

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Catarina Alexandra dos Santos Lopes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Coorientador: Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Professora Adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche do Instituto Politécnico de Leiria

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus agradecimentos aos que me apoiaram durante o meu percurso e tornaram possível a realização deste trabalho:

Aos responsáveis pelo projeto onde o presente trabalho se insere, *Developing magnetic nanoparticle immobilized enzyme catalysts for biofuel applications*, Cooperação Científica e Tecnológica entre Portugal e a Índia, nomeadamente, a Doutora Suzana Ferreira Dias (Portugal) e Doutor Rajeev K Sukumaran (Índia), CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum, Índia.

À minha orientadora Professora Suzana Ferreira Dias pelo conhecimento científico transmitido, pelo apoio, disponibilidade e paciência que foram fundamentais para a entrega deste trabalho.

À minha coorientadora Professora Natália Osório, pela ajuda e conhecimentos transmitidos relativamente à parte prática do trabalho e o seu apoio.

Aos técnicos de laboratório Diana Faria e Daniel Duarte, que disponibilizaram a sua ajuda durante o trabalho laboratorial e na resolução de inúmeros problemas.

À Joana Rodrigues, pelo auxílio prestado no laboratório e ensino de conhecimentos laboratoriais.

Ao Professor Jorge Gominho, pelo auxílio e disponibilidade na resolução dos problemas relativos ao cromatógrafo gasoso.

Ao meu colega e amigo Miguel Póvoas pelo companheirismo, cooperação no trabalho de laboratório e palavras de encorajamento.

À Sónia Oliveira e Danyelle Mota, pelas palavras amigas e esclarecimento de dúvidas.

Às minhas colegas Bárbara Soares, Carolina Monteiro e Rita Soares que partilharam esta fase do percurso académico comigo e com as quais tudo se tornou um pouco mais fácil.

Aos meus melhores amigos pelo apoio e palavras de alento.

E finalmente, ao meu namorado e família que foram a minha âncora e me deram força para conquistar mais um objetivo.

Obrigada a todos!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo produzir lípidos dietéticos do tipo MLM, por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona bruto (OBA), de elevada acidez (20,2%), com teores elevados de produtos de oxidação (K_{232} : 6,98 e K_{270} :2,22) e de clorofilas totais (91 mg/kg feofitina *a*). Os MLM são triacilgliceróis (TAG) que contêm ácidos gordos de cadeia longa (L) em posição *sn*-2 e ácidos gordos de cadeia média (M) nas posições *sn*-1,3. Os MLM foram obtidos por acidólise de OBA com ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0). As reações decorreram em descontínuo, em meio livre de solvente, razão molar de 1:2 (OBA:M), a 50 °C durante 48 h. Utilizou-se como fonte de ácidos gordos de cadeia longa o OBA bruto e após remoção, por adsorção, de 99% de pigmentos clorofilinos. Testaram-se como biocatalisadores as lipases imobilizadas comerciais de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (*sn*-1,3 seletiva) e de *Candida antarctica* (Novozym 435), e lipases comerciais líquidas (Novozym 388, Lipozyme CALB L e Novozym 735) por nós imobilizadas nos suportes sintéticos Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000.

A Lipozyme RM IM e Novozym 435 catalisaram preferencialmente a formação de novos TAG com C10:0 em detrimento de C8:0, com rendimento em novos TAG de 56,6% (m/m) e 48,7% (m/m) a partir do óleo bruto e óleo descorado, respetivamente, por ação da Lipozyme RM IM, 52,5% (m/m) e 53,6% (m/m) a partir de óleo bruto e descorado, respetivamente, por ação de Novozym 435. O rendimento em novos TAG (%) obtidos por acidólise catalisada por Novozym 435 diminuiu com o aumento de temperatura (60 °C). Os rendimentos em novos TAG obtidos por acidólise catalisada pelas lipases imobilizadas no laboratório foram inferiores a 12,6%.

Palavras-Chave: Lípidos estruturados, Lípidos dietéticos, Óleo de bagaço de azeitona, Lipozyme RM IM, Novozym 435.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce dietetic lipids of the type MLM, by enzyme catalysis, using crude olive pomace oil (OPO) with high acidity (20.2%), and high contents of oxidation products (K_{232} : 6.98 e K_{270} :2.22) and chlorophyll pigments (91 mg/kg feofitin a).

MLM are triacylglycerols (TAG) containing long-chain fatty acids (L) at position *sn*-2 and medium-chain fatty acids (M) at positions *sn*-1,3. MLM were obtained by acidolysis of OPO with caprylic (C8:0) or capric (C10:0) acids. Batch reactions were carried in solvent-free media, using a molar ratio of 1:2 (OPO:M) at 50 °C for 48 h. Crude OPO and the oil after removal of 99% of chlorophyll pigments were used as source of long-chain fatty acids. The following biocatalysts were used: commercial immobilized lipases from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (*sn*-1,3 regioselective) and from *Candida antarctica* (Novozym 435), and liquid commercial lipases (Novozym 388, Lipozyme CALB L and Novozym 735) immobilized by us in synthetic resins Lewatit VP OC 1600 and Accurel MP 1000.

Lipozyme RM IM and Novozym 435 preferentially catalysed the formation of new TAG with C10:0 than with C8:0, yielding 56.6% (w/w) and 48.7% (w/w) of new TAG when crude OPO and bleached OPO were used, catalysed by Lipozyme RM IM; and 52.5% (w/w) and 53.6% (w/w) when crude OPO and bleached OPO were used, catalysed by Novozym 435. New TAG yields obtained by acidolysis catalysed by Novozym 435 decreased with temperature increase (60 °C). New TAG yields obtained by acidolysis catalysed by the lipases immobilized in the laboratory were lower than 12.6%.

Key-words: Structured Lipids, Dietetic Lipids, Olive pomace oil; Lipozyme RM IM, Novozym 435.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE QUADROS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento do Tema.....	1
1.2. Objetivos do trabalho.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Lípidos	4
2.1.1. Definição e Aspectos Gerais	4
2.1.2. Absorção e metabolismo lipídico	6
2.1.2.1. Ácidos gordos essenciais	8
2.2. Lípidos Estruturados.....	9
2.2.1. Tipo de reações utilizadas para síntese de lípidos estruturados	10
2.2.2. Catálise Química	11
2.2.3. Catálise Enzimática	11
2.2.3.1. Imobilização de enzimas	13
2.2.3.2. Parâmetros que influenciam a atividade enzimática	14
2.2.3.3. Utilização de meios com solvente orgânico e meio livre de solvente	16
2.2.4. Produção de lípidos estruturados dietéticos	16
2.3. Processo de obtenção e caracterização de óleo de bagaço de azeitona.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Materiais	25
3.1.1. Biocatalisadores e suportes de imobilização	25
3.1.2. Substratos.....	26
3.1.3. Reagentes	26
3.2. Métodos.....	28

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

3.2.1.	Remoção dos pigmentos do óleo de bagaço de azeitona bruto por adsorção	28
3.2.2.	Caracterização do óleo de bagaço de azeitona	29
3.2.2.1.	Determinação do perfil de ácidos gordos	29
3.2.2.2.	Determinação da acidez	29
3.2.2.3.	Determinação dos produtos de oxidação	30
3.2.2.4.	Determinação da cor e características cromáticas	31
3.2.2.5.	Determinação de clorofilas totais	33
3.2.3.	Imobilização de enzimas líquidas em suportes de resina sintética Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000	34
3.2.3.1.	Preparação de biocatalisadores com diferente atividade de água	35
3.2.4.	Avaliação da atividade hidrolítica de enzimas comerciais	35
3.2.5.	Determinação do teor de proteína pelo método de Bradford	36
3.2.6.	Ensaio de acidólise e interesterificação enzimática para produção de lípidos estruturados MLM.....	37
3.2.7.	Análise dos produtos de reação de acidólise e interesterificação enzimática	39
3.2.7.1.	Derivatização e cromatografia gasosa	39
3.2.7.2.	Quantificação dos produtos de reação.....	40
3.2.8.	Análise Estatística	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1.	Caracterização do óleo de bagaço de azeitona bruto.....	47
4.1.1.	Composição em ácidos gordos	47
4.1.2.	Determinação da acidez.....	48
4.1.3.	Determinação dos produtos de oxidação.....	49
4.1.4.	Determinação da cor e características cromáticas	50
4.1.5.	Determinação da clorofila total.....	51
4.2.	Influência do processo de adsorção nas propriedades do óleo	52
4.3.	Avaliação do rendimento da imobilização enzimática.....	57
4.3.1.	Determinação da atividade hidrolítica	57
4.3.2.	Determinação da proteína imobilizada pelo método de Bradford.....	59
4.4.	Preparação de biocatalisadores imobilizados com diferentes atividades de água	60
4.5.	Identificação do perfil de triacilgliceróis de óleo de bagaço de azeitona por cromatografia gasosa.....	62

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

4.6.	Acidólise e interesterificação enzimática catalisada por lipases imobilizadas comerciais ...	64
4.7.	Avaliação dos ensaios de acidólise enzimática catalisados por biocatalisadores imobilizados em laboratório.....	70
4.7.1.	Avaliação de reações de acidólise enzimática catalisadas por lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos a a_w 0,9	70
4.7.2.	Avaliação de reações de acidólise enzimática catalisadas por lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos a a_w 0,75	73
5.	CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Curva de calibração que relaciona a concentração de proteína (mg/mL) com a absorvância a 595 nm.....	36
Figura 2-Cromatograma onde estão representados os picos correspondentes aos compostos ácido caprílico, ácido cáprico, ácido oleico, padrão interno monodecanoína e trioleína.....	40
Figura 3-Curva de calibração de C8:0 (a), C10:0 (b).....	41
Figura 4-Curva de calibração dos ésteres etílicos de C8 (a) e C10 (b).....	42
Figura 5-Curva de calibração dos ésteres metílicos de C8 (a) e C10 (b).....	42
Figura 6-Curva de calibração de trioleína utilizada para a quantificação do TAG OOO e dos novos TAG.....	42
Figura 7-Curva de calibração do ácido oleico.....	43
Figura 8- Cromatogramas no tempo zero e após 48 h de reação de acidólise com OBA B e C10:0, catalisada por Lipozyme RM.....	45
Figura 9-Diagrama de cromaticidade C.I.E para solução de 1% de óleo de bagaço de azeitona bruto.....	51
Figura 10-Acidez total do óleo após os tratamentos de descoloração com 4% terras ativadas.....	53
Figura 11 – Avaliação do impacto da adsorção nos níveis de oxidação do OBA através dos coeficientes de extinção específica na região ultravioleta.....	53
Figura 12-Óleo de bagaço de azeitona antes (óleo B) e após os três tratamentos adsorção (óleo D).55	
Figura 13-Picos referentes aos TAG das amostras de azeite virgem extra (a) e OBA (b).....	64
Figura 14- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante a acidólise com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50 °C.....	64
Figura 15- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) e seus ésteres metílicos e etílicos, durante reação com OBA bruto (B) ou após descoloração (D) catalisada pela lipase Novozym 435, a 50 °C.....	65
Figura 16-Rendimento em novos TAG (% , m/m) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante a acidólise com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50 °C.....	66
Figura 17- Rendimento em novos TAG (% , m/m) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) ou interesterificação com seus ésteres metílicos e etílicos catalisada pela lipase Novozym 435, a 50°C.....	66
Figura 18- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50°C.....	68
Figura 19- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) ou interesterificação com seus ésteres metílicos e etílicos catalisada pela lipase Novozym 435, a 50 °C.....	68
Figura 20- Conversão de ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) durante a acidólise de OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela Novozym 435, a 60 °C.....	69

Figura 21- Rendimento em novos TAG (% m/m) obtidos por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada por Novozym 435, a 60 °C	70
Figura 22- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada por Novozym 435, a 60 °C	70
Figura 23- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA bruto (A) ou descolorado (B), catalisada pelas lipases imobilizadas em Lewatit VP OC 1600	71
Figura 24- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA bruto (A) ou descolorado (B), catalisada pelas lipases imobilizadas em Accurel MP 1000	71
Figura 25- Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (A) ou descolorado (B) catalisada pelas lipases imobilizadas em Lewatit VP OC 1600	72
Figura 26- Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (A) ou descolorado (B) catalisada pelas lipases imobilizadas em Accurel MP 1000	73
Figura 27- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA B nos sistemas selecionados em Lewatit VP OC 1600	74
Figura 28- Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA B nos sistemas selecionados em Lewatit VP OC 1600	74

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1-Reações de produção de lípidos MLM por catálise enzimática.....	19
Quadro 2-Condições operacionais método de separação utilizados nos tratamentos de extração dos pigmentos do óleo de bagaço de azeitona.....	28
Quadro 3- Ensaios de produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico MLM.....	38
Quadro 4-Composição em ácidos gordos (%) do óleo de bagaço de azeitona, por cromatografia gasosa capilar	47
Quadro 5- Acidez das amostras de óleo de bagaço de azeitona bruto (média±desvio padrão, n=3)..	48
Quadro 6-Coefficientes de extinção específica para avaliação dos produtos de oxidação do óleo de bagaço de azeitona, (média ± desvio padrão), n=3.....	49
Quadro 7- Cor e características cromáticas do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o Sistema CIE.....	50
Quadro 8-Composição em ácidos gordos do óleo descorado	52
Quadro 9-Características cromáticas após tratamento de descoloração	54
Quadro 10-Variação percentual de absorvância dos óleos bruto e após tratamentos de adsorção	55
Quadro 11-Atividade hidrolítica das enzimas comerciais	57
Quadro 12-Valores de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização nos suportes	58
Quadro 13-Rendimento de imobilização em Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000 em proteína ...	59
Quadro 14- Medição da atividade da água dos biocatalisadores (média ± desvio padrão, n=3).....	61
Quadro 15-Composição de azeite virgem extra em TAG C50, C52 e C54	62
Quadro 16 – Valores relativos a componentes de interesse do óleo de bagaço de azeitona.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG – Ácidos gordos

AGL – Ácidos gordos livres

ALA – *Alfa-linolenic acid* – Ácido alfa-linolénico

a_w – Atividade da água

CALB – Lipase B de *Candida antarctica*

DAG - Diacilgliceróis

DHA – *Docosahexaenoic acid* – Ácido docosa-hexenóico

EPA – *Eicosapentaenoic acid* – Ácido eicosa-pentenóico

GLA – *gamma linolenic acid* – Ácido gama-linolénico

HDL – *High density lipoprotein* – Lipoproteína de alta densidade

L – Ácido gordo de cadeia longa

LCFA – *Long chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia longa

M – Ácido gordo de cadeia média

MAG – Monoacilgliceróis

MLM – *Medium Long Medium* – Triacilgliceróis contendo um ácido gordo de cadeia média

nas posições *sn*-1,3 e um ácido gordo de cadeia longa na posição interna

MCFA – *Medium chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia média

MUFA – *Monounsaturated fatty acids* – Ácidos gordos monoinsaturados

OBA – Óleo de bagaço de azeitona

PUFA – *Polyunsaturated fatty acids* – Ácidos gordos polinsaturados

SCFA – *Short chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia curta

SFA – *Saturated fatty acids* – Ácidos gordos saturados

SL – *Structured lipids* – Lípidos estruturados

TAG – Triacilgliceróis

TCL – Triacilgliceróis de cadeia longa

TCM – Triacilgliceróis de cadeia média

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do Tema

O padrão de consumo alimentar característico de cada região do globo reflete os distintos graus de desenvolvimento dos países. Nos países mais desenvolvidos, o crescimento demográfico, o aumento da industrialização e da urbanização, tem resultado numa alteração notória ao nível do estilo de vida da população e do seu nível de consumo (Pekkanivew, 1975; Monteiro, 1996).

A população urbana é cada vez mais sedentária e procura alimentos de fácil acesso e preparação, muitas vezes de maior densidade energética e menor interesse nutricional (IPES-Food, 2017). As más práticas alimentares que daqui culminam estão associadas com as principais causas de mortalidade e morbidade, incluindo patologias cardiovasculares, hipertensão, diabetes tipo II, excesso de peso e obesidade e osteoporose (Ortega, 2006). Com o objetivo de minimizar os custos crescentes no setor da saúde, os governos de vários países incentivaram o desenvolvimento de estudos sobre alimentos que possuam efeitos benéficos para a saúde, para além dos seus efeitos nutricionais básicos: os alimentos funcionais. Este mercado tem uma crescente adesão dos consumidores, cada vez mais informados e conscientes do seu autocuidado (Siró *et al.*, 2008).

O conceito de alimento funcional aplica-se a um alimento natural não modificado ou a um alimento que sofreu modificações tais como (Ashwell, 2002; Roberfroid, 2002): i) a melhoria de componentes através da alteração das condições de produção, crescimento ou por via biotecnológica; ii) a adição de componentes que evidenciam benefício terapêutico iii) a remoção de componentes ou substituição destes componentes por alternativas preferíveis, por via tecnológica ou biotecnológica; iv) a modificação por via enzimática, química ou (bio)tecnológica; v) a modificação da biodisponibilidade de um componente alvo ou; vi) uma combinação de qualquer destas possibilidades.

O avanço no conhecimento científico relativamente aos ácidos gordos (AG) despoletou a investigação em novas moléculas como os lípidos estruturados (*Structured Lipids* – SL) que permitem a melhoria de propriedades funcionais e nutricionais e têm aplicação nas áreas de medicina, nutracêutica e alimentar (Willis *et al.*, 1998; Gunstone, 1999; Osborn & Akoh, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Sakurai & Pokorný, 2003).

Entre eles, os lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM, apresentam menor valor calórico, 5-7 kcal/g, comparativamente aos lípidos convencionais (9 kcal/g) (Xu, 2000). A sua composição e estrutura associa a fácil digestibilidade, absorção e metabolismo dos ácidos gordos de cadeia média (M), com os benefícios de saúde atribuídos aos ácidos gordos de cadeia longa (L) (principalmente ácidos gordos essenciais) (Jandacek *et al.*, 1987; DeMichele *et al.*, 1989; Teo *et al.*, 1989; Jennings & Akoh, 1999, 2001; Mu & Høy, 2000, 2001; Xu, 2004).

Os MLM são uma mais valia na nutrição de indivíduos com desordens de absorção de gordura ou problemas metabólicos (Babayan, 1987; Low *et al.*, 2007). As suas propriedades beneficiam a sua aplicação em formulações de nutrição parentérica e entérica. Devido ao seu menor valor calórico dão

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

origem a *snacks* para grupos alvo. Poderão também ser um recurso para a melhoria de performance durante o exercício físico prolongado (Brouns & Vusse, 1998).

Os lípidos dietéticos são comumente obtidos através da reação de acidólise catalisada por lipases *sn*-1,3 regioseletivas que demonstram a capacidade de catalisar a substituição dos ácidos gordos nas posições *sn*-1,3 do esqueleto de glicerol do triacilglicerol (TAG), mantendo a posição interna intacta (Ferreira-Dias *et al.*, 2019). A catálise enzimática em meio livre de solvente permite a obtenção de produtos considerados como naturais, algo que agrada ao consumidor, e a recuperação e reutilização das lipases, através da sua imobilização em suportes hidrofóbicos (Castro, 2003). Contudo, a atividade das lipases é influenciada por vários fatores como o pH, temperatura, produtos de oxidação, ácidos gordos livres (AGL) e atividade da água (a_w) (Mateo *et al.*, 2007).

Torna-se interessante produzir estes produtos de valor acrescentado a partir de matérias primas de baixo custo, como é o caso do óleo de bagaço de azeitona (OBA) bruto.

O bagaço de azeitona é um subproduto da extração de azeite virgem, muito típica da região mediterrânica. Na campanha de 2017/2018, dados provisórios apontaram para uma produção mundial de azeite de 3315 mil toneladas. A produção total dos países produtores europeus foi de 2183 mil toneladas, com 138,4 mil toneladas de produção com origem em Portugal (COI, 2018). O óleo de bagaço de azeitona tem origem na valorização do resíduo bagaço (MADRP, 2007).

Este óleo é rico em ácido oleico, palmítico e linoleico, tal como o azeite e tem propriedades semelhantes a outros óleos vegetais como o óleo de soja, óleo de girassol e colza, produtos competitivos em aproveitamentos não-alimentares. Assim é possível substituir outros óleos virgens na produção de lípidos estruturados, minimizando o custo de matéria prima e contribuindo para um impacto positivo no sector oleícola (Figueiredo *et al.*, 2014).

1.2. Objetivos do trabalho

O presente trabalho teve como objetivo a produção de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM a partir de óleo de bagaço de azeitona bruto, por acidólise com os ácidos gordos livres caprílico e cáprico, utilizando a lipase comercial de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM e, a lipase B de *Candida antarctica* comercial, Novozym 435, como catalisadores da reação. As reações de acidólise decorreram em modo descontínuo, meio livre de solvente, razão molar (OBA:M) de 1:2 e carga de lipase de 5% em relação ao óleo, a 50 °C.

Com a Novozym 435, desenvolveram-se reações de interesterificação enzimática com ésteres metílicos e etílicos de ácido caprílico e cáprico, a uma razão molar (OBA:éster) de 1:2 a 50 °C e reações de acidólise a 60 °C.

