torragem (calor seco, calor húmido ou *Jet-sploder*), micronização e extrusão (Newkirk, 2010; Bellaver & Snizek, 2012).

A torragem consiste na exposição da matéria-prima a temperaturas elevadas durante um curto período de tempo (Newkirk, 2010), e pode ser efetuada de três formas:

- Por calor seco através de um torrador de tambor – tambor rotativo onde as temperaturas variam entre 110°C e 170°C. Este método é comum em pequenos produtores, mas é difícil conseguir o ponto de torragem ideal, pois este varia com a quantidade, tamanho e humidade da semente, o que altera o tempo de exposição ao tratamento (Bellaver & Snizek, 2012);
- Por calor húmido – as sementes são conduzidas por tubos onde é injetado o vapor, com baixa pressão de trabalho (processo semelhante à autoclavagem) (Bellaver & Snizek, 2012);
- Por *Jet-sploder* – a soja é transportada ao longo de um tubo perfurado onde é injetado ar a elevada temperatura (315°C) (Varga, 2014; Bellaver & Snizek, 2012). Neste processo, a semente não deve estar mais de um minuto sob ação desta temperatura, caso contrário o seu potencial nutritivo é reduzido, podendo mesmo ser inutilizada (Varga, 2014). Os parâmetros deste tratamento dependem do equipamento utilizado e do conteúdo de humidade da semente, e após a exposição à temperatura, as sementes devem ser rapidamente arrefecidas para interromper a desnaturação da proteína (Newkirk, 2010).

A micronização é um tratamento onde as sementes são transportadas num tapete rolante, passando numa câmara onde sofrem a incidência de radiação infravermelha (IV), como fonte de calor. A semente é sujeita, durante cinco a quinze minutos, à radiação IV com um comprimento de onda entre 1,8 a 3,4 microns (Newkirk, 2010; Bellaver & Snizek, 2012).

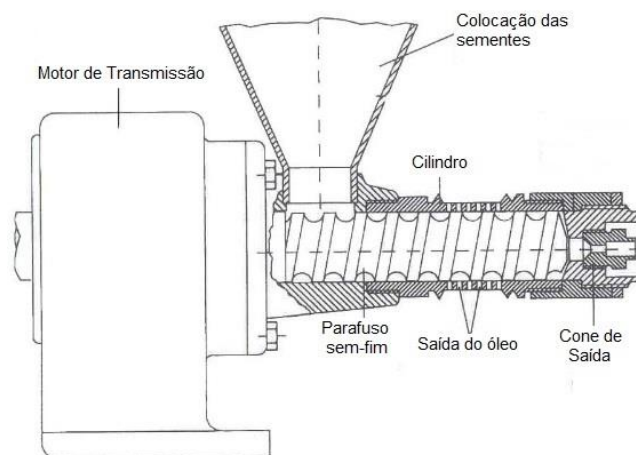
A extrusão consiste na aplicação de temperatura (130°C a 150°C) e alta pressão num curto período de tempo. Este processamento é um ótimo meio para eliminar os fatores anti-nutricionais, e como não envolve só tratamento térmico (recorre também à pressão), ocorre lise das paredes celulares da semente, contribuindo para o aumento da digestibilidade (Newkirk, 2010; Bellaver & Snizek, 2012).

3.1.2. Tratamentos com extração do óleo

Muitas vezes, é economicamente viável, conciliar o tratamento térmico com a extração do óleo das sementes, que pode ser usado na formulação de rações. Neste contexto, existem dois tipos de tratamentos que merecem destaque: a extração mecânica, mais utilizado por pequenas empresas transformadoras, e a extração por solvente, sendo este o processo mais utilizado na indústria de transformação, mas também o mais complexo, e por isso pouco viável em pequena escala (Newkirk, 2010; Bellaver & Snizek, 2012).

A extração por prensa mecânica contínua, também conhecida por *expeller* (Figura 7), consiste num cone onde são colocadas as sementes, que passam por um parafuso helicoidal dentro de um cilindro, que as movimenta para a frente e comprime-as ao mesmo tempo, fazendo com que o óleo esorra do cilindro, e o resíduo continue, sendo expelido pelo cone de saída. Este processo é feito pela força de um motor que faz rodar o parafuso sem-fim (Kurki, Bachmann & Hill, 2008; Pighinelli, 2010). A forma de tornar este processo mais eficiente é conseguir sementes com temperatura e teor de humidade ótimos, para conseguir obter um maior rendimento de óleo (Pighinelli, 2010).

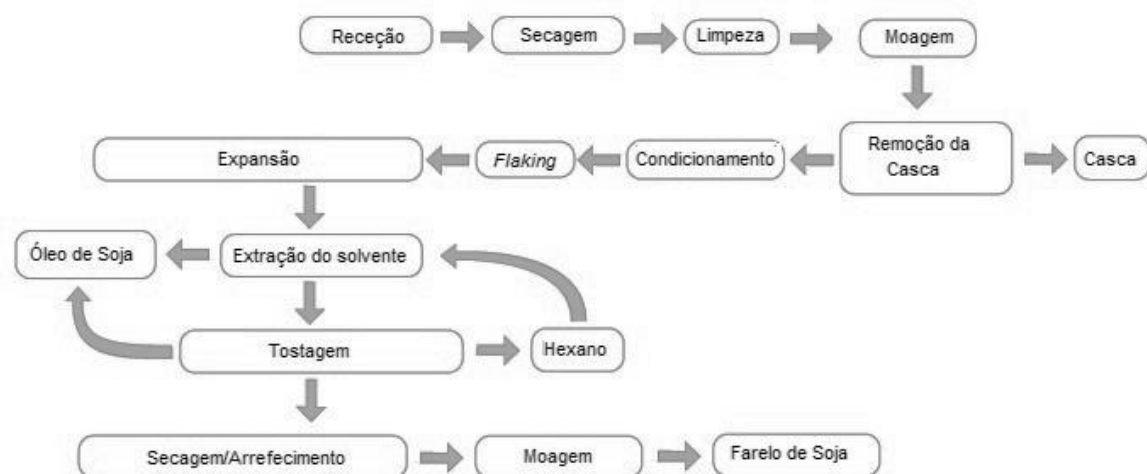
Figura 7 - Esquema de funcionamento de um *expeller* (adaptado de Kurki & Hill, 2008).



Por fim, o método de extração por solvente, que é usado apenas em larga escala devido ao elevado custo inicial de aquisição, complexidade de operações e risco de explosão devido aos solventes químicos usados, nomeadamente o Hexano (altamente inflamável) (Kurki & Hill, 2008). Este método envolve onze etapas diferentes (Figura 8, pagina 17): Secagem (as sementes passam por secadores com ventilação forçada), Limpeza (são removidas partículas

do solo, plantas, insetos ou outros contaminantes, através de ventiladores e peneiras vibratórias), Moagem (as sementes passam por um moinho de rolos), Remoção da casca (através de correntes de ar), Condicionamento (a soja é submetida a uma temperatura de 74°C para prevenir a transformação em farinha na próxima etapa), *Flaking* (a semente passa novamente num conjunto de rolos de aço rotativos, originando um floco de aproximadamente 0,3 milímetros de espessura, que permite que o solvente possa depois imergir todas as partes da semente), Expansão (por um processo de diferenças de pressão, irá tornar os flocos da semente mais porosos, facilitando a absorção do solvente), Extração do solvente (os flocos passam por uma corrente de hexano), Torragem (após a passagem do solvente é feito um aquecimento para evaporar todos os resíduos de hexano, e destruir os fatores anti-nutricionais da soja, mantendo a qualidade da proteína), Secagem/Arrefecimento (é feita uma correção da humidade da soja para 12%) e termina com a Moagem (com um moinho de martelos para garantir o tamanho uniforme das partículas de soja) (Newkirk, 2010).

Figura 8 - Esquema do processamento da Extração do óleo por solvente (adaptado de Newkirk, 2010).



3.2. Tratamento de Alta Pressão Hidrostática

A tecnologia de Alta Pressão Hidrostática é um processo de conservação atérmico, que tem vindo a ser cada vez mais utilizado em detrimento dos tratamentos térmicos, pois conseguem-se obter alimentos seguros (livre de microrganismos patogénicos) e de grande qualidade (não se verificam alterações nutricionais, sensoriais ou funcionais dos alimentos) (Rastogi, Raghavaro, Balasubramaniam, Niranjan & Knnor, 2007; Garriga, Aymerich, Monfort & Hugas, 2004; Campos, Dosualdo & Cristianini, 2003). Outras vantagens da utilização deste método são a redução da utilização de químicos (Téllez-Luis, Ramírez, Pérez-Lámela, Vázquez &

Simal-Gándarra, 2001), e o reduzido impacto ambiental - os resíduos produzidos são muito reduzidos, e o processo requer apenas água (que pode ser reutilizada) e eletricidade (Patterson, Ledward & Rogers, 2006).

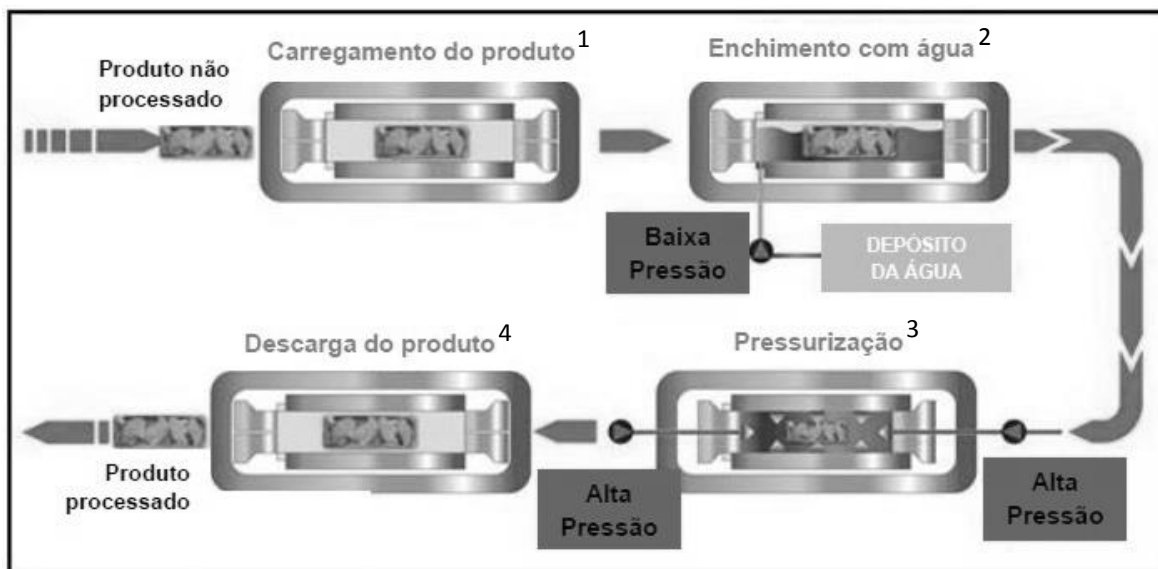
Nos alimentos, a alta pressão pode causar desnaturação das proteínas, solidificar lípidos e quebrar membranas biológicas, afetando a estrutura das proteínas, funcionalidade das enzimas (pressão superior a 300MPa pode causar a inativação de algumas enzimas irreversivelmente) e a gelatinização do amido (Tavares, Martins, Ferraz & Fernandes, 2010).

3.2.1. Mecanismo do Tratamento de Alta Pressão Hidrostática

Este método assenta em dois princípios gerais – Princípio de Le Chatelier e Lei de Pascal (Martins, 2014). O princípio de Le Chatelier afirma que qualquer reação química, mudança de conformação molecular ou transição de fase, é acompanhado por uma redução de volume que será favorecido em altas pressões, enquanto as reações de aumento de volume tendem a ser inibidas pela pressão (Tavares *et al*, 2010; Carvalho, 2014). A Lei de Pascal defende que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea a todo o produto, independentemente da sua forma e volume (Tavares *et al*, 2010; Carvalho, 2014). Nos tratamentos térmicos a lei de Pascal não se verifica, visto que o tratamento é dependente da convecção e condução do calor, logo o tratamento não consegue ser uniforme e imediato, e os resultados no produto são inferiores aos obtidos por tratamentos de alta pressão.

Relativamente ao método de tratamento, na indústria alimentar, o tratamento de alta pressão pode funcionar de forma semicontínua ou descontínua (Martins, 2014): a principal diferença entre estes dois processos é que no primeiro (semicontínuo) são processados alimentos líquidos não embalados, fazendo o tratamento de alta pressão parte do processo de produção – a pressão é exercida diretamente no produto (Patterson *et al*, 2006; Herrero & Avila, 2006) – enquanto, o segundo (descontínuo), é utilizado em alimentos sólidos ou líquidos pré-embalados, não existindo perigo de contaminação por partículas provenientes do equipamento ou do processamento (Télliez-Luis *et al*, 2001). O processo descontínuo (Figura 9, página 19) inclui uma câmara de pressão, um fluido de pressurização, responsável pela transmissão da pressão, e uma bomba para gerar a pressão (Patterson *et al*, 2006). O fluido mais utilizado é a água porque possui baixa compressibilidade e maior compatibilidade com o alimento, diminuindo assim o risco de contaminação (Martins, 2014). Este processo geralmente funciona em salas refrigeradas para que seja mantida uma temperatura entre os 10 °C e os 20 °C - abaixo dos 10 °C o processo é demasiado caro, e acima dos 20 °C podem existir efeitos térmicos sobre o alimento (Serra *et al*, 2007; Fulladosa, Serra, Gou & Arnau, 2009; Vercaemmen *et al*, 2011).

Figura 9 – Esquema de um Sistema de Tratamento de Alta Pressão Hidrostática Descontínuo (adaptado de Martins, 2014).
¹O alimento pré-embalado entra na câmara de pressão e esta é fechada; ²A câmara é preenchida pelo fluido de pressurização (água) e o ar é retirado por uma bomba de baixa pressão; ³Ação da alta pressão; ⁴A câmara é descarregada, e tem-se o produto tratado.



3.2.2. Efeito do tratamento de Alta Pressão Hidrostática sobre a Soja

A soja, como já mencionado, possui fatores antinutricionais que necessitam de ser modificados, onde os tratamentos térmicos são bastante eficazes. Segundo Torrezan *et al* (2010), os tratamentos de alta pressão são insuficientes para alterar, significativamente, estas características, e portanto é necessário conjugar os dois métodos de tratamento: térmico e alta pressão. Também Ven, Matser & Berg (2005), estudaram os tratamentos de alta pressão como inativação dos inibidores de tripsina em sementes de soja, e verificaram que para a inativação completa é necessário pressões muito elevadas (800 MPa) ou tratamentos combinados (60 °C/600 MPa). Apenas conseguiram a inativação de 90% dos inibidores aplicando uma temperatura entre 77 °C e 90 °C, e uma pressão entre 750 e 525 MPa, durante menos de dois minutos (Ven *et al*, 2005).

Relativamente aos microrganismos, existem várias respostas possíveis de acordo com a espécie em análise, uma vez que existem microrganismos que conseguem tolerar pressões até 100 MPa (Téllez-Luis *et al*, 2001). O tempo de exposição ao tratamento também é decisivo (Ghafoor, Al-Juhaimi & Park, 2011). As bactérias Gram-negativas são as mais sensíveis ao processamento de alta pressão hidrostática, seguidas das leveduras, bolores e bactérias gram-positivas. Os esporos e vírus são muito resistentes a este processamento (Smelt, 1998).

Essencialmente, para que este tratamento tenha sucesso na indústria alimentar, é necessário eliminar microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos e microrganismos patogénicos, de forma a prolongar o período de vida útil e garantir a segurança destes produtos (Martins, 2014).

Em relação à proteína, a alta pressão causa desnaturação das proteínas, desorganizando a sua estrutura, nomeadamente as suas ligações não covalentes (Martins, 2014). As ligações covalentes não são afetadas, sendo esta uma vantagem da utilização deste tratamento - os efeitos das reações de *Maillard* e o aroma a cozido não aparecem nos alimentos (há manutenção do sabor natural do produto) (Herrero & Avila, 2006). Esta alteração das proteínas pode ser questionada em alimentos ricos em proteína, como os ovos, carne ou peixe, mas por outro lado, pode também ser considerada benéfica por aumentar a digestibilidade de outros alimentos (Martins, 2014).

Quanto à fração lipídica, esta também é afetada pela alta pressão, por alteração do seu estado físico, com aumento do ponto de fusão e formação de cristais densos e estáveis - isto provoca alteração da estrutura dos lípidos, o que afeta a permeabilidade da membrana celular (Chefetel & Culioli, 1997). A pressão vai também induzir a oxidação lipídica (responsável pela diminuição da qualidade nutritiva dos alimentos), sendo ainda necessários mais estudos para esclarecer este acontecimento (Martins, 2014; He, Huang, Li, Qin, Wang & Yang, 2012). Estudos recentes têm explicado este acontecimento através da rutura das membranas, inativação de enzimas antioxidantes e libertação do ferro da mioglobina (Bolumar, Skibsted & Orlien, 2012). Mathias *et al* (2010), estudou as alterações oxidativas em produtos cárneos por alta pressão, e verificou que a oxidação lipídica do produto tratado a 400 MPa por 15 minutos à temperatura ambiente não diferiu significativamente da amostra controlo (por análise do índice de peróxido).

Em relação aos hidratos de carbono, poucos estudos existem deste parâmetro (Martins, 2014), sabendo-se que os monossacáridos não são alterados a níveis de pressão entre 100 e 1000 MPa (He *et al*, 2012). Os polissacáridos, como o amido, têm um papel importante na textura dos alimentos, e segundo Hugas *et al* (2002), os polissacáridos podem ser alterados pela alta pressão: a gelatinização do amido é promovida pela alta pressão.

Está claro que é necessário investigar com maior profundidade os efeitos destas novas técnicas de processamento de alimentos, a fim de perceber realmente que alterações ocorrem nos produtos pressurizados, e que benefícios podem trazer à alimentação humana.

4. Metabolismo Lipídico Ruminal

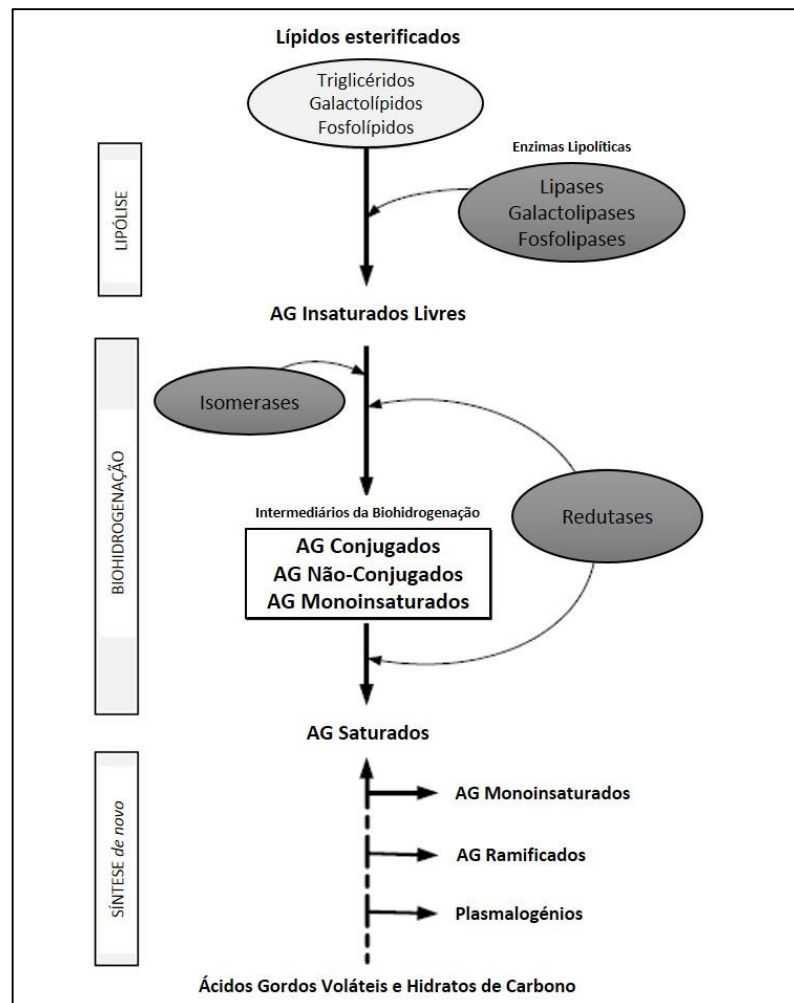
Nos ruminantes, após ingestão dos alimentos, os lípidos presentes são sujeitos a uma série de processos que ocorrem no ecossistema ruminal (Harfoot & Hazlewood, 1997). O estômago dos ruminantes é formado por quatro compartimentos distintos, onde nos primeiros três – rúmen, retículo e omaso – ocorre a digestão fermentativa, e no abomaso ocorre a digestão enzimática. Esta particularidade do sistema digestivo dos ruminantes permite-lhes aproveitar com maior eficiência os alimentos (Silva, 2013).