De forma a comparar a atividade das lipases líquidas Novozym 388 (lipase de *Rhizomucor miehei*), Novozym 735 e Lipozyme CALB L (lipase A e B de *Candida antarctica*) com as lipases comerciais imobilizadas, realizaram-se reações de acidólise nas mesmas condições já referidas. Para facilitar a recuperação dos biocatalisadores realizou-se a imobilização das lipases líquidas nos suportes

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

hidrofóbicos Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000. O rendimento do processo foi avaliado em termos de proteína imobilizada e atividade hidrolítica.

A influência da concentração de pigmentos na atividade catalítica foi avaliada através da comparação dos resultados das reações para a produção dos lípidos estruturados MLM utilizando como fonte de triacilgliceróis: o óleo de bagaço de azeitona bruto e o óleo de bagaço de azeitona descorado, através de um conjunto de extrações sucessivas.

De modo a estudar o impacto do processo de extração dos pigmentos no óleo de bagaço de azeitona bruto nas suas características, foram avaliadas a composição em ácidos gordos, a acidez, a absorvância no UV, a cor, características cromáticas e o teor em clorofilas totais do óleo antes e após a extração por adsorção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lípidos

Os alimentos com baixo teor de gordura são um exemplo de um novo e crescente segmento de mercado, fortemente impulsionado pelas exigências dos consumidores. Além disso, a indústria alimentar tem procurado desta forma responder a um dos principais objetivos das entidades mundiais de saúde nos últimos anos, a redução do consumo de gordura em geral (WHO, 2018). Contudo, estudos desenvolvidos acerca do efeito dos diferentes tipos de lípidos na saúde do ser humano evidenciaram a funcionalidade desta classe de nutrientes, corroborando a possibilidade de estes serem considerados alimentos funcionais ou componentes de um alimento funcional.

2.1.1. Definição e Aspectos Gerais

Os lípidos englobam um conjunto de biomoléculas complexo e heterogêneo quimicamente, que apresentam em comum a solubilidade em solventes orgânicos, como é o caso do éter dietílico, hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol, e elevada insolubilidade em água (Carey, 2000). Esta família de compostos, bastante diversa em termos estruturais, engloba pigmentos, vitaminas, ácidos gordos e seus derivados, esteróides, terpenos, fosfolípidos, esfingolípidos, entre outros (Kresge *et al.*, 2010).

Os lípidos são comumente distinguidos com base no seu estado físico à temperatura ambiente. Designam-se óleos quando são líquidos à temperatura ambiente e gorduras quando são sólidos (Giese, 1996; Carey, 2000; Akoh & Min, 2002).

Com base na sua estrutura, podem ser classificados como derivados, simples ou complexos. Os lípidos derivados correspondem aos ácidos gordos e álcoois, vitaminas lipossolúveis, hidrocarbonetos e esteróis que permitem a construção de moléculas mais complexas que podem ocorrer nestas formas ou resultar de lípidos simples e complexos por hidrólise. Os lípidos simples são compostos por ácidos gordos e álcoois, incluindo os acilgliceróis, éter acilgliceróis, esteróis, seus ésteres e ceras. Quando hidrolisados, os lípidos simples libertam dois compostos diferentes, normalmente, um álcool e um ácido. Os lípidos complexos incluem os fosfolípidos, glicolípidos e esfingolípidos. Estas estruturas geram três ou mais compostos diferentes quando hidrolisados (Akoh & Min, 2002)

Mais de 95% dos óleos e gorduras animais e vegetais são constituídos por triacilgliceróis. Os TAG são ésteres formados por uma molécula de glicerol a qual estão associados três ácidos gordos (Erickson, 2002). Todos os organismos eucarióticos, e alguns procarióticos, possuem a capacidade de sintetizar os TAG. Nos animais, apesar destes compostos serem metabolizados no fígado e intestino, a sua maioria é armazenada no tecido adiposo como reserva energética ou em outros tecidos na forma de aglomerados (Birsoy *et al.*, 2013).

Além de triacilgliceróis, os óleos e gorduras contêm em menores quantidades monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livres, tocoferóis, proteínas, esteróis e vitaminas (Faria *et al.* 2002; Hidalgo & Zamora, 2003). As substâncias que constituem os óleos e gorduras podem ser

reunidas em duas grandes categorias: acilgliceróis e não-acilgliceróis. Consideram-se acilgliceróis os compostos que apresentam uma molécula de glicerol associada até três ácidos gordos. Em todos os óleos encontramos pequenas quantidades de componentes não-acilgliceróis (Moretto & Fett, 1998). Alguns destes componentes são removidos parcialmente ou totalmente durante o processo de refinação. A sua presença pode afetar as características dos óleos, nomeadamente, o seu efeito pró oxidante ou antioxidante, odor, sabor e cor. Alguns exemplos são os fosfatídeos, esteróis, ceras, hidrocarbonetos insolúveis, carotenoides, clorofila, tocoferóis, lactonas e metilcetonas (Faria *et al.*, 2002).

Os ácidos gordos estão esterificados em posições distintas do esqueleto da molécula de glicerol. Estas posições representam-se através de um sistema de numeração estereoespecífica (*sn*): *sn-1*, *sn-2* e *sn-3*. A sigla *sn* refere-se à posição dos átomos de carbono no glicerol. O átomo de carbono na parte superior, pela projeção vertical de *Fischer*, é designado de *sn-1* (posição exterior), *sn-2* refere-se à posição no carbono-2 (posição intermédia) e *sn-3* (posição exterior) refere-se à posição inferior (Berry, 2009).

Os TAG podem ser hidrolisados em ácidos gordos e glicerol. Os diacilgliceróis (dois ácidos gordos associado ao glicerol) e monoacilgliceróis (um ácido gordo associado ao glicerol) encontram-se habitualmente em quantidades vestigiais nos tecidos animais e vegetais (Simões, 2011).

O consumo de lípidos, embora essencial, pode oferecer tanto impactos positivos como negativos para a saúde humana. Os lípidos são macronutrientes essenciais na dieta humana que atuam como fonte de energia (9kcal/g) armazenada no tecido adiposo; fonte de ácidos gordos essenciais que são precursores de prostaglandinas (hormonas necessárias à regulação de várias funções vitais); fonte e veículo de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e também de outros componentes bioativos, tais como os fito esteróis, carotenoides, e antioxidantes, benéficos para a saúde humana. O consumo excessivo e desequilíbrio no seu metabolismo pode levar a diversas desordens metabólicas como doenças coronárias, dislipidemia, obesidade, etc. (Small, 1991; Chen *et al.*, 2013).

As propriedades funcionais dos óleos e gorduras são consequência da sua composição em triacilgliceróis. As características físicas e químicas, o destino metabólico e as propriedades nutricionais dos óleos e gorduras comestíveis dependem da composição em ácidos gordos, nomeadamente, o seu grau de saturação e comprimento da cadeia hidrocarbonada, da sua distribuição estereoquímica na molécula de glicerol e das suas formas polimórficas (McGrady, 1993; Osborn & Akoh, 2002)

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia de hidrocarbonetos longa, livres ou esterificados (Moretto *et al.*, 2002). O carbono mais próximo do terminal carboxilo (-COOH) recebe a designação alfa (α). O terminal metil (-CH₃) é denominado ómega (ω) (Campos, 2005). A maioria dos ácidos gordos presentes na natureza é composta por um número par de átomos de carbono, com cadeias de tamanho variável de quatro a vinte seis átomos de carbono. Quando saturados possuem apenas ligações simples entre os carbonos e possuem pouca reatividade química. Os ácidos gordos insaturados são mais reativos e suscetíveis a oxidação térmica (Giese, 1996).

Os óleos vegetais tendem a possuir uma a quatro insaturações na cadeia carbonada, e apresentam-se líquidos enquanto as gorduras que são ricas em ácidos gordos saturados, são sólidas a temperatura ambiente (cerca de 20 °C). Assim, as gorduras animais contêm um número de saturações maior que insaturações e um ponto de fusão elevado (Giese, 1996; Fennema, 2000; Faria *et al.*, 2002).

Os ácidos gordos podem ser classificados quanto ao comprimento da sua cadeia e quanto ao número de insaturações. Além disso podem apresentar conformação *cis* ou *trans* das ligações duplas (Lísa & Holčapek, 2008).

Atendendo à ausência ou presença de ligações duplas na cadeia carbonada, os ácidos gordos classificam-se em ácidos gordos saturados (*Saturated Fatty Acids* – SFA) quando não possuem ligações duplas, em ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids* - MUFA), caso possuam apenas uma ligação dupla e em ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFA) na presença de duas ou mais ligações duplas (EFSA, 2010).

Os ácidos gordos recebem uma designação de acordo com a nomenclatura atribuída pela IUPAC, ou são descritos pela forma abreviada x:y onde x representa o número de átomos de carbono da cadeia e y o número de ligações duplas. A posição das ligações duplas representa-se pela forma n-z, onde z representa a posição da primeira ligação dupla a contar do terminal metil (Simões, 2011).

Quanto ao comprimento da cadeia podemos distinguir em: ácidos gordos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acids* – SCFA) quando apresentam de entre dois a seis átomos de carbonos (C2:0-C6:0), ácidos gordos de cadeia média (*Medium Chain Fatty Acids* - MCFA) quando apresentam entre seis a doze átomos de carbono (C8:0-C12:0) e ácidos gordos de cadeia longa (*Long Chain Fatty Acids* - LCFA) caso apresentem entre catorze a vinte quatro carbonos (C14:0-C24:0) na sua constituição, independentemente do grau de insaturação (Osborn & Akoh, 2002).

As características físicas e reatividade química são determinadas pela natureza, a proporção e a localização dos ácidos gordos na molécula de TAG. Efetivamente, triacilgliceróis que contenham os mesmos ácidos gordos, qualitativamente e quantitativamente, manifestam propriedades físicas, químicas e fisiológicas diferentes se os ácidos gordos estiverem distribuídos de forma distinta no esqueleto de glicerol (Osborn & Akoh, 2002).

2.1.2. Absorção e metabolismo lipídico

A composição em ácidos gordos, a sua posição no esqueleto de glicerol e as suas propriedades físicas e bioquímicas resultam em diferentes propriedades fisiológicas, demonstrando-se ao nível da absorção no trato gastrointestinal e no processo metabólico (Osborn & Akoh, 2002). Consequentemente, a sua distribuição nos tecidos também é afetada (Gunstone, 2006).

Estas características estão diretamente relacionadas a doenças coronárias, ao balanço energético, sensibilidade à insulina e ao metabolismo em jejum e pós-prandial com subsequente impacto na saúde humana (Berry, 2009).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

O primeiro passo na digestão das gorduras ocorre no estômago e é catalisado pela lipase lingual ou gástrica. Os principais produtos de digestão desta fase gástrica são os diacilgliceróis e ácidos gordos livres o que facilita a fase de digestão intestinal (Thomson *et al.*, 1989). Na região do duodeno, a hidrólise é catalisada pela lipase pancreática (lipase *sn*-1,3 específica) gerando ácidos gordos livres, que ocupam as posições exteriores dos TAG, e 2-monoacilgliceróis (2-MAG), os quais formam micelas com os sais biliares (Carlier *et al.*, 1991). Estas, em conjunto com as micelas mistas, formadas pela inserção de fosfolípidos, ajudam na absorção dos lípidos apolares na membrana das microvilosidades. Os lípidos absorvidos são reesterificados para formar novamente os TAG no retículo endoplasmático liso (Hernell & Bläckberg, 1982).

A velocidade da reação de hidrólise realizada pela lipase pancreática depende do comprimento da cadeia e grau de insaturação dos AG presentes nas posições *sn*-1 e *sn*-3 (Osborn & Akoh, 2002).

Os ácidos gordos de cadeia curta são voláteis, hidrossolúveis e de baixo peso molecular. Assim, são mais rapidamente absorvidos no estômago que os restantes ácidos gordos. Como tal, são adequados ao controlo da obesidade devido ao seu baixo valor calórico: ácido acético (C2:0), 3,5 kcal/g; ácido butírico (C4:0), 6,0 kcal/g; e ácido caproico (C6:0), 7,5 kcal/g (Akoh, 1998).

Os ácidos gordos de cadeia média podem ser absorvidos no estômago, após a hidrólise pela lipase gástrica (Christensen *et al.*, 1995), e também podem ser solubilizados na fase aquosa do conteúdo intestinal, onde se ligam fracamente à albumina e são transportados até ao fígado através da veia porta (Decker, 1996). Cerca de 80% a 100% dos MCFA presentes em todo o fluxo portal são captados pelo fígado e a parcela remanescente segue pela corrente sanguínea, tornando-se disponível aos tecidos periféricos (Brouns & van der Vusse, 1998; Jeukendrup *et al.*, 1998 (a), 1998 (b); Mcardle *et al.*, 1999). Ao contrário dos ácidos gordos de cadeia longa, não são significativamente incorporados em lipoproteínas (quilomícrons e VLDL-*Very low density lipoprotein*), possibilitando que sejam absorvidos diretamente na corrente sanguínea. A velocidade de absorção no intestino dos MCFA é muito semelhante à da glicose e estes são rapidamente oxidados no fígado e utilizados pelo organismo. Como não sofrem reesterificação em TAG significativa, não se acumulam no tecido adiposo, o que permite o controlo da obesidade (Jeukendrup *et al.*, 1998 (a), 1998 (b); Mcardle *et al.*, 1999). Por estas razões, os MCFA são usados como fonte rápida de energia em algumas síndromes metabólicas, como na deficiência de enzima pancreática (fibrose cística) (Jensen *et al.*, 1994). No entanto, os ácidos gordos de cadeia média estão implicados no aumento do colesterol no sangue e não devem ser exclusivos na dieta dado que não fornecem ácidos gordos essenciais (Jeukendrup *et al.*, 1998 (a), 1998 (b); Mcardle *et al.*, 1999).

A biodisponibilidade digestiva dos triacilgliceróis de cadeia média (TCM) é maior que a dos triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). A hidrólise dos TCM inicia-se no estômago de forma mais rápida e completa e a sua absorção na porção proximal, mais rápida e eficiente (Osborn & Akoh, 2002).

A elevada hidrofobicidade resultante das longas cadeias hidrocarbonadas impede a absorção e transporte direto dos LCFA. Os ácidos gordos de cadeia longa deixam o intestino, na forma de TCL, pela via linfática, após a incorporação em quilomícrons (formados por TAG, fosfolípidos, colesterol e

apoproteínas) e são segregados finalmente para a corrente sanguínea (Ramírez *et al.*, 2001). Uma fração desses quilomícrons sofre hidrólise intravascular, libertando a maioria dos LCFA para os tecidos extra-hepáticos, enquanto que a fração restante é transportada para o fígado. Os LCFA atingem este órgão como ácidos gordos ligados à albumina ou na forma de TAG.

Todos os AG utilizam os dois sistemas de transporte em proporções variáveis. Quanto maior é a cadeia carbonada do AG, mais este é encontrado na linfa e menos no sangue portal. Na linfa, estes circulam como TAG associados aos quilomícrons. No sangue portal, os AG estão ligados à albumina. Em trabalhos prévios considerou-se que o “destino” metabólico dos MCFA estaria restrito quase que exclusivamente ao fígado (Colleone, 2002).

2.1.2.1. Ácidos gordos essenciais

Entre os ácidos gordos de cadeia longa estão AG considerados de elevada importância devido às suas propriedades nutricionais, fisiológicas e/ou físicas, nomeadamente, os ácidos gordos polinsaturados ômega-3 e ômega-6, o ácido linoleico conjugado (*conjugated linoleic acid* - CLA) e o ácido λ -linolénico (*gamma linolenic acid* - GLA) (Ferreira-Dias, 2010).

Os ácidos ômega-6 linoleico (18:2n-6) e ômega-3 linolénico (18:3n-3) são considerados ácidos gordos essenciais porque não são sintetizados pelo organismo humano (Ferreira-Dias, 2010), mas são absolutamente necessários para a saúde, pelo que devem ser incluídos na dieta (Guilliams, 2000). Os organismos animais podem converter estes dois compostos noutros importantes ácidos gordos, nomeadamente o ácido linoleico em araquidónico (20:4n-6) e o ácido α -linolénico em ácidos ômega-3 de cadeia mais longa como o ácido eicosapentaenóico (*eicosapentaenoic acid* - EPA, 20:5n-3) e o docosahexaenóico (*docosahexaenoic acid* - DHA, 22:6n-3) (Harper *et al.*, 2006), no entanto, o organismo humano tem uma capacidade de conversão de 5-10% em EPA e apenas de 2-5% no caso de DHA, dependendo do consumo de lípidos na dieta (Arterburn *et al.*, 2006).

O EPA e DHA são ácidos gordos ômega-3 encontrados essencialmente em óleos de origem marinha, com elevados benefícios na saúde humana. Estes ácidos gordos essenciais são importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, regulação da pressão arterial e do processo de inflamação (Basu *et al.*, 2006; Howlett, 2008). O DHA revela-se de maior importância no desenvolvimento infantil do cérebro e sistema nervoso e do seu normal funcionamento na idade adulta (Helland *et al.*, 2003; Valenzuela, 2009).

O ácido linoleico conjugado, presente no leite e carne de ruminantes, consiste numa mistura de isómeros geométricos e posicionais de ácido linoleico que contêm ligações duplas conjugadas na sua cadeia carbonada. A sua ingestão tem demonstrado efeitos anticarcinogénicos, antioxidantes, antiateroscleróticos, antidiabéticos, de antiobesidade e melhorias na imunidade (Goli *et al.*, 2008)

O ácido γ -linolénico (GLA) é um composto anticancerígeno presente em algumas plantas que funciona como precursor da prostaglandina 1 e ácido 15-hidroxi dihomogama linolénico, que apresentam propriedades anti inflamatória e anti trombótica (Lumor & Akoh, 2005). A síntese de GLA

a partir de ácido linoleico é de apenas 10%, e como tal a toma de suplementos pode apresentar benefício para o organismo (Soto *et al.*, 2004).

A importância demonstrada pelos PUFA na saúde dos humanos levou ao estabelecimento de doses recomendadas diárias de ingestão para estes compostos (Ferreira-Dias, 2010). Adicionalmente, vários estudos têm revelado a importância da razão ómega-6/ómega-3 na dieta. A alimentação ocidental é deficiente em ómega-3 e apresenta excesso de ingestão de ómega-6 relativamente ao que está estabelecido no padrão genético do ser vivo e no seu processo evolutivo. Este fator promove o aumento de doenças cardiovasculares, cancros, doenças autoimunes e anti inflamatórias e também o grau de obesidade (Simopoulos, 2016; DiNicolantonio & O'Keefe, 2018).

Dentro dos LCFA podem também destacar-se os monoinsaturados, que não sendo ácidos gordos essenciais, estão relacionados com a manutenção de nível de triacilglicéris totais saudável, diminuição do teor de lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*, LDL) responsáveis pelo transporte de colesterol do fígado até às artérias periféricas aumentando o risco de doença cardiovascular, o aumento de lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL), responsáveis por retirar o colesterol das artérias e transportá-lo até ao fígado para ser eliminado (Jenkins *et al.*, 2010) e a modulação do funcionamento do sistema imunológico (Yaqoob, 1998). Além disso, não apresenta evidências de aumento de risco de desenvolvimento de cancros (Dodge *et al.*, 2006) e aumento de pressão arterial como é o caso das gorduras saturadas (Appel, 2017). Alguns estudos demonstram que os MUFA podem promover o aumento da lipólise dos adipócitos (Sorquier *et al.*, 2003). Os monoinsaturados podem também ser benéficos no contexto de estratégia de controlo de peso, dado que induzem a uma redução da trigliceridemia pós-prandial comparativamente ao consumo de gorduras saturadas e favorecem o dispêndio energético e função termogénica (Palou & Bonet, 2007). Os ácidos gordos monoinsaturados incluem o ácido palmitoleico (16:1), oleico (C18:1), eláidico (18:1, trans-9) e ácido vacênico (18:1, trans-11). O mais abundante na dieta humana é o ácido oleico (18:1n-9). Nos países mediterrânicos a maior fonte de ácido oleico é o azeite (74 g/100 g) e outros óleos vegetais como o óleo de colza (59 g/100 g), óleo de amendoim (46 g/100 g), óleo de girassol (32 g/100 g), óleo de milho (29 g/100 g) e óleo de soja (24 g/100 g) (Nicklas *et al.*, 2004).

O ácido oleico apresenta potencial antiaterogénico e antitrombótico, aumenta a razão HDL/LDL e reduz a agregação de plaquetas (Holman, 1961). A substituição de gorduras saturadas por fontes de ácido oleico reduz os níveis de triglicéridos totais e LDL enquanto favorece o aumento do HDL e a melhoria da sensibilidade à insulina (Palomer *et al.*, 2008).

2.2. Lípidos Estruturados

A transformação de óleos e gorduras é uma das áreas da indústria alimentar com maior necessidade de desenvolvimento de tecnologias mais económicas e sustentáveis. A produção de produtos de elevado valor acrescentado, como os lípidos estruturados, pode assentar no aproveitamento de óleos naturais de custo reduzido como matéria-prima (Ferreira-Dias, 2010).

Os lípidos estruturados consistem em moléculas TAG que sofreram (Osborn & Akoh, 2002): i) modificação através da incorporação de novos ácidos gordos, ii) reestruturação da posição dos ácidos gordos ou perfil de ácidos gordos na molécula, iii) síntese para um maior rendimento de novos TAG, por via enzimática ou química.

Podem ser sintetizados com o intuito de melhorar características físicas (polimorfismo natural, ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida, viscosidade e consistência) e/ou químicas (estabilidade oxidativa) de produtos alimentares ricos em gordura, bem como para a modificação de propriedades nutricionais (presença ou ausência de ácidos gordos saturados ou insaturados de fácil absorção e digestão). O avanço no conhecimento relativo aos ácidos gordos despoletou um crescente interesse na utilização de óleos e gorduras no tratamento e prevenção de doenças, bem como a melhoria da saúde. A produção de lípidos estruturados permite a melhoria de propriedades funcionais e nutricionais que permitem a sua aplicação nas áreas de medicina, nutracêutica e alimentar (Willis *et al.*, 1998; Gunstone, 1999; Osborn & Akoh, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Sakurai & Pokorný, 2003).

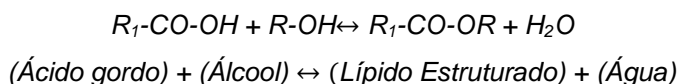
Os SL têm encontrado ampla aplicação na indústria alimentar, nomeadamente, em formulações para margarinas (Soares *et al.*, 2013); na produção de gorduras de baixo valor calórico (Osborn & Akoh, 2002), de sucedâneos da manteiga de cacau (Liu *et al.*, 2007); de triacilgliceróis ricos em ácidos gordos de cadeia média ou ricos em outros ácidos gordos específicos (ex: ómega-3 PUFA, CLA, GLA) (Pérignon *et al.*, 2012) e de sucedâneos de gordura de leite humano (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

Na produção de SL devem ser tidos em conta os diferentes fatores: tipo de reação, (bio)catalisadores, composição do meio reacional e modo de operação de reação (Ferreira-Dias *et al.*, 2013).

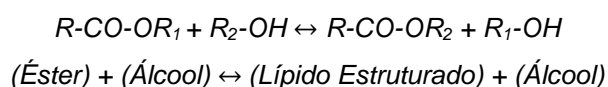
2.2.1. Tipo de reações utilizadas para síntese de lípidos estruturados

Os lípidos estruturados são produzidos a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, média ou longa, de gorduras de origem animal ou vegetal. Dependendo do tipo de substrato disponível, podem ser usados os seguintes métodos de obtenção (Lee & Akoh, 1998):

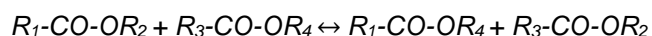
Esterificação é a designação da reação química entre um álcool e um ácido que origina um éster e a libertação de água.



Alcoólise consiste na transesterificação, ou seja, a transformação de um éster noutra, por reação entre um álcool e um éster.



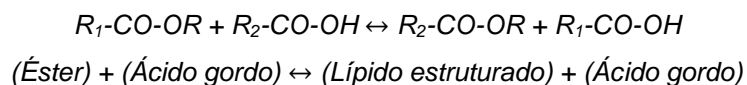
Interesterificação química ou enzimática produz a redistribuição dos ácidos gordos ligados ao glicerol.



Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona



Acidólise corresponde a uma reação entre um éster e um único ou uma mistura de ácidos gordos livres de modo a que estes substituam os ácidos gordos presentes no éster original.



Esta reação é maioritariamente utilizada na produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico do tipo MLM, recorrendo a lipases *sn*-1,3 seletivas, em meio não aquoso (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

2.2.2. Catálise Química

A forma de interesterificação mais usual na indústria ocorre sob auxílio de um catalisador químico não seletivo que provoca a modificação da posição dos ácidos gordos dentro da molécula de TAG, aleatoriamente, dado que as ligações éster nos TAG são hidrolisadas de forma indiscriminada (Xu, 2000).

A grande vantagem da interesterificação química prende-se com maior viabilidade económica, dado que os catalisadores químicos apresentam uma atividade elevada e menor custo do que as lipases (Marangoni & Rousseau, 2002).

A reação decorre a temperaturas elevadas (até 270 °C), sob pressões reduzidas, condições anidras e em períodos curtos (Erickson, 1995; Moreno *et al.*, 2004). As desvantagens associadas à utilização de catalisadores inorgânicos incluem os custos provocados pelo consumo energético durante a síntese devido às condições de temperatura e pressão utilizadas; a degradação de compostos de interesse como os PUFA; a dificuldade de remoção do catalisador após a reação e consequente contaminação dos produtos finais, e, a geração de reações secundárias indesejadas com formação de produtos secundários como sabões, MAG e DAG que têm de ser removidos, aumentando os custos de purificação do produto e diminuindo o rendimento da reação (Erickson, 1995).

A acidólise química tem atualmente poucas aplicações devido à falta de especificidade posicional durante o processo. As principais aplicações da síntese química no âmbito dos óleos e gorduras compreendem a modificação das propriedades de fusão e taxa de plasticidade das gorduras, bem como a produção de TAG de elevado ponto de fusão (Konishi *et al.*, 1993).

2.2.3. Catálise Enzimática

As enzimas têm a capacidade de aumentar a velocidade de uma reação química ao diminuírem a sua energia de ativação, sem que sejam consumidas. O biocatalisador apresenta na sua estrutura um ou mais centros ativos onde ocorre a fixação de determinadas moléculas-substrato (Chang & Goldsby, 2013). A velocidade de uma reação enzimática é medida pela quantidade de substrato consumido ou de produto formado por unidade de tempo (Weil, 2000).

Existem vários fatores que influenciam a atividade e a estabilidade das enzimas, e no caso particular das lipases, destacam-se a temperatura, pH, a atividade da água e a presença de compostos inibidores da atividade enzimática como os produtos de oxidação lipídica e ácidos gordos livres (Wang & Gordon, 1991; Correia & Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998).

As potencialidades das lipases e a sua versatilidade como catalisadores têm atraído o interesse dos investigadores pela diversidade de aplicações na modificação e síntese lipídica de produtos de grande importância. A produção de lípidos estruturados para fins alimentares por via enzimática tem sido uma aposta crescente como substituto de catalisadores inorgânicos, devido aos seus benefícios comparativamente ao processo químico convencional (Galanakis, 2019).

Para este processo, são utilizadas lipases (triacilglicerol lipases, E.C. 3.1.1.3), da classe das hidrolases, que catalisam a reação de hidrólise de ésteres insolúveis, na interface óleo/água, e são eficientes catalisadores de reações de esterificação e interesterificação quando em meio orgânico e baixa atividade da água (Cambou & Klivanov, 1984).

As lipases podem ser de origem microbiana natural ou recombinante, vegetal ou animal, e são conhecidas pela sua função fisiológica na digestão e absorção de lípidos (Akoh, 1995; Pandey *et al.*, 1999). As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque apresentam procedimentos mais simples de isolamento, têm maior estabilidade e propriedades diversificadas (Carvalho, 2003 citado por Bule, 2014).

Estes biocatalisadores apresentam uma região, estereo-seletividade e especificidade características, que permitem uma estruturação que não é possível de obter por via química (Willis *et al.*, 1998). Independentemente do meio onde se encontram, algumas lipases apresentam uma elevada seletividade quanto (Jensen, 1992): i) à classe dos lípidos; ii) à posição dos ácidos gordos na molécula de glicerol; iii) às características dos ácidos gordos (tais como o comprimento da cadeia hidrocarbonada e o grau de insaturação); iv) a um isómero ótico ou ainda v) a combinação de alguns destes pontos.

De acordo com a sua especificidade, as lipases podem ser classificadas como: i) lipases não específicas, quando não apresentam especificidade em relação à posição dos ácidos gordos, atuando nas três posições da molécula de glicerol ou em ii) lipases com especificidade *sn*-1,3, quando catalisam a libertação dos ácidos gordos apenas nas posições externas da molécula de TAG, originando, por hidrólise, AGL, 1,2 (2,3)-DAG e 2-MAG (Xu, 2000).

O interesse crescente na síntese enzimática é consequência das importantes vantagens das lipases sobre os catalisadores químicos clássicos. Como já mencionado, oferecem maior especificidade pelo substrato, regioselectividade e enantioselectividade; condições de reação moderadas (temperatura inferior a 70 °C) permitindo poupança energética e menor degradação térmica; originam um número reduzidos de coprodutos; há menor geração de efluentes; permitem a obtenção de produtos considerados como naturais, algo que agrada ao consumidor (Osborn & Akoh, 2002). Além disso, as lipases são enzimas que não necessitam de cofatores. Este conjunto de fatores permite assim um vasto campo de aplicação tecnológica (Lee & Lee, 2006; Wu *et al.*, 2006). As limitações à sua utilização na indústria prendem-se com os custos operacionais elevados, taxas de reação lentas,

instabilidade e perda de atividade catalítica, impossibilidade de regeneração e variabilidade de qualidade do produto obtido (Mateo *et al.*, 2007).

2.2.3.1. Imobilização de enzimas

A utilização de enzimas solúveis inclui algumas desvantagens como a instabilidade da sua estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural, a perda de atividade resultante de condições dos processos industriais e a inibição pelo substrato ou produto. Desta forma, têm um tempo de meia-vida operacional curto e um custo elevado. Além disso, muitas vezes não é possível proceder à sua recuperação (Krajewska, 2004).

A imobilização enzimática em suportes adequados possibilita a redução do custo de utilização das lipases e confere maior viabilidade do processo a nível industrial. A imobilização tem como principais objetivos (Castro, 2003): i) a estabilização do biocatalisador; ii) a maior facilidade de recuperação do biocatalisador do meio reacional e controlo do tempo de reação; iii) a possibilidade de utilização das lipases em sistemas contínuos e reutilização em sistemas descontínuos; iv) a concentração de grandes quantidades de biocatalisador num pequeno volume de reator de forma a intensificar o processo de síntese; v) a formação de um microambiente para a enzima, que melhora a sua estabilidade térmica e química; vi) o aumento da área interfacial entre enzima e substrato.

Na síntese de lípidos estruturados, é necessário que os suportes de imobilização utilizados sejam inertes e que tanto estes como os restantes materiais e metodologias utilizadas sejam adequados para a produção de enzimas imobilizadas de grau alimentar. Existem vários suportes disponíveis salientando-se polímeros sintéticos como: “Accurel® MP 1000”, “Eupergit® C”, a “Lewatit® VP OC 1600” e “Sepabeads” (Tecelão *et al.*, 2012).

Existem duas categorias de técnicas de imobilização: i) imobilização por ligação a suportes sólidos (por adsorção, ligação covalente ou ligação iónica); ii) imobilização por inclusão (ou confinamento) em matrizes, cápsulas ou microcápsulas. Também é possível a combinação de duas ou mais técnicas (Knezevic *et al.*, 2004).

Por imobilização em suportes sólidos, a enzima fica retida nos poros ou na superfície do material, criando-se um complexo enzima-suporte que mantém as características físicas do material e retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. As enzimas livres têm um custo de preparação mais baixo, no entanto, só podem ser utilizadas uma única vez. A utilização de técnicas de imobilização permite uma poupança significativa do custo global do processo, desde que o processo de imobilização não seja dispendioso, haja boa recuperação de atividade enzimática e que haja uma considerável estabilidade operacional (Al-Zuhair, 2007).

Segundo Castro (2003), as desvantagens da imobilização são: i) a perda de capacidade catalítica durante a imobilização; ii) problemas de transferências de massa interna no caso de suportes porosos; iii) separação física entre catalisador e fluido podendo ocorrer degradação mecânica e libertação de partículas finas; iv) criação de condições inibitórias de substratos e/ou produtos no microambiente (Mateo *et al.*, 2007); v) tempos de reação mais longos.

As enzimas são moléculas de estrutura tridimensional complexa que quando expostas a condições inadequadas podem sofrer desnaturação, com perda da sua atividade. Após a imobilização, é importante ter em conta a estabilidade no armazenamento, referente à capacidade da enzima manter a sua atividade catalítica entre o momento de produção e o seu uso, e, a estabilidade operacional que descreve a manutenção da atividade catalítica durante a reação (Carvalho *et al.*, 2015).

A estabilidade operacional da enzima é em regra superior após ser imobilizada, contudo, a sua atividade residual é quase sempre mais fraca que a da respetiva enzima nativa. Este facto resulta de perdas de atividade causadas durante o procedimento de imobilização e por efeitos de transferência de massa. Com efeito, nem toda a enzima que é colocada em contacto com o suporte fica imobilizada no mesmo e, da enzima que é imobilizada com sucesso, parte pode sofrer mudanças conformacionais que alteram a sua eficiência catalítica ou mesmo a inativação da mesma (Mateo *et al.*, 2007). É ainda de referir que no que respeita a atividade das lipases imobilizadas, esta depende de vários fatores como a própria lipase, o tipo de suporte e o procedimento de imobilização (Madalozzo, 2011).

Alguns exemplos de lipases comerciais na sua forma imobilizada são da lipase de *Thermomyces lanuginosa* “Lipozyme TL IM”, de *Candida antarctica* “Novozym 435” e de *Rhizomucor miehei* “Lipozyme RM IM”.

O procedimento de adsorção é dos mais utilizados devido à sua simplicidade. A enzima é imobilizada a um suporte sólido por ligações de baixa energia (van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e iónicas). A eficiência da adsorção depende do tamanho da proteína a ser adsorvida, da área superficial do adsorvente e principalmente do tamanho dos poros do suporte sólido. A eficiência é também condicionada pela concentração da enzima: a quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração da enzima em solução, atingindo um patamar de saturação (Villeneuve *et al.*, 2000). O uso de aditivos ou solventes polares como o etanol pode beneficiar o rendimento da adsorção conforme verificado por Balcão *et al.* (1996). A escolha do material de suporte tem em conta fatores como força mecânica, estabilidade física e química, carácter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (Villeneuve *et al.*, 2000).

2.2.3.2. Parâmetros que influenciam a atividade enzimática

A atividade das lipases é influenciada por vários fatores como a temperatura, força iónica, pH, razão molar, tempo de reação, substratos do meio reacional e pela atividade termodinâmica da água (Sahin *et al.*, 2005; Guillén *et al.*, 2011). Além disso, a reação pode ser inibida por elevadas concentrações de substratos e/ou produtos, a enzima pode sofrer inativação por ação de metais pesados e outros compostos como produtos de oxidação dos lípidos, ácidos gordos livres, entre outros (Mateo *et al.*, 2007).

Respeitante ao pH, a origem da lipase condiciona o pH ótimo para a sua atividade. Lipases de origem fúngica têm pH ótimo perto da neutralidade ou ligeiramente ácido, contrariamente às lipases de origem bacteriana que têm um pH ótimo perto da neutralidade ou ligeiramente alcalino (Soumanou *et al.*, 2013).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

A temperatura é um dos parâmetros mais estudados no que toca ao aumento da velocidade de uma reação enzimática. O aumento da temperatura favorece a atividade da enzima até um valor ótimo a partir do qual a aceleração da taxa de desnaturação provoca a perda de conformação original da enzima, inativando-a de forma reversível ou irreversível (Malcata *et al.*, 1990). O tempo de vida útil da lipase está diretamente associado à temperatura de reação e à termoresistência da enzima e é um fator que define em grande parte a viabilidade económica de processos industriais (Bailey & Ollis, 1986). A maioria das lipases funcionam a condições de temperatura constantes, sendo o intervalo de temperatura ótimo entre 30 a 50 °C para lipases microbianas. É ainda de referir que a imobilização das enzimas pode permitir uma estabilização térmica entre 60 a 70 °C (Soumanou *et al.*, 2013).

A atividade da água é uma medida da água disponível no sistema e corresponde à relação entre a pressão de vapor de água desse sistema e a pressão de vapor de água pura no ar saturado à mesma temperatura (Sancho-Madriz, 2003).

A água tem influência na manutenção da estrutura da enzima e o seu funcionamento, afetando crucialmente a catálise enzimática (Kuntz & Kauzmann, 1974 citado por Rodrigues, 2011). As lipases são enzimas que apresentam uma cinética de ativação interfacial na interface lípido-água. Estruturalmente, contêm uma unidade constituída por um oligopéptido helicoidal, que protege o centro ativo. Esta proteção abre de forma a expor o centro ativo, quando interage com uma interface hidrofóbica, permitindo o livre acesso ao substrato (ativação interfacial). A ausência de água resulta na inativação da enzima (Reetz, 2002)

A nível molecular, o mecanismo de interesterificação envolve a hidrólise da molécula de éster e posterior reesterificação. Assim é necessário que a água esteja presente pelo menos vestigialmente, criando um sistema microaquoso, mas não em excesso, promovendo apenas a reação de hidrólise (Macrae, 1983). Diferentes enzimas têm exigências diferentes em relação à a_w que necessitam para manter um nível apreciável de atividade catalítica. Para algumas lipases, a a_w tem de ser próxima de 1, mas outras lipases, como é o exemplo da lipase de *Rhizomucor miehei*, demonstram uma atividade catalítica elevada para valores muito baixos e ótima abaixo de 0,5 (Halling *et al.*, 2004).

A atividade da água influencia a temperatura a que uma determinada proteína sofre desnaturação térmica, sendo que a estabilidade das enzimas aumenta consideravelmente em meios com baixos níveis de atividade da água, tornando possível biotransformações a temperaturas mais elevadas que aquelas usadas em soluções aquosas convencionais (Aldercreutz, 1982 citado por Rodrigues, 2011). Para a maioria das enzimas o processo de termodesnaturação inicia-se entre os 40 °C e 50 °C (Bailey & Ollis, 1986). Algumas preparações comerciais de lipases imobilizadas são termorresistentes como a *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) e de *Candida antarctica* (Novozym 435) produzidas pela Novozymes A/S, que são indicadas na modificação enzimática na ausência de solventes orgânicos devido à sua resistência térmica e elevada atividade (Rodrigues, 2011).

Os produtos de oxidação primária são um fator que diminui a atividade e estabilidade das lipases (Correia & Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998). A utilização de gorduras polinsaturadas e sua

incorporação em TAG apresenta como dificuldade a manutenção da estabilidade oxidativa durante o processamento e armazenamento dos mesmos, com impacto na atividade e estabilidade das lipases (Osório *et al.*, 2006).

O efeito da presença de elevados teores de AGL nos meios reacionais na inativação/inibição de lipases não é consensual entre estudos. Alguns estudos referem que ocorre, efetivamente, uma inibição de atividade (Dunn *et al.*, 2003), outros afirmam não ter qualquer efeito negativo na estabilidade enzimática (Holm & Cowan, 2008). Quanto maior for o teor inicial em ácidos gordos livres, mais elevados tornar-se-ão ainda, após reação de interesterificação (Perrin, 1996; Bermejo *et al.*, 2014).

2.2.3.3. Utilização de meios com solvente orgânico e meio livre de solvente

A produção de lípidos estruturados com lipases imobilizadas pode decorrer num sistema descontínuo ou contínuo em reator de leito fixo ou leito fluidizado, em meio com solvente ou livre de solvente, onde participam apenas os substratos (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

O solvente orgânico tem a capacidade de dissolver ésteres e outros compostos hidrofóbicos, o que permite que sejam utilizadas condições de temperatura próximas da temperatura do meio ambiente. A extração e recuperação dos ésteres produzidos é facilitada o que influencia o desencadear da reação no sentido de formação dos produtos. Sendo imiscível com a água, cria a partição entre duas fases inibindo efeitos inibitórios provocados pelo substrato e/ou produtos. No entanto, a utilização de solvente orgânico aumenta a complexidade do meio de reação, os custos associados e dificulta a recuperação e purificação dos produtos desejados (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

Além disso, na indústria alimentar o solvente deve ser biocompatível e obrigatoriamente de grau alimentar. Solventes com log P acima de 4 são considerados biocompatíveis dado que são hidrofóbicos e como tal não removem a água necessária para a manutenção da atividade biocatalítica. Em sistemas reacionais catalisados por lipases tem-se utilizado o n-hexano apesar de apresentar um valor log P de apenas 3,5 (Laane *et al.*, 1985).

A utilização de sistemas livres de solvente para a catálise de SL é preferida de uma perspetiva ambiental, de segurança alimentar e do ponto de vista económico dado que o passo de recuperação e purificação dos produtos desejados não implica a remoção do solvente utilizado (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

2.2.4. Produção de lípidos estruturados dietéticos

Através do conhecimento do metabolismo lipídico é possível definir criteriosamente a estrutura e composição do lípido estruturado de forma a alcançar o objetivo desejado, seja atuando contra doenças específicas, na melhoria de certos estados metabólicos ou manutenção do bem-estar dos indivíduos saudáveis (Akoh, 1995; Kubow, 1996; Willis *et al.*, 1998; Mu & Høy, 2001).

Os triacilgliceróis de baixo valor calórico podem consistir em (Ferreira-Dias *et al.*, 2019): i) TAG com ácidos gordos de cadeia curta (C) nas posições 1 e 3 e um ácido gordo de cadeia longa (L) na

posição interna (CLC), ii) TAG que apresentam um ácido gordo de cadeia média (M) nas posições 1 e 3 e um ácido gordo de cadeia longa na posição *sn*-2 (MLM), iii) TAG que apresentam apenas ácidos gordos de cadeia média na sua constituição (MMM).