Os lípidos presentes na dieta são essencialmente derivados de forragens – onde se apresentam sob a forma de galactolípidos e outros glicolípidos ricos em C18:3 e fosfolípidos – e de alimentos compostos (cereais, bagaços de oleaginosas, entre outros) sob a forma de triglicéridos ricos em C18:2 (Alves, 2011; Bessa, 2001; Silva, 2013).

O metabolismo lipídico ruminal ocorre através dos seguintes processos microbianos: lipólise, biohidrogenação e síntese *de novo* (Figura 10) (Harfoot & Hazlewood, 1997), que serão abordados de seguida.

Figura 10 - Metabolismo Lipídico Ruminal (adaptado de Alves, 2011)

Nota: A linha tracejada da Síntese *de novo* significa que existem etapas intermediárias deste processo que não estão representadas na imagem.



4.1. Lipólise

A primeira fase da metabolização dos lípidos complexos (galactolípidos, fosfolípidos e triglicéridos) é a sua hidrólise com libertação de AG e das moléculas de suporte (glicerol e galactose, que são posteriormente metabolizados a AG voláteis) (Silva, 2013). A lipólise é um processo aparentemente rápido, e é bastante importante porque é o pré-requisito para a biohidrogenação dos AG insaturados, que só se efetua na presença do radical carboxílico livre (Alves, 2011; Bessa, 2001; Flevez *et al*, 2007; Buccioni *et al*, 2012; Maia, 2010).

A lipólise ocorre por ação de enzimas lipolíticas. No caso dos galactolípidos, as enzimas responsáveis pela hidrólise são as galactolipases, que podem ser de origem vegetal ou microbiana. Os fosfolípidos são degradados maioritariamente, por ação microbiana, visto que os ruminantes possuem um inibidor na saliva da principal fosfolipase vegetal – fosfolipase D. E, nos triglicéridos, a lipólise é igualmente rápida e completa – não são detetados di e monoglicéridos – ocorrendo por ação de lípases microbianas (Bessa, 2001). Os microrganismos com maior influência na lipólise são as bactérias, principalmente as bactérias anaeróbias do género *Butyrivibrio spp*, no caso dos galactolípidos e dos fosfolípidos, e as bactérias *Anaerovibrio lipolytica* no caso dos triglicéridos (Alves, 2011; Bessa, 2001; Buccioni *et al*, 2012).

Contudo, e apesar de essencial para a biohidrogenação, este processo origina a formação indesejada de AG saturados e AG *trans*, chegando uma menor quantidade de AGPI ao intestino delgado para serem digeridos e absorvidos (Harfoot & Hazlewood, 1997). Neste sentido, têm sido desenvolvidos vários estudos para controlar a extensão da lipólise, nomeadamente, por alteração do pH, presença de aditivos, natureza dos lípidos da dieta e tempo de retenção das partículas no rúmen (Bessa, 2001).

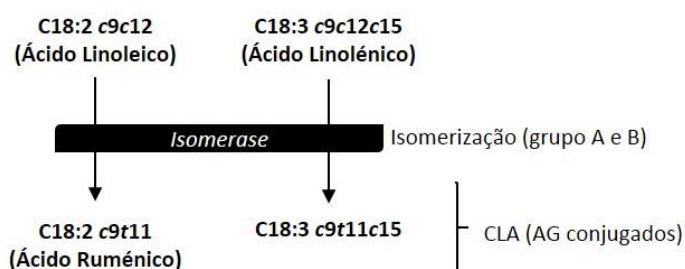
4.2. Biohidrogenação

A biohidrogenação é um processo natural que ocorre no rúmen, e que após a lipólise dos lípidos da dieta, e através de processos de isomerizações e hidrogenações, transforma os AG insaturados livres em AG saturados ou em compostos intermédios – Intermediários da Biohidrogenação – quando a hidrogenação não é completa. Este processo ocorre por ação dos microrganismos presentes no rúmen, maioritariamente pelas bactérias (Harfoot & Hazlewood, 1997).

A isomerização consiste em modificações da configuração geométrica (alteração *cis* para *trans*, ou vice-versa) e da posição de algumas duplas ligações – esta etapa pode levar à formação de ácidos gordos *trans*.

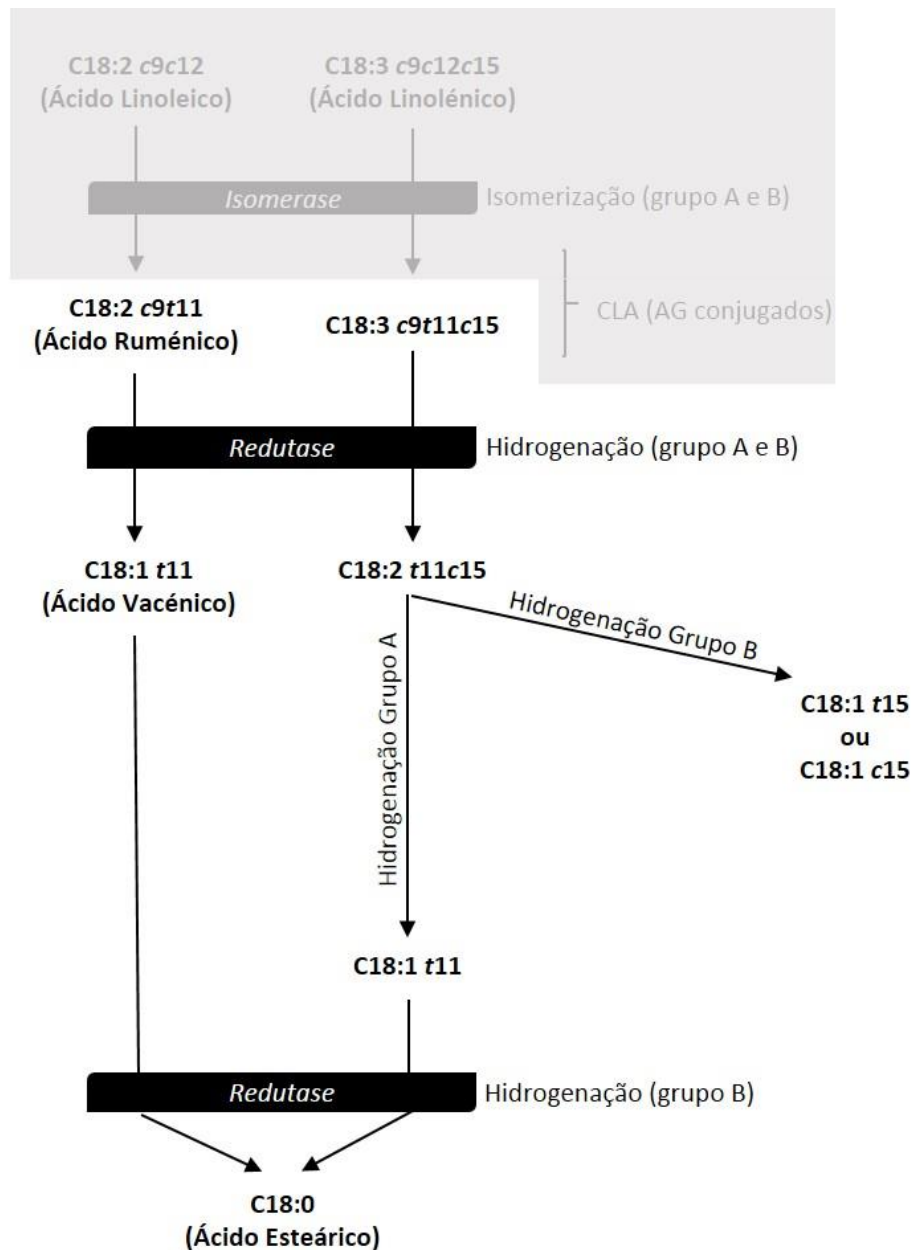
Uma das etapas da biohidrogenação conhecida há décadas, é a isomerização do ácido linoleico, C18:2-c9c12, e do ácido linolênico, C18:3-c9c12c15, catalisada por *isomerases*, com formação dos seus isómeros conjugados, respetivamente, C18:2-c9t,11 e C18:3-c9,t11,c15 (Figura 11), por migração da dupla ligação do C12 para o C11 (Harfoot & Hazlewood, 1997; Maia, 2010).

Figura 11 - Primeira etapa da via principal da Biohidrogenação do C18:2n-6 e C18:3n-3: Isomerização
(adaptado de Alves, 2011; Bessa, 2001; Maia, 2010)



Outra das etapas da biohidrogenação é a hidrogenação. Neste processo, os ácidos gordos insaturados são hidrogenados com formação de diversos isómeros. No caso do C18:2-c9t11 e do C18:3-c9t11c15, são catalisadas as hidrogenações das duplas ligações *cis*-9 e *cis*-15, resultando a formação do ácido *trans*-11 octadecenóico (C18:1-t11), e posterior formação do ácido esteárico, caso a biohidrogenação seja completa (Figura 12, página 24) (Bessa, 2001). Estudos científicos têm demonstrado a existência de duas populações distintas de bactérias – classificadas como bactérias do grupo A e do grupo B (ver anexo 2) – com capacidade de hidrogenar incompletamente os AG insaturados (sem formação do C18:0), ou com capacidade de realizar o último passo da biohidrogenação (formação do C18:0) (Harfoot & Hazlewood, 1997). A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* (grupo A) é a principal responsável pela biohidrogenação ruminal (Jenkins, Wallace, Moate & Mosley, 2008), no entanto para que a biohidrogenação do ácido linoleico ou do ácido linolênico seja completa, são necessários os dois tipos de bactérias, e neste processo podem ser produzidos inúmeros isómeros octadecadienóicos e/ou octadecenóicos, mesmo que ainda não se conheçam todas as vias e os microrganismos envolvidos na sua formação. Mais recentemente, foi proposta uma nova divisão dos grupos de bactérias suportada na taxonomia atual assente na sequenciação do 16S rRNA, onde todas as bactérias são relacionadas filogeneticamente com os *Butyrivibrios*: *Butyrivibrio proteoclasticus* (antigo grupo B) e as restantes incluem-se no antigo grupo A (Lourenço, Ramos-Morales & Wallace, 2010).

Figura 12 - Segunda etapa da via principal da biohidrogenação do C18:2n-6 e C18:3n-3: Hidrogenação
(adaptado de Alves, 2011; Bessa, 2001; Maia, 2010)

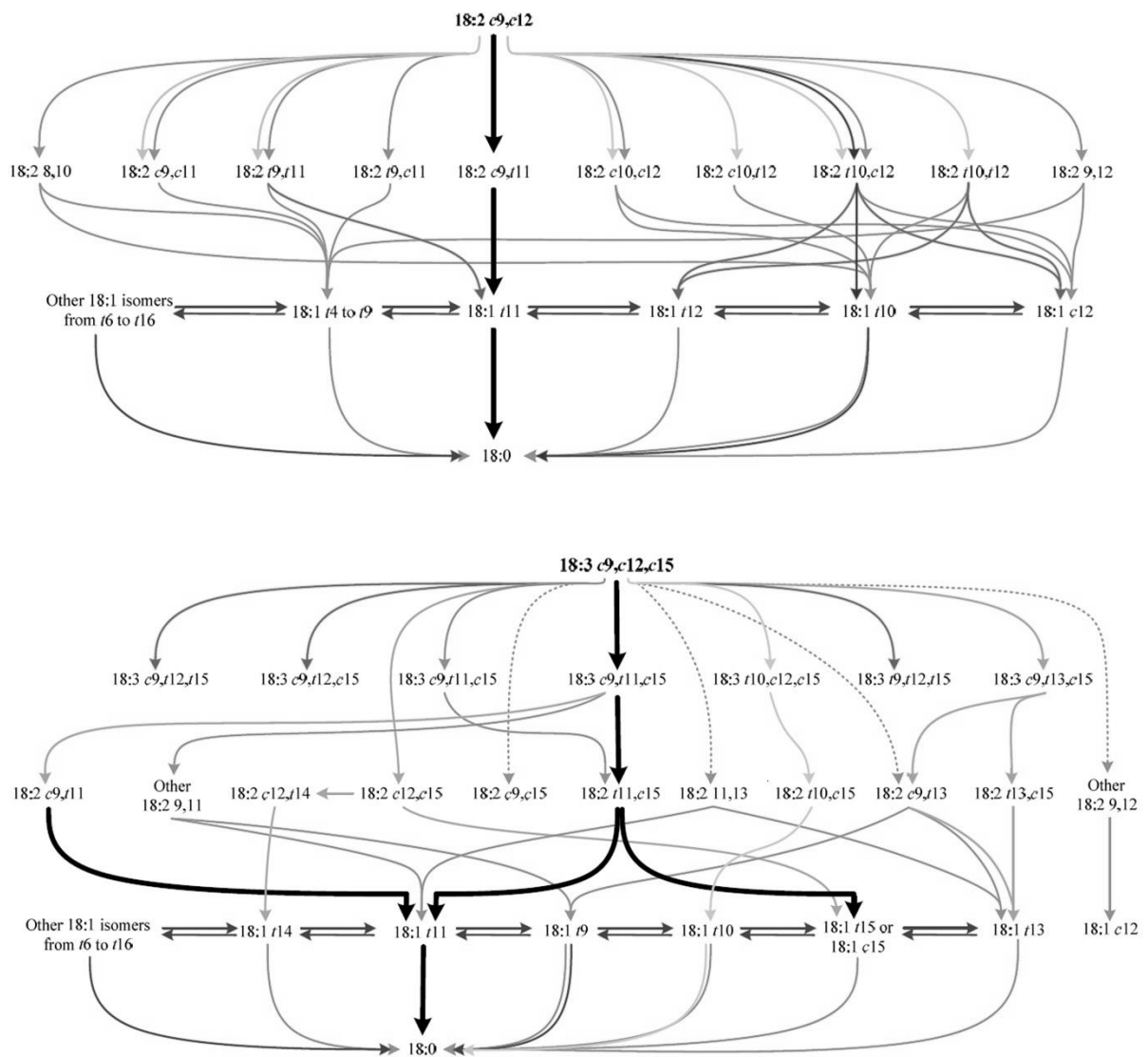


Relativamente aos Intermediários da Biohidrogenação, estes são os produtos que não são completamente hidrogenados, ou seja, não chegam a formar C18:0. Vários estudos têm demonstrado que alguns dos intermediários da biohidrogenação podem trazer benefícios à saúde humana, como por exemplo o C18:2-c9,t11. Desta forma, o estudo destes intermediários tem vindo a ganhar maior interesse por parte dos investigadores visto que, consoante a sua estrutura, podem ter uma ação biológica distinta, e assim através do consumo da carne e leite de ruminantes, produzir efeitos negativos ou benéficos na saúde humana (Alves, 2011).

Hoje já são conhecidos inúmeros intermediários da biohidrogenação (Figura 13), no entanto as suas vias metabólicas, microrganismos intervenientes e efeitos na saúde são ainda objeto de investigação (Bessa, s/d).

Figura 13 - Vias de Biohidrogenação do Ácido Linoleico e do Ácido Linolénico (adaptado de Maia, 2010)

Nota: As linhas a negrito representam as principais vias de biohidrogenação, já anteriormente referidas, e as restantes linhas representam vias propostas por diversos autores para explicar os intermediários da biohidrogenação.



4.3. Síntese *de novo*

Os lípidos complexos dos microrganismos ruminais refletem a extrema diversidade biológica deste ecossistema e são geralmente constituintes das membranas (Thompson, 1992). Estes lípidos microbianos são produzidos através de moléculas precursoras presentes na dieta dos ruminantes (como a glicose), e por isso a sua quantidade depende dessa mesma dieta e das espécies bacterianas presentes, que além de modificarem os AG dos alimentos, sintetizam (*síntese de novo*) uma serie de AG diferentes (Alves, 2011; Silva, 2013).

Os AG de cadeia impar (contendo 15 a 17 átomos de C) e/ou ramificada (Tabela 5) também podem ter origem neste processo da *Síntese de novo* (Alves, 2011; Silva, 2013).

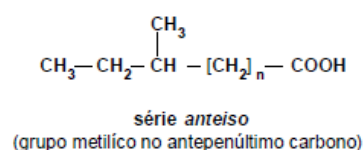
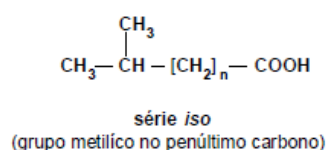
Tabela 5 - Principais AG sintetizados pelo processo *Síntese de novo*.

Ácido Gordo Nome comum	
iso-tetradecanóico	iso-C14:0
13-metiltetradecanóico	iso-C15:0
Pentadecanóico	C15:0
12-metiltetradecanóico	anteiso-C15:0
iso-hexadecanóico	iso-C16:0
Heptadecanóico	C17:0
15-metilhexadecanóico	iso-C17:0
14-metilhexadecanóico	anteiso-C17:0

Como mencionado, os lípidos provenientes de biossíntese cooperam na manutenção da fluidez das membranas, e essa regulação é muitas vezes conseguida através dos AG ramificados da série iso e anteiso (Figura 14), nomeadamente pelos ácidos 12- e 13-metiltetradecanóico (Alves,2011; Kaneda, 1991; Vlaeminck, Fievez, Cabrita, Fonseca & Dewhurst, 2006).

Figura 14 - Formula geral dos AG ramificados: iso e anteiso (adaptado de Bessa, 2001)

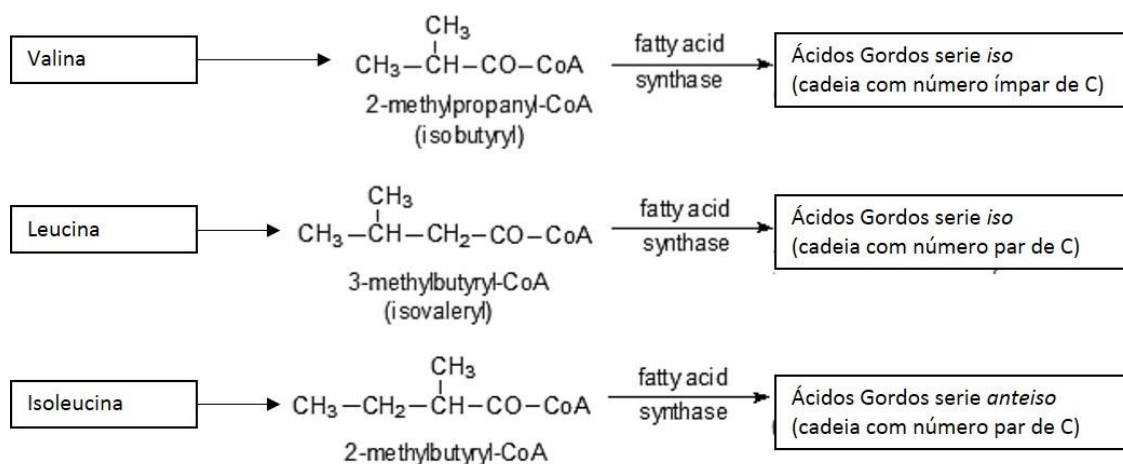
Nota: o grupo metilo é o responsável pela alteração da configuração



Nos AGS esta síntese tem como *primer* a Acetil-CoA e o alongamento é feito por condensações de malonil-CoA, sendo o ácido palmítico o produto final. Por outro lado, os AG ramificados das series iso e anteiso têm como primers AG voláteis ramificados (Kaneda, 1991), nomeadamente o 2-metilpropanato, 3-metilbutirato e 2-metilbutirato, que têm origem nos respetivos aminoácidos, a valina, leucina e isoleucina (Figura 15) (Salar, Gahlawat, Siwach & Duhan, 2014; Yumoto, 2013; Christie, 2014).

Relativamente aos AG insaturados, a síntese pelos microrganismos ruminais não é ainda bem conhecida, mas crê-se que apenas podem ser sintetizados a AG monoenóicos, nomeadamente C16:1-c9 e C18:1-c11 (Fulco, 1977).

Figura 15 - Síntese dos Ácidos Gordos de cadeia ramificada (adaptado de Christie, 2014).



Capítulo 2

Materiais e Métodos

1. Sementes de Soja

Para este estudo foram usadas sementes de soja adquiridas num supermercado em Portugal, da marca Próvida, com os seguintes dados nutricionais: em 100 g de produto tem-se 38 g de proteína, 20 g de lípidos, 22 g de hidratos de carbono, 4 g de fibra e um valor energético de 413 Kcal. Sobre os ácidos gordos nenhuma informação é facultada.