Os lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM permitem a prevenção da obesidade pelo seu menor valor calórico, 5-7 kcal/g, comparativamente aos lípidos convencionais (9 kcal/g) (Xu, 2000). Estes novos lípidos são produtos com um metabolismo único que associam os benefícios de saúde atribuídos aos LCFA (principalmente ácidos gordos essenciais), rapidamente absorvidos como 2-MAG quando na posição interna de TAG, e asseguram as vantagens associadas aos MCFA, de fácil digestibilidade, absorção e metabolismo dos MCFA quando nas posições *sn*-1,3 (Jandacek *et al.*, 1987; DeMichele *et al.*, 1989; Teo *et al.*, 1989; Jennings & Akoh, 2001; Mu & Høy, 2000, 2001; Xu, 2004).

OS MCFA são uma mais valia na nutrição de indivíduos com desordens de absorção de gordura ou problemas metabólicos (Babayan, 1987; Low *et al.*, 2007). Em pacientes que não conseguem atingir as suas necessidades nutricionais por via oral ou quando o trato gastrointestinal não funciona adequadamente, utiliza-se a nutrição parentérica (via intravenosa) ou entérica (através do tubo digestivo). A aplicação dos MLM em formulações de nutrição parentérica e entérica tem como objetivo garantir uma taxa de hidrólise e absorção mais próxima da fisiológica, fornecendo energia utilizável para o músculo através da utilização dos corpos cetónicos e os LCFA (Mattson & Jandacek, 1991). As misturas físicas de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) para aplicações medicinais retêm a taxa de absorção individual de cada um dos óleos fornecidos, algo que é modificado nos lípidos estruturados, aumentando a absorção total pelo intestino tanto de MCFA como LCFA (Jandacek *et al.*, 1987; Hasselmann & Kummerlen, 1998; Mu & Høy, 2000; Osborn & Akoh, 2002; Xu, 2004; Goldberg, 2012).

No caso de pacientes com insuficiência pancreática e fibrose cística, com deficiências no nível de lipases, dado que os SL são hidrolisados tão facilmente quanto os MCFA, o nível de lipase pancreática necessária para hidrólise e absorção de ácidos gordos é menor (Jandacek *et al.*, 1987).

Já foi demonstrado o seu papel na preservação da função do reticuloendotelial, atenuação do catabolismo proteico e melhoria do balanço do azoto, melhoria na função imunológica sendo vantajoso para imunossuprimidos ou transplantados, na resposta a infeção e queimaduras, prevenção de trombose, ressecção de risco de cancro, com inibição ou redução da taxa de crescimento de tumores, entre outros. É também utilizado em alimentos do tipo *snack* em pacientes obesos e idosos. Apesar de úteis no controlo da obesidade, o consumo elevado de ácidos gordos de cadeia média pode ter efeitos tóxicos e aumentar os níveis de colesterol sérico (Akoh, 1995; Willis *et al.*, 1998; Jennings & Akoh, 1999; Mu & Høy, 2001; Osborn & Akoh, 2002; Goldberg, 2012). A maioria dos lípidos estruturados com funções dietéticas existentes no mercado são produzidos por interesterificação química, como é o caso de Structolipid™, produzido pela Pharmacia e Upjohn AB (Suécia), composto por uma mistura de TAG de cadeia média (provenientes de óleo de coco ou de óleo de palmiste) e TAG cadeia longa (provenientes de óleo de soja refinado) (Rubin *et al.*, 2000) e Caprenin™, produzido pela Procter e Gamble (E.U.A.), é constituído por ácido caprílico, ácido cáprico e ácido beénico (Webb & Sanders, 1991).

Relativamente à melhoria de performance, tem sido estudado o impacto do consumo de MCFA antes do período de atividade física. A extrapolação para os SL assenta na capacidade que os sujeitos normais e saudáveis têm de converter os SL prontamente aos seus componentes. Os MCFA são rapidamente oxidados ao nível das mitocôndrias e utilizados pelos músculos como fonte de energia, algo que diminuiria a utilização de glicogénio e permitiria guardá-lo ao longo do período contínuo de esforço. Outro potencial benefício seria a inibição do pico de insulina e possível hipoglicémia durante o exercício que ocorre após uma refeição com elevados hidratos de carbono. Alguns estudos têm mostrado de forma consistente um aumento modesto de corpos cetónicos circulantes após ingestão de TCM e uma diminuição da subida de níveis de insulina após ingestão de uma quantidade isocalórica de glúcidos, mas durante o exercício houve preferência pela glucose para oxidação (Decombaz *et al.*, 1983).

A composição rica em ácidos gordos saturados faz com que os MLM sejam menos suscetíveis à oxidação, mais estáveis e também mais solúveis em água, comparativamente a TCL. Estas propriedades fazem com que os TCM sejam aplicados no transporte de “*flavours*”, cores e vitaminas; na prevenção de aderência e fornecimento de brilho em produtos de confeitaria (Akoh, 1998), resultando numa alternativa menos calórica.

A incorporação dos ácidos gordos desejados para a formação de TAG modificados é conseguida através de i) acidólise de vários óleos com ácidos gordos livres, ii) interesterificação de TAG com ácidos gordos etílicos ou metílicos (Huang & Akoh, 1996; Feltes *et al.*, 2009), catalisadas por lipases *sn*-1,3 específicas (Ferreira-Dias, 2010). Ambas as reações já foram realizadas em meios livres de solvente ou na presença de solvente orgânico, em sistema contínuo ou descontínuo. Na maioria das experiências (Quadro 1), utilizaram-se lipases comerciais imobilizadas em cargas entre 4% (Shimada *et al.*, 1996) a 20% (Jennings & Akoh, 2000, 2001).

A acidólise e interesterificação são reações reversíveis, onde se atinge o equilíbrio. Distinguem-se em duas fases: inicialmente, ocorre a hidrólise das ligações éster com libertação dos ácidos gordos; de seguida, ocorre a esterificação dos AGL ao esqueleto da molécula de glicerol. A otimização da reação resulta do balanço da taxa das reações de hidrólise e esterificação (Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

O equilíbrio e a velocidade das reações de interesterificação são função de vários parâmetros tais como a temperatura de reação, a composição do sistema reacional, o teor de água, a carga da enzima, a presença de inibidores da reação. Até ao momento de equilíbrio ocorre a incorporação dos AGL nos TAG presentes no sistema. Devido à cinética da reação, o máximo de incorporação de AG observado na acidólise é usualmente inferior a 50 mol-%, valor inferior ao máximo teórico de 66 mol-% esperados quando são utilizadas lipases *sn*-1,3 específicas. A utilização destes biocatalisadores não permite resolver totalmente a migração de acilo que resultam na deterioração da qualidade dos SL e formação de produtos secundários indesejáveis. Além dos fatores mencionados anteriormente que condicionam a reação, a migração de acilo é afetada também pelo suporte enzimático, o solvente e o sistema utilizado (Xu, 2003).

Quadro 1-Reações de produção de lípidos MLM por catálise enzimática

Reação	Substratos	Biocatalisador	Sistema	Referência
Acidólise	Óleo de gralha de uva + C8:0/C10:0	Enzima não comercial imobilizada ROL e CPL imobilizada no látex da papaia	Meio livre de solvente	(Costa et al., 2018)
Acidólise	Óleo de semente de abóbora + C10:0	Lipozyme TL IM	Meio livre de solvente ou n-hexano	(Sousa et al., 2018)
Esterificação directa; Esterificação em dois passos; acidólise	Concentrado de PUFA de óleo de sardinha + C8:0	Novozym 435 Lipozyme RM IM	n-hexano	(Morales-Medina et al., 2017)
Acidólise	Óleo de abacate + C8:0	Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM	Meio livre de solvente	(Caballero et al., 2014)
Acidólise	Azeite + C8:0/C10:0	lipase 2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> imobilizada não comercial	Meio livre de solvente	(Casas-Godoy et al., 2013)
Acidólise	Azeite + C8:0/C10:0	ROL imobilizada não-comercial	Meio livre de solvente	(Nunes et al., 2012)
Interesterificação	Óleo de peixe + éster metílico de C8:0 Óleo de peixe + TCM	Lipozyme RM IM	Meio livre de solvente	(Feltus et al., 2009)
Acidólise	Óleo de sésamo + C8:0	Lipozyme RM IM	Meio livre de solvente	(Kim & Akoh, 2006)

O fator tempo e temperatura demonstram promover a reação de migração de acilo como demonstrado durante produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico num sistema descontínuo, com a lipase comercial de *Rhizomucor miehei* num meio livre de solvente (Xu et al., 1998), utilizando o mesmo biocatalisador na reação de acidólise de óleo de girassol e uma mistura de ácido palmítico e esteárico (Carrín & Crapiste, 2008) ou durante a reação de acidólise de óleo de sésamo e ácido caprílico. Neste mesmo sistema, a razão molar AGL:TAG não demonstrou efeito significativo na migração de acilo (Kim & Akoh, 2005). No geral, a migração de acilo ocorre com menor extensão

quando em sistemas de reator de leito contínuo e em meio livre de solvente (Xu *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2004; Kim & Akoh, 2006).

A incorporação de M em TAG mostrou ser dependente do tipo de substrato, da razão molar óleo:AG, do biocatalisador utilizado, do tipo de sistema (solvente orgânico vs meio livre de solvente) e o modo de operação (descontínuo vs contínuo) (Ferreira-Dias, 2010).

A razão molar óleo:AG ótima para a produção de lípidos estruturados por acidólise varia de acordo com o biocatalisador e o sistema de reação utilizado. Na acidólise em reatores descontínuos de trioleína com ácido caprílico, catalisada pela lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), em n-hexano, observou-se um decréscimo na taxa reacional quando a razão molar óleo:ácido caprílico foi superior a 1:6, provavelmente devido a fatores inibitórios do aumento do ácido (Camacho *et al.* 2003). Foram obtidos resultados semelhantes na acidólise de óleo de soja com ácido caprílico, em meio livre de solvente, catalisada pela lipase comercial imobilizada de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) (Turan *et al.*, 2006). A incorporação de ácido cáprico em banha, em n-hexano aumentou até a uma razão molar de banha:ácido cáprico de 1:2, enquanto que para razões molares superiores (até 1:8) não ocorreu aumento significativo da incorporação de ácidos gordos. Contudo, foi observado um aumento de ácido esteárico em triacetina (Yang *et al.*, 2001) e de GLA numa mistura de óleo de palmiste e oleína de palma (Lumor & Akoh, 2005) com o aumento da razão molar.

Apesar do possível aumento da incorporação de ácidos gordos com o aumento de AG utilizados, a presença em excesso de ácidos gordos que não reagem é indesejável do ponto de vista da pureza e obtenção final do produto (Ferreira-Dias, 2010).

2.3. Processo de obtenção e caracterização de óleo de bagaço de azeitona

A azeitona, fruto da oliveira, é composta por polpa (70-90% do fruto), o endocarpo (9-27%) e a semente (2-3%) (Moral & Méndez, 2006). Uma azeitona possui uma quantidade média em óleo, proveniente da polpa, de cerca de 22% do seu peso fresco (44% do peso seco) (Kiritsakis & Markakis, 1988) podendo atingir 65% do peso seco com o amadurecimento (Fernández & Garrido, 1971).

De acordo com o Regulamento (UE) n.º 1308/2013, os azeites designados como virgens são os azeites obtidos a partir do fruto de oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o produto e que não tenham sido submetidos a outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação ou da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

A produção do azeite virgem pode ser dividida em cultivo, colheita, preparação e obtenção de azeite e armazenamento e acondicionamento do produto (Marques, 2015).

Após a colheita das azeitonas na fase ideal de maturação, os frutos são transportados para o lagar, atravessam um processo de seleção, limpeza e lavagem e são posteriormente moídos, formando uma

pasta que é batida e aquecida durante a termobatedura para o aumento do rendimento de extração do azeite (Figueiredo *et al.*, 2014; Marques, 2015). Durante o processo promove-se a rutura das células vegetais, permitindo que as gotículas de azeite contactem com enzimas que, na presença de oxigénio desenvolvem reações de degradação. A partir dos açúcares podem também ocorrer reações de fermentação por microrganismos, com formação de etanol, ácido acético e acetato de etilo. Todos estes fatores estão associados à ocorrência de reações de hidrólise e oxidação lipídica, originando, respetivamente, ácidos gordos livres e hidroperóxidos que desempenham um papel importante na qualidade do azeite (Navarra *et al.*, 2011). A tecnologia de separação sólido-líquido difere de acordo com o sistema de extração utilizado, existindo o sistema tradicional de prensas, o sistema contínuo de três fases e o sistema contínuo de duas fases. Pelo que, é na extração propriamente dita que residem as diferenças entre os vários processos (Aparício & Harwood, 2013).

O sistema tradicional de prensagem e o sistema contínuo de três fases originam no final do processo o azeite virgem (produto principal), o bagaço de azeitona seco e as águas ruças (Aires, 2007; Aparicio & Harwood, 2013). O sistema contínuo de duas fases é considerado mais ecológico e tem vindo a substituir os processos de extração tradicional e contínuo de três fases. No final do processo obtém-se o azeite virgem, o bagaço húmido e uma reduzida quantidade de águas ruças (Aparício & Harwood, 2013). Contudo, o sistema de duas fases é responsável pela produção de maiores quantidades de bagaço de azeitona caracterizado por um elevado teor de humidade, sendo assim designado de bagaço de azeitona húmido (Aires, 2007).

Em média, 100 kg de azeitona produzem cerca de 20 kg de azeite (Alcaide *et al.*, 2010); conforme os casos, e em função dos sistemas de extração, e produzem os efluentes e os subprodutos seguintes: 40 kg de bagaço (taxa de humidade de 25-35%) mais 40 kg de águas residuais se se utiliza o sistema tradicional (de prensas); 55 kg de bagaço (taxa de humidade de 45%-50%) mais 100 kg de águas residuais se se utiliza o sistema contínuo a 3 fases; 70 kg de bagaço (taxa de humidade superior a 60%) mais 10 kg de águas residuais se se utiliza o sistema contínuo a 2 fases (CAR/PP, 2000; Moral e Méndez, 2006).

As águas ruças apresentam maiores problemas para a indústria do azeite dado que resultam em efeitos nefastos para os ecossistemas quando descarregados indevidamente para o meio ambiente, que vão desde a ameaça à vida aquática, poluição das águas superficiais e subterrâneas, maus odores, fitotoxicidade e alterações na qualidade do solo (Kiril *et al.*, 2010), potenciando assim graves problemas ecológicos (Dermeche *et al.*, 2013). Uma vez que ainda não existe uma solução eficiente e economicamente viável de valorizar/tratar este efluente que acaba por ser descarregado no meio ambiente, houve uma crescente adesão ao sistema de duas fases para evitar a sua produção (MADRP, 2007).

O bagaço de azeitona é constituído por polpa e epicarpo dos frutos, partes do caroço e do tegumento da azeitona triturados, além de água, podendo apresentar elevada variabilidade nos teores de óleo residual e de água (Mendoza *et al.*, 1996; Gariso, 2011). Apresenta compostos inorgânicos e quantidades apreciáveis de lenhina, celulose e hemicelulose, bem como outra matéria orgânica que inclui proteínas, poliálcoois, ácidos gordos, açúcares, polifenóis e outros pigmentos (Rincón *et al.* 2013).

A carga orgânica que comporta é responsável pelo seu carácter fitotóxico e antimicrobiano que conjuntamente com o elevado teor de humidade (principalmente no caso do bagaço húmido) torna difícil o seu manuseamento, armazenamento e transporte, características que dificultam o tratamento/valorização deste resíduo (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Uma das possíveis formas de tratamento/valorização aplicadas a nível industrial encontradas para o bagaço de azeitona é a obtenção de óleo de bagaço de azeitona por um processo de extração usando n-hexano, seguida de cogeração de energia elétrica (Ruiz-Méndez *et al.*, 2013).

Os bagaços obtidos no lagar de azeite são, na sua grande maioria, encaminhados para fábricas extratoras do óleo de bagaço de azeitona. Considera-se a entrada de dois tipos de bagaço, o húmido (proveniente dos lagares de 2 fases) e o seco (proveniente dos lagares de três fases e do sistema tradicional de prensas). Em ambos os casos, efetua-se uma secagem até que o teor de humidade seja de 8% - 10% e uma extração química com a ajuda de hexano, que dissolve a fração oleosa do bagaço e permite a obtenção do óleo de bagaço de azeitona bruto (Freitas, 2007).

No caso do bagaço de duas fases, este pode ser sujeito a uma segunda centrifugação permitindo extrair 40 a 60% do óleo retido utilizando *decanters*. O óleo obtido é comercialmente classificado como óleo de bagaço de azeitona bruto devido às características que apresenta (Moral & Méndez, 2006).

O intervalo de tempo entre a saída do lagar e a chegada até a empresa extratora de óleo de bagaço de azeitona deve ser curto (Freitas, 2007). No entanto, o bagaço húmido pode permanecer em lagoas nas imediações até cerca de seis meses, dependendo da capacidade do extrator. A exposição prolongada ao oxigénio, resulta em fenómenos de degradação como a hidrólise, a oxidação e formação de compostos de fermentação como ésteres metílicos e etílicos. As propriedades do óleo que se obtém *à posteriori* variam consoante o tempo de armazenamento (Moral & Méndez, 2006) e são principalmente afetadas quando armazenados por mais de dois meses e, principalmente, em óleos que sofreram dupla centrifugação (Hinojosa & Méndez, 2004).

Os bagaços tradicionais e de três fases requerem um pré-condicionamento diferente dos de duas fases, antes da extração por solvente (Moral & Méndez, 2006).

A etapa crucial de secagem requer elevado consumo energético e exige uma pesquisa contínua no sentido de minimizar o tempo de residência, custos e melhoria da qualidade do produto obtido (Freire *et al.*, 2001). Em secadores rotativos, a água presente no bagaço sofre evaporação por transferência de calor de gases de aquecimento que circulam a uma temperatura de aproximadamente 450 °C (Petrakis, 2006). Os gases de aquecimento e vapores formados são posteriormente arrefecidos e limpos antes da sua emissão.

O bagaço extratado, que é um resíduo obtido no final da extração de óleo de bagaço com solvente, ou os caroços separados anteriormente são uma alternativa eficiente em termos de calor, custo e impacto ambiental com baixo conteúdo de cinzas, aos gases exaustos de turbina ou planta de cogeração (Moral & Méndez, 2006).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

A temperatura de secagem do óleo de bagaço de azeitona bruto promove a degradação do óleo. Este facto é visível pelo aumento da acidez, índice de peróxidos e coeficientes de extinção específicos, bem como pelo aparecimento de polímeros corados acastanhados e a oxidação dos TAG (~35%) (Gomes & Caponio, 1997).

Podem-se distinguir as seguintes fases do processo de obtenção do óleo de bagaço de azeitona bruto: preparação da polpa, extração com o hexano, dessolventização e destilação da miscela (mistura de solvente e óleo) (Ortega *et al.*, 2001).

A polpa de azeitona após secagem é submetida a uma moenda de forma a permitir um nível de percolação ideal e a adequada penetração do solvente nos sólidos e misturada com uma pequena quantidade de caroços de azeitona para melhor drenagem. A preparação da polpa tem como objetivo garantir um elevado rendimento de extração tal como facilitar a dessolventização (Moral & Méndez, 2006).

Existem vários métodos de extração e destilação da miscela, ou seja, a separação da mistura de óleo e solvente. Na extração com solvente ocorre a mistura de uma fase líquida, o hexano, com uma fase sólida, o bagaço, em que o solvente penetra no bagaço e desenvolvem-se fenómenos de dissolução e difusão, ocorrendo a transferência do óleo das partículas do bagaço para o solvente (Moral & Méndez, 2006).

Resultam da extração resíduos sólidos de bagaço extratado separados por meios mecânicos ou gravíticos e uma solução composta por óleo dissolvido em solvente, a miscela.

O hexano presente no resíduo sólido é evaporado sob vácuo em um dessolventizador, que consiste numa coluna vertical com vários pratos de dupla face aquecida a vapor (Peña *et al.*, 2003). Este resíduo é usualmente seco e arrefecido num conjunto de pratos adicionais, localizados abaixo dos utilizados no processo de dessolventização (Moral & Méndez, 2006)

Durante a destilação ocorre a separação dos componentes da miscela através da introdução de suficiente calor para a destilação do componente com menor ponto de ebulição. O n-hexano deve ser recuperado e reincorporado no processo (Moral & Méndez, 2006; Petrakis, 2006).

Após a destilação obtém-se o óleo de bagaço de azeitona bruto, definido como “o óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solventes ou por processos físicos, ou óleo correspondente, com exceção de certas características específicas, a um azeite lampante, com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75º, nº 2, previstas para esta categoria” (Regulamento (UE) n.º 1308/2013).

Este óleo caracteriza-se por uma coloração verde escura, característica do elevado teor em clorofilas, odor e sabor desagradáveis (Petrakis, 2006). A natureza do processo de obtenção do óleo de bagaço de azeitona bruto, faz com que coloração também escureça, devido às altas temperaturas a que fica submetido o bagaço na fase de secagem (Gomes & Caponio, 1997).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

A extração química é responsável pela maior fração insaponificável do óleo de bagaço de azeitona bruto comparativamente ao azeite (Gutiérrez & Izquierdo, 1994 citado por Sebadelhe, 2008). É notória a presença em maior quantidade de ceras, esteróis totais e eritrodiol e uvaol nos óleos de bagaço de azeitona do que nos azeites (Ruiz-Méndez & Dobarganes, 1999; Regulamento Delegado (UE) 2015/1830). Devido ao efeito do processamento, principalmente da secagem, nas propriedades do óleo de bagaço de azeitona, a legislação europeia estabelece para o óleo de bagaço de azeitona parâmetros como a acidez, presença de ácidos gordos *trans*, da absorção no ultravioleta, entre outros, superiores (Moral & Méndez, 2006).