2. Tratamento de Alta Pressão Hidrostática

Interessa referenciar que, o tratamento de alta pressão das sementes de soja foi elaborado e da responsabilidade da Universidade de Aveiro.

Primeiro, as sementes foram separadas em seis porções de 30 g, e de seguida, cada porção foi termoselada e embalada sob vácuo em sacos de poliamida-polietileno (PA/PE-90, Albipack – Packaging Solutions, Portugal).

Depois, as amostras foram pressurizadas com e sem presença de água: para 30 g de amostra foram adicionados 50 mL de água, e as pressões aplicadas foram de 300 MPa e 500 MPa (Tabela 6), sendo a pressurização feita com recurso ao equipamento Hiperbaric 55 (Hiperbaric, Burgos, Espanha). Este equipamento tem uma camara de pressurização de 200 mm de diâmetro interno, 2000 mm de comprimento, uma pressão máxima de operação de 600 MPa e está conectado a uma unidade de refrigeração (RMA KH 40 LT, Ferroli, San Bonifacio, Italy) que permite o controlo de temperatura da água de entrada (a temperatura usada foi de 15 °C), utilizada como fluido de pressurização.

Por fim, as amostras pressurizadas foram enviadas para a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, devidamente acondicionadas, e foram armazenadas no frio (-20 °C).

Tabela 6 - Amostras enviadas pela Universidade de Aveiro para o ensaio

Amostra	Código da Amostra	Quantidade de Semente (g)	Adição de Água (mL)	Condição
1	A	30	-	Controlo
2	D	30	50	Controlo
3	G	30	-	300 MPa
4	J	30	50	300 MPa
5	M	30	-	500 MPa
6	P	30	50	500 MPa

3. Incubação *in vitro*

O ensaio *in vitro* envolveu 5 incubações independentes (réplicas) nos dias 7, 14, 17, 21 e 24 de Outubro de 2014. As incubações foram efetuadas no período de manhã no Laboratório de Metabolismo Lipídico em Ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Todo o material usado foi previamente aquecido em estufa a 39°C e o protocolo seguido encontra-se disponível em anexo (Anexo 3 – Procedimento para incubações *in vitro* com suco de rumem, Método LMLR-R5.1).

Preparação das amostras

As amostras foram retiradas do frio e deixadas em repouso (Figura 16) até atingir a temperatura ambiente, enquanto se efetuava a preparação do material. Na preparação de material foram identificados 24 tubos de incubação (Figura 17) (4 tubos para cada amostra, para posterior análise do pH e dos AG no tempo 0 e 6 horas) (ver anexo 4 – Identificação dos códigos das amostras do ensaio).

De seguida, numa balança analítica (Kern AEJ, Balingen, Germany), foram pesadas 30 mg de alimento (ração de borregos) e 30 mg de substrato (semente de soja triturada), diretamente no tubo de incubação (Figura 18), registando todos os pesos em tabela (tubo, substrato e alimento), e fechando os tubos para que não ocorressem perdas por oxidação.

Figura 16 - Amostras de Soja pressurizadas



Figura 17 – Identificação dos tubos

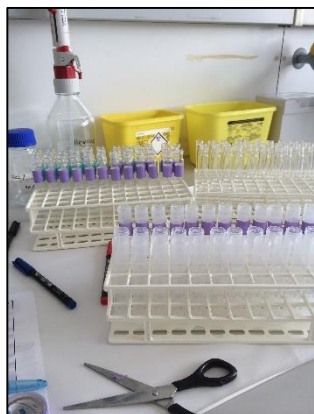


Figura 18 – Pesagem do alimento e do substrato



Preparação da Solução Tampão

Foram preparados 500 mL de solução tampão. Primeiro, num erlenmeyer com 100 mL de H₂O destilada, foram dissolvidas, aproximadamente, 0,285 g de Cloreto de Potássio, 0,235 g de Cloreto de Sódio, 0,060 g de Sulfato de Magnésio e 0,020 g de Cloreto de Cálcio, com auxílio de um agitador magnético (Agimatic-E). De seguida, esta solução foi adicionada a uma outra solução preparada composta por 100 mL de H₂O destilada com 4,90 g de Hidrogeno carbonato de sódio e 4,65 g de Hidrogeno fosfato disódico, e perpez-se o balão com 300 mL de água destilada.

Por fim, foi medido o pH da solução tampão, que deve ser, aproximadamente, 7. O pH foi medido com recurso a um medidor de pH digital (J.P Selecta, Barcelona, Espanha) (Figura 19).

Figura 19 - Preparação da solução tampão e medição de pH



Preparação do conteúdo ruminal

Foi recolhido conteúdo ruminal de dois ovinos canulados (uma ovelha e um borrego) antes da alimentação da manhã. Os animais eram alimentados com um alimento composto comercial (Anipura, Puraovinos) (500 kg) e forragem, ambos divididos em duas porções por dia (9h30 e 17h00). O alimento continha, em média, 22% proteína bruta, 9,5% fibra, 6,5% gordura, assim como 0,4% de sódio e uma mistura de vitaminas (Vitamina A, D3 e E com quantidades de 7500 UI/kg, 1500 UI/kg e 7,5 mg/kg, respetivamente).

O conteúdo ruminal foi filtrado por 4 camadas de gaze com um funil de porcelana para um kitazato de 1000 mL. De seguida, foi medido 100 mL de fluido ruminal de cada um dos animais e registado o pH de cada um, sendo depois misturados e efetuada nova medição do pH do fluido. Esta etapa ocorre no mínimo de tempo possível, tal como a próxima etapa, de forma a evitar a exposição ao oxigénio.

Preparação do meio de incubação

O meio de incubação foi preparado na razão 1:2, ou seja, 200 mL de fluido ruminal para 400 mL de solução tampão.

A solução tampão (400 mL) foi colocada em banho a 39 °C e foi saturada com dióxido de carbono (simulação das condições ruminais). A esta solução adicionou-se 200 mL de fluido ruminal filtrado, e deixou-se a saturar com CO₂.

Incubação

A cada tubo de incubação previamente preparado, foi adicionado 6 mL de meio de incubação, sempre na presença de CO₂ e agitação. De seguida, os tubos relativos à análise de AG do tempo 0 foram tapados e colocados diretamente na arca congeladora (-20 °C), enquanto os tubos do tempo 6 foram tapados e colocados em banho de água a 39 °C com agitação durante as 6 horas. Aos tubos relativos à medição de pH e posterior análise de AGV, do tempo 0, foi medido o pH e depois colocados na arca congeladora, e os do tempo 6 foram para o banho, juntamente com os tubos para análise de AG.

Para cada ensaio, a ordem dos tubos e a sua posição no banho foi aleatorizada através da aplicação online random.org.

Após as 6 horas, os tubos foram retirados do banho e colocados diretamente na arca congeladora a -20 °C, exceto os tubos de amostras para análise dos AGV, que são usados também para medição de pH, e só após este procedimento foram congelados.

É de referir que o pH do meio de incubação foi medido no início e no fim do processo de incubação.

Neste ensaio, e após as 5 incubações, foram geradas 60 amostras para determinação dos AGV e 60 amostras para determinação dos AG de cadeia longa (Anexo 4 – Identificação dos códigos das amostras).

4. Análise dos Ácidos Gordos

Após 6 dias de congelação, os tubos para análise dos ácidos gordos de cadeia longa foram colocados, aleatoriamente, no liofilizador durante 3 dias, para que fosse removida toda a água presente na amostra por sublimação. Depois da liofilização, os tubos foram colocados novamente a -20 °C, conservando as amostras até preparação dos AG: transesterificação.

4.1. Ácidos Gordos de Cadeia Longa

Preparação das Amostras

Para determinação dos AG de cadeia longa é necessário recorrer ao procedimento anexado nesta dissertação (Anexo 5 – Transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal – Método LMLR-R3.1).

Os tubos com as amostras foram retirados, de modo aleatório, da arca e deixados a descongelar à temperatura ambiente, durante, aproximadamente, duas horas. De seguida, os tubos foram pesados, na mesma balança analítica, para saber qual a quantidade de amostra presente, e adicionou-se 1 mL de tolueno seco, para auxiliar a libertação dos AG. As amostras foram deixadas em repouso durante uma noite no frigorífico.

O padrão interno utilizado foi o C19:0, que precisou de ser dissolvido no equipamento de ultrassons (Elma S 60H, Elmasonic) antes de ser utilizado. Adicionou-se 1 mL de padrão interno em cada tubo, e colocaram-se no ultrassons durante 10 minutos. De seguida, adicionou-se 2 mL de solução de metóxido de sódio em metanol (0,5 M) e levou-se ao vortex para homogeneizar durante dez segundos, seguindo para o banho a 50 °C durante dez minutos, com agitação.

Depois dos tubos arrefecerem à temperatura ambiente, adicionou-se 3 mL de solução HCl/metanol (10%), homogeneizou-se no vortex, e colocou-se novamente no banho a 80 °C durante dez minutos com agitação.

De seguida, após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL da solução de Carbonato de Potássio 6% e 2 mL de *n*-hexano+BHT (BHT – butil-hidroxitolueno, é usado como antioxidante), agitou-se em vortex e centrifugou-se durante cinco minutos. Recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo de ensaio (com 0,5 g, aproximadamente, de sulfato de sódio anidro, devido ao seu elevado poder de absorção de água), e no tubo de incubação foram adicionados novamente 2 mL de *n*-hexano+BHT, e repetiu-se a centrifugação e a recolha do sobrenadante (Figura 20, página 35).

Seguidamente, agitou-se o tubo com o sobrenadante em vortex e centrifugou-se durante 5 minutos para que fosse possível retirar a fase hexano que contém os ácidos gordos para um novo tubo, onde posteriormente foi colocado num equipamento de evaporação em corrente de azoto a 37 °C.

Por fim, adicionou-se 1 mL de *n*-hexano ao tubo, e transferiu-se para um vial de cromatografia gasosa (CG) (Figura 21, página 35) e acondicionou-se na arca frigorífica (Figura 22, página 35).

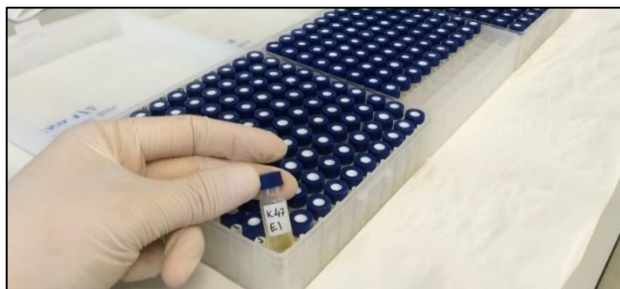
Figura 20 - Recolha do sobrenadante



Figura 21- Transferência da amostra para um vial de CG



Figura 22 - Viais de CG acondicionados



Análise por Cromatografia Gasosa

Os AG sob a forma de ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa (Figura 23) com deteção por ionização de chama (GC-FID), utilizando-se um equipamento Shimadzu QP2010-plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 24 e 25, página 36), equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SP-2560, 100 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,20 µm espessura da fase estacionária, Supelco).

Durante a análise o injetor e o detetor foram mantidos a 250 °C e 280 °C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 ml/minuto e foi injetada 1 µl de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50 °C (mantida durante 1 minuto), aumentou depois para 50 °C/minuto até aos 150 °C (mantida durante 20 minutos), aumentou a 1 °C/minuto até aos 190 °C, e finalmente, aumentou a 2 °C/minuto até aos 220 °C onde foi mantida durante 40 minutos.

Figura 23 - Cromatograma dos AG cadeia longa da amostra de Soja (ver em pormenor no anexo 7)

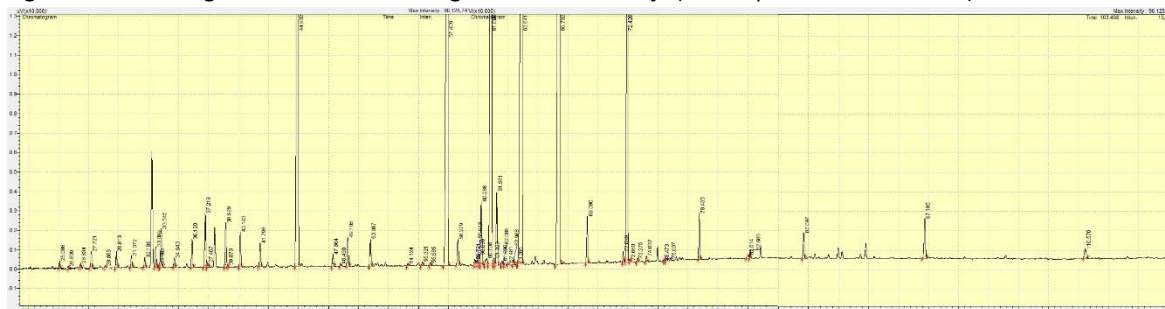


Figura 24 - Equipamento de CG Shimadzu



Figura 25 - Viais de CG em análise



4.2. Ácidos Gordos Voláteis

Para determinação dos AGV em incubações com suco de rúmen por cromatografia gasosa, é necessário recorrer a um procedimento de preparação das amostras como o apresentado no Anexo 6 desta dissertação (Método LMLR-V1.1).

Começou-se por retirar os tubos da arca e colocá-los a descongelar, durante 2 horas, à temperatura ambiente, enquanto foi preparado o material para o protocolo (Figura 26).

Figura 26 - Amostras para análise dos AGV



De seguida, homogeneizou-se a amostra em vortex e colocou-se a centrifugar durante 5 minutos, retirando o extrato líquido da amostra para continuar o procedimento. Deste extrato, pipetou-se 1 mL para um *ependorf*, no qual foi também adicionado 170 μ L de ácido ortofosfórico (25% v/v). Levou-se ao vortex e deixou-se a repousar durante 30 minutos no frigorífico.

Depois, colocaram-se os *ependorfs* a centrifugar a 14000 rcf durante 15 minutos, e transferiu-se o sobrenadante para um vial de CG. Os viais foram armazenados em arca frigorífica a -20 $^{\circ}$ C.

Preparação das Curvas de Calibração

A determinação da concentração de AGV foi efetuada com recurso a curvas de calibração ($y = a x + b$) para cada ácido identificado (ácidos: acético (C2:0), propiónico (C3:0), *iso*-butírico (*i*-C4:0), butírico (C4:0), *iso*-valérico (*i*-C5:0) e valérico (C5:0)).

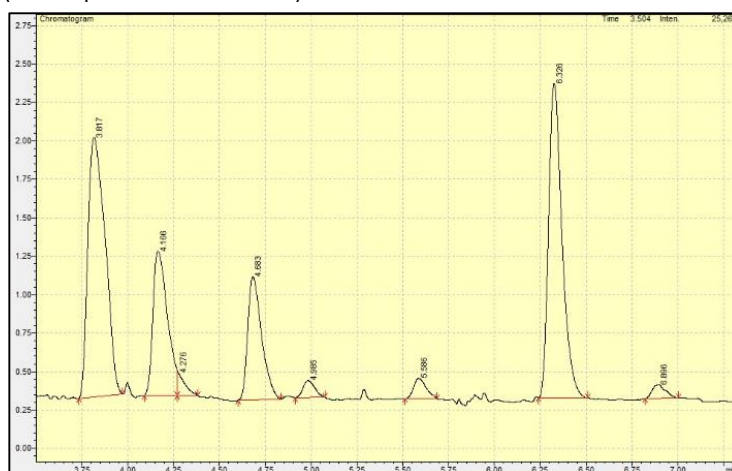
Primeiro, começou-se por preparar 100 mL de soluções aquosas de 50 mmol/L com padrões puros dos AGV (solução mãe) e 50 mL de ácido *iso*-capróico (*i*-C6:0) com uma concentração também de 50 mmol/L, que serviu como padrão interno. Com estas duas soluções, seguindo o protocolo do anexo 6, prepararam-se soluções com concentrações entre 0,2 a 30 mmol/L, a fim de conseguir traçar uma reta de regressão para cada AGV (ver anexo 8 – Equações das retas de regressão das Curvas de Calibração dos AGV).

Análise por cromatografia gasosa

Os AGV foram analisados por cromatografia gasosa (Figura 27) com deteção por ionização de chama (GC-FID), utilizando-se um equipamento Shimadzu QP2010-plus (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (Nukol, 30 m × 0,25 mm diâmetro interno × 0,25 µm espessura da fase estacionária, Supelco, Bellefont, PA, USA).

Durante a análise o injetor e o detetor foram mantidos a 220 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 0,56 mL/minuto e foi injetada 1 µL de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 180 °C e foi mantida durante 10 minutos.

Figura 27 - Cromatograma dos AGV da amostra de Soja
(ver em pormenor no anexo 9)



5. Análise Estatística

A produção de AGV durante a incubação foi calculada diretamente através da diferença da concentração de AGV existente às 0 horas e às 6 horas. Relativamente aos AG de cadeia longa C18, devido à grande variabilidade observada entre tubos, e assumindo como negligenciável a produção do total de AG C18 estimou-se o balanço e a biohidrogenação usando a média do conteúdo total de C18 presente às 0 horas e 6 horas. Os cálculos para o balanço do AG, tomando como exemplo o C18:0, seguem os seguintes passos:

Passo 1: Calcular a média do total dos AG C18 (em µg/tubo)

$$[\Sigma C18_{m\u00e9dio}] = \frac{[\Sigma C18_{0\text{ horas}}] + [\Sigma C18_{6\text{ horas}}]}{2}$$

Passo 2: Calcular a quantidade de C18:0 no total médio de AG C18 (em µg/tubo) às 0 e 6 horas

$$[C18:0_{m\u00e9dio,0h}] = \frac{[\Sigma C18_{m\u00e9dio}] \times \%C18:0_{0\text{ horas}}}{100} \quad [C18:0_{m\u00e9dio,6h}] = \frac{[\Sigma C18_{m\u00e9dio}] \times \%C18:0_{6\text{ horas}}}{100}$$

Onde,

$\%C18:0_{x\text{ horas}}$, representa a percentagem de C18:0 existente no total de AG C18 no tubo às 0 e 6 horas, respetivamente.

Passo 3: Calcular o balanço (em µg) de C18:0 durante a incubação

$$[C18:0_{balan\u00e7o}] = [C18:0_{m\u00e9dio,6h}] - [C18:0_{m\u00e9dio,0h}]$$

Para calcular os AG insaturados C18 da dieta, que são os AG biohidrogenados (C18:1-c9, C18:2-c9c12 e C18:3-c9c12c15), calcula-se:

Passo 4: Percentagem do AG biohidrogenado

$$\% \text{ AG BH} = \frac{[AG_{m\u00e9dio,0\text{ horas}}] - [AG_{m\u00e9dio,6\text{ horas}}]}{[AG_{m\u00e9dio,0\text{ horas}}]} \times 100$$

Por fim, para obter os resultados, em percentagem, dos produtos da biohidrogenação efetua-se o passo 5. Os produtos da biohidrogenação são todos os AG cujo balanço tem valor positivo, nomeadamente C18:0, isómeros C18:1, isómeros C18:2 e AG-oxo.

Passo 5: Percentagem dos produtos da biohidrogenação (BHP) (exemplo: C18:0)

$$\%C18:0 = \frac{[C18:0_{\text{balanço}}]}{[\Sigma \text{ dos balanços dos BHP}]} \times 100$$

Os dados foram analisados incluindo no modelo estatístico os efeitos fixos principais: adição de água (com ou sem), tratamento (controlo, pressão de 300 MPa e pressão de 500 MPa), o tempo de incubação (0 ou 6 horas) e a interação entre todos os fatores, e como bloco aleatório cada incubação. O tratamento estatístico foi efetuado através do procedimento de modelos mistos “proc MIXED” do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Capítulo 3

Resultados e Discussão

1. Parâmetros da Fermentação Ruminal

Os parâmetros mais utilizados para avaliar a fermentação ruminal são o pH e a concentração de ácidos gordos voláteis que é indicativa de uma maior quantidade de microrganismos no rúmen, e assim, à partida, será obtida uma maior digestibilidade do alimento (Passini, Rodrigues, Castro & Silveira, 2003).

1.1. pH

O pH ruminal está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação (Church, 1979; Santana Neto, Oliveira, Valença & Cavalcante, 2012). A acidificação do meio ruminal (diminuição do pH) ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, e a rápida fermentação ocorre devido às elevadas taxas de degradação (Costa, 2010). Então, o pH reflete as características da dieta e qualquer alteração na taxa de crescimento das bactérias e dos protozoários (Costa, 2010; Santana Neto *et al*, 2012).