A composição em ácidos gordos deste subproduto é idêntica aos restantes produtos obtidos a partir da azeitona, correspondendo as maiores percentagens ao ácido gordo monoinsaturado oleico (55,0%-83,0%), ao ácido linoleico (3,5%-21,0%) e ao ácido palmítico (7,5%-20,0%). A composição em ácidos gordos e isómeros *trans* dos óleos provenientes da azeitona encontra-se presente no Anexo I.

A extração do óleo de bagaço de azeitona, a sua refinação, embalagem e distribuição têm um papel decisivo na atividade económica do sector (10% da produção agrícola final em Espanha) (Moral & Méndez, 2006). Durante a refinação são removidos alguns compostos do óleo como os fosfatídeos e substâncias mucilaginosas, que possam precipitar durante o período de armazenamento e uso, através de uma degomagem (Marques, 2015). Os ácidos gordos livres são neutralizados e eliminados na forma de sabões com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, que são depois separados por centrifugação (Marques, 2015). Durante a descoloração os compostos clorofilinos, carotenoides e pigmentos acastanhados formados durante a aplicação de elevadas temperaturas no processamento são removidos (Marques, 2015). Contudo, nesta etapa pode ocorrer o aumento de produtos de oxidação secundários (Antonopoulos *et al.*, 2006). São também removidos os compostos voláteis formados durante a refinação que resultam em odor desagradável e também na remoção parcial de substâncias relativamente voláteis como esteróis, hidrocarbonetos ou tocoferóis durante a desodorização (Marques, 2015)

O óleo de bagaço de azeitona bruto compreende uma composição em ácidos gordos idêntica ao azeites virgens, refinados e óleos de bagaço de azeitona refinados, graças à manutenção da composição em ácidos gordos inicial (Varela, 2012), propriedades semelhantes a outros óleos vegetais como o de soja, girassol ou colza e um preço de mercado competitivo (750 €/tonelada) (Gariso, 2011; Olinerca, 2019). As propriedades do óleo de bagaço de azeitona bruto estão representadas no anexo II.

O aproveitamento do óleo de bagaço de azeitona bruto como substituto de outros óleos vegetais virgens na produção de lípidos estruturados, um produto de valor acrescentado, pode ter um impacto positivo no sector oleícola (Figueiredo *et al.*, 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Biocatalisadores e suportes de imobilização

As reações de acidólise realizadas foram catalisadas pelas lipases comerciais Lipozyme® RM IM e Novozym® 435 (Novozymes A/S, Dinamarca).

A Lipozyme® RM IM consiste numa lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina de troca iónica fraca, Duolite A568, que é utilizada maioritariamente na obtenção de lípidos estruturados de valor acrescentado. Este biocatalisador mantém a sua estrutura secundária e terciária numa vasta gama de temperatura, com uma temperatura ótima de 70°C e temperatura de desnaturação de 90°C. A imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em resina iónica permite a manutenção de 100% da seletividade enzimática.

De acordo com a Strem Chemicals Inc., o biocatalisador Novozym® 435 é uma lipase não específica que deriva da enzima de *Candida Antarctica B*, imobilizada numa barreira hidrofóbica de resina acrílica. Atua numa gama de temperatura de 20 °C-110 °C, com temperatura ótima entre 30°C e 60°C. Apresenta uma atividade de 10000 PLU/g (1 PLU é a quantidade de atividade enzimática que produz 1 µmol de laureato de propilo por minuto, em condições-padrão), com boa performance em condições anidras. Oferece especificidade para substratos como ésteres e álcoois e regio- e enantio-seletividade.

Foram também realizados ensaios com enzimas líquidas (Lipozyme CALBL, Novozym 735 e Novozym 388) imobilizadas nos suportes Lewatit® VP OC 1600 e Accurel MP 1000.

A Lipozyme® CALBL apresenta uma atividade de 5000 LU/g (LU: unidade de lipase) e temperatura ótima entre 30°C e 60°C. Tal como a Novozym® 435, deriva da lipase não específica de *Candida antarctica B*. Demonstra elevada especificidade para ésteres e álcoois (Novozymes, 2016).

A Novozym 735 corresponde à lipase de *Candida antarctica (agora M Antarcticus) A* (CAL-A) que é caracterizada como termoestável, operacional até 90°C e capaz de sintetizar ésteres lipídicos, na presença de água, quando os substratos (éster e álcool) são pouco solúveis ou insolúveis em água (Brenneis *et al.*, 2004). Ocorre redução significativa de atividade na presença de ésteres hidrofílicos. No seu estado original tem atividade de aciltransferase mais baixa que o grupo CpLIP2 (do microrganismo *Candida parapsilosis*), mas mais elevada que as lipases clássicas (Patkar *et al.*, 1993; HØegh *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 2006). É referido que a enzima no seu estado puro revela atividade ótima entre 50 e 70°C e pH neutro. Além disso, utiliza preferencialmente ácidos gordos de cadeia curta (C4:0-C8:0) (Pfeffer *et al.*, 2006).

A lipase de *Rhizomucor miehei* em formulação líquida, conhecida comercialmente como Novozym® 388, é uma enzima *sn*-1,3 seletiva produzida por *Aspergillus sp* (Asano *et al.*, 2015).

As resinas Accurel MP 1000 e a Lewatit VP OC 1600 são suportes hidrofóbicos. O suporte de imobilização Lewatit VP OC 1600 é um polímero de ésteres metacrílicos, de forma esférica e com uma aparência branca opaca. Possui uma área específica de 130 m²/g com uma dimensão média de poro de 15 nm e um teor de água de 55-65% (Severino, 2014). Foi oferecido por Lenntech, Lanxess Energizing Chemistry, Holanda. A Accurel MP 1000 é uma resina polimérica à base de polipropileno (Villeneuve *et al.*, 2000) porosa que permite a adsorção de aditivos a 65% (ACCUREL®, 2018), com uma área específica de 70 m²/g e um diâmetro médio de poro de 2000 nm (Bule, 2014).

3.1.2. Substratos

Fonte de triacilgliceróis

Utilizou-se óleo de bagaço de azeitona bruto fornecido pela empresa Ucasul-União de Cooperativas Agrícolas Uclrl, como fonte de ácido oleico para a obtenção de lípidos estruturados MLM. Este óleo foi posteriormente submetido a adsorção e também utilizado como substrato.

De acordo com o Regulamento nº 1989/2003, de 6 de novembro, o óleo de bagaço de azeitona bruto tem como componentes maioritários o ácido gordo monoinsaturado oleico (C18:1), o ácido palmítico e o ácido polinsaturado linoleico.

Fonte de ácidos gordos de cadeia média

Utilizaram-se o ácido caprílico (C₈H₁₆O₂; MM:144,21 g/mol) e o ácido cáprico (C₁₀H₂₀O₂; MM:172,26 g/mol), com grau de pureza superior ou igual a 98% e também, o octanoato de etilo (C₁₀H₂₀O₂; MM 172,26 g/mol), o decanoato de etilo (C₁₂H₂₄O₂; MM 200.32 g/mol), o octanoato de metilo (C₉H₁₈O₂; 158,24 g/mol) e o decanoato de metilo (C₁₁H₂₂O₂; 186,29 g/mol), com grau de pureza superior ou igual a 99%, da TCI Europe N.V., Bélgica, de modo a fornecer os ácidos gordos livres de cadeia média.

3.1.3. Reagentes

Os principais reagentes utilizados para a execução do presente trabalho foram os seguintes:

- ✓ 2,2,4-Trimetilpentano 99,8%, anidro, de grau analítico, da Fischer Scientific, Reino Unido;
- ✓ Acetona, de grau analítico, da Fischer Scientific Reino Unido;
- ✓ Ácido orto-fosfórico 85% previamente preparada;
- ✓ Albumina bovina (>96%), da Sigma-Aldrich;
- ✓ Álcool Etílico 98,8% de grau analítico, Fischer Scientific, Reino Unido;
- ✓ Azul Coomassie brilhante G 250, reagente de laboratório, da BIOCHEM Chemopharma;
- ✓ Diclorometano, de grau analítico;
- ✓ Éter dietílico de grau analítico;
- ✓ Fosfato dissódico hidratado (Na₂HPO₄.12H₂O), da Panreac Química S.A.;
- ✓ Fosfato monopotássico (KH₂PO₄), da Panreac Química S.A.;
- ✓ Glutaraldeído 25%, da Merck;

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- ✓ Hidróxido de sódio, da Fischer Scientific Reino Unido;
- ✓ Monodecanoína (99%), da Larodan AB;
- ✓ n-Heptano, de grau analítico, da Fischer Scientific;
- ✓ n-Hexano 95%, de grau analítico, da Carlo Erba Reagents;
- ✓ N-metil-Ntrimetil-silil-trifluoracetamida – MSTFA (>90%), da TCI Europe N.V., Bélgica;
- ✓ Piridina, de grau analítico, da Fischer Scientific;
- ✓ Solução de fenolftaleína;
- ✓ Sulfato de sódio anidro, da Panreac Química S.L.U;
- ✓ Tetracloreto de carbono, da Fischer Scientific, Reino Unido;
- ✓ Tetrahidrofurano, da Merck.

3.2. Métodos

3.2.1. Remoção dos pigmentos do óleo de bagaço de azeitona bruto por adsorção

Foram disponibilizadas pela empresa Ucasul, quatro amostras de 400 mL de um lote de óleo de bagaço de azeitona (OBA) bruto (óleo B).

Após a caracterização das quatro amostras, procedeu-se à mistura e homogeneização da totalidade do óleo num gobelé de 2000 mL com o agitador Eurostar digital (IKA Labortechnik), durante 5 min a 700 rpm.

Com o objetivo de avaliar o impacto do teor de pigmentos nas reações de acidólise realizaram-se extrações sucessivas dos pigmentos do óleo B, por adsorção com terras ativadas.

A adsorção é comparável à descoloração utilizada no processo de refinação de óleos vegetais, com o objetivo de remoção de pigmentos. Consiste na retenção de uma espécie química (adsorvato) de uma fase fluída pela superfície de um sólido, o adsorvente. Durante o processo de adsorção, estabelece-se um equilíbrio de concentração para o adsorvato. Quando o equilíbrio termodinâmico da concentração de adsorvato estiver estabelecido entre a solução e o adsorvente, não ocorre qualquer adsorção adicional (Doran, 1996). As terras ativadas são muito mais eficientes como adsorvente do que as terras naturais, em particular em óleos escuros. A percentagem de terras usadas varia entre 0,15% e os 4% (Pêcego, 2014).

Pode distinguir-se dentro do processo três tratamentos, com diferentes condições de temperatura, tempo de contacto e separação (Quadro 2) (Zschau, 2000; Valenzuela Dias & Souza Santos, 2001).

Quadro 2-Condições operacionais método de separação utilizados nos tratamentos de extração dos pigmentos do óleo de bagaço de azeitona

Condições	Tratamento 1 (1º T)	Tratamento 2 (2º T)	Tratamento 3 (3º T)
Temperatura (°C)	65	90	110
Tempo de contacto (min)	60	40	30
Método de separação	Filtração a baixa pressão	Filtração a baixa pressão	Centrifugação

Durante os tratamentos, o óleo foi aquecido em placa de aquecimento num gobelé, com controlo de temperatura por termómetro. O contato entre o óleo e as terras ativadas (4% (m/v)) foi promovido por ação do agitador mecânico Eurostar digital (IKA Labortechnik).

Após as duas primeiras reações de adsorção, o óleo foi filtrado recorrendo a bomba de vácuo de diafragma KNF Laboport. Retirou-se uma amostra do óleo obtido após o primeiro (óleo após 1º T) e segundo tratamento (óleo após 2º T). O resultado da última reação de adsorção foi submetido a

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

centrifugação durante 15 min a velocidade 7 na centrífuga MLW T52.1. O óleo obtido no final do terceiro tratamento é designado como óleo descorado (óleo D).

3.2.2. Caracterização do óleo de bagaço de azeitona

As quatro amostras de óleo de bagaço de azeitona bruto foram caracterizadas com base na acidez do óleo, absorvância no ultravioleta (UV) e cor e características cromáticas, em triplicado.

A mistura da totalidade do óleo de bagaço de azeitona bruto e o óleo descorado, obtido após o conjunto de tratamentos de extração de pigmentos, foram caracterizados quanto ao perfil de ácidos gordos, a acidez do óleo, absorvância no UV, cor e características cromáticas e teor em clorofilas totais, em triplicado.

As amostras de óleo obtidas após o primeiro e segundo tratamento de extração de pigmentos foram avaliadas quanto à sua acidez, absorvância no UV e cor e características cromáticas, em triplicado.

3.2.2.1. Determinação do perfil de ácidos gordos

A análise da composição em ácidos gordos do OBA B e D foi realizada pelo Laboratório de Estudos Técnicos, no Instituto Superior de Agronomia.

A determinação decorreu de acordo com o anexo X do Regulamento (CEE) 2568/1991, de 11 de julho. Procedeu-se em duas fases: a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (anexo XB) e a aplicação da cromatografia gasosa para determinar qualitativamente e quantitativamente a composição da mistura de ésteres metílicos dos ácidos gordos (anexo XA).

O método de metilação adequado para a amostra de óleo de bagaço de azeitona é o método de metilação a quente por meio de uma solução metanólica de metóxido de sódio, seguida de uma esterificação em meio ácido.

3.2.2.2. Determinação da acidez

A determinação da acidez do óleo foi efetuada de acordo com o procedimento indicado pela Norma Portuguesa NP-903 (1987).

Este método permite avaliar o grau de alteração de um óleo através da hidrólise (Perrin, 1996; Bermejo *et al.*, 2014). Durante a reação de hidrólise, as moléculas de água, que são um fraco nucleófilo, atacam as ligações éster dos triacilgliceróis, produzindo glicerol, acilgliceróis mais simples e ácidos gordos livres (Santos, 2016).

Uma toma de amostra de 1 g foi dissolvida em 50 mL de mistura dissolvente de éter dietílico:etanol (1:1 v/v). A determinação da acidez baseia-se na neutralização dos ácidos gordos livres da amostra com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, por titulação, na presença do indicador fenolftaleína.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

O ponto de equivalência é visualizado pela alteração de cor para rosa claro, quando os ácidos gordos livres presentes na amostra reagem na totalidade com o titulante (McNaught & Wilkinson, 1997)

A acidez (A) foi expressa em percentagem mássica de ácido oleico e calculada da seguinte forma:

$$A = V \times \frac{c}{1000} \times M \times \frac{100}{m} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

V: volume de NaOH consumido, expresso em mL

c: concentração da solução de NaOH utilizada como titulante, expressa em mol/L

M: massa molar, em grama por mole, do ácido oleico (282 g/mol)

m: massa de amostra analisada, expressa em g.

Sabendo que a solução de NaOH utilizada tem a concentração exata de 0,1 N, a equação 1 pode ser simplificada:

$$A = \frac{V \times 2,82}{m} \quad (\text{Equação 2})$$

3.2.2.3. Determinação dos produtos de oxidação

Os produtos de oxidação foram determinados por espectrofotometria ultravioleta (UV) segundo a Norma Portuguesa NP-970 (1986).

A oxidação dos ácidos gordos insaturados resulta na formação de produtos primários de oxidação (hidroperóxidos) e deslocação das duplas ligações com a conseqüente formação de dienos conjugados, que absorvem radiação para um comprimento de onda de 232 nm. Os peróxidos, produtos primários de oxidação, são intermediários instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas ou em presença de metais de transição. Por decomposição, originam compostos de natureza muito diversa (aldeídos, cetonas), os quais são genericamente designados produtos secundários. Estes absorvem radiação para um comprimento de onda (c.d.o) entre 268 e 270 nm (Kiritsakis, 1992; NP-970, 1986).

Para a determinação espectrofotométrica preparou-se uma solução de 0,1 g de amostra diluída em 10 mL de iso-octano, num balão volumétrico de 10 mL e homogeneizou-se.

A determinação dos produtos de oxidação foi efetuada em células de quartzo utilizando o espectrofotómetro UNICAM UV/Vis, com iso-octano como referência, nos valores de comprimento de onda 232, 268, 270 e 272 nm.

A lei de *Lambert Beer* indica que a absorvância é diretamente proporcional à concentração, sem limitação. No entanto, há uma maior precisão e linearidade em soluções de absorvância entre 0,2 e 0,8. Como tal, foi necessário preparar uma diluição de 1:10 da solução inicial para outro balão volumétrico de 10 mL, recorrendo a uma micropipeta para transferir 1 mL da solução anterior.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Para obter os valores de extinção específica K_{232} e K_{270} é necessário ter em conta:

E: o valor de extinção (corresponde ao valor de absorvância) lido no comprimento de onda 232 nm e 270 nm, respetivamente;

c': a concentração da solução, expressa por g em 100 mL;

s: a espessura da célula de quartzo ($s=1$ cm).

Devido à diluição da solução inicial é necessário, também, ter em conta a massa de amostra analisada e o volume de ambas as soluções para o cálculo de **c'**.

Assim sendo, utilizou-se a seguinte equação:

$$K' = \frac{E}{c' \times s} \quad (\text{Equação 3})$$

3.2.2.4. Determinação da cor e características cromáticas

A determinação de pigmentos foi realizada adaptando o procedimento descrito pela Norma Portuguesa NP-937:1987 relativa à determinação da cor dos óleos e suas características cromáticas em gorduras e óleos comestíveis.

Segundo a *Commission Internationale de L'éclairage* (CIE), a cor é um aspeto da perceção visual de um objeto distinto, que um observador distingue mediante o tamanho, forma, textura, posição e brilho, dependendo os mesmos da posição espectral da luz incidente e também da geometria da ótica de visualização (Gariso, 2011).

A CIE introduziu o sistema RGB (*red-green-blue*) e com ele o sistema xyz para a representação tridimensional da cor (onde x-vermelho, y-verde; z-azul, são os “valores triestímulos” ou coordenadas de cromaticidade). Definiram-se padrões primários – X, Y, Z – para evitar valores negativos e substituir as cores RGB, para representar o espetro de cor. O padrão Y foi escolhido de forma a ser semelhante à curva de sensibilidade do olho humano (luminância ou transparência). Sendo assim, retirado o brilho ou a luminosidade de definição de cor em CIE XYZ e utilizando as coordenadas de cromaticidade x e y, obtém-se o Diagrama de Cromaticidade CIE (Lima & Laranjeira, 2010 citado por Ventura, 2014)

A cor de um óleo é a característica dada pela sensação visual humana normal, perante a luz transmitida por uma camada de óleo (transparência), em que incide a luz difusa do dia com céu encoberto (corresponde ao iluminante C). Pode distinguir-se entre a cor aparente e a cor verdadeira, sendo que a cor aparente resulta da absorção da luz pelas partículas em fase homogénea mas, também das partículas em suspensão verdadeira e coloidal e a cor verdadeira é obtida após eliminar a turvação por centrifugação (Ventura, 2014).

As características cromáticas são atributos da cor que incluem:

Coordenadas cromáticas - abcissa x e ordenadas y do diagrama de cromaticidade da CIE correspondente à luz transmitida pelo óleo (NP-937, 1987).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Transparência – Percentagem (Y %) da luz incidente, transmitida após a passagem pela camada do óleo. Pela sua definição, Y correspondente também à luz amarela, ou coordenada cromática amarela (NP-937, 1987).

Comprimento de onda dominante – Radiação espectral (λ), expressa em nanómetros (nm), que predomina na luz transmitida pelo óleo. É determinado através do diagrama de cromaticidade, sendo a radiação espectral correspondente ao ponto da curva de contorno desse diagrama, definido pelo lugar geométrico de todas as radiações monocromáticas (curva das cores saturadas), onde cruza a recta que passa pelos pontos definidos pelas coordenadas cromáticas da cor do óleo (x,y) e do iluminante C (NP-937, 1987).

Pureza – Percentagem da luz com o comprimento de onda dominante (σ %), no feixe de luz transmitido pelo óleo. Permite medir o maior ou menor grau de monocromaticidade (100%) ou heterocromaticidade (0%) da luz transmitida pelo óleo (NP-937, 1987).

Tangente de α – declive da reta que une as coordenadas cromáticas (y, x) do diagrama de cromaticidade da CIE correspondente à luz transmitida pelo óleo em estudo e o ponto correspondente à luz branca padrão, o iluminante C. O ângulo α é formado por essa reta e o eixo das abcissas do referido diagrama (NP-937, 1987)

O procedimento da norma consiste em uma determinação espectrofotométrica na qual se utilizou o espectrofotómetro UNICAM UV/Vis a uma temperatura de 20°C, das transmitâncias (T (%)) do óleo, utilizando tetracloreto de carbono como referência e referidas à espessura de 1 cm, nos comprimentos de onda de 445, 495, 560 e 625 nm.

A preparação das amostras de óleo exigiu a eliminação de água e filtração do óleo, antes da sua leitura. A eliminação de água foi realizada adicionando ¼ de colher de sulfato de sódio anidro ao óleo, num copo de 100 mL.

Após cerca de 5 minutos, procedeu-se a uma centrifugação a 8000 rpm durante 20 min (centrífuga 1,2 kg/dm da HERMLE Labortechnik). O conteúdo do tubo de centrífuga foi filtrado com seringa e filtro 0,45 μ m para um tubo de 5 mL.

Preparou-se uma solução de 1% de óleo filtrado em tetracloreto de carbono, num balão volumétrico.

O tratamento de resultados foi adaptado da NP-937:1987 calculando-se as coordenadas cromáticas, a pureza e o comprimento de onda dominante.

Sendo T_{445} , T_{495} , T_{560} , T_{595} e T_{625} as transmitâncias do óleo, em termos de percentagem, na espessura de 1 cm, respetivamente nos comprimentos de onda de 445, 495, 560, 595 e 625 nm, os estímulos X, Y, Z são obtidos pelas expressões:

$$X = 19 T_{445} + 38 T_{560} + 13 T_{595} + 28 T_{625} \quad (\text{Equação 4})$$

$$Y = 21 T_{495} + 62 T_{560} + 17 T_{625} \quad (\text{Equação 5})$$

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

$$Z = 94 T_{445} + 24 T_{495} \quad (\text{Equação 6})$$

As coordenadas cromáticas foram determinadas pelas expressões:

$$x = \frac{x}{X+Y+Z} \quad (\text{Equação 7})$$

$$y = \frac{y}{X+Y+Z} \quad (\text{Equação 8})$$

Com o objetivo de comparar a evolução dos pigmentos presentes no óleo bruto e após os tratamentos sucessivos de extração de pigmentos, procedeu-se a uma conversão dos valores de T (%) obtidos para os determinados comprimentos de onda em valores de absorvância (A), de acordo com a seguinte equação:

$$A = 2 - \log_{10} T(\%) \quad (\text{Equação 9})$$

3.2.2.5. Determinação de clorofilas totais

O conteúdo em clorofila foi determinado de acordo com a metodologia de determinação de pigmentos clorofilinos totais em óleos vegetais brutos, expressos em mg de feofitina a/kg de óleo analisado (Pokorný *et al.*, 1995). Este método é adequado para teores de clorofila total superiores a 1 mg/kg.

A amostra, a temperatura ambiente, foi submetida a filtração com bomba de vácuo (MZ 2C Vacuumbrand GMBH+CO KG), um funil de Buckner, um kitasato e papel de filtro Whatman nº 1 125 mm Ø, imediatamente antes da leitura espectralométrica.

Realizou-se a leitura de absorvância no espectrofotómetro UNICAM UV/Vis nos comprimentos de onda 630, 670 e 710 nm, numa célula de quartzo de 5 mm, utilizando ar como referência.

O conteúdo em clorofilas totais, expresso em mg de feofitina a/kg de óleo é igual a:

$$C = 345,3 \times (A_{670} - 0,5 \times A_{630} - 0,5 \times A_{710}) : L \quad (\text{Equação 10})$$

Em que,

C: conteúdo em clorofilas totais, expresso em mg de feofitina a/kg de óleo;

A: absorvância no respetivo comprimento de onda;

L: espessura da célula de quartzo (mm).

3.2.3. Imobilização de enzimas líquidas em suportes de resina sintética Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000

A imobilização das enzimas líquidas realiza-se por adsorção física. As regiões hidrofóbicas presentes na superfície em torno do centro ativo da lipase ligam-se facilmente aos grupos hidrofóbicos da matriz de suportes hidrofóbicos, com consequente estabilização da forma aberta da lipase (Alves *et al.*, 2016).

O volume de lipase líquida utilizada por unidade de massa de suporte hidrofóbico durante a imobilização diferiu e teve por base os valores iniciais de atividade hidrolítica determinados. Imobilizou-se um volume de lipase líquida de 0,1 mL de Novozym 388, 0,18 mL de Novozym 735 e 1,13 mL de Lipozyme CALBL, por grama de suporte hidrofóbico. Os volumes de Novozym 735 e Lipozyme CALBL resultam da razão entre a sua atividade hidrolítica e a de Novozym 388, a lipase com maior atividade hidrolítica.

A lipase foi dissolvida em 20 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7) por grama de suporte. Desta solução designada como solução-mãe, retirou-se 1 mL com auxílio de micropipeta para posterior determinação de teor de proteína por método de Bradford.

A solução enzimática mãe permaneceu em contacto com o suporte durante 18 h, sob agitação moderada em placa magnética Variomag Compact. Após as 18 h, procedeu-se a uma filtração a baixa pressão e foram recolhidos 5 mL do filtrado para determinação do teor de proteína pelo método de Bradford. Ao imobilizado adicionou-se 25 mL de solução de glutaraldeído a 2,5% (por grama de suporte), que permaneceu em agitação magnética durante 2 h ao fim das quais se realizou nova filtração a baixa pressão, recorrendo a uma bomba de vácuo MZ 2C Vacuumbrand GMBH+CO KG.

Após filtração, o biocatalisador foi lavado com 50 mL de solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M; pH 7) em duas lavagens sucessivas. Manteve-se o imobilizado em filtração a baixa pressão durante cerca 5 minutos.

Posteriormente, este foi retirado para placa de petri e colocado 24 h em exsiccador. O biocatalisador resultante foi armazenado em um frasco de plástico a 4 °C.

O processo descrito foi utilizado para a imobilização com os dois suportes sintéticos. Relativamente ao suporte de Accurel MP 1000, inicialmente humedeceu-se o suporte com 7 mL de etanol/g de suporte, durante 15 min. O etanol foi retirado cuidadosamente com micropipeta. A adição de etanol permite deslocar o ar presente nas partículas e permitir a entrada das soluções enzimáticas (Menoncin *et al.*, 2009).

No caso de Lewatit VP OC 1600, o suporte permaneceu três dias no exsiccador anteriormente ao processo de imobilização, para remover a água presente.

A adição de glutaraldeído promove as ligações inter cruzadas (*cross-linking*) estáveis entre a lipase e a matriz do suporte e também intermoleculares entre as moléculas de enzima, impedindo a sua lixiviação para o meio reacional (Costa *et al.*, 2013).

3.2.3.1. Preparação de biocatalisadores com diferente atividade de água

Após o processo de imobilização das lipases nos suportes hidrofóbicos realizou-se a determinação da atividade da água. Mediu-se também a atividade da água da lipase Novozym 435. A atividade de água foi determinada através da leitura efetuada pelo medidor Rotronic HP23-AW-A, a uma temperatura de 20 °C controlada com banho de água HAAKE D8 FISIONS.

Procedeu-se à avaliação da alteração da a_w dos biocatalisadores imobilizados em laboratório quando colocados no exsiccador pelo período de 24 h e 28 h, em triplicado.

Com base nos resultados e por comparação à a_w de Novozym 435 optou-se pelo seguinte: os biocatalisadores imobilizados em Accurel MP 1000 permaneceram 24 h no exsiccador, antes de serem utilizados nos ensaios de acidólise a a_w próxima de 0,9; os biocatalisadores imobilizados em Lewatit VP OC 1600 MP foram utilizados diretamente nos ensaios de acidólise a a_w próxima de 0,9; os biocatalisadores Lewatit VP OC 1600-Novozym 735, -Novozym 388 e -Lipozyme CALBL permaneceram 72 h numa atmosfera rica em cloreto de sódio (NaCl) a temperatura ambiente, antes de serem utilizados nos ensaios de acidólise a a_w de 0,75.

3.2.4. Avaliação da atividade hidrolítica de enzimas comerciais

A avaliação da atividade hidrolítica foi realizada para as lipases comerciais imobilizadas Lipozyme RM IM e Novozym 435, para as lipases comerciais em formulação líquida Lipozyme CALBL, a Novozym 735 e Novozym 388 e também para o resultado da imobilização das três lipases anteriormente mencionadas nos suportes de imobilização de Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000. A avaliação realizou-se de acordo com o método de Soares *et al.* (1999) com algumas modificações.

Dissolveram-se 3,5 g de goma arábica em 50 mL de água destilada, com auxílio de um agitador magnético durante um período de 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se à solução 50 g de azeite virgem extra, 80 mL de solução-tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7), e homogeneizou-se a emulsão utilizando o ultraturrax T25 Basic da IKA Labor Technik durante cerca de 1 min.

Para cada avaliação, utilizou-se uma toma de 9 mL da solução anterior que foi colocada em reatores de vidro de parede dupla, mantidos a 30 °C por ação de um banho termostaticado JULABO GmbH. O conteúdo permaneceu em agitação magnética durante 10 minutos até a adição de 0,3 g, no caso das enzimas imobilizadas, e 0,1 mL, no caso das formulações líquidas. Promoveu-se a reação de hidrólise durante um período de 5 minutos.

Para desencadear o fim da reação de hidrólise adicionaram-se 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1, v/v).

A quantidade de ácidos gordos livres presentes na solução foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 M, na presença de fenolftaleína como indicador. Como solução branco, preparou-se uma solução de 9 mL de emulsão e 20 mL de solução de acetona:etanol.

Uma unidade de atividade hidrolítica (U) define-se como a quantidade de enzima que produz 1 micromole (μmol) de ácido oleico por minuto. O rendimento de imobilização em termos de atividade hidrolítica calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\eta = \frac{\text{Atividade hidrolítica após imobilização}}{\text{Atividade hidrolítica solução enzimática inicial}} \times 100\% \quad (\text{Equação 11})$$

Para este cálculo é importante ter em conta o volume de solução enzimática inicial imobilizada por grama de suporte de imobilização.

3.2.5. Determinação do teor de proteína pelo método de Bradford

O teor de proteína presente nas soluções enzimáticas iniciais e no filtrado após a imobilização enzimática foi avaliado de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

O método permite a determinação da concentração de proteína na presença de reagente de Bradford pela ligação das proteínas ao reagente *Coomassie* Azul Brilhante G-250, formando um complexo que absorve a 595 nm.

A leitura espectrofotométrica permite relacionar a absorvância medida com a concentração de proteína numa solução. A partir de uma solução de soro de albumina bovina (*Bovine Serum Albumine*, BSA) de 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7, produziram-se seis soluções de concentração de BSA crescentes (0 a 1 mg/mL) em tubos de ensaio para construir uma curva de calibração. Adicionaram-se 5 mL de reagente de Bradford aos seis tubos de ensaio e agitou-se utilizando o vórtex. Ao fim de 15 minutos leu-se a absorvância das várias soluções no comprimento de onda de 595 nm, utilizando a solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7 como solução-branco.

A curva de calibração obtida representada na figura 1 permite explicar 99,45 % da variável “concentração da proteína” (Nagelkerke, 1991).

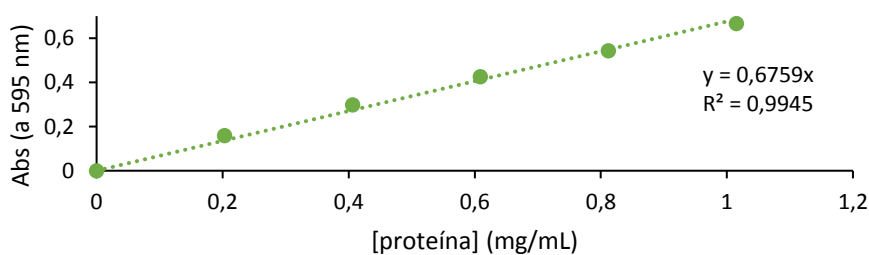


Figura 1-Curva de calibração que relaciona a concentração de proteína (mg/mL) com a absorvância a 595 nm.

Para a determinação da absorvância por espectrofotometria das soluções enzimáticas iniciais foi necessário preparar uma solução composta por 0,45 mL de solução enzimática e 5 mL de reagente de Bradford, exceto no caso de imobilização de Lipozyme CALBL em que foi possível adicionar apenas 0,3 mL de solução enzimática.

Para determinar a proteína presente no primeiro filtrado, obtido antes da adição de glutaraldeído, foi necessário preparar uma solução de 1 mL de solução de filtrado e 5 mL de reagente de Bradford. As soluções utilizadas como branco utilizaram um volume igual de solução tampão (em relação à solução enzimática) e 5 mL de reagente Bradford. Tal como para as soluções preparadas

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

para a curva de calibração, após a adição do Bradford, promoveu-se a agitação da solução e esperou-se 15 minutos até à leitura a 595 nm.

O rendimento de imobilização (η) em termos de proteína foi calculado pela Equação 12. O teor de proteína obtido para a solução enzimática antes da adição do suporte de imobilização está representado como P_i e o teor de proteína obtido na solução sobrenadante após imobilização está representado por P_f .

$$\eta = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100\% \quad (\text{Equação 12})$$

3.2.6. Ensaio de acidólise e interesterificação enzimática para produção de lípidos estruturados MLM

Os ensaios de acidólise foram conduzidos em sistema descontínuo, em reatores de vidro de parede dupla, com capacidade de 25 cm³, em meio livre de solvente. A temperatura de reação foi mantida por circulação de água pela parede dupla dos reatores, em circuito fechado, por água aquecida por um banho termostaticado.

Foram realizados ensaios utilizando como óleo fornecedor de triacilgliceróis o OBA bruto (B) e OBA descorado (D), dos quais se pesaram 6 g.

As fontes de AG utilizadas nos diferentes ensaios foram as seguintes: ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), octanoato de etilo (FAEE-C8:0), decanoato de etilo (FAEE-C10:0), octanoato de metilo (FAME-C8:0) e decanoato de metilo (FAME-C10:0).

Os ensaios de acidólise mantiveram como parâmetros comuns a razão molar TAG:AGL ou TAG:éster de 1:2 e uma quantidade de massa de biocatalisador de 5% (m/m) em relação ao óleo fonte de TAG.

Utilizaram-se lipases comerciais imobilizadas e lipases comerciais líquidas imobilizadas em Accurel MP 1000 e Lewatit VP OC 1600.

O quadro 3 sumariza os vários ensaios decorridos ao longo do estudo efetuado, aplicados tanto para o óleo B como o óleo D. No caso dos ensaios a a_w de 0,75 apenas se utilizou OBA B.

Quadro 3- Ensaios de produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico MLM

Biocatalisador	M	Temperatura (°C)	a _w	
Lipozyme RM IM; Novozym 435	C8:0	50	-	
	C10:0			
Novozym 435	C8:0	60		
	C10:0			
	FAEE-C8:0	50		
	FAEE-C10:0			
	FAME-C8:0			
	FAME-C10:0			
Accurel-N735; Accurel-N388; Accurel-CALBL; Lewatit-N735; Lewatit-N388; Lewatit-CALBL	C8:0	50		0,9
	C10:0			
Lewatit-N735; Lewatit-N388	C8:0	50	0,75	
Lewatit-N735; Lewatit-CALBL	C10:0			

Legenda: B- Óleo bruto; D- Óleo após descoloração; Accurel-N735-lipase Novozym 735 imobilizada em suporte Accurel MP 1000; Lewatit-N388-lipase Novozym 388 imobilizada em Lewatit VP OC 1600; CALB-lipase Lipozyme CALBL. As restantes denominações seguem o mesmo raciocínio.

Os reatores de vidro foram mantidos vedados durante a reação de acidólise por tampas de borracha cobertas de alumínio para evitar reações de oxidação promovidas pelo contacto com oxigénio.

Utilizou-se agitação magnética para evitar os gradientes de temperatura e concentração de lipase, substrato e produto dentro do reator.

Foram recolhidas amostras de 1 mL aos tempos 0 h (antes de introduzir o biocatalisador), após 24 h de reação e ao fim de 48 h de reação, recorrendo a uma micropipeta. As amostras recolhidas foram guardadas em tubos *ependorf* e armazenadas a -20 °C até serem analisadas por cromatografia gasosa. Depois de concluída a reação a separação do biocatalisador do meio reacional foi conseguida por filtração com funil e papel de filtro Whatman nº 1. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.2.7. Análise dos produtos de reação de acidólise e interesterificação enzimática

3.2.7.1. Derivatização e cromatografia gasosa

A norma europeia EN 14105, de abril de 2011, para a determinação de glicerol, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis em biodiesel, descreve o método adotado para a análise das amostras obtidas nos vários ensaios de acidólise e interesterificação realizados. Especificamente, são analisadas as amostras correspondentes ao tempo zero, ou seja, antes de iniciar a reação, após 24 horas de reação e após 48 horas de reação, em duplicado.

Inicialmente, dissolveram-se 0,05 g de amostra em n-hexano, num balão volumétrico de 10 mL. Após agitação, retirou-se uma toma de 0,5 mL da solução para um balão de vidro periforme de 10 mL, que foi colocado num evaporador rotativo de vácuo Rotavapor R-200 (Büchi) para evaporação do solvente, a 30 °C e a baixas pressões (<150 mbar).

Obteve-se um resíduo seco ao qual adicionaram-se 400 µL de padrão interno para monoacilgliceróis monodecanoína (PI Mono C19), 200 µL de piridina e 200 µL de N-metil-N-trimetil-silil-trifluoracetamida (MSTFA), por esta mesma ordem. Este último foi adicionado com seringa Hamilton máx. 100 µL. Após agitação no agitador vortex, as amostras permaneceram a temperatura ambiente, durante 15 minutos.

A solução de monodecanoína foi preparada diluindo $0,05 \pm 0,001$ g de monodecanoína em 20 mL de tetrahydrofurano. Entre utilizações, esta solução foi armazenada a 4 °C, mantendo-se estável durante 3 meses. A piridina e o MSTFA foram igualmente armazenados a 4 °C, protegidos da humidade.

Após o período de 15 minutos, adicionaram-se 4 mL de n-heptano à mistura que contém a amostra e agitou-se utilizando o agitador vortex.

Uma toma da mistura foi transferida para um *vial* e posteriormente analisaram-se 1 µL da mesma, no cromatógrafo gasoso capilar, Agilent Technologies 7820A, munido de injetor *on-column*. O cromatógrafo gasoso referido tem acoplado um injetor *Cool on Column* (COC), com seringa que introduz a amostra no estado líquido no cromatógrafo.

Utilizou-se como gás de transporte (fase móvel), hélio, fornecido a um caudal de 25 mL/min que transporta a amostra volatilizada através da coluna cromatográfica capilar Agilent J&W 123-5711 DB-5ht 15 m x 0,32 mm x 0,10 µm onde ocorre a separação dos componentes por diferenças de interação com a fase estacionária.

Para esta separação utilizou-se uma rampa de temperatura que inicia com a temperatura de 50°C, durante 1 min, aumentando até uma temperatura de 180 °C a uma taxa de 15 °C/min; a temperatura mantém-se a 180 °C durante 10 min; aumenta posteriormente para 230°C a uma taxa de 7 °C/min; mantém-se a temperatura de 230 °C durante 7 min; aumenta depois para 370°C a uma taxa de 10 °C/min, mantendo o patamar final a 370 °C durante 26 min. Assim o tempo total de corrida foi de 43 minutos.

Os compostos abandonam a coluna cromatográfica volatilizados no gás de transporte e são detetados pelo detetor. Utilizou-se um detetor por ionização de chama (*Flame Ionization Detector* FID) que utiliza uma chama alimentada por uma fonte de ar (300 mL/min) e hidrogénio (30 mL/min), que promove a pirólise dos compostos orgânicos produzindo iões e eletrões que geram uma diferença de potencial, ou seja, geram eletricidade através da chama. O sinal elétrico gerado é proporcional à quantidade de composto analisada e entra num sistema de dados que permite construir um cromatograma onde os compostos estão representados na forma de picos (Berger, 1996). Utiliza-se também uma fonte de gás inerte para o detetor, o azoto (N₂) a um caudal de 30 mL/min. As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se a 50 °C e 380 °C, respetivamente.

Antes da análise das amostras procedeu-se a uma corrida cromatográfica de solvente n-heptano para limpeza da coluna. Além disso, entre amostras o cromatógrafo realizou a limpeza da seringa com a mistura de solventes diclorometano:metanol (A) (1:1 v/v) e n-heptano (B).

3.2.7.2. Quantificação dos produtos de reação

A análise por cromatografia gasosa permitiu obter cromatogramas onde cada composto é representado por um pico, com uma área proporcional à quantidade de composto na mistura e num dado tempo de retenção (t_r , em min). Os picos presentes nos cromatogramas foram associados aos compostos de interesse ou espécies de compostos pelo seu tempo de retenção, utilizando padrões de referência como meio de comparação.

Os padrões de referência utilizados foram a trioleína ($t_r=31,68$ min), a monodecanoína ($t_r=18,32$ min), o ácido oleico ($t_r=12,04$ min), o ácido caprílico ($t_r=5,11$ min), o ácido cáprico ($t_r=6,68$ min) (Fig. 2), o octanoato de etilo ($t_r=4,41$ min), o decanoato de etilo ($t_r=6,05$ min), o octanoato de metilo ($t_r=3,81$ min) e o decanoato de metilo ($t_r=5,49$ min).