Para que exista uma atividade microbiana favorável no rúmen, o pH deve rondar os $6,7 \pm 0,5$ (Costa, 2010; Santana Neto *et al*, 2012). A estabilidade do pH é atribuída à saliva (esta tem poder tampão) e à capacidade da mucosa ruminal em absorver os ácidos produzidos na fermentação ruminal (Van Soest, 1994).

Posto isto, nos gráficos abaixo (Gráficos 1 a 6), é possível verificar que o pH, das cinco incubações *in vitro* deste ensaio, teve um comportamento conforme o esperado: decréscimo significativo ($P < 0,001$) do pH entre as 0 e as 6 horas (em média, o pH desceu 0,15, sendo o pH inicial médio de 6,65), o que sugere que ocorreu fermentação em todos os casos.

Gráfico 1 - pH das amostras A1 (0h) e A19 (6h)

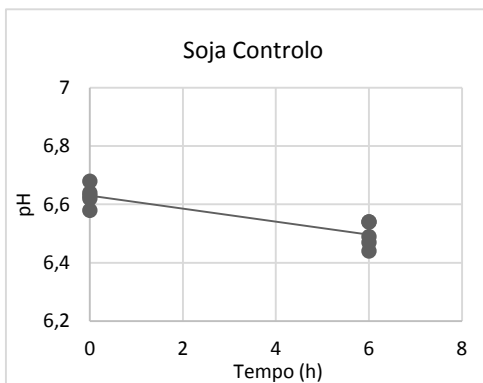


Gráfico 2 - pH das amostras D4 (0h) e D22 (6h)

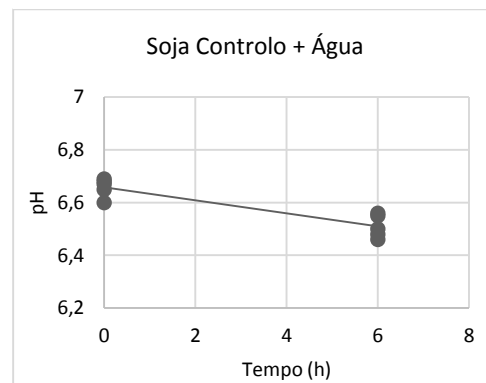


Gráfico 4 - pH das amostras G7 (0h) e G25 (6h)

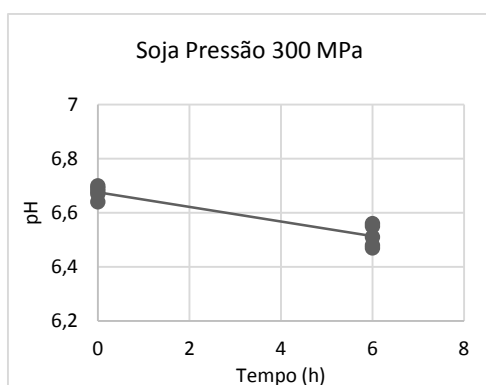


Gráfico 3 - pH das amostras J10 (0h) e J28 (6h)

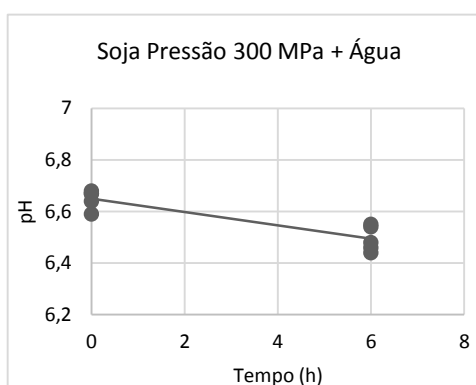


Gráfico 6 - pH das amostras M13 (0h) e M31 (6h)

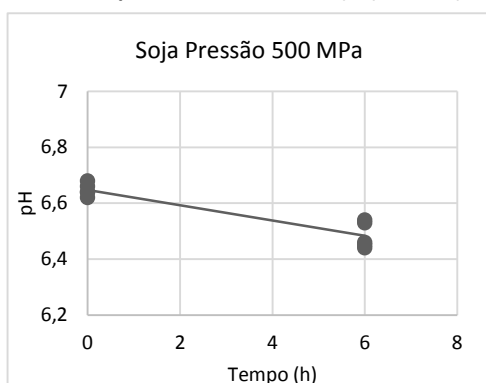
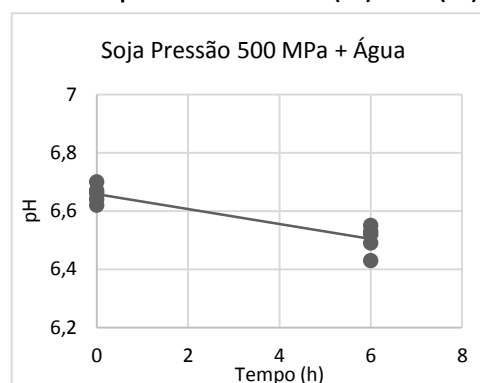


Gráfico 5 - pH das amostras P16 (0h) e P34 (6h)



1.2. Ácidos Gordos Voláteis

Os AGV são a maior fonte de energia para os ruminantes, que provém da fermentação, essencialmente dos hidratos de carbono, dos alimentos ingeridos (Sierra, 2014; Santana Neto *et al*, 2012). Segundo Owens & Goetsch (1993) citado por Santana Neto *et al* (2012), a concentração de AGV em animais com dietas baseadas em concentrado pode rondar dos 80 a 150 mmol/L de líquido ruminal enquanto em animais em pastagem ficam em torno dos 50 a 100 mmol/L.

Segundo Costa (2010), a proporção dos diferentes AGV produzidos varia dependendo dos componentes químicos degradados e do pH ruminal – é produzida uma maior proporção de C2:0 na degradação da celulose e hemiceluloses, enquanto a degradação do amido e açúcares origina maior quantidade de C2:0 e C3:0, e menor quantidade de C4:0.

Na tabela 7 (página 45) está representada a concentração total de AGV encontrados neste ensaio, e por observação, verifica-se que em todos os casos, houve aumento da quantidade de AGV no tempo 6h, o que sugere que ocorreu fermentação.

É também possível verificar que a concentração de AGV no tempo 6h (entre 56 e 62 mmol/ L, aproximadamente), se encontra de acordo com os valores encontrados na literatura, tendo em conta as limitações do sistema de incubação *in vitro*.

Em termos de percentagem de cada AGV, o ácido acético está presente com grande evidência, representando uma proporção molar, em média, cerca de 63,9% do total de AGV médios da amostra, seguido do ácido propiónico com 19,6% e o ácido butírico com 11,5%. Os restantes ácidos encontram-se em proporções muito inferiores: em média, 1,6% para o ácido *iso*-butírico, 2% para o *iso*-valérico e 1,4% para o ácido valérico. Estes resultados estão também em concordância com as referências, que define que a população microbiana, geralmente transforma os hidratos de carbono em 60 a 70% de C2:0 e 18 a 22% de C3:0 (Goularte *et al*, 2011).

Estatisticamente, verifica-se que a utilização de água no tratamento de pressurização não teve um efeito significativo sobre a produção de AGV ($P > 0,05$) e a pressão exercida teve um efeito significativo apenas nos AGV da forma *iso* – este efeito poderá estar relacionado com uma possível alteração da fração proteica da soja durante a pressurização, visto que os AGV da forma *iso* provém essencialmente de aminoácidos – este é um tema que necessita de maior investigação dados os escassos estudos neste sentido. O efeito do tempo, tal como era esperado, foi extremamente significativo ($P < 0,001$) em todos os AGV, podendo afirmar-se que o tempo de retenção dos alimentos no rúmen (digestão fermentativa) tem realmente um efeito sobre a produção dos AGV: quanto maior a fermentação maior a quantidade de AGV presentes no rúmen.

Tabela 7 – Efeito da Água (A), da Pressão (P) e do Tempo (T) na concentração de AGV (em mmol/L) produzidos durante a fermentação ruminal.

	Tratamento com água						Tratamento sem água						Erro Padrão da Média	<i>p-value</i>			
	controle		P300		P500		controle		P300		P500			A	P	T	AxPxT
	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h					
C2:0	24,26	37,84	24,10	38,40	22,55	37,10	24,18	37,84	23,76	36,75	22,78	39,25	1,277	0,926	0,675	<0,001	0,490
C3:0	7,60 ^c	12,02 ^a	7,45 ^c	12,04 ^a	6,67 ^c	10,97 ^{ab}	6,63 ^c	11,93 ^a	7,16 ^c	10,66 ^b	7,35 ^c	12,03 ^a	0,452	0,465	0,556	<0,001	0,037
i-C4:0	0,59	0,85	0,66	0,95	0,74	1,17	0,50	0,86	0,56	0,74	0,83	1,15	0,060	0,118	<0,001	<0,001	0,158
C4:0	4,14 ^d	6,90 ^{ab}	4,03 ^d	6,97 ^{ab}	3,70 ^d	6,33 ^c	3,87 ^d	6,83 ^{ab}	3,82 ^d	6,72 ^{bc}	3,81 ^d	7,25 ^a	0,198	0,665	0,402	<0,001	0,025
i-C5:0	0,79 ^c	1,34 ^a	0,80 ^c	1,36 ^a	0,73 ^{cd}	0,94 ^b	0,70 ^{cd}	1,28 ^a	0,73 ^{cd}	1,04 ^b	0,63 ^d	1,26 ^a	0,051	0,078	0,001	<0,001	<0,001
C5:0	0,57	0,90	0,53	0,81	0,54	0,78	0,58	0,87	0,51	0,80	0,54	0,85	0,042	0,772	0,068	<0,001	0,935
Total AGV	37,94	59,83	37,57	60,53	34,93	57,28	36,47	59,62	36,55	56,72	35,94	61,80	1,753	0,844	0,630	<0,001	0,175

a, b, c, d, médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

C2:0, Ácido Acético; C3:0, Ácido Propiónico; i-C4:0, Ácido *iso*-Butírico; C4:0, Ácido Butírico; i-C5:0, Ácido *iso*-Valérico; C5:0, Ácido Valérico; AGV, Ácidos Gordos Voláteis.

P300, Pressão 300 MPa; P500, Pressão 500 MPa; A, efeito da água; P, efeito da pressão; H, efeito da hora; AxPxH, interação dos efeitos.

2. Biohidrogenação

Sendo a biohidrogenação o ponto fulcral desta dissertação, interessa analisar os principais AG intervenientes da biohidrogenação, nomeadamente, os substratos da biohidrogenação (C18:1-c9, C18:2-c9c12 e C18:3-c9c12c15) e os produtos da biohidrogenação (C18:0, Intermediários C18:1, C18:2 e os AG-oxo). Os ácidos gordos de origem microbiana também serão levemente abordados para perceber se de algum modo houve síntese de AG pelos microrganismos neste estudo *in vitro*.

2.1. Ácidos Gordos de Cadeia Longa C18

Por análise da Tabela 8 (página 47), verificou-se que os ácidos gordos C18 presentes em maior quantidade na amostra foram os AG provenientes da dieta: 15-17% de C18:1-c9, 39-49% de C18:2-c9c12 e 7-9% de C18:3-c9c12c15. O AGS com maior expressão foi o C18:0, com cerca de 21-32%. Troegeler-Meynadier *et al* (2014) efetuou também um estudo *in vitro* com sementes de soja, e os resultados são similares: maior quantidade de ácido linoleico, seguido do ácido oleico e do ácido linolénico.

Efeito da interação água x pressão x tempo

A interação entre os três fatores foi maioritariamente significativa ($P < 0,05$). Apenas nos AG C18:1-c11, C18:1-c13 e C18:2-t11c15, respetivamente $P = 0,051$, $P = 0,052$ e $P = 0,320$, a interação não foi significativa, no entanto o valor encontra-se no limiar da significância estatística (0,05).

Por observação da tabela 8 (página 47), verificou-se que a proporção de ácidos gordos, em particular dos intermediários da biohidrogenação, tende a ser maior no tempo 6 comparativamente com o tempo 0. A proporção destes AG aumentar entre as 0 horas e as 6 horas significa que houve digestão fermentativa, e como tal potenciou-se a biohidrogenação. Relativamente à influência do tratamento de pressurização, os resultados não foram todos no mesmo sentido, no entanto, tende a influenciar de alguma forma a biohidrogenação. São necessários mais estudos sobre tratamentos de alta pressão (atérmicos) nesta área de investigação, para que se consiga interpretar de forma mais coerente os resultados obtidos. A maioria dos estudos de processamento de sementes disponíveis são com tratamentos de extrusão, onde é aplicada temperatura, e nesses casos concluem que a extrusão tem uma inibição da isomerização do C18:2 (Troegeler-Meynadier *et al*, 2006).

Tabela 8 - Efeito da água (A), da pressão (P) e do tempo (T) na proporção de AG de cadeia C18 durante a digestão fermentativa (% do total de C18)

	Tratamento com água						Tratamento sem água						Erro Padrão da Média	<i>p-value</i>			
	controle		P300		P500		controle		P300		P500			A	P	T	AxPxT
	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6					
C18:0	21,5 ^c	32,1 ^a	22,2 ^c	32,6 ^a	22,0 ^c	25,7 ^b	21,7 ^c	28,4 ^b	22,0 ^c	26,1 ^b	20,4 ^c	28,4 ^b	1,40	0,022	0,048	<0,001	0,007
C18:1-t6,t7,t8	0,11 ^d	0,27 ^b	0,12 ^d	0,40 ^a	0,10 ^d	0,19 ^d	0,10 ^d	0,26 ^b	0,10 ^d	0,18 ^c	0,10 ^d	0,28 ^b	0,022	0,015	0,061	<0,001	<0,001
C18:1-t9	0,08 ^d	0,20 ^b	0,09 ^d	0,27 ^a	0,08 ^d	0,15 ^c	0,08 ^d	0,19 ^{bc}	0,09 ^d	0,19 ^{bc}	0,07 ^d	0,20 ^b	0,017	0,275	0,010	<0,001	0,015
C18:1-t10	0,15 ^e	0,42 ^b	0,16 ^e	0,60 ^a	0,15 ^e	0,32 ^{cd}	0,14 ^e	0,39 ^b	0,16 ^e	0,27 ^d	0,14 ^e	0,38 ^{bc}	0,026	0,000	0,019	<0,001	<0,001
C18:1-t11	1,12 ^d	3,29 ^b	1,19 ^d	5,20 ^a	1,17 ^d	2,61 ^{bc}	1,11 ^d	4,60 ^a	1,20 ^d	2,14 ^c	1,07 ^d	5,38 ^a	0,383	0,382	0,835	<0,001	<0,001
C18:1-t12	0,14 ^f	0,34 ^b	0,15 ^f	0,42 ^a	0,14 ^f	0,22 ^e	0,14 ^f	0,27 ^{cd}	0,14 ^f	0,23 ^{de}	0,13 ^f	0,30 ^{bc}	0,019	0,002	0,006	<0,001	<0,001
C18:1-c9	17,0 ^{ab}	15,0 ^c	17,2 ^{ab}	14,9 ^c	17,0 ^{ab}	16,4 ^b	16,5 ^b	15,4 ^c	17,5 ^a	16,6 ^b	16,8 ^{ab}	15,3 ^c	0,32	0,511	0,023	<0,001	0,002
C18:1-t15	0,12 ^{cd}	0,25 ^b	0,13 ^{cd}	0,32 ^a	0,12 ^{cd}	0,16 ^c	0,13 ^{cd}	0,23 ^b	0,11 ^d	0,17 ^c	0,12 ^{cd}	0,23 ^b	0,017	0,038	0,059	<0,001	<0,001
C18:1-c11	1,19	1,12	1,19	1,16	1,18	1,20	1,17	1,17	1,27	1,26	1,20	1,19	0,023	0,006	0,002	0,192	0,051
C18:1-c12	0,08 ^e	0,43 ^b	0,09 ^e	0,54 ^a	0,09 ^e	0,35 ^c	0,09 ^e	0,39 ^{bc}	0,09 ^e	0,27 ^d	0,08 ^e	0,38 ^{bc}	0,024	0,000	0,103	<0,001	<0,001
C18:1-c13	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,004	0,126	0,065	0,005	0,052
C18:1-c14,t16	0,10 ^f	0,25 ^b	0,11 ^f	0,29 ^a	0,10 ^f	0,15 ^{de}	0,12 ^{ef}	0,20 ^c	0,11 ^f	0,16 ^d	0,10 ^f	0,20 ^c	0,012	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
C18:2-c9c12	49,1 ^a	38,6 ^c	48,4 ^a	36,0 ^d	48,8 ^a	44,0 ^b	49,4 ^a	40,3 ^c	48,8 ^a	44,2 ^b	50,1 ^a	39,3 ^c	1,18	0,024	0,093	<0,001	<0,001
C18:2-t11c15	0,01	0,11	0,01	0,08	0,00	0,03	0,00	0,14	0,01	0,11	0,00	0,11	0,021	0,059	0,098	<0,001	0,320
CLA-c9t11	0,04 ^{de}	0,12 ^c	0,04 ^{de}	0,21 ^b	0,03 ^e	0,21 ^b	0,02 ^e	0,22 ^b	0,04 ^e	0,09 ^{cd}	0,02 ^e	0,28 ^a	0,018	0,741	0,004	<0,001	<0,001
CLA-t11c13	0,07 ^d	0,17 ^b	0,07 ^d	0,23 ^a	0,07 ^d	0,17 ^b	0,06 ^d	0,17 ^b	0,06 ^d	0,12 ^c	0,08 ^{cd}	0,16 ^b	0,014	0,003	0,947	<0,001	0,005
CLA-tt	0,07 ^{bc}	0,30 ^a	0,16 ^b	0,38 ^a	0,15 ^b	0,27 ^a	0,02 ^c	0,29 ^a	0,13 ^b	0,16 ^b	0,14 ^b	0,35 ^a	0,037	0,074	0,075	<0,001	0,011
C18:3-c9c12c15	8,92 ^{abc}	6,86 ^h	8,51 ^{cd}	6,17 ⁱ	8,66 ^{bc}	7,77 ^{ef}	9,07 ^{ab}	7,22 ^{gh}	8,14 ^{de}	7,59 ^{fg}	9,33 ^a	7,38 ^{fg}	0,250	0,006	<0,001	<0,001	0,000
C18-oxo	0,05 ^{def}	0,09 ^{cde}	0,05 ^{cdef}	0,18 ^a	0,11 ^{bcd}	0,09 ^{cd}	0,01 ^f	0,11 ^{bc}	0,03 ^{ef}	0,08 ^{cde}	0,05 ^{def}	0,17 ^{ab}	0,026	0,134	0,054	<0,001	0,019
Total C18 (mg/g MS)	29,5	30,2	27,7	30,3	28,1	30,2	29,2	32,2	28,4	28,2	30,6	32,1	1,30	0,299	0,157	0,041	0,740

a, b, c, d, e, f, g, médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente (P<0,05).

C18:0, Ácido Esteárico; C18:1-c9, Ácido Oleico; C18:2-c9c12, Ácido Linoleico; C18:3-c9c12c15, Ácido Linolénico; CLA, Ácido Linoleico Conjugado; outros são isômeros do C18
 P300, Pressão 300 MPa; P500, Pressão 500 MPa; A, efeito da água; P, efeito da pressão; H, efeito da hora; AxPxH, interação dos efeitos.

Efeitos individuais da água, pressão e tempo

Analisando aos AG em que a interação não foi significativa, verificou-se que o uso da água no processamento das sementes durante a pressurização, não teve um comportamento homogêneo: no caso do C18:1-c11, a presença da água teve um efeito significativo, verificando-se uma diminuição da proporção de AG no processamento sem água.

Generalizando, observando as percentagens e comparando o tratamento com água e sem água, verificou-se que a proporção de ácidos gordos no tratamento sem água tende a ser menor do que no tratamento com água. Esta tendência pode sugerir que a água poderá influenciar o comportamento dos AG durante o tratamento de alta pressão, nomeadamente por ser um elemento integrante do processo de pressurização (como foi explicado no capítulo 1) – a pressão é transmitida através da água.

Relativamente à pressão, tendencialmente, a proporção de AG aumenta entre o controlo e quando é aplicada uma pressão de 300 MPa. Contudo com a aplicação de maior pressão (500 MPa), o efeito parece reverter e prejudicar a composição dos AG, o que sugere que será uma pressão demasiado intensa.

Efeito na Biohidrogenação

Para analisar a biohidrogenação recorreu-se a uma outra metodologia, usando a percentagem dos AG biohidrogenados (Ácido oleico, linoleico e linolénico) e a percentagem dos produtos da biohidrogenação (Ácido esteárico, isómeros C18:1, C18:2 e os AG oxo) (Tabela 9, página 49).