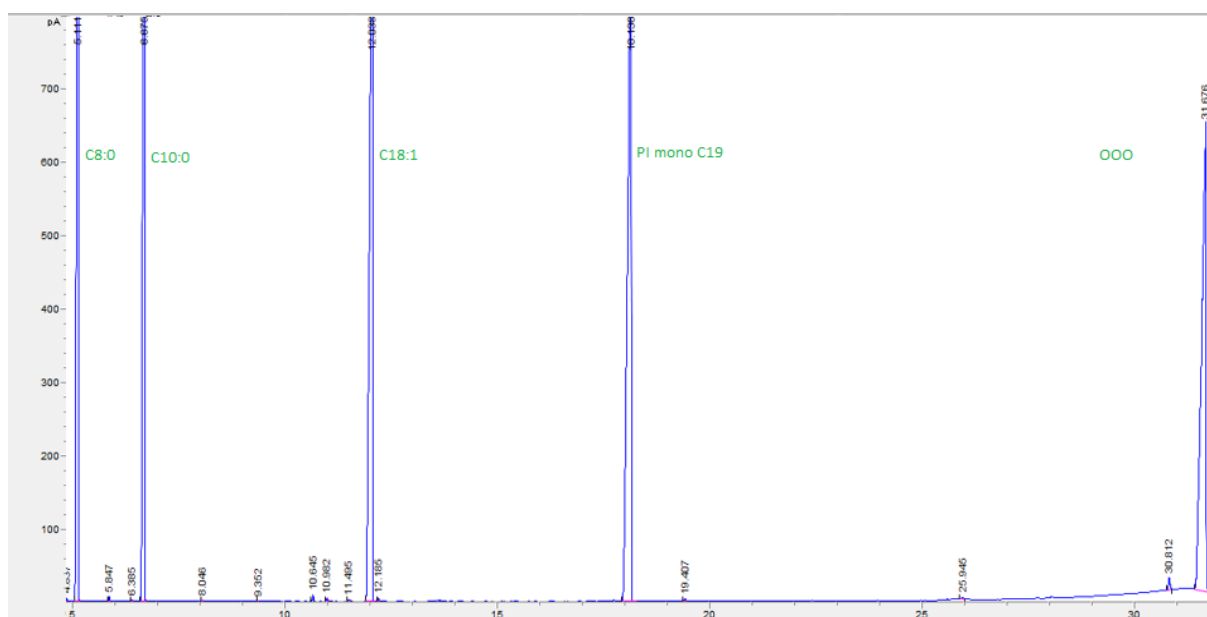


Figura 2-Cromatograma onde estão representados os picos correspondentes aos compostos ácido caprílico, ácido cáprico, ácido oleico, padrão interno monodecanoína e trioleína

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Segundo a norma europeia EN 14105, abril de 2011, os AGL apresentam tempos de retenção inferiores a 17 min, os MAG possuem um tempo de retenção entre 17,8 e 20 minutos e os DAG eluem no intervalo de 20 a 25 minutos.

Procedeu-se à quantificação das fontes de ácidos gordos de cadeia média utilizadas durante os ensaios e também da trioleína (OOO), TAG maioritário do OBA. Além, disso quantificou-se a presença de ácido oleico (C18:1) que resulta da hidrólise da trioleína. Os compostos MAG e DAG não foram quantificados dado não serem relevantes para o objetivo do trabalho. Os AGL presentes além de C8:0, C10:0 e C18:1 não foram quantificados devido à elevada acidez do produto inicial e contaminação das amostras. A quantificação do substrato limitante durante a produção de MLM realizou-se com base nas curvas de calibração de cada composto de interesse. O padrão de monodecanoína foi utilizado como padrão interno.

As curvas de calibração fazem relacionar a área de ácido caprílico e ácido cáprico, respetivamente, com a quantidade de massa analisada, tendo como comparação o padrão interno monodecanoína (PI mono C19) (Fig. 3 a e b)

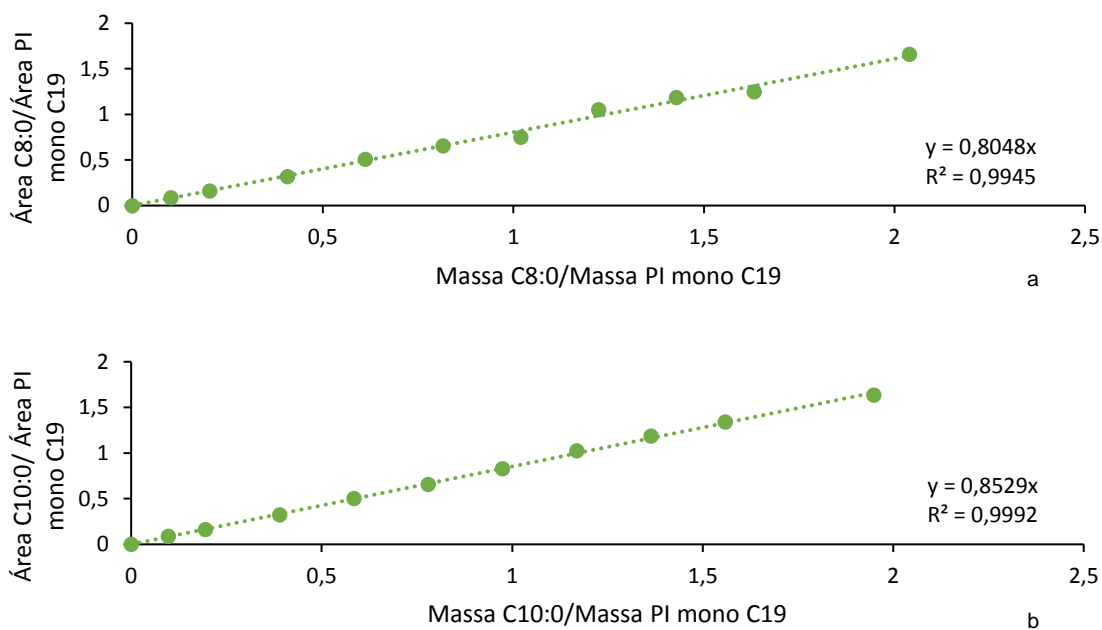


Figura 3-Curva de calibração de C8:0 (a), C10:0 (b).

Também houve a necessidade de elaborar curvas de calibração para os ésteres etílicos (Fig. 4 a e b) e metílicos (Fig. 5 a e b) destes ácidos gordos de cadeia média, pela sua utilização para a produção de MLM.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

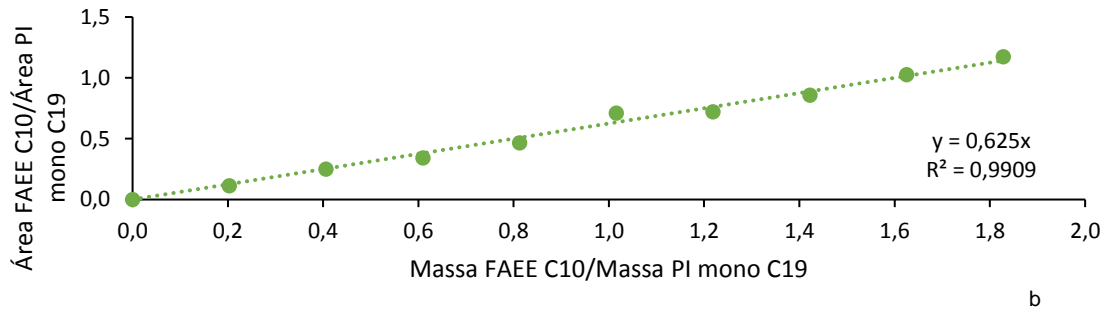
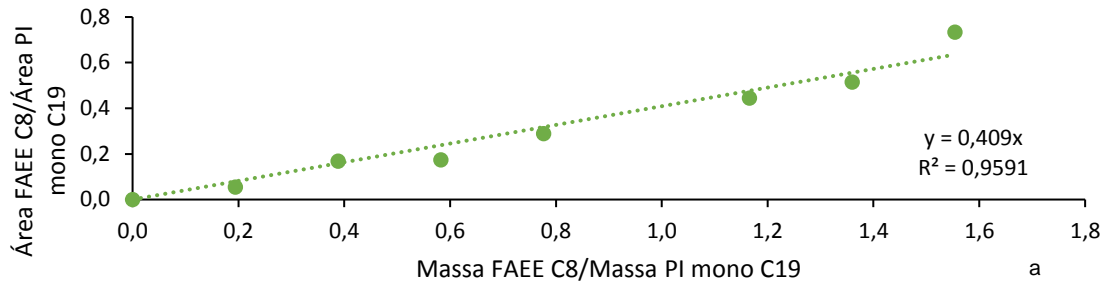


Figura 4-Curva de calibração dos ésteres etílicos de C8 (a) e C10 (b).

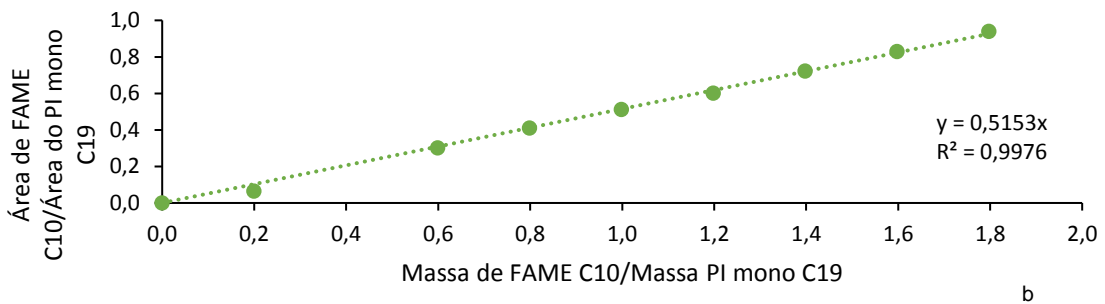
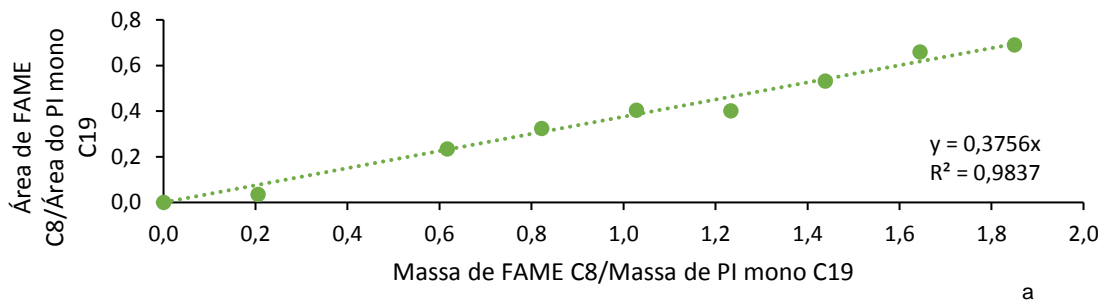


Figura 5-Curva de calibração dos ésteres metílicos de C8 (a) e C10 (b).

A quantificação de trioleína e novos TAG foi realizada através da curva de calibração do padrão de referência de trioleína (Fig. 6).

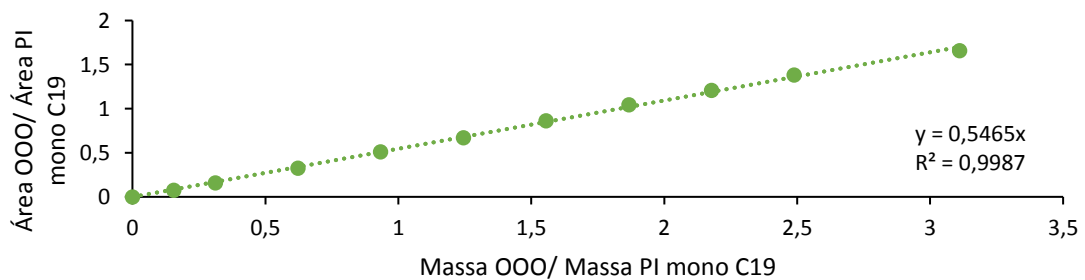


Figura 6-Curva de calibração de trioleína utilizada para a quantificação do TAG OOO e dos novos TAG.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

A curva de calibração elaborada para a quantificação do consumo ou aumento de ácido oleico está representada na figura 7.

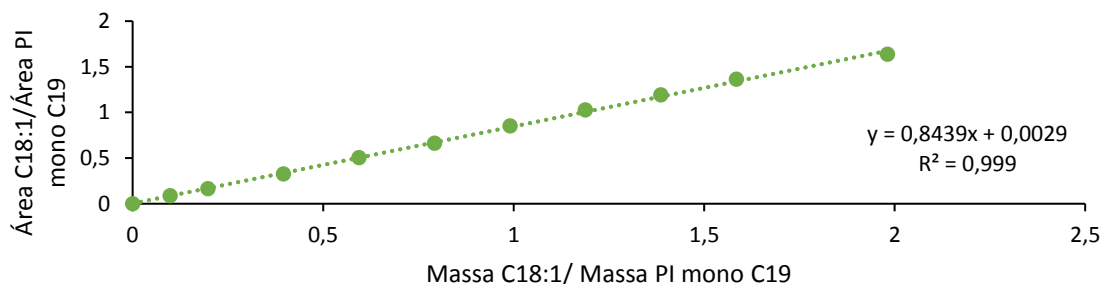


Figura 7-Curva de calibração do ácido oleico

A taxa de conversão (**X**) de um determinado composto foi calculada pela razão entre a quantidade de substrato consumido ao longo da reação e a quantidade de substrato inicial.

Assim, calcularam-se as taxas de conversão (% m/m ou área/área) para C8:0, C10:0, FAEE-C8:0, FAEE-C10:0, FAME-C8:0, FAME-C10:0 e trioleína, de acordo com a seguinte fórmula:

$$X = \frac{\text{Substrato inicial} - \text{Substrato final}}{\text{Substrato inicial}} \times 100\% \quad (\text{Equação 13})$$

Para obter a quantidade mássica do composto é necessário utilizar as equações das curvas de calibração, dividindo pela área de PI mono C19 e multiplicando pela quantidade analisada de padrão interno. O substrato inicial é o substrato presente na amostra do tempo zero, antes da reação de acidólise ou interesterificação e o substrato final é a quantidade de composto presente no tempo t, sendo estes, após 24 h ou, então, após 48 h de reação.

Em alguns casos foi necessário calcular a conversão em área nos casos em que se verificou alteração da área total do cromatograma ao longo das análises cromatográficas (Equação 14).

$$X = \frac{\left(\frac{\frac{A_i}{A_{PI}}}{\sum \frac{A_i}{A_{PI}}} - \frac{\frac{A_f}{A_{PI}}}{\sum \frac{A_f}{A_{PI}}} \right)}{\left(\frac{\frac{A_i}{A_{PI}}}{\sum \frac{A_i}{A_{PI}}} \right)} \times 100\% \quad (\text{Equação 14})$$

Onde,

Ai e Af: são a área inicial (tempo 0) e final (tempo t) de compostos;

API: é a área de padrão interno mono C19 no respetivo cromatograma;

A quantificação de TAG novos foi expressa em rendimento mássico (**η**; % m/m), calculado pela equação seguinte:

$$\eta = \frac{\text{Produto formado}}{\text{Substrato inicial}} \times 100\% \quad (\text{Equação 15})$$

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Para as reações de acidólise e interesterificação, utilizou-se como substrato inicial a massa de TAG no tempo zero, expressos em trioleína, e como produto os novos TAG no tempo t, calculados também pela equação da curva de calibração de trioleína (Equação 16).

$$\eta_{TAG} = \frac{\text{Novos TAG}}{\text{TAG}_{\text{iniciais}}} \times 100 \% \quad (\text{Equação 16})$$

Contabilizaram-se como novos TAG os picos na zona de TAG que não estavam já presentes na amostra inicial.

A figura 8 exemplifica os cromatogramas obtidos pela análise cromatográfica da amostra anteriormente à catálise enzimática e após 48 h de reação de acidólise. Neste caso ocorreu a acidólise de OBA B com C10:0, catalisada por Lipozyme RM IM.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

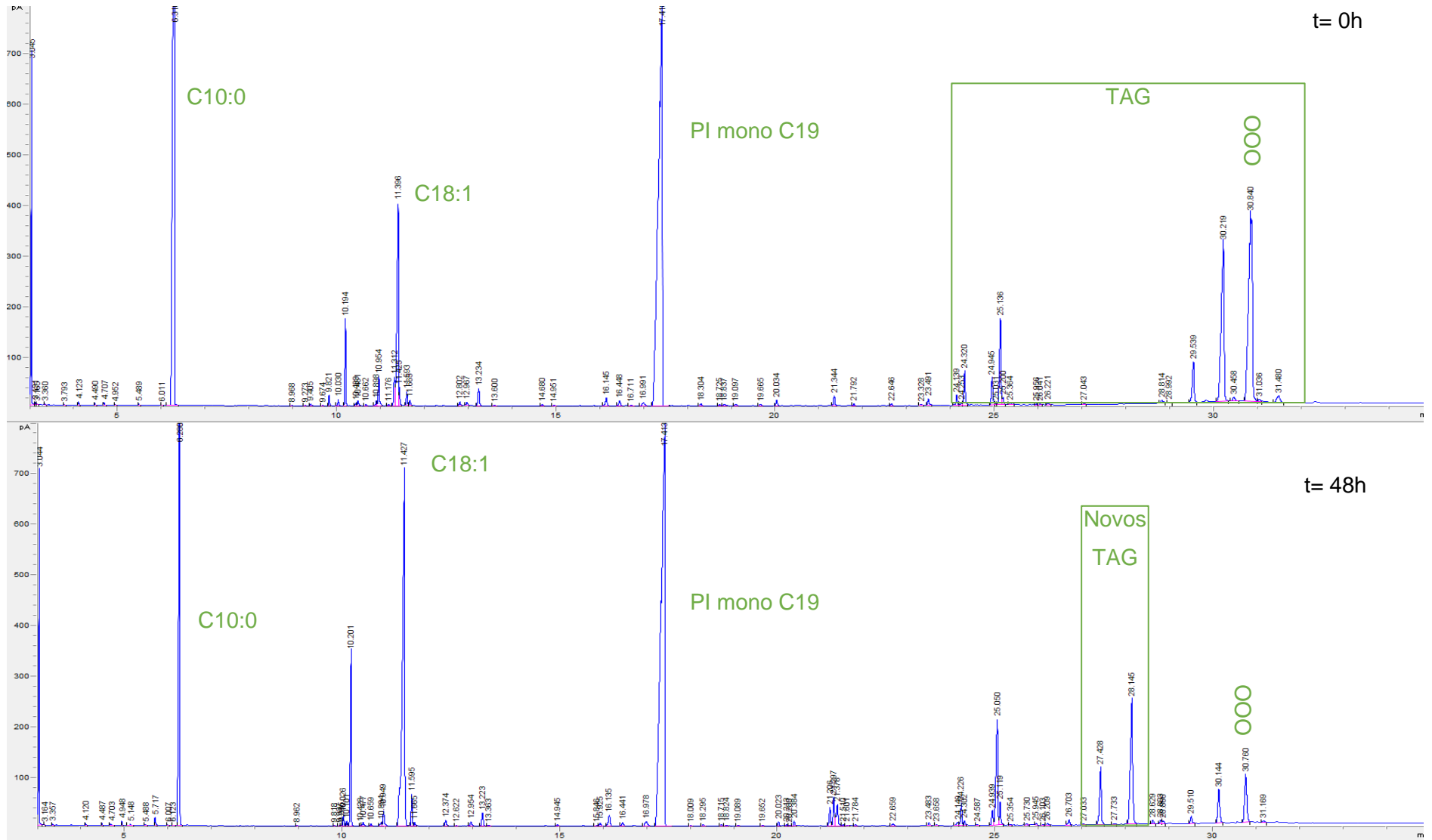


Figura 8- Cromatogramas no tempo zero e após 48 h de reação de acidólise com OBA B e C10:0, catalisada por Lipozyme RM

3.2.8. Análise Estatística

Avaliou-se a igualdade da média dos critérios de qualidade acidez do óleo e a presença dos produtos de oxidação entre as quatro amostras de óleo de bagaço de azeitona e a sua mistura. Avaliou-se também a igualdade entre a média obtida para os mesmos critérios após os tratamentos de extração de pigmentos.

Para tal, utilizaram-se testes t de Student de amostras emparelhadas bicaudal, com $n=3$ e 2 graus de liberdade e probabilidade de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$). Os testes foram realizados com recurso ao software *IBM SPSS Statistics Viewer*, cujo output, nomeadamente o *p-value*, permitiu rejeitar ou não a hipótese nula de igualdade entre as médias. Os testes foram realizados após confirmação da normalidade dos grupos em teste.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do óleo de bagaço de azeitona bruto

4.1.1. Composição em ácidos gordos

A composição em ácidos gordos obtida por cromatografia gasosa capilar após metilação encontra-se representada no quadro 4.

Quadro 4-Composição em ácidos gordos (%) do óleo de bagaço de azeitona, por cromatografia gasosa capilar

Ácido gordo	Teor (%) do composto no óleo bruto
C14:0	0,04
C16:0	13,44
C16:1	1,29
C17:0	0,12
C17:1	0,2
C18:0	2,32
C18:1	70,67
C18:2	10,10
C18:3	0,77
C20:0	0,44
C20:1	0,31
C22:0	0,19
C22:1	0,01
C24:0	0,1

Legenda: C14:0: ácido láurico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoleico, C17:0: ácido margárico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oleico, C18:2: ácido linoleico, C18:3: ácido linolénico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido 5-eicosenóico, C22:0: ácido behénico, C22:1: ácido cetoleico, C24:0: ácido lignocérico.

Tal como verificado no Regulamento n.º 2015/1830, os ácidos gordos maioritários correspondem ao ácido oleico (70,7%), palmítico (13,4%) e linoleico (10,1%) e os teores obtidos encontram-se entre os intervalos legislados.