Relativamente aos AG biohidrogenados, na presença de água, verificou-se que, numericamente, sem aplicação de pressão, o ácido linolénico foi o AG que sofreu maior biohidrogenação (cerca de 22,2%), seguido do ácido linoleico (cerca de 20,0%) e o ácido oleico (19,7%). Quando aplicada a pressão, a proporção de AG biohidrogenados não se comporta de maneira igual com os dois níveis de pressão: com 300 MPa a biohidrogenação do ácido oleico, linoleico e linolénico é semelhante ao controlo. No entanto, aplicando a pressão 500 MPa, notou-se uma grande diminuição na proporção de AG biohidrogenados, o que sugere que realmente aplicando uma pressão mais elevada às sementes de soja é possível proteger os ácidos gordos da biohidrogenação ruminal.

Quando o tratamento da soja é efetuado sem água, o comportamento da biohidrogenação é diferente. Pelos resultados (Tabela 9, página 49) verificou-se que a percentagem de biohidrogenação do ácido oleico, linoleico e linolénico é semelhante no grupo controlo e na pressão mais elevada (500 MPa), e quando aplicada a pressão 300 MPa, há uma diminuição da biohidrogenação do ácido linoleico e linolénico, relativamente aos outros dois tratamentos. Isto sugere que a pressão mais baixa poderá favorecer a compressão das partículas tornando-

as menos disponíveis ao ataque microbiano, mas que o aumento de pressão poderá ter um efeito expansivo, aumentando a exposição à ação microbiana. De facto, alterações da estrutura das sementes através da aplicação de alta pressão já foi descrita por alguns autores. Por exemplo, Guo *et al* (2015), efetuou um estudo onde avaliou as alterações das propriedades estruturais do amido na semente de Lotus, provocadas pelo tratamento de alta pressão, e verificou que, usando uma pressão de 600 MPa a estrutura do amido foi completamente destruída (gelatinização completa do amido), estando este resultado de acordo com outros estudos publicados.

No ensaio *in vitro* de Troegeler-Meynadier (2014), os resultados foram também apresentados sob a forma de balanço, e verificou-se uma diminuição da quantidade de ácido linoleico e linolénico entre as sementes de soja não tratadas e as sementes com tratamento de extrusão (temperatura: 125°C). Estes resultados estão de acordo com os resultados do tratamento sem água obtido neste ensaio, contudo, como o tipo de tratamento é diferente não podemos assumir que terá as mesmas implicações.

Tabela 9 – Efeito da Água (A) e da Pressão (P) na semente de soja por estimativa da biohidrogenação e produtos biohidrogenados

	Tratamento com água			Tratamento sem água			Erro Padrão da Média	<i>p-value</i>		
	controlo	P300	P500	controlo	P300	P500		A	P	AxP
Biohidrogenação (%)										
C18:1-c9	19,7	13,4	3,1	6,6	4,9	9,0	3,97	0,135	0,226	0,067
C18:2-c9c12	20,0 ^{ab}	25,5 ^a	10,0 ^c	18,5 ^b	10,3 ^c	21,6 ^{ab}	2,70	0,339	0,254	<0,001
C18:3-c9c12c15	22,2 ^a	27,4 ^a	10,3 ^b	20,3 ^a	7,2 ^b	21,1 ^a	2,77	0,066	0,063	<0,001
Produtos da BH (%)										
C18:0	66,1	60,3	57,4	54,6	64,8	55,3	3,90	0,373	0,321	0,168
C18:1	30,0	35,0	36,1	38,4	29,2	39,1	3,65	0,556	0,368	0,203
C18:2	3,8 ^b	3,9 ^b	6,9 ^a	6,2 ^{ab}	4,8 ^{ab}	4,8 ^{ab}	0,81	0,564	0,259	0,038
C18-oxo	0,05	0,74	0,00	0,74	1,17	0,80	0,409	0,041	0,252	0,707

a, b, c, médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

C18:1-c9, Ácido Oleico; C18:2-c9c12, Ácido Linoleico; C18:3-c9c12c15, Ácido Linolénico; C18:0, Ácido Esteárico; C18:1, somatório de todos os AG de cadeia C18:1, exceto o C18:1-c9; C18:2, somatório de todos os AG de cadeia C18:2, exceto o C18:2-c9,c12.

P300, Pressão 300 MPa; P500, Pressão 500 MPa; A, efeito da água; P, efeito da pressão; H, efeito da hora; AxPxH, interação dos efeitos.

Em relação aos produtos da biohidrogenação, verificou-se que em todos os tratamentos o principal produto da biohidrogenação foi o ácido esteárico (o produto final da biohidrogenação), seguido dos isómeros C18:1 e dos C18:2. Relativamente ao efeito dos

tratamentos, apenas se verificaram interações significativas nos intermediários da biohidrogenação de cadeia C18:2, em que o valor mais elevado foi verificado no tratamento com água e com aplicação de pressão 500 MPa. Este tratamento, como já foi referido anteriormente, foi também o que apresentou taxas de biohidrogenação mais baixas. No entanto, de modo geral, parece verificar-se que a aplicação da pressão, apesar de alterar a biohidrogenação, não aparenta modificar o padrão das classes de intermediários formados. Nos AG-oxo, houve um efeito da água, apresentando valores mais elevados quando não foi utilizada água no processamento. Esta classe de intermediários da biohidrogenação não está bem estudada no rúmen nem a sua incorporação na carne e gordura de ruminantes bem como os seus efeitos biológicos na saúde humana.

Este resultado mostra que o tratamento de alta pressão influencia a biohidrogenação, apesar de serem necessários mais estudos nesta área para comprovar e perceber o acima descrito. O facto de no tratamento sem água os resultados serem contraditórios e menos explícitos, pode dever-se a uma alteração da forma de como é aplicada a pressão sobre a semente, visto que a pressão não passa para o produto através da água (sem água na câmara de pressurização). Apesar deste método de processamento incluir a utilização de água, foi necessário investigar se o comportamento era idêntico quando não se utilizava água, para tornar o processo viável na alimentação animal, devido às elevadas quantidades de alimento a tratar.

2.2. Outros Ácidos Gordos de Cadeia Longa

Neste grupo, incluem-se os ácidos gordos de origem microbiana, ou seja, os ácidos gordos que estão presentes maioritariamente nas membranas microbianas, entre os quais: DMA (dimetilacetais), ácidos gordos de cadeia ramificada (iso- e anteiso-), ácidos gordos saturados de cadeia par, ácidos gordos saturados de cadeia ímpar e outros ácidos gordos monoinsaturados (AGMI) (Tabela 10, página 51).

Tabela 10 - Efeito da água (A), da pressão (P) e do tempo (T) na concentração de AG de origem microbiana durante a digestão fermentativa (mg/g MS)

	Tratamento com água						Tratamento sem água						Erro Padrão da Média	<i>p-value</i>			
	controle		P300		P500		controle		P300		P500			A	P	T	AxPxT
	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6					
DMA	0,58	0,67	0,57	0,70	0,58	0,68	0,54	0,71	0,61	0,70	0,57	0,71	0,044	0,634	0,805	<0,001	0,976
AG-iso	0,38	0,44	0,37	0,43	0,37	0,43	0,36	0,45	0,39	0,44	0,37	0,45	0,026	0,543	0,999	<0,001	0,982
AG-anteiso	0,42	0,46	0,41	0,47	0,40	0,49	0,40	0,49	0,43	0,49	0,41	0,49	0,027	0,553	0,943	<0,001	0,978
AGS ímpares	0,55	0,46	0,39	0,42	0,39	0,41	0,41	0,45	0,43	0,46	0,40	0,44	0,045	0,867	0,150	0,689	0,478
AGS pares	7,76	8,19	7,28	8,15	7,34	7,94	7,51	8,67	7,70	7,85	7,69	8,37	0,322	0,298	0,401	0,001	0,802
Outros AGMI	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05	0,07	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,007	0,758	0,541	0,009	0,977
Total AG (mg/g MS)	39,4	40,7	37,0	40,6	37,4	40,4	38,7	43,3	38,2	38,4	40,3	42,8	1,72	0,317	0,245	0,016	0,825

DMA, inclui DMA 13:0, DMA i-C14:0, DMA C14:0, DMA i-C15:0, DMA a-C15:0, DMA 15:0, DMA i-C16:0, DMA C16:0, DMA C18:1-t11, DMA C18:1-c9;

AG-iso, inclui i-C13:0, i-C14:0, i-C15:0, i-C16:0, i-C17:0, i-C18:0;

AG-anteiso, inclui a-C15:0, a-C17:0;

AGS ímpares, inclui C13:0, C15:0, C17:0, C19:0, C23:0;

AGS pares, inclui C12:0, C14:0, C16:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0;

Outros AGMI, inclui C16:1, C20:1-c11.

Pelos resultados obtidos na tabela acima, verificou-se que estes AG se encontram em concentrações muito reduzidas e não foi significativa a interação dos efeitos. Individualmente, o fator água não foi significativo em qualquer destes grupos de AG, não se verificando uma diferença evidente entre o tratamento com água e sem água. Relativamente à pressão, este fator também pareceu não ter influência no ensaio. O facto de estes fatores não terem tido evidência estatística, pode dever-se ao facto de a sua origem não ser o alimento (semente de soja), que foi onde o tratamento de alta pressão hidrostática atuou. Quanto à hora, é evidente a significância estatística ($P < 0,05$) na maior parte dos AG de origem microbiana devido ao tempo de incubação, o que demonstra que houve crescimento microbiano.

CONCLUSÃO e PERSPETIVAS FUTURAS

Os lípidos têm sido alvo de muitas pesquisas devido aos efeitos que podem ter na saúde humana. Uma das formas de contornar os seus efeitos negativos é tentar alterar a composição de AG dos alimentos antes que estes sejam consumidos pela população. Desta forma, olhando para os produtos de origem animal, interessa continuar a investigar o que se pode alterar na sua alimentação animal para que os seus produtos tenham maior proporção de ácidos gordos benéficos, nomeadamente AGPI (CLA, C18:1- n -11, C18:3-c9c12c15 e outros ácidos gordos ómega-3).

Relativamente ao processamento de alimentos por alta pressão hidrostática, é também ainda um tema em investigação, pelo que não foi possível obter muita informação na literatura sobre o objeto de estudo deste ensaio, de forma a conseguir obter conclusões definitivas. No entanto, e apesar das suas limitações, é conhecido o seu potencial dado ser um tratamento atérmico, não alterando as propriedades nutritivas e sensoriais do alimento, e têm-se obtido resultados bastante positivos na segurança e prolongamento da vida útil dos produtos.

Deste ensaio, onde se averiguou o efeito da aplicação de alta pressão da semente de soja no metabolismo ruminal dos ácidos gordos, nomeadamente, através da análise da biohidrogenação, é possível concluir que o tratamento de alta pressão hidrostática influencia de alguma forma a biohidrogenação, e que a forma como o tratamento é feito (com água, sem água e a intensidade da pressão) pode influenciar a concentração de ácidos gordos de forma benéfica ou não.

Pelo que foi apresentado, conclui-se que os resultados obtidos são bastante promissores uma vez que sugerem que o tratamento das sementes sem adição de água e com pressões mais baixas, que em termos tecnológicos e financeiros são mais vantajosos, aumenta a proteção dos ácidos gordos polinsaturados da biohidrogenação ruminal, o que potenciará um aumento destes ácidos gordos nos produtos dos ruminantes, nomeadamente na carne e no leite.

É de referir que este é um estudo preliminar, e que são necessários mais estudos científicos sobre o efeito do tratamento de alta pressão hidrostática na soja, e noutras sementes oleaginosas, como por exemplo em semente de linhaça ou de girassol, para que possa ser possível comparar resultados, chegar a conclusões coerentes e suportadas por vários investigadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akoh, C.C and Min, D.M. (2008). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3ª Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, USA. Acedido em Nov. 19, 2014. Disponível: <http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Food%20Lipids%20-%20Chemistry,%20Nutrition%20and%20Biotechnology%20Third%20Edition.pdf>.

Albuquerque, T. (2009). *Composição em ácidos gordos de batatas fritas de pacote comercializadas em Portugal e a sua importância na nutrição*. Tese de Mestrado. Coimbra: Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra. Acedido a Ago. 6, 2015. Disponível: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/727/1/Mestrado_TGA.pdf.

Alves, S. P. (2011). *Ruminant lipid nutrition and metabolism: development and application of methodologies for fatty acid analysis*. Tese de doutoramento em ciências veterinárias. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.

Alves, S.P., Santos-Silva, J., Cabrita, A.R.J. & Bessa, R.J.B. (2013). *Detailed dimethylacetal and fatty acid composition of rumen content from lambs fed lucerne or concentrate supplemented with soybean oil*. PLoS ONE 8(3): e58386. doi:10.1371/journal.pone.0058386.

Andriguetto, J. et al. (2002). *Nutrição Animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal*. São Paulo. Acedido a Ago. 12, 2015. Disponível: https://books.google.pt/books?id=jlUIBJ4eeroC&pg=PA315&lpg=PA315&dq=sementes+oleaginosas+alimenta%C3%A7ao+animal&source=bl&ots=7QvIJOJKiZ&sig=VxQkQelJ5ArWHRMIg-IECzsQoc&hl=ptPT&sa=X&ved=0CDwQ6AEwBGoVChMInLW_6GjxwIVg1YUCh3ZRg2z#v=onepag_e&q=sementes%20oleaginosas%20alimenta%C3%A7ao%20animal&f=false.

Bellaver, C. & Snizek, P.N. (2012). *Processamento da soja e suas implicações na alimentação de salinos e aves*. Acedido a Ago. 31, 2015. Disponível: http://file.aviculturaindustrial.com.br/Material/Tecnico/2012/soja_si_ai.pdf.

Berk, Zeki. (1992). *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans*. Israel Institute of technology. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e00.htm#con>.

Bessa, R.J.B. (2001). *Utilização de óleo de soja como suplemento de luzerna desidratada na alimentação de ovinos. Efeito sobre o ecossistema e metabolismo retículo-ruminal*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Bessa, R.J.B. (2002). *Revalorização nutricional das gorduras dos ruminantes*. Porto: ICBAS – Universidade do Porto. ENZ-INIA. 30pp.

Bessa, R.J.B., Portugal, P.V., Mendes, I.A. & Santos-Silva, J. (2005). *Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate*. Livestock Production Science. 96:185-194.

Bessa, R.J.B. (s/data). *A metabolização dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen. Parte I – Biohidrogenação*. Laboratório de Metabolismo Lipídico de Ruminantes-CIIISA-FMV. Lisboa. Acedido a Ago. 22, 2015. Disponível: <http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/150-bioidrogenacao>.

Bolumar, T., Skibsted, L. & Orlén, V. (2012). *Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing*. Food Chemistry. 134:2114-2120.

Brasil, I.C., Vasconcelos, I.M., Morais, J.K. et al. (2004). *Efeito do processamento térmico na qualidade nutricional da soja em dietas para frangos de corte*. Acedido a Ago. 30, 2015. Disponível: www.propgpq.uece.br/semana_universitaria/anais/.../agrarias_03.doc.

- Buccioni, A., Decandia, M. et al. (2012). *Lipid metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant*. Animal Feed Science and Technology. Elsevier. 174:1-25.
- Campos, F.P., Dosualdo, G & Cristianini, M. (2003). *Utilização da Tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos*. Brazilian journal of food technology. 6(2):351-357.
- Candeias, V., Nunes, E., Morais, C., Cabral, M & Silva, P.R. (2005). *Gorduras: princípios para uma alimentação saudável*. Direção Geral de Saúde, Lisboa. Acedido a Ago. 07, 2015. Disponível: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008722.pdf>.
- Carrageta, M. (2008). *Tudo o que deve saber sobre o Colesterol*. Fundação Portuguesa de Cardiologia. Lisboa. Acedido a Ago. 08, 2015. Disponível: <http://www.fpcardiologia.pt/wp-content/uploads/2013/08/Brochura-CRC-Colesterol-N%C2%BA-10-Final.pdf>.
- Carvalho, M.G. (2014). *Tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos (página 2)*. Monografia. Universidade Federal do Ceará. 21pp.
- Casal, S. (2010). *Estrutura bioquímica e metabolismo das diferentes gorduras*. Revista Factores de Risco. nº16, 56-63pp. Acedido a Ago. 06, 2015. Disponível: <http://www.spc.pt/DL/RFR/artigos/242.pdf>.
- Chefetel, J.C. & Culioli, J. (1997). *Effects of high pressure on meat: a review*. Meat Science. 46(3):211-236.
- Chempro. (2014). *Top-notch technology in production of oils and fats*. Áustria. Acedido a Ago. 18, 2015. Disponível: <http://www.chempro.in/fattyacid.htm>.
- Christie, W.W. (1989). *Gas Chromatography and Lipids*. The Oily Press. Bridgwater. Acedido a Nov. 19, 2014. Disponível: http://lipidlibrary.aocs.org/gc_lipid/02_prelim/index1.htm.
- Christie, William. (2014). *A Lipid primer: saturated straight-chain*. AOCS Library. Acedido a Ago. 29, 2015. Disponível: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39327#biosyn>.
- Christie, Willian. (2012). *A Lipid primer: branched-chain*. AOCS Lipid Library. Acedido a Ago. 29, 2015. Disponível: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39321>.
- Church, D.C. (1979). *Digestive physiology and nutrition of ruminants. Vol.1 – Digestive Physiology*. 3ªed. Oxford Press Inc. 350pp.
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C. & Sleator, R.D. (2008). *High-pressure processing: effects on microbial food safety and foos quality*. Microbiology Letters. 281:1-9.
- Costa, D. (2010). *Degradabilidade ruminal e parâmetros da fermentação em dietas contendo silagem de cana-de-açúcar e caroço de algodão*. Tese de Doutorado. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Acedido a Ago. 11, 2015. Disponível: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-8FMJFH/tese_dayana_alves_costa.pdf?sequence=1.
- Costa, N. (2014). *Avaliação de ácidos gordos trans em alimentos processados: estudo do panorama português*. Tese de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição. Porto; FCNA – Universidade do Porto. Acedido a Ago. 11, 2015 Disponível: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/78310/2/111646.pdf>.
- Dias Filho, S.A. (2004). *Avaliação físico-química, toxicológica e da estabilidade do óleo de tapiá*. Dissertação de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. UFPB. 94pp.
- Dijkstra, Albert J. (2006). *Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils*. European Journal of Lipid Science and Technology. 108(3):249–264.

- EFIC. (2008). *A importância dos ácidos gordos ómega 3 e ómega 6. European Food Information Council*. Acedido a Ago. 08, 2015. Disponível: <http://www.eufic.org/article/pt/nutricao/gorduras/artid/importancia-dos-acido-gordos-omega-3-e-omega-6/>.
- Esquível, M.G. (2014). Os Lípidos. Slides de Aulas. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Acedido a Ago. 01, 2015. Disponível: https://www.google.pt/search?q=lipidos+maria+gloria+ezquivel&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=uHTDVYvIBMH8Uu6iqdgE.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J. & Dennis, E.A. (2009). *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids*. J.Lipid Res. 50: S9-S14. Acedido a Ago. 05, 2015. Disponível: http://shaker.umh.es/docencia/Biomoleculas_ONLINE/lipid/review.2009.lipidclassification.pdf.
- Figueiredo P. & Santos, G. (2003). *CLA: com para o produtor, bom para o consumidor*. Acedido a Ago. 18, 2015. Disponível: <http://www.nupel.uem.br/leiteCLA.pdf>.
- Flevez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F. & Doreau, M. (2007). *Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation in vivo, in vitro and in situ*. Eur. J. Lipid Science Technology. 109: 740-756.
- Fonseca, H. & Gutierrez, L.E. (1974). *Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais*. Acedido a Ago. 12, 2015. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/aesalq/v31/38.pdf>.
- Freitas, J., Bravim, F., Buss, D., Lemos, E., Alberto, A., Fernandes, R. & Fernandes, P. (2012). *Influence of cellular fatty acid composition on the response of Saccharomyces cerevisiae to hydrostatic pressure stress*. Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research. 12:871-878.
- Fulco, A.J. (1977). *Fatty acid desaturation in microorganisms. Polyunsaturate Fatty Acids*. W.H. Kunau e R.T. Holman. American Oil Chemists Society. Illinois. 19-36.
- Fulco, A.J. (1983). *Fatty-acid metabolism in bacteria*. Progress in Lipid Research. 22:133-160.
- Fulladosa, E., Serra, X., Gou, P. & Arnau, J. (2009). *Effects of potassium lactate and high pressure on transglutaminase restructured dry-cured hams with reduced salt content*. Meat Science. 82:213-218.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. & Hugas, M. (2004). *Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf-life*. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 5:451-457.
- Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F.Y.I. & Park, J. (2011). *High Pressure Treatments of soybean and soybean products. Recent trends for enhancing the diversity and quality of soybean products*. Edited by Dora Krezhova. Intech. 67-80.
- Goularte, S.R., Ítavo, L.C.V., Santos, G.T., Itavo, C.C.B.F., Oliveira, L.C.S., Favaro, S.P., Dias, A.M., Torres Junior, R.A.A. & Bittar, C.M.M. (2011). *Volatile fatty acids in rumen of cows fed different concentrate level diets*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63(6). Acedido a Set. 15, 2015. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000600027&script=sci_arttext.
- Guo, Z., Zeng, S., Lu, X., Zhou, M., Zheng, M. & Zheng, B. (2015). *Structural and physicochemical properties of lotus seed starch treated with ultra-high pressure*. Food Chemistry. 186:223-230.
- Harfoot C.G. & Hazlewood, G.P. (1997). *The rumen microbial ecosystem: lipid metabolism in the rumen*. P.H. Hobson and C.S. Stewart editor. Blackie academic & professional. 382-426.
- He, Z., Huang, Y., Li, H., Qin, G., Wang, T. & Yang, J. (2012). *Effect of high-pressure treatment on the fatty acid composition of intramuscular lipid in pork*. Meat Science. 90:170-175.
- Herrero, A.M. & Avila, M.D.R. (2006). *Innovaciones en el procesamiento de alimentos: tecnologías no térmicas*. Revista de Medicina. Universidad Navarra. 50:71-74.

- Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J.M. (2002). *New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology*. Meat Science. 62:359-371.
- Ibramugy, A.D. & Chibale, M.A. (2013). *Avaliação físico-química dos grãos de soja*. Laborat. Moçambique. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAgJ7wAK/avaliacao-fisico-quimica-dos-graos-soja>.
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE (2008). *Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem*. Journal of Animal Science. 86: 397-412.
- Jeremias, César (2009). *Tecnologia de qualidade desde 1937: vantagens de extrusar soja*. Lucato. Acedido a Ago. 30, 2015. Disponível: <http://www.lucato.ind.br/Extrusar%20Soja%20VANTAGENS.pdf>.
- Kamphorst, J.J., Cross, J.R., Fan, J., de Stanchina, E., Mathew, R., White, E.P., Thompson, C.B. & Rabinowitz, J.D. (2013). *Hypoxic and ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids*. PNAS. 110(22):8882-8887.
- Kaneda T. (1991). *Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bactéria – biosynthesis, function and taxonomic significance*. Microbiological Reviews. 55:288-302.
- Kates, M. (1986). *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. Elsevier Science, New York.
- Klein, Catherine. (2011). *Biohydrogenation of Docosahexaenoic Acid*. All dissertations. Paper 802. Clemson University. 97pp.
- Kurki, Al., Bachmann, J. & Hill, H. (2008). *Oilseed processing for small-scale producers*. ATTRA – National Sustainable Agriculture Information Service. Acedido a Ago. 31, 2015. Disponível: <http://www.cyberlipid.org/oilseed2008.pdf>.
- Lima, M.F. et al. (2004). *Ácido graxo ómega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação*. Nutrire: Rev.Soc.Bras.Alim. Nutr. 28:65-77. Acedido a Ago. 22, 2015. Disponível: https://naturalis.com.br/pdf/DHA/artigo_01.pdf.
- Lourenco, M, Ramos-Morales E. & Wallace, R.J. (2010). *The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation*. Animal 4:1008-1023.
- Machado, J.C., Waquil, J.M., Santos, J.P. & Reichenbach, J.W. (2006). *Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte. 27(232):76-57.
- Maia, M.R. G. (2010). *Microorganisms and dietary factors affecting biohydrogenation and conjugated linoleic acid production in the rumen ecosystem*. Tese de doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Mancini Filho, J., Lajolo, F.M. & Vizeu, D.M. (1979). *Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity*. Journal of Food Science. Chicago. 44(4):1194-1196.
- Marques, A.C. (2008). *Propriedades funcionais da linhaça (Linum usitatissimum L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Acedido a Ago. 18, 2015. Disponível: http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2363.
- Martins, C. (2014). *Efeito da tecnologia de alta pressão hidrostática nas características microbiológicas e físicas da tripa natural de suíno*. Tese de Mestrado. Lisboa: ISA/FMV – Universidade de Lisboa.
- Martins, M.B. et al. (2008). *Propriedades dos ácidos gordos polinsaturados Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça*. Rev Inst Ciências Saúde. 26(2):153-156. Acedido a Ago. 08, 2015.

Disponível: http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2008/02_abr_jun/V26_N2_2008_p153-156.pdf.

Mathias, S.P., Rosenthal, A., Gaspar, A., Deliza, R., Slongo, A.P., Vicente, J., MAsson, L.M. & Barbosa, C. (2010). *Alterações oxidativas (cor e lipídios) em presunto de peru tratado por alta pressão hidrostática*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 30(4):852-857.

Medina-Meza, I.G., Barnaba, C. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2014). *Effects of high pressure processing on lipid oxidation: a review*. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 22:1-10.

Mendes, J. Sousa & Silva, M., Machado, M. & Santos, P. (2008). *Biossíntese dos lípidos*. Metabolismo e Endocrinologia. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Mendonça, A. (2012). *Ácidos graxos saturados e insaturados*. Acedido a Ago. 06, 2015. Disponível: <http://pt.slideshare.net/adriannemendonca/cidos-graxos-saturados-e-insaturados>.

Moreira, N.X., Curi, R. & Mancini Filho, J. (2002). *Ácidos graxos: uma revisão*. Revista Nutrire. São Paulo. 24: 105-123. Acedido a Ago. 06, 2015. Disponível: <http://www.revistanutrire.org.br/files/v24n%C3%BAnico/v24nunicoa07.pdf>.

Morgado, E., Ezequiel, J., Galzerano, L., Malheiros, E.B., Santos, V.C. & Cattelan, J.W. (2013). *Fermentação, cinética e degradação ruminal em ovinos alimentados com fontes de carboidratos associadas ao óleo*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 34(6):3081-3092. Acedido a Ago. 30, 2015. Disponível: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/12630>.

Motta, V.T. (2009). *Lípídeos e Membranas*. *Bioquímica Básica*. Autolab. Acedido a Nov. 19, 2014. Disponível: <http://www.gilvan.pro.br/lipidios.pdf>.

Moura, N.C., Canniatti-Brazaca, S.G., Souza, M.C. & Dias, C.T.S. (2007). *Composição de cultivars de soja submetida a diferentes tratamentos térmicos*. Alim. Nutr., Araraquara. 28(2):151-160. Acedido a Ago. 30, 2015. Disponível: <http://www.lce.esalq.usp.br/tadeu/soja.pdf>.

Mozaffarian, D., Katan M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. & Willett, W.C. (2006). *Trans fatty acids and cardiovascular disease*. New England Journal of Medicine. 354:1601-1613. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra054035>.

Neto, J.B.F., Krzyzanowski, F.C., Pádua, G.P., Costa, N.P. & Henning, A.A. (2007). *Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade – série sementes*. Circular técnica 40. Acedido a Ago. 25, 2015. Disponível: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/cirtec/cirtec40.pdf>.

Newkirk, Rex. (2010). *Soybean: feed industry guide 1st edition*. Canadian International Grains Institute. 48pp. Acedido a Ago. 30, 2015. Disponível: <https://cigi.ca/wp-content/uploads/2011/12/2010-Soybean-Feed-Industry-Guide.pdf>.

Oliveira, D.A., Piovesan, N.D., José, I.C., Barros, E.G., Dias, D.C. & Moreira, M.A. (2006). *Lipoxigenases e teor de ácido linomênico relacionados à qualidade de sementes de soja*. Revista Brasileira de Sementes. 28(1):30-35.

Passini, R., Rodrigues, P., Castro, A. & Silveira, A. (2003). *Parâmetros da fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados*. Revista Bras. Zootec. 32(5):1266-1274.

Patel, D., Kumar, R. & Prasad, S. (2004). *Variation in the chemical constituents of soybean due to industrial pollution*. J.Serb.Chem.Soc. 69:635-640. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2004/0352-51390409635P.pdf>.

Patterson, M.F., Ledward, D.A. & Rogers, N. (2006). *High Pressure Processing*. In J.G. Brennan (Ed.), Food Processing Handbook. Weinheim, Alemanha. 173-196pp.

Pighinelli, Anna. (2010). *Estudo da extração mecânica e da transesterificação etílica de óleos vegetais*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Agrícola, Uni.Est. Campinas. 26-28.

Acedido a Ago, 2015. Disponível: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/882711/1/AnnaLeticiaMontenegroTurtelliD.pdf>.

Popa, V.M., Gruia, A., Raba, D.N., Dumbrava, D., Moldovan, C., Bordean, D. & Mateescu, C. (2012). *Fatty acid composition and oil characteristics of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from Romania*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 18(2):136-140. Acedido a Ago. 18, 2015. Disponível: http://journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/61602L07_Popa_Vol.18%282%29_2012.pdf

Puignau, J. (1992). *Dialogo XXXIV: Produccion de soja*. IICA, Montevideo, Uruguay. Acedido a Ago. 14, 2015. Disponível: https://books.google.pt/books?id=sowgAQAAIAAJ&pg=PA252&lpg=PA252&dq=processamento+semente&source=bl&ots=v-Bqz2CKIlg&sig=33rtswJdkSBQrF9Ab3Emk1qHJ3U&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CFIQ6AEwCWovChMIraj_0Y3AxwIVWHOOCh07bwtw#v=onepage&q=processamento%20semente&f=false.

Rastogi, N.K., Raghavaro, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K. & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47:69-112. Acedido a Ago. 22, 2015. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364696>

Rocha, S.C. (2009). *Ácidos Gordos Poliinsaturados n-3: benefícios para a saúde*. Monografia. Faculdade de ciências da nutrição e alimentação. Universidade do Porto. Acedido a Ago. 22, 2015. Disponível: http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54721/3/127719_0940TCD40.pdf.

S.Thiago, L. & Silva, J. (2003). *Soja na alimentação de bovinos*. Circular técnica 31. Embrapa. Acedido a Ago. 14, 2015. Disponível: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104635/1/Soja-na-alimentacao-de-bovinos.pdf>.

Salar, R.K., Gahlawat, S.K., Siwach, P. & Duhan, J.S. (2014). *Biotechnology: prospects and applications – Capítulo 13*. Springer Science & Bussines Media. 165-166. Acedido a Ago. 29, 2015. Disponível: <https://books.google.pt/books?id=oZa4BAAAQBAJ&pg=PA165&lpg=PA165&dq=de+novo+synthesis+of+branched+fatty+acids&source=bl&ots=P0iRntkASw&sig=h9ojqpMpl5gQFxFwPePQHs2oVAlly&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CGsQ6AEwCWovChMIh4jGiKDMxwIVC-kUCh1n6AxL#v=onepage&q=de%20novo%20synthesis%20of%20branched%20fatty%20acids&f=false>.

Santana Neto, J.A., Oliveira, V.S., Valença, R.L. & Cavalcante, L.A.D. (2012). *Características da fermentação ruminal de ovinos em pastejo – revisão de literatura*. Revista Científica de Medicina Veterinária. X(19):21pp.

Sawazaki, H.E., Teixeira, J.P.F. & Miranda, M.A.C. (1987). *Avaliação da atividade da lipoxigenase em linhagens de soja*. Bragantia, Campinas. 46(2):371-380.

Serra, X., Sárraga, C. et al. (2007). *High pressure applied to frozen ham at different process stages: effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham*. Meat Science. 75:12-20.

Sierra, Elwi. (2014). *Bioquímica do rúmen*. Apresentação UEP. Acedido a Set. 15, 2015. Disponível: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/marcostuliooliveira/aula10bioquimicarumen.pdf>.

Silva, B. (2004). *A casca de soja e a sua utilização em alimentação animal*. Revista eletrônica Nutritime. 1(1):59-68. Acedido a Ago. 14, 2015. Disponível: http://nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/008V1N1P59_68_JUL2004.pdf.

Silva, L. et al. (2011). *SimbiSoy ICETA*. I&DT. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: http://www.adi.pt/docs/FOOD_I&DT_Simbisoy.pdf.

Silva, M., Naves, M., Oliveira, R. & Leite, O. (2006). *Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja*. Ciência Tecnologia Alimentos. Campinas. 26(3):571-576. Acedido a Ago. 13, 2015. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n3/31758.pdf>.

Silva M.S.P. (2013). *Utilidade dos ácidos gordos dos eritrócitos como biomarcadores dos ácidos gordos do músculo em bovinos*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 74pp.

Sirvaranjani, M.D. (2015). De novo synthesis of fatty acids. Acedido a Ago. 28, 2015. Disponível: http://pt.slideshare.net/ranajni_09/de-novo-synthesis-of-fatty-acids.

Smelt, J.P.P.M. (1998). *Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends in Food Science and Technology*. 9:152-158.

Sucupira, N., Xerez, A.C.P. & Sousa, P.H.M. (2012). *Perdas vitamínicas durante o tratamento térmico de alimentos*. UNOPAR. *Cient. Cienc. Biol. Saúde*. 14(2):121-128.

Tavares, M., Martins, M., Ferraz, V. & Fernandes, L. (2010). *Altas Pressões*. Monografia. Processamento Geral dos Alimentos. ESA Coimbra. 29pp.

Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lámela, C., Vázquez, M. & Simal-Gándarra, J. (2001). *Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos*. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 3:66-80. Acedido a Ago. 15, 2015. Disponível: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72430101>.

Thompson G.A. (1992). The regulation of membrane Lipid metabolism: regulation of branched-chain fatty acid synthesis. 2ª edição. 38-39. Acedido a Ago. 28, 2015 Disponível: <https://books.google.pt/books?id=f-fe2jLjSPIC&pg=PA39&lpg=PA39&dq=de+novo+synthesis+of+branched+fatty+acids&source=bl&ots=46l1-5AeKU&sig=taEvFS48fPNfv1Xh5Y8YKgsn0Ms&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CFcQ6AEwBmoVChMIh4jGiKDMxwIVC-kUCh1n6AxL#v=onepage&q=de%20novo%20synthesis%20of%20branched%20fatty%20acids&f=false>.

Torrezan, R., Frazier, R. & Cristianini, M. (2010). *Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os teores de fitato e inibidor de tripsina de soja*. B.CEPPA. Curitiba. 28(2):179-186. Acedido a Ago. 07, 2015. Disponível: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/viewFile/20400/13590>.

Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M.C. & Enjalbert, F. (2006). *Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and trans-octadecenoic acids in situ*. *Revue Méd. Vét.*. 157(10):509-514.

Troegeler-Meynadier, A., Puaut, S., Farizon, Y. & Enjalbert, F. (2014). *Effects of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation in vitro*. *J.Dairy Sci*. 97:5657-5667.

UNL (2002). *O Azeite e o ácido oleico*. Química dos produtos naturais I. FCT, Universidade Nova de Lisboa. Acedido a Ago. 09, 2015. Disponível: <http://www2.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qpn1/molweb/2002/oleico/NET.htm>.

Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª ed. Ithaca: Cornell University Press. 476pp. Acedido a Ago. 24, 2015. Disponível: <https://books.google.pt/books?id=-mwUu6PL1UgC&pg=PP1&lpg=PP1&dq=Nutritional+ecology+of+the+ruminant&source=bl&ots=DOSxwZldRI&sig=RLH6oVRkkTqxtl8qfsaY4MwNmdl&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CDkQ6AEwAmoVChMI7Jrr3uaVyAIVxQMaCh2s3QBd#v=onepage&q=Nutritional%20ecology%20of%20the%20ruminant&f=false>.

Varga, V. (2014). *Soybeans and soybean byproducts for dairy cattle*. Dairy & Animal Science. The Pennsylvania State University. Acedido a Ago. 31, 2015. Disponível: <http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/nutrition-and-feeding/ration-ingredients/soybeans-and-soybean-byproducts-for-dairy-cattle>.

Ven, C., Matser, A.M. & Berg, R.W. (2005). *Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington. 53(4):1087-1092.

Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Lurquin, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., Paelinck, H., Hendrickx, M.E.G. & Michiels, C.W. (2011). *Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12:407-415.

Vilela, A.H.F., Gama, B.S., Ferreira, C.G.M, Romanelli, M.T.D., Abrantes, P.H.A. & Almeida, P.G. (s/data). Processo de secagem da soja. Centro Universitário de Belo Horizonte. Acedido a Ago. 24, 2015. Disponível: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAfNTwAH/processo-secagem-soja>.

Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, ARJ., Fonseca, A.J.M. & Dewhurst, R.J. (2006). *Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review*. Animal Feed Science and Technology. 131:389-417.

Yumoto, I. (2013). *Cold-adapted microorganisms*. Caister Academic Press. UK. 189-201. Acedido a Ago. 29, 2015. Disponível: https://books.google.pt/books?id=Ts8AAgAAQBAJ&pg=PA190&lpg=PA190&dq=de+novo+synthesis+of+fatty+acids+microorganisms&source=bl&ots=G s0UQDTMVH&sig=-rsRutifUjGAvtmb8WBQ_OaRJRY&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CCsQ6AEwAWoVChMlzMOgrpzMxwIVy34aCh27Nge-#v=onepage&q=de%20novo%20synthesis%20of%20fatty%20acids%C&f=false.

Zambiasi, R.C., Przybylski, R., Zambiasi, M.W. & Mendonça, C.B. (2007). Fatty acid composition of vegetable oils and fats. Curitiba. V.25(1): 111-120. Acedido a Ago. 12, 2015. Disponível: <http://www.nononsensecosmethic.org/wp-content/uploads/2015/01/fatty-acid-oil-composition.pdf>.

ANEXOS

- Nomenclatura dos AGS e AGI – Anexo 1
- Bactérias intervenientes na BH do Grupo A e do Grupo B – Anexo 2
- Procedimento para incubações *in vitro* com suco de rúmen – Anexo 3
- Identificação dos códigos das amostras do ensaio – Anexo 4
- Protocolo: Transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal – Anexo 5
- Determinação de AGV em incubações com suco de rúmen – Anexo 6
- Exemplo do Cromatograma dos AG de cadeia longa – Anexo 7
- Equações das retas de regressão das curvas de calibração dos AGV – Anexo 8
- Exemplo do Cromatograma dos AG voláteis – Anexo 9

Anexo 1 – Nomenclatura dos ácidos gordos saturados e insaturados

Tabela 11 - Nomenclatura dos AG saturados (adaptado de Akoh & Min, 2008)

Nome Sistemático	Nome Comum	Nome Shorthand
Ác. Metanóico	Ác. Fórmico	C1:0
Ác. Etanóico	Ác. Acético	C2:0
Ác. Propanóico	Ác. Propiónico	C3:0
Ác. Butanóico	Ác. Butírico	C4:0
Ác. Pentanóico	Ác. Valérico	C5:0
Ác. Hexanóico	Ác. Capróico	C6:0
Ác. Heptanóico	Ác. Enantico	C7:0
Ác. Octanóico	Ác. Caprílico	C8:0
Ác. Nonanóico	Ác. Pelargónico	C9:0
Ác. Decanóico	Ác. Cáprico	C10:0
Ác. Undecanóico	-	C11:0
Ác. Dodecanóico	Ác. Laurico	C12:0
Ác. Tridecanóico	-	C13:0
Ác. Tetradecanóico	Ác. Merístico	C14:0
Ác. Pentadecanóico	-	C15:0
Ác. Hexadecanóico	Ác. Palmítico	C16:0
Ác. Heptadecanóico	Ác. Margárico	C17:0
Ác. Octadecanóico	Ác. Esteárico	C18:0
Ác. Nonadecanóico	-	C19:0
Ác. Eicosanóico	Ác. Araquídico	C20:0
Ác. Docosanóico	Ác. Beénico	C22:0
Ác. Tricosanóico	-	C23:0
Ác. Tetracosanóico	Ác. Lignocérico	C24:0
Ác. Hexacosanóico	Ác. Cerótico	C26:0
Ác. Octacosanóico	Ác. Montânico	C28:0
Ác. Tricontanóico	Ác. Melíssico	C30:0
Ác. Dotriacontanóico	Ác. Laceroico	C32:0

Tabela 12 - Nomenclatura dos AG insaturados (adaptado de Akoh & Min, 2008)

Nome Sistemático	Nome Comum	Nome Shorthand
c9-Dodecenoico	Ác. Lauroleico	C12:1ω3
c5-Tetradecenoico	Ác. Fiseterico	C14:1ω9
c9-Tetradecenoico	Ác. Miristoleico	C14:1ω5
c9-Hexadecenoico	Ác. Palmitoleico	C16:1ω7
c7,c10,c13-Hexadecatrienoico	-	C16:3ω3
c4,c7,c10,c13-Hexadecatetraenoico	-	C16:4ω3
c9-Octadecenoico	Ác. Oleico	C18:1ω9
c11-Octadecenoico	Ác. <i>cis</i> -Vacénico	C18:1ω7
t11-Octadecenoico	Ác. Vacénico	*
t9-Octadecenoico	Ác. Elaídico	*
c9,c12-Octadecadienoico	Ác. Linoleico	C18:2ω6
c9,t11-Octadecadienoico	Ác. Ruménico	*
c9,c12,c15-Octadecatrienoico	Ác. Linolénico	C18:3ω3
c6,c9,c12-Octadecatrienoico	Ác. γ-Linolénico	C18:3ω6
c6,c9,c12,c15-Octadecatetraenoico	Ác. Estearidónico	C18:4ω3
c11-Eicosenoico	Ác. Gondóico	C20:1ω9
c9-Eicosenoico	Ác. Gadoleico	C20:1ω11
c8,c11,c4-Eicosatrenoico	Ác. Dihomo-γ-Linolénico	C20:3ω6
c5,c8,c11,c14-Eicosatetraenoico	Ác. Araquidónico	C20:4ω6
c5,c8,c11,c14,c17-Eicosapentaenoico	Ác. Eicosapentanoico	C20:5ω3
c13-docosenoico	Ác. Erucico	C22:1ω9
c11-docosenoico	Ác. Cetoléico	C22:1ω11
c7,c10,c13,c16,c19-Docosapentaenoico	Ác. DPA, Clupanodónico	C22:5ω3
c4,c7,c10,c13,c16,c19-Docosahexaenoico	Ác. DHA, Cervónico	C22:6ω3
c15-Tetracosenoico	Ác. Nervónico	C24:1ω9

* Na nomenclatura Shorthand não existe denominação para os AG *trans*

Anexo 2 – Bactérias intervenientes na BH do Grupo A e do Grupo B

Tabela 13 - Bactérias ruminais capazes de hidrogenar os AGI em C18 e padrões de BH observados (adaptado de Harfoot & Hazlewood (1997), citado por Bessa (2001))

Grupo	Bactéria	Produtos finais resultantes da hidrogenação de			Referências ¹
		C18:3 n-3	C18:2 n-6	C18:1 n-9	
A	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	—	C18:1 (46%)	—	Polan <i>et al.</i> (1964)
A	<i>B. fibrisolvens A38</i>	—	C18:2 c-9,t-11 (68%) C18:1 t-9 e t-11 (23%)	Não hidrogenou	Kepler <i>et al.</i> (1966)
A	<i>B. fibrisolvens A38</i>	C18:3 c-9,t-11,c-15 C18:2 Δ ¹¹ ,Δ ¹⁵	C18:2 c-9,t-11 C18:1 t-11	—	Kepler e Tove (1967)
A	<i>B. fibrisolvens S2</i>	C18:1 t-11 (nos lípidos celulares)	C18:1 t-11 (nos lípidos celulares)	—	Hazlewood e Dawson (1979)
A	<i>Treponema (Borrelia)</i>	Isomerização e posterior hidrogenação	C18:2 c-9,t-11 (5%) C18:1 t-11 (85%)	—	Sachan e Davis (1969) Yokoyama e Davis (1971)
A	<i>Micrococcus sp.</i>	Isomerização e posterior hidrogenação	C18:1 t-11 (principal isómero)	—	Miles <i>et al.</i> (1970)
A	<i>Ruminococcus albus F2/6</i>	C18:1 t (95%) C18:1 c (5%) C18:3 c-9,t-11,c-15* C18:2 t-11,c-15*	C18:2 c-9,t-11* C18:1 t (95%) C18:1 c (5%)	Não hidrogenou	Kemp <i>et al.</i> (1975)
A	<i>Eubacterium F2/2</i>	C18:3 c-9,t-11,c-15 C18:2 t-11,c-15 C18:1 t-11	C18:2 c-9, t-11 C18:1 t-11 (95%)	Não hidrogenou	Kemp <i>et al.</i> (1975)
A	<i>Eubacterium W461</i>	C18:3 c-9,t-11,c-15* C18:2 t-11,c-15* C18:1 t-11 (33%) C18:1 c-11 (48%)	18:2 c-9,t-11* C18:1 t-11 (48%)	Não hidrogenou	Kemp <i>et al.</i> (1975)
A	<i>Bacilo gram (-) R8/3</i>	C18:2 t-11,c-15 (100%)	C18:1 t-11 (96%)	Não hidrogenou	
A	<i>Bacilo gram (-) LMS/1A ; LMS/1B</i>	C18:2 t-11,c-15 (100%)	C18:1 t-11 (100%)	Não hidrogenou	Hazlewood <i>et al.</i> (1976)
A	<i>2/7/2</i>	C18:2 t-11,c-15 (100%)	C18:2n-3 (25% intacto) C18:1 t-11 (75%)	—	Hazlewood <i>et al.</i> (1976)
A	<i>Bacilo gram (-) EC7/2</i>	C18:2 t-11,c-15 (70%) C18:1 t-11 (30%)	C18:1 t-11 (100%)	Não hidrogenou	Hazlewood <i>et al.</i> (1976)
A	<i>Bacilo gram (-) R7/5</i>	C18:1 t-10 (6%) C18:1 t-11 (32%) C18:1 t-12 (15%) C18:1 c-11 (44%) C18:1 c-12 (4%)	C18:1 t-10 (11%) C18:1 t-11 (14%) C18:1 t-12 (8%) C18:1 c-11 (62%) C18:1 c-12 (5%)	Não hidrogenou	Hazlewood <i>et al.</i> (1976)
A	<i>Vibrio gram (-) 2/9/1</i>	C18:1 t-10 (14%) C18:1 t-11 (41%) C18:1 t-12 (11%) C18:1 c-11 (29%) C18:1 c-12 (4%)	C18:1 t-10 (15%) C18:1 t-11 (46%) C18:1 t-12 (12%) C18:1 c-11 (25%) C18:1 c-12 (5%)	Não hidrogenou	
B	<i>Fusocillus babrahamensis P2/2</i>	C18:3 c-9,t-11,c-15* C18:2 t-11,c-15 (15%) C18:1 c-15 (85%)	C18:2 c-9,t-11* C18:1 t-11 (70%) C18:0 (30%)	C18:0 (80%) C18:0-OH (20%)	White <i>et al.</i> (1970) Hazlewood <i>et al.</i> (1976) Kemp <i>et al.</i> (1975)
B	<i>Fusocillus T344</i>	C18:3 c-9,t-11,c-15* C18:2 t-11,c-15* C18:1 c-15 (85%)	C18:2 c-9,t-11* C18:1 t-11 (65%) C18:0 (35%)	C18:1 t-11 (5%) C18:1 c-9 (5%) C18:0 (90%)	Hazlewood <i>et al.</i> (1976) Kemp <i>et al.</i> (1975)
B	<i>Bacilos gram (-) R8/5</i>	C18:2 t-11,c-15 (25%) C18:1 c-15 (50%) C18:1 t-15 (25%)	C18:1 t-11 (50%) C18:0 (40%)	C18:1 c-9 (60%) C18:0-OH (40%)	Hazlewood <i>et al.</i> (1976)

* aparecimento provisório ou transitório

¹ referências citadas por Harfoot & Hazlewood

t, trans; c-, cis; Δ, dupla ligação que tanto pode ser cis ou trans

Nota: O grupo A, mais numeroso, é constituído por bactérias capazes de hidrogenar 18:2 n-6 e 18:3 n-3 incompletamente, não produzindo ácido esteárico. O grupo B é capaz de hidrogenar completamente o 18:2 n-6, 18:1-c9 e outros isómeros 18:1, a C18:0 [43].

Anexo 3 – Procedimento para incubações *in vitro* com suco de rúmen

Método: LMLR-R5.1
Última alteração: 28-02-2014

Colheita e filtração:

1. Recolher conteúdo ruminal de ovinos canelados;
2. Filtrar o conteúdo ruminal por 4 camadas de gaze com um funil de porcelana para um kitazato de 1 ou 2L;
3. Juntar num frasco 100 mL de fluido ruminal de cada um dos animais;
4. Medir o pH do fluido ruminal filtrado de cada um dos animais e da mistura;

Meio de cultura e solução tampão:

1. Preparar solução tampão de McDougall (McDougall, 1948) de acordo com a tabela anexa;
2. Aquecer a solução tampão a 39°C e saturar com CO₂;
3. Verificar o pH da solução que deverá ser ~7 (se necessário acertar com sol. HCl);
4. Adicionar o conteúdo ruminal filtrado à solução tampão num frasco de tampa azul na diluição 1:2 (fluido ruminal:tampão, v/v) e saturar com CO₂;
5. Para 450 mL de meio de cultura adicionar 300 mL de sol. tampão e 150 mL do fluido ruminal filtrado.

Quantidades para 500 mL de solução tampão:		
<i>Solução A (dissolver em 100 mL de H₂O destilada)</i>		g
Cloreto de potássio	KCl	0,285
Cloreto de sódio	NaCl	0,235
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,060
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,020
<i>Adicionar a Solução A a um balão contendo em 100 mL:</i>		
Hidrogeno carbonato de sódio	NaHCO ₃	4,90
Hidrogeno fosfato disódico	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4,65
Perfazer o balão com 300 mL com água destilada		

Incubação:

1. Pesar 60 mg de cada substrato para os tubos de incubação;
2. Adicionar 6 mL do meio de cultura a cada tubo de incubação sob CO₂;
3. Colocar os tubos no banho de água a 39°C com agitação (colocar os tubos do tempo 0, diretamente na arca congeladora a -20°C, sem ir ao banho);
4. Retirar os tubos do banho após 6 horas de incubação e colocar diretamente na arca congeladora a -20°C.

Nota: o material a utilizar durante todo o procedimento deve ser aquecido em estufa a 39°C.

Anexo 4 – Identificação dos códigos das amostras do ensaio

Tabela 14 - Códigos das Amostras do ensaio

Semente	Pressão	Água	Tempo	Letra	Numeração	Código	Medição	Observações
Soja	0	0	0	A	1	A1	pH	Controlo
Soja	0	0	6	A	19	A19	pH	Controlo
Soja	0	0	0	A	37	A37	AG	Controlo
Soja	0	0	6	A	55	A55	AG	Controlo
Soja	0	50	0	D	4	D4	pH	Controlo
Soja	0	50	6	D	22	D22	pH	Controlo
Soja	0	50	0	D	40	D40	AG	Controlo
Soja	0	50	6	D	58	D58	AG	Controlo
Soja	300	0	0	G	7	G7	pH	P300
Soja	300	0	6	G	25	G25	pH	P300
Soja	300	0	0	G	43	G43	AG	P300
Soja	300	0	6	G	61	G61	AG	P300
Soja	300	50	0	J	10	J10	pH	P300
Soja	300	50	6	J	28	J28	pH	P300
Soja	300	50	0	J	46	J46	AG	P300
Soja	300	50	6	J	64	J64	AG	P300
Soja	500	0	0	M	13	M13	pH	P500
Soja	500	0	6	M	31	M31	pH	P500
Soja	500	0	0	M	49	M49	AG	P500
Soja	500	0	6	M	67	M67	AG	P500
Soja	500	50	0	P	16	P16	pH	P500
Soja	500	50	6	P	34	P34	pH	P500
Soja	500	50	0	P	52	P52	AG	P500
Soja	500	50	6	P	70	P70	AG	P500

Esta designação foi repetida cinco vezes, e em cada incubação, ao código da amostra adicionou-se E1, E2, E3, E4 ou E5.

Por exemplo, para a amostra A1 tivemos: A1-E1; A1-E2; A1-E3; A1-E4 e A1-E5.

Anexo 5 – Transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal

Método: LMLR-R3.1
Última alteração: 24-02-2013

Reagentes e soluções:

- Tolueno seco;
- n-Hexano com adição de 25 mg/L de BHT;
- n-Hexano para GC;
- Sulfato de sódio anidro;
- Água ultrapura;
- Metóxido de sódio 0,5M em metanol;
- Solução 10% HCl em metanol por adição de cloreto de acetilo em metanol seco. (ATENÇÃO: reação isotérmica, adicionar muito lentamente e com agitação o cloreto de acetilo ao metanol);
- Solução aquosa 6% K₂CO₃;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 (1 mg/mL em n-Hexano).

Procedimento:

1. Pesar a amostra para tubos (de 23 mL) com rolhas de teflon (certificar que vedam bem)

Nota: A quantidade de amostra deve ser tal de modo a conter 10 a 50 mg de ácidos gordos. Aproximadamente 500 a 250 mg de conteúdo ruminal, abomaso ou bactérias.

2. Adicionar 1 mL de padrão interno (1 mg/mL) e 1 mL de tolueno seco e colocar no ultrassons durante 10 min;
3. Adicionar 2 mL solução metóxido de sódio em metanol 0,5 M e levar ao vortex (10 seg);
4. Colocar em banho de água a 50°C durante 10 min, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
5. Adicionar 3 mL de solução HCl/metanol e agitar em vortex (10 seg);
6. Colocar novamente em banho de água a 80°C durante 10 min, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
7. Adicionar 2 mL da solução 6% K₂CO₃ e 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
8. Recolher o sobrenadante para um novo tubo que já contém 0,5 g de sulfato de sódio anidro;

9. Adicionar novamente ao resíduo 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
10. Recolher o sobrenadante para o mesmo tubo do passo 8;
11. No caso de amostras muito pigmentadas adicionar 0,5 g de carvão ativado e deixar repousar 1 hora;
12. Agitar o tubo com o sulfato de sódio anidro em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
13. Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um novo tubo e evaporar em corrente de azoto a 37°C;
14. Adicionar 1 mL de n-Hexano p/ GC e colocar num vial de GC.

Anexo 6 – Determinação de AGV em incubações com suco de rúmen

Método: LMLR-V1.1
Última alteração: 19-02-2014

Soluções

- Solução aquosa de ácido orto-fosfórico (25% v/v)
- Padrão interno, *iso*-C6, 50 mmol/L em água ultrapura.

Preparação do extrato de incubações com suco de rúmen

1. Descongelar os tubos à temperatura ambiente;
2. Homogeneizar em vortex a baixa velocidade, centrifugar durante 5 minutos e utilizar o extrato líquido no restante procedimento.

Procedimento:

Nota: todas as medições devem ser bastante rigorosas.

1. Pipetar 1 mL de extrato para um eppendorf;
2. Adicionar 170 µL de ácido orto-fosfórico (25% v/v) e 130 µL de padrão interno (50 mmol/L);
3. Agitar em vortex a baixa velocidade durante 30 segundos e deixar repousar durante 30 minutos no frigorífico;
4. Centrifugar a 14000 rcf durante 15 minutos;
5. Transferir o sobrenadante para um vial de GC;
6. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos AGV e guardar a -20°C.

Cálculos:

A determinação da concentração dos AGV (expressos em mmol/L), é efetuada para cada ácido gordo através de curvas de calibração ($y = a x + b$) utilizando padrão interno (PI).

$$[AGV]mmol/L = \left[\left(\frac{Area\ AGV}{Area\ PI} \right) - b \right] \div a \times [PI] \times diluição$$

Em que: [PI] = 5 mmol/L; diluição = 1,3

Nota: As curvas de calibração devem ser efetuadas sempre que se instala a coluna cromatográfica (Nukol, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm e.f.e.), ou sempre que se façam alterações ao método cromatográfico.

Preparação das curvas de calibração:

Preparar uma solução aquosa (“Solução Mãe”, SM) de 50 mmol/L com padrões puros de AGV: acético (C2), propiónico (C3), iso-butírico (iC4), butírico (C4), iso-valérico (iC5), valérico (C5) e caproico (C6), de acordo com a tabela seguinte:

Para 100 mL de SM adicionar as quantidades da tabela e completar com água ultrapura:

Padrão	Peso Molecular (g/mol)	Densidade (g/mL)	Volume a adicionar (µL)
Ácido Acético	60,05	1,049	286
Ácido Propiónico	74,08	0,993	373
Ácido iso-Butírico	88,11	0,950	464
Acido Butírico	88,11	0,964	457
Acido iso-Valérico	102,13	0,925	552
Acido Valérico	102,13	0,939	544
Acido Caproico	116,16	0,927	627

A solução SM de concentração 50 mmol/L é utilizada para obter as soluções diluídas de 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 30 mmol/L. Estas soluções podem ser feitas em viais de 1 mL com adição de ácido iso-caproico (iC6:0) como padrão interno a uma concentração de 5mmol/L.

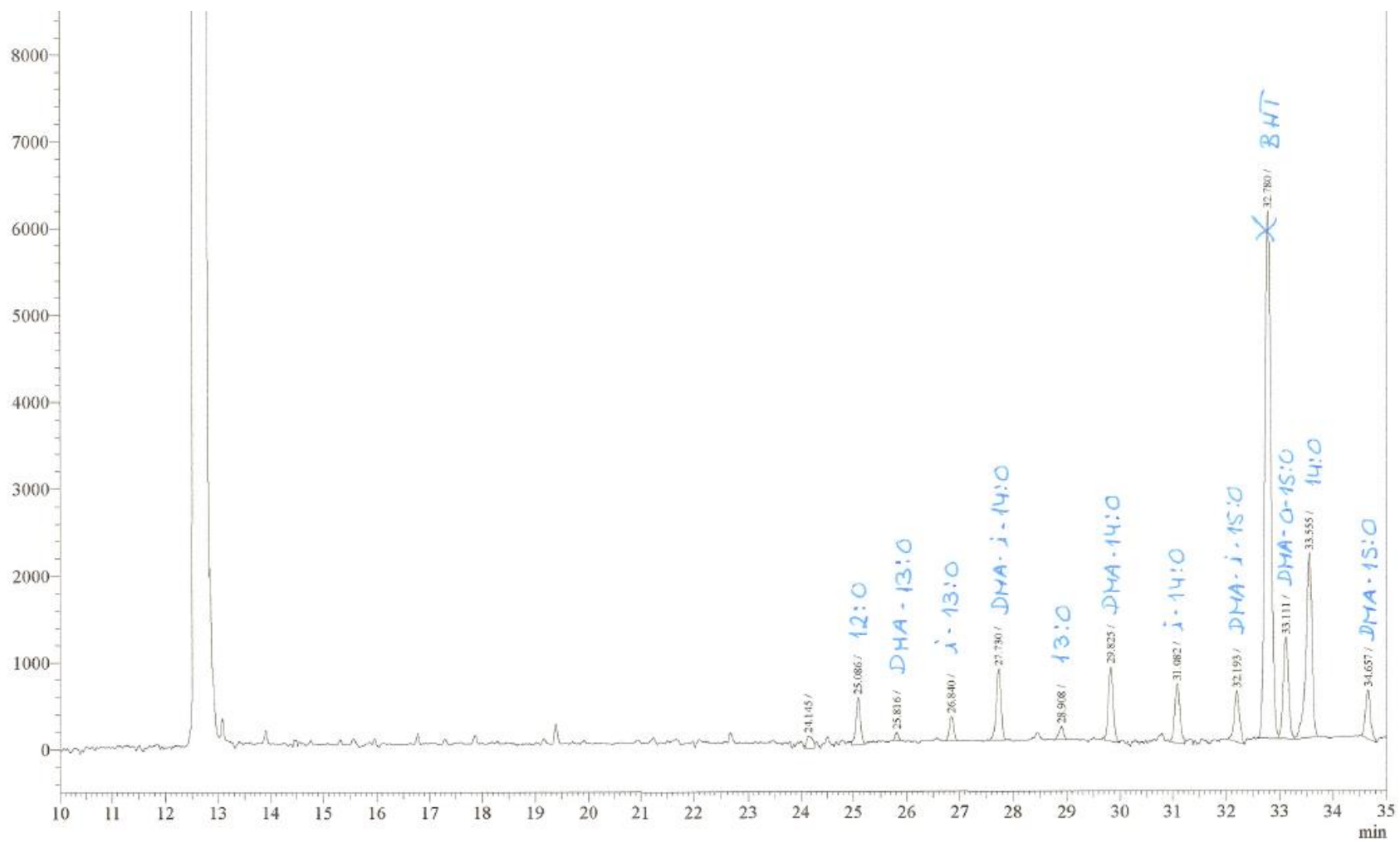
Nota: Preparar 50 mL de ácido orto-fosfórico (Peso Molecular: 116,16 g/mol; d: 0,923 g/mL) de concentração 50 mmol/L, por adição de 314 µL e completar com água ultrapura (Solução **PI**)

Para 1 mL das soluções diluídas, adicionar das soluções SM e PI as quantidades definidas na tabela seguinte, e completar com água ultrapura:

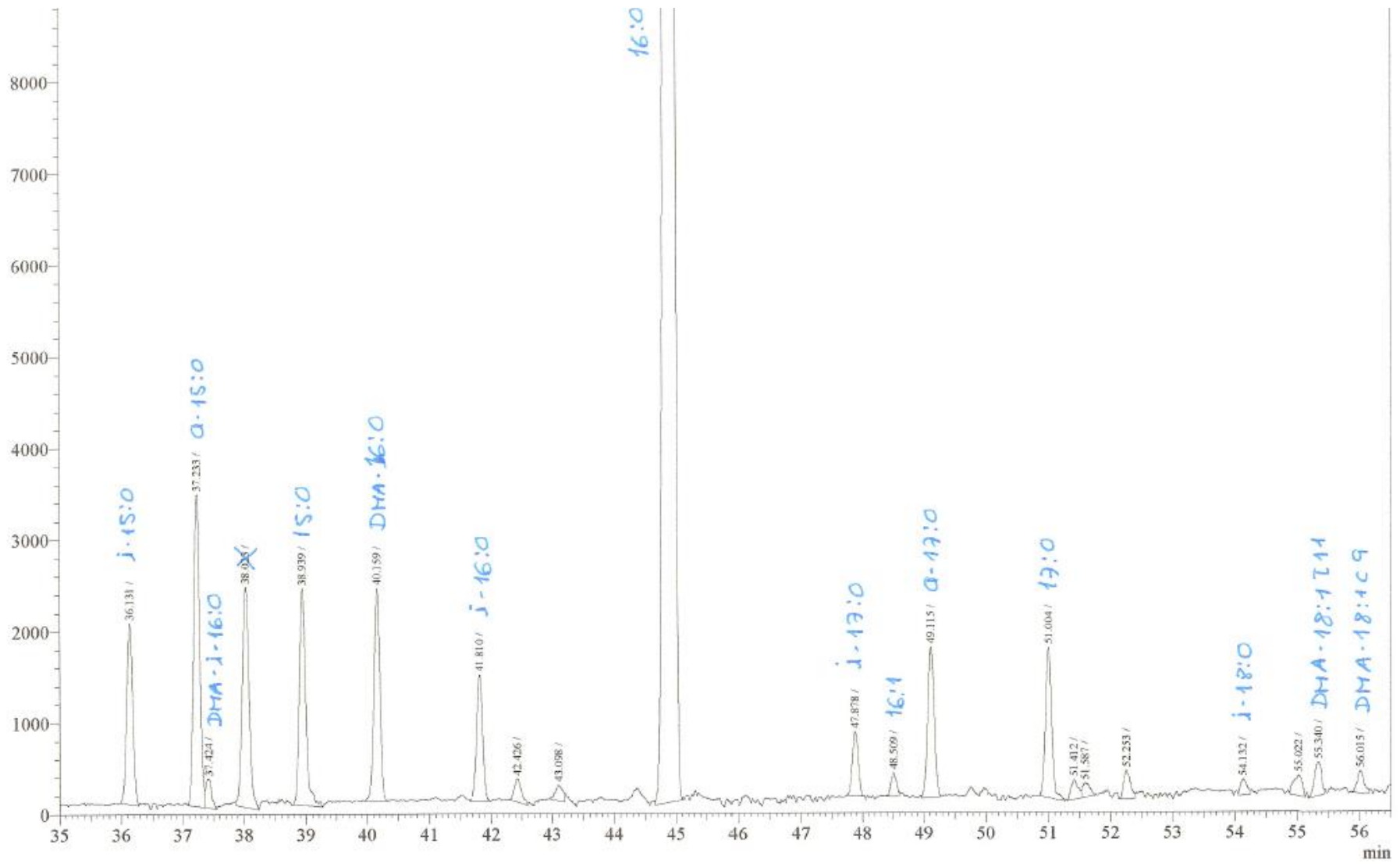
Concentração (mmol/L)	Vol. de SM, µL (50 mmol/L)	Vol. de PI, µL (50 mmol/L)	Vol. de Água (µL)
0,2	4	100	896
0,5	10	100	890
1	20	100	880
2,5	50	100	850
5	100	100	800
7,5	150	100	750
10	200	100	700
15	300	100	600
20	400	100	500
30	600	100	300

Anexo 7 – Exemplo do Cromatograma dos AG de cadeia longa

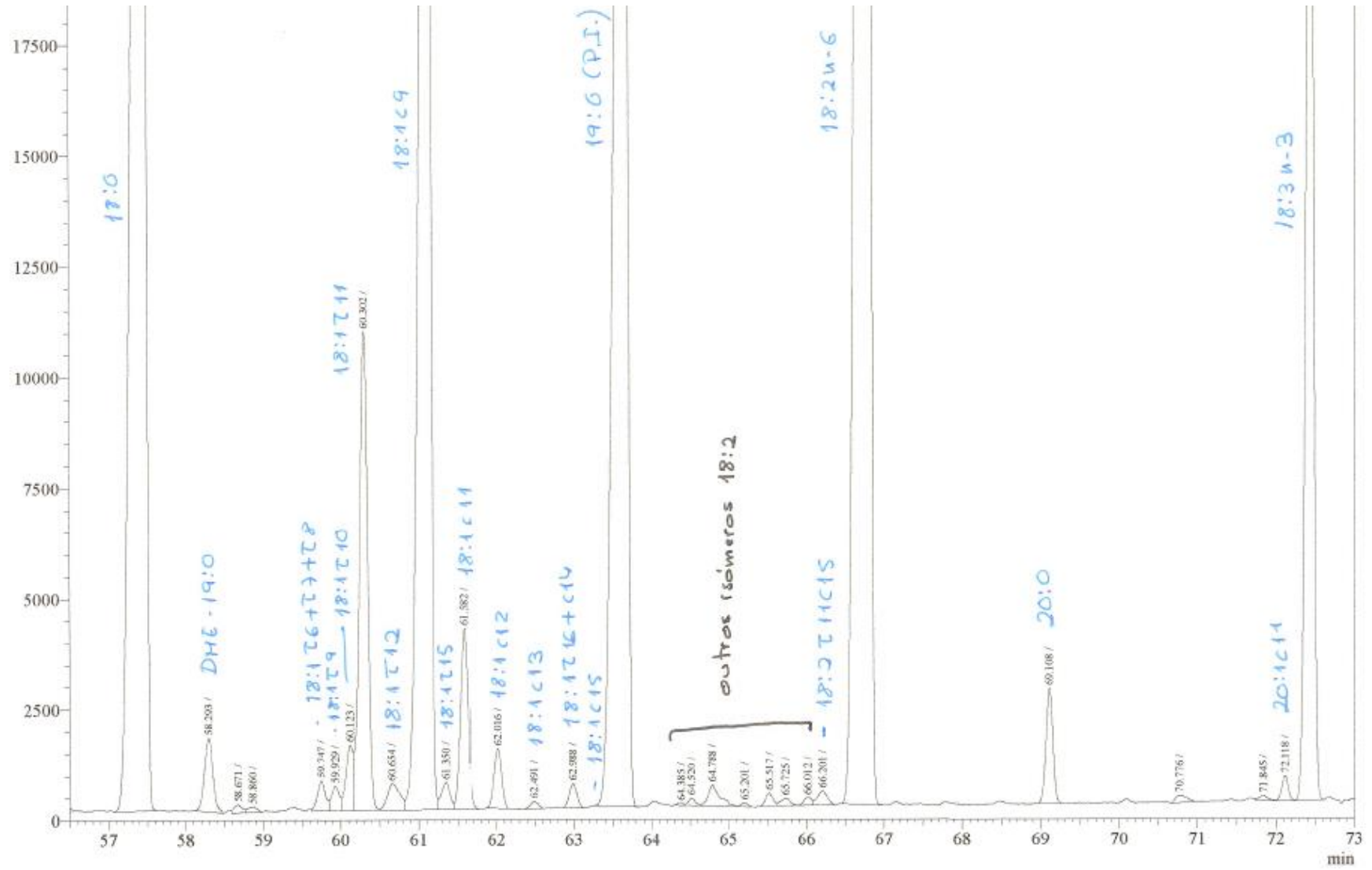
Amostra A55-E1 (Legenda dos eixos: intensidade x tempo)



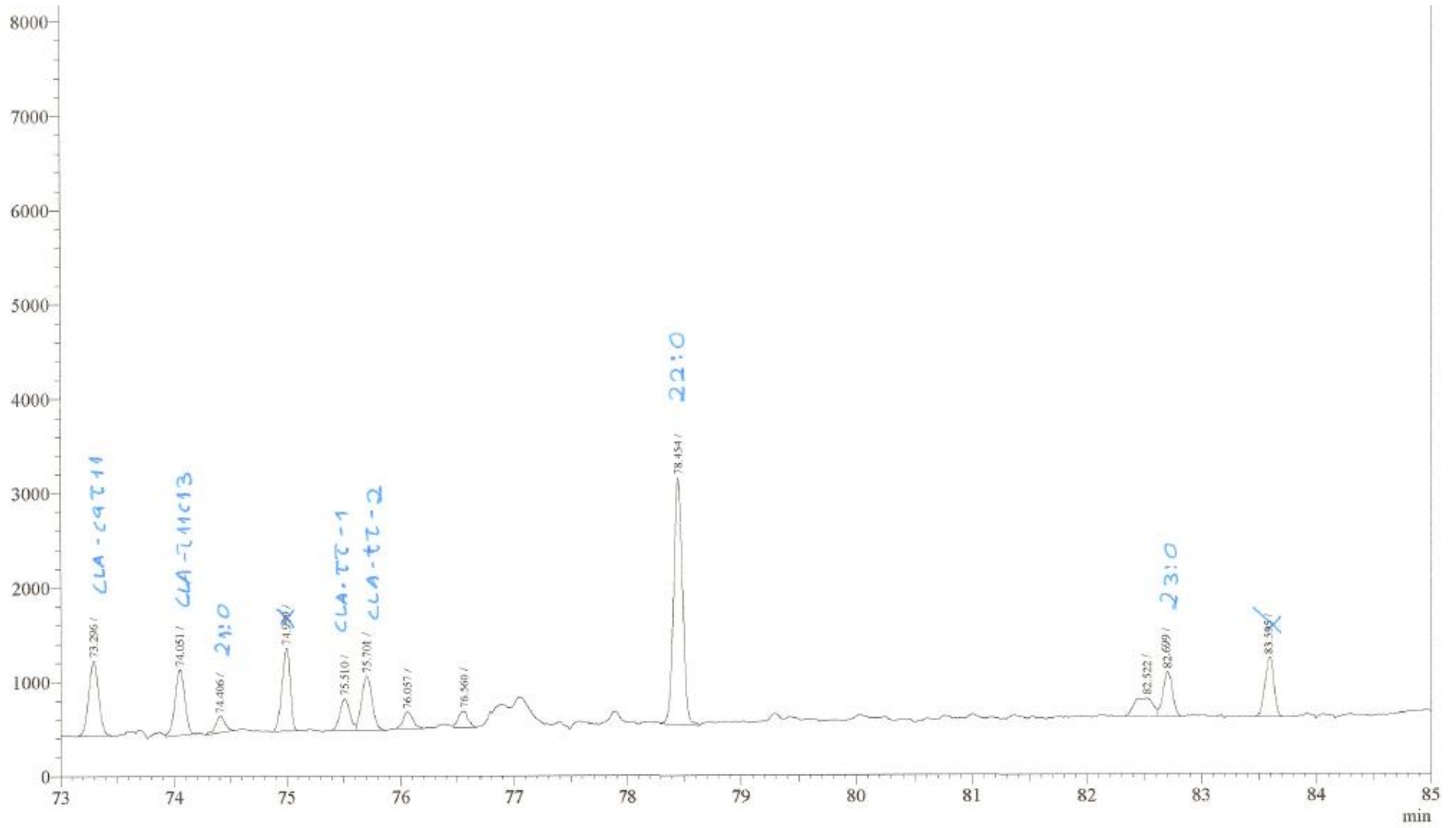
(continuação)



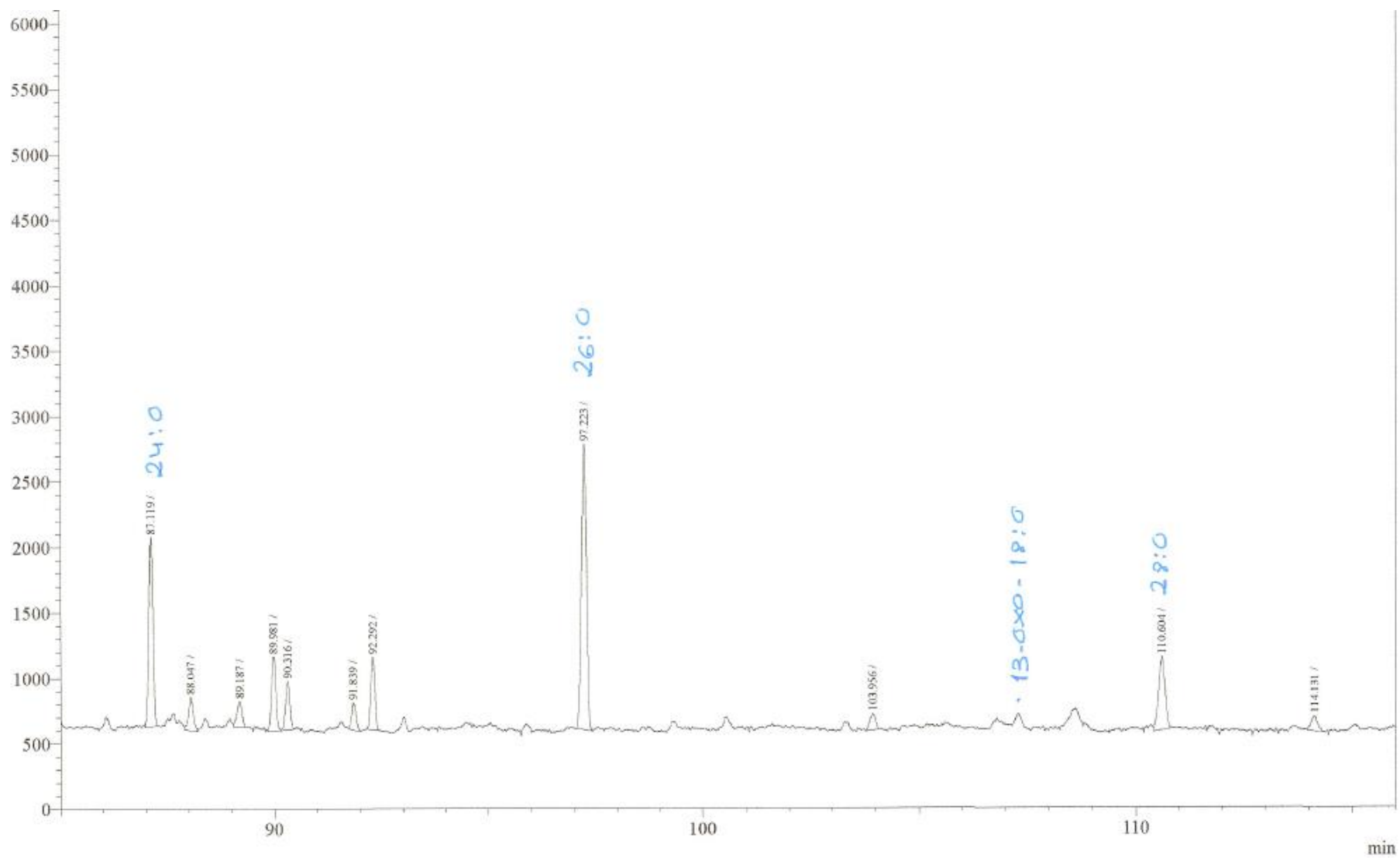
(continuação)



(continuação)

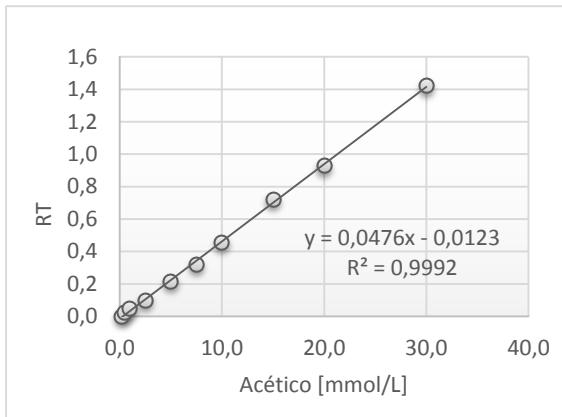


(continuação)

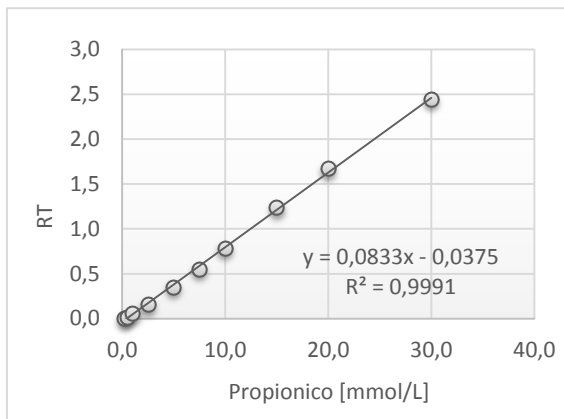


Anexo 8 – Equações das Retas de Regressão das Curvas de Calibração dos AGV

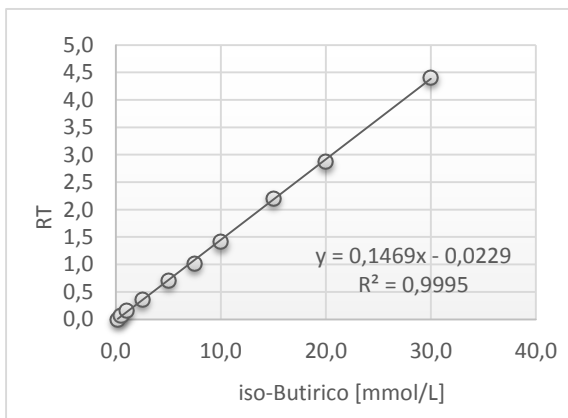
Curva de Calibração do C2:0



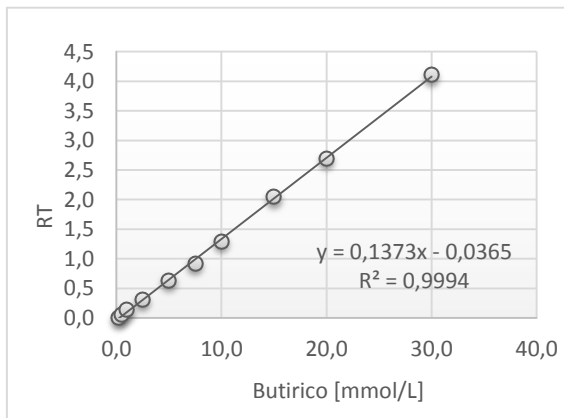
Curva de Calibração do C3:0



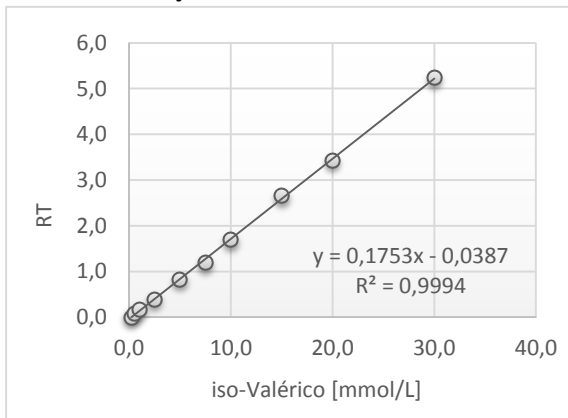
Curva de Calibração do iC4:0



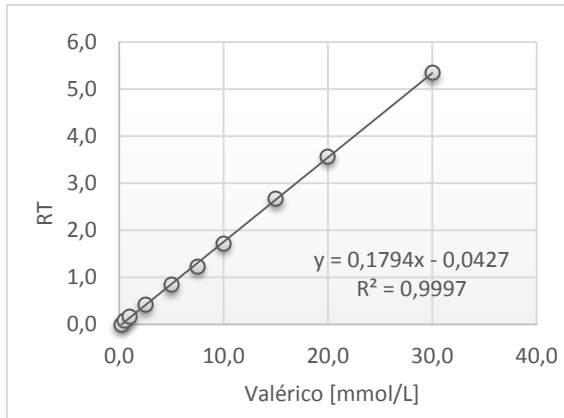
Curva de Calibração do C4:0



Curva de Calibração do iC5:0



Curva de Calibração do C5:0



Anexo 9 – Exemplo do Cromatograma dos AG voláteis
Amostra A1-E1 (Legenda dos eixos: intensidade x tempo)