O óleo de bagaço de azeitona bruto tem uma composição rica em ácidos gordos monoinsaturados considerados benéficos no contexto de estratégia de controlo de peso comparativamente aos ácidos gordos saturados dado que induzem a uma redução da trigliceridemia pós-prandial, favorecem o dispêndio energético e a função termogénica (Palou & Bonet, 2007). Além disso, apresentam potencial antiaterogénico e antitrombótico, aumentam a razão HDL/LDL e reduzem

a agregação de plaquetas (Holman, 1961). As suas propriedades tornam o ácido oleico interessante para o aproveitamento na produção de lípidos estruturados do tipo MLM.

4.1.2. Determinação da acidez

A empresa Ucasul forneceu quatro amostras de OBA (OBA 1,-2,-3 e -4) de um lote de óleo de bagaço de azeitona bruto, que resulta da extração química da gordura residual do bagaço após a secagem do mesmo até cerca de 8% de humidade (Freitas, 2007). Todas as amostras individuais e a amostra resultante da sua mistura foram avaliadas quanto à sua acidez por método titrimétrico com base forte. O quadro 5 apresenta os valores de acidez obtidos (%) para as amostras individuais e a média global. O valor obtido para a mistura do óleo encontra-se no capítulo 4.2..

Quadro 5- Acidez das amostras de óleo de bagaço de azeitona bruto (média±desvio padrão, n=3)

	Acidez (%)
OBA 1	20,1 ± 0,7 ^a
OBA 2	20,4 ± 1,1 ^a
OBA 3	20,0 ± 0,7 ^a
OBA 4	20,5 ± 0,5 ^a
Média	20,2 ± 0,7 ^a

Legenda: Índices iguais indicam resultados sem diferenças estatisticamente significativas, $\alpha=0,05$.

O óleo de bagaço de azeitona bruto não é um produto destinado ao consumo final e, como tal, não tem um limite de acidez (Regulamento Delegado (UE) 2015/1830, de 8 de julho).

Os resultados obtidos relativamente à acidez das amostras de OBA bruto apresentam entre 20,0% (OBA 3) e 20,5% (OBA 4), com uma diferença relativa de 2,5%, não havendo diferenças significativas entre as amostras ($\alpha=0,05$) (Anexo III).

A média das várias amostras corresponde a 20,2% e não apresenta diferenças significativas em relação ao valor de acidez da mistura de óleo total. O valor de acidez da mistura do óleo total é utilizado para a caracterização do óleo inicial no restante trabalho.

O bagaço de azeitona obtido como resíduo da extração de azeite em sistema de duas fases apresenta um teor de humidade elevado, promovendo a libertação dos ácidos gordos durante o armazenamento (Hinojosa & Méndez, 2004). Para reduzir o teor de humidade utiliza-se a secagem que tem um impacto na acidez do óleo final devido às elevadas temperaturas utilizadas (Gomes & Caponio, 1997).

O elevado grau de acidez do óleo pode afetar a atividade das lipases e inibir a reação de acidólise para obtenção de lípidos dietéticos (Mateo *et al.*, 2007).

4.1.3. Determinação dos produtos de oxidação

Através de espectrofotometria na região UV, avaliou-se a absorvância nos comprimentos de onda 232, 268, 270 e 272 nm. Dos últimos três apresenta-se o comprimento de onda onde a absorvância foi máxima. Segundo a NP-970:1986, as absorvâncias ou densidades de transmissão no ultravioleta são essencialmente índices de alteração por oxidação de uma gordura ou óleo.

O quadro 6 apresenta as médias e desvio padrão dos coeficientes de extinção nos respectivos comprimentos de onda.

Quadro 6-Coeficientes de extinção específica para avaliação dos produtos de oxidação do óleo de bagaço de azeitona, (média \pm desvio padrão), n=3

Designação da amostra	Extinção específica	
	K ₂₃₂	K ₂₇₀
OBA 1	6,18 \pm 0,17 ^a	1,85 \pm 0,05 ^a
OBA 2	6,27 \pm 0,34 ^a	2,25 \pm 0,22 ^a
OBA 3	6,56 \pm 0,99 ^a	2,15 \pm 0,01 ^a
OBA 4	5,91 \pm 0,27 ^a	1,93 \pm 0,15 ^a
Média	6,23 \pm 0,52	2,05 \pm 0,21

Legenda: Índices iguais na mesma coluna indicam resultados sem diferenças estatisticamente significativas, $\alpha=0,05$.

Segundo o Regulamento Delegado (UE) 2015/1830, de 8 de julho, não se encontram estabelecidos coeficientes de extinção específica que sejam aplicados à categoria de óleo de bagaço de azeitona bruto.

Os coeficientes de extinção observados revelam a degradação da qualidade do óleo em estudo, nomeadamente por oxidação lipídica, a causa mais importante de deterioração do óleo (Bendini *et al.*, 2010). O primeiro coeficiente de extinção específica traduz a presença de produtos da oxidação primária dos ácidos gordos insaturados, nomeadamente, hidroperóxidos e dienos conjugados, que absorvem a um comprimento de onda de $\lambda=232$ nm (Wan, 2000). K₂₃₂ oscila entre os 5,91 \pm 0,27 (OBA 4) e 6,56 \pm 0,99 (OBA 3), não havendo diferenças significativas a um nível de significância de 0,05 (Anexo IV).

O segundo coeficiente de extinção relaciona-se com a absorvância de produtos secundários como aldeídos e cetonas, formados a partir dos peróxidos instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas e na presença de metais de transição (Zschau, 2000). Relativamente a K₂₇₀, os valores obtidos variam entre 1,85 \pm 0,05 (OBA 1) e 2,25 \pm 0,22 (OBA 2), não havendo diferenças significativas entre si (Anexo IV). Os valores de oxidação utilizados no restante trabalho são resultantes da avaliação da mistura de óleo total (Capítulo 4.2.).

O óleo de bagaço de azeitona é muito sensível à foto-oxidação devido ao elevado teor em clorofilas que se excitam na presença de luz, sendo essencial evitar a exposição a esta durante o armazenamento do bagaço de azeitona e OBA bruto (Kiritsakis, 1992; Silva, *et al.*, 1999).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Contudo, é mais resistente à oxidação (auto-oxidação) do que os óleos ricos em ácidos gordos polinsaturados, devido ao seu baixo teor em ácidos desta natureza e à presença de antioxidantes naturais, tais como tocoferóis e compostos fenólicos (Kiritsakis, 1992). No entanto, a exposição a fatores como a temperatura extrema associada ao processo de secagem do bagaço, ou a presença de metais e metalo-proteínas acelera a oxidação condicionando fortemente a qualidade do óleo (Morales & Przybylski, 2000).

O óleo avaliado revela um cheiro intenso a ranço resultante de oxidação dos ácidos gordos insaturados como é o caso do ácido oleico (Kubow, 1990; Espín *et al.*, 2000).

4.1.4. Determinação da cor e características cromáticas

Avaliou-se a cor do OBA bruto com base no Sistema CIE de modo a obter o perfil real de cada componente cromática e do produto alimentar (NP-937:1987).

As médias das coordenadas cromáticas, pureza (σ %) e comprimento de onda dominante de cada amostra de OBA analisada estão representadas no quadro 7.

Quadro 7- Cor e características cromáticas do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o Sistema CIE

Amostra	Coordenadas cromáticas		Pureza (σ %)	Tangente de α	Comprimento de onda dominante (λ , nm)
	x	y			
OBA 1	0,46	0,49	87,2	1,168	575
OBA 2	0,46	0,49	87,5	1,178	575
OBA 3	0,46	0,49	86,8	1,179	575
OBA 4	0,45	0,49	85,0	1,198	575
Média	0,46	0,49	86,6	1,181	575

As amostras apresentam coordenadas x e y próximas a 0,46 e 0,49, respetivamente. O eixo do x relaciona-se com a cor vermelha e o eixo y com a cor verde (Lima e Laranjeira, 2010 citado por Ventura, 2014). O comprimento de onda dominante é de 575 nm, na zona do amarelo. A média das coordenadas encontra-se representada no Diagrama de cromaticidade x, y do sistema C.I.E, figura 9, tal como a reta que permite determinar o comprimento de onda dominante.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

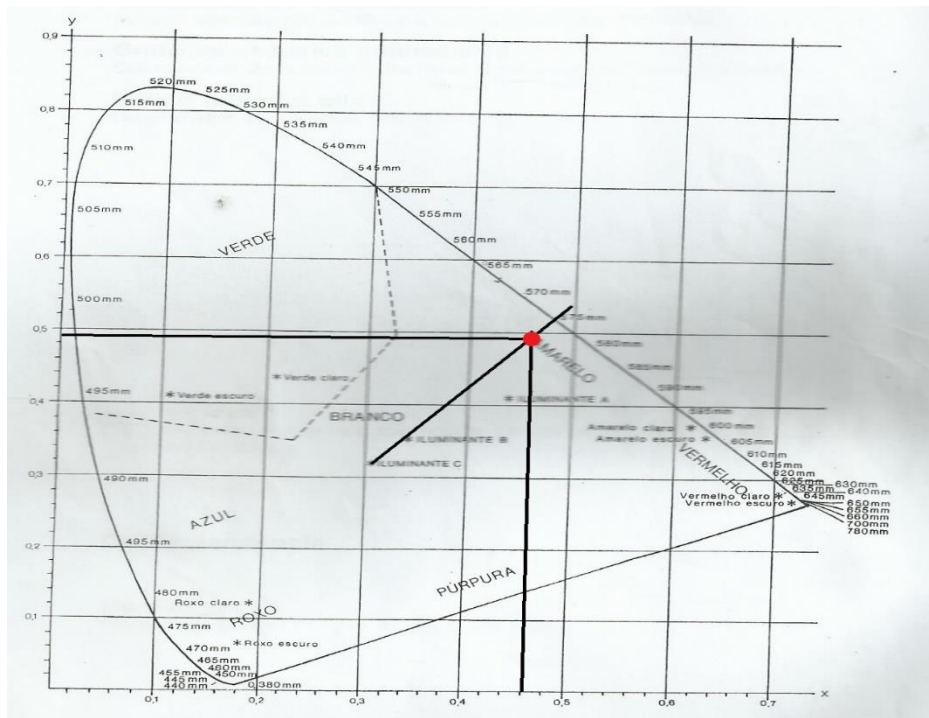


Figura 9-Diagrama de cromaticidade C.I.E para solução de 1% de óleo de bagaço de azeitona bruto

A pureza, correspondente à percentagem (σ %) da luz com o comprimento de onda dominante, no feixe de luz transmitido pelo óleo, oscilou entre 85,0% e 87,5% indicando elevada monocromaticidade do óleo, ou seja, que grande parte da luz transmitida pelo óleo apresenta um comprimento de onda da zona do amarelo. A maior dispersão na medição deste parâmetro resultou possivelmente devido a existência de turvação nas amostras resultante de partículas em suspensão (Ventura, 2014).

Os resultados obtidos não correspondem ao que se observa visualmente: o óleo apresenta uma cor verde escura, mesmo quando diluído e após eliminar a turvação por filtração

4.1.5. Determinação da clorofila total

O teor de clorofila total resultou da leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 630, 670 e 710 nm, numa célula de 5 mm de espessura, de acordo com o método descrito por Pokorny *et al.* (1995).

Através de uma análise em triplicado encontrou-se que o óleo de bagaço de azeitona bruto tem um teor médio de $91,0 \pm 0,64$ mg/kg de feofitina a, (n=3).

As clorofilas são responsáveis pela coloração verde nos óleos vegetais, evidente no óleo avaliado, sendo maioritária a clorofila a, cerca de 80% (Giuliani *et al.*, 2011). Não foram encontrados dados relativos ao teor de pigmentos clorofilinos de outras amostras de OBA estudadas. Contudo, na bibliografia encontra-se a utilização do teor em clorofilas totais para caracterização de azeites, 0,84 mg/kg (Arbequina), 1,94 mg/kg (Coratina), 0,90 mg/kg (Koronoeki) (Bruscatto *et al.*, 2017) são alguns dos resultados obtidos. Assim, a quantidade de pigmentos do azeite depende da variedade, da cultura e também do estado de maturação do fruto, das condições de armazenamento e processamento (

Rahmani & Csallany, 1991; Giuliani *et al.*, 2011). O OBA apresenta teores de pigmentos clorofilinos superiores aos do azeite pela elevada capacidade de extração do hexano (Moral & Ruiz-Mendez, 2006).

Estes pigmentos fotossintéticos são de elevada importância para o processo oxidativo do OBA: na ausência de luz têm capacidade antioxidante, atuando em sinergia com os compostos fenólicos e inibindo a etapa inicial da auto-oxidação (Méndez & Falqué, 2007). Na presença de luz, participam no mecanismo de foto-oxidação de degradação do óleo em que há participação do oxigénio singleto como intermediário para a formação de peróxidos (Karleskind, 1996). O teor de clorofila encontrado poderá explicar em parte a elevada degradação oxidativa do óleo, resultando de foto-oxidação, provocada pela exposição do óleo a fontes luminosas (Karleskind, 1996). Tanto a quantidade elevada de pigmentos como o aumento de produtos de oxidação poderão interferir na atividade das lipases que se pretendem utilizar como catalisadores das reações de acidólise (Xu *et al.*, 1998).

4.2. Influência do processo de adsorção nas propriedades do óleo

Para estudar o efeito do teor de pigmentos clorofilinos nos ensaios de acidólise procedeu-se a um processo remoção destes pigmentos por adsorções sucessivas com 4% terras ativadas. A amostra de OBA utilizada foi uma amostra compósita das quatro amostras disponíveis. O óleo bruto foi submetido a três tratamentos com binómios temperatura/tempo distintos (Quadro 2). Designa-se o óleo obtido após o primeiro e segundo tratamento como “óleo após 1º T” e “óleo após 2º T”, respetivamente. O óleo final é designado como óleo descorado (D).

O quadro 8 representa a composição em ácidos gordos do óleo descorado.

Quadro 8-Composição em ácidos gordos do óleo descorado

Ácido gordo	Teor (%) do composto no óleo descorado
C14:0	0,02
C16:0	13,42
C16:1	1,28
C17:0	0,13
C17:1	0,19
C18:0	2,3
C18:1	70,84
C18:2	10,06
C18:3	0,73
C20:0	0,44
C20:1	0,3
C22:0	0,19
C22:1	0,01
C24:0	0,09

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Os tratamentos de adsorção não alteraram a composição em ácidos gordos inicial. Contudo, não sabemos em que tipo de moléculas os ácidos gordos se encontram organizados.

A figura 10 mostra a evolução da acidez do óleo ao longo dos tratamentos de descoloração.

Índices iguais indicam que não há diferenças significativas entre as médias da acidez após os tratamentos, a um nível de significância de 0,05.



Figura 10-Acidez total do óleo após os tratamentos de descoloração com 4% terras ativadas

O óleo bruto inicial apresenta uma acidez de $20,3 \pm 0,21\%$. A ação da temperatura durante os tratamentos provoca um ligeiro aumento gradual de acidez que se mostra não ser significativo, segundo teste-t de amostras emparelhadas (Anexo V). Pode-se afirmar que a ação das terras ativadas e a temperatura não tiveram um impacto significativo na acidez do óleo original.

A figura 11 revela os coeficientes de extinção específica do óleo antes e após tratamento com terras ativadas a cada binómio tempo/temperatura.

A mistura de óleo bruto apresenta inicialmente K_{232} igual a $6,98 \pm 0,15$ e K_{270} igual a $2,22 \pm 0,11$, revelando baixa qualidade em termos da presença de hidroperóxidos e também de produtos de degradação em aldeídos, cetonas e outras moléculas de cadeia curta (Jadhav *et al.*, 1996).

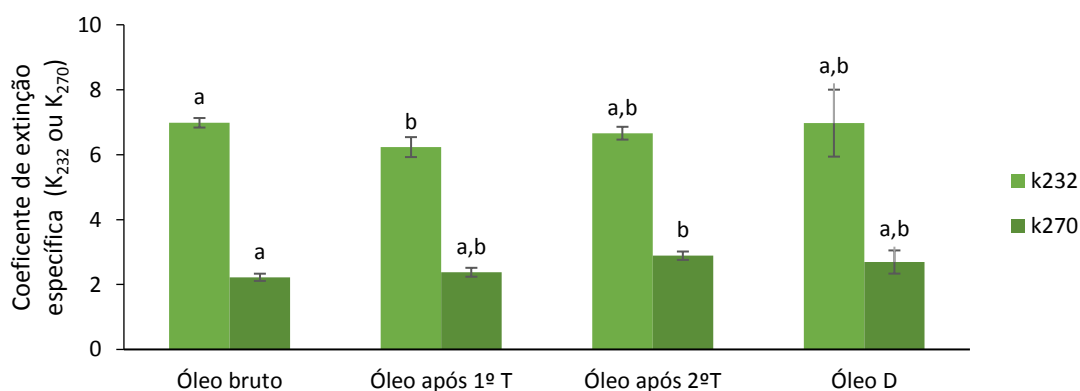


Figura 11 – Avaliação do impacto da adsorção nos níveis de oxidação do OBA através dos coeficientes de extinção específica na região ultravioleta.

Índices associados ao valor de cada critério iguais indicam que não há diferença estatística significativa, $\alpha=0,05$

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Os coeficientes de extinção específica do óleo descorado não são estatisticamente diferentes (($p=0,988$) dos níveis de oxidação iniciais: o óleo bruto apresenta $K_{232}=6,98\pm 0,15$ e $K_{270}=2,22\pm 0,11$; o óleo descorado caracteriza-se por $K_{232}=6,97\pm 1,03$ e $K_{270}=2,69\pm 0,36$ (Anexo VI).

Os valores de K_{232} e K_{270} não variaram significativamente ao longo dos tratamentos, com terras ativadas.

Após o primeiro tratamento há uma ligeira diminuição do nível de oxidação primária em relação ao valor inicial ($K_{232}=6,23\pm 0,31$) pela remoção de produtos de oxidação primária por ação das terras ativadas (Eskin & Shahidi, 2015). Contudo, este valor não é significativamente diferente do coeficiente de extinção do óleo após 2^oT e óleo D.

O coeficiente K_{270} do óleo após o segundo tratamento não apresenta igualdade estatística ao do óleo bruto ($p\text{-value}=0,035$), no entanto não revela diferença estatística em relação às restantes amostras. O valor obtido após o segundo tratamento pode resultar do efeito térmico e ação das terras ativadas que promoveu a continuação do processo oxidativo dos peróxidos e hidroperóxidos já presentes, aumentando os produtos secundários (Mounts, 1981; citado por Eskin & Shahidi, 2015).

A cor, características cromáticas e valores de absorvância no visível das amostras obtidas ao longo dos tratamentos encontram-se nos quadros 9 e 10.

Quadro 9- Características cromáticas após tratamento de descoloração

Designação do óleo Parâmetros	Óleo bruto	Óleo após 1 ^o T	Óleo após 2 ^o T	Óleo D
Coordenadas cromáticas (x; y)	0,45; 0,48	0,46; 0,49	0,35; 0,38	0,34; 0,36
Pureza ($\sigma\%$)	81,77	84,65	28,80	19,33
Tangente de α	1,185	1,160	1,658	1,566
Comprimento de onda dominante (nm)	575	574	571	572

O óleo bruto e o óleo obtido após o primeiro tratamento apresentam características semelhantes e encontram-se na zona amarela do diagrama de cromaticidade. Isto revela que a adsorção a 65 °C não foi eficiente em termos de alteração de cor. No entanto, há um aumento de pureza, ou seja, há uma maior transferência da radiação dominante e maior monocromaticidade.

Os tratamentos onde foi utilizada temperatura mais elevada num período mais curto (3^o tratamento: 110 °C/30 min) tiveram maior efeito na remoção de cor: as coordenadas cromáticas resultam num ponto na zona branca do diagrama. A cor que nos é indicada através do diagrama distancia-se da cor observada pelo indivíduo: o óleo aparenta ter uma cor mais próxima de verde quando em bruto e amarelo quando descorado (Fig. 12). Após o 2^o e 3^o tratamento há uma diminuição

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

considerável da pureza, de 65% e 76%, respectivamente. Tal significa que há uma maior heterogeneidade de compostos e da radiação que é emitida.

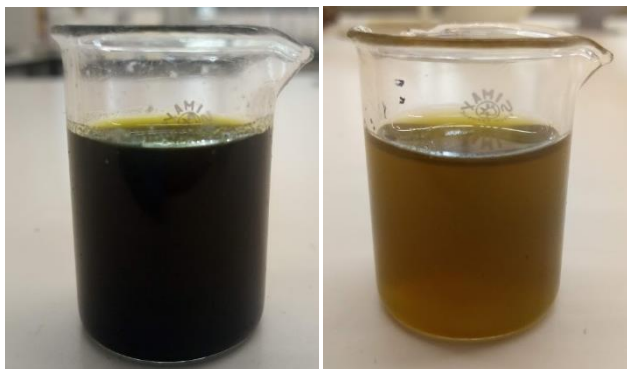


Figura 12-Óleo de bagaço de azeitona antes (óleo B) e após os três tratamentos adsorção (óleo D).

Devido à dificuldade de caracterização colorimétrica do óleo, optou-se por estudar a diminuição da absorvância nos comprimentos de onda estabelecidos pela norma NP-937 (1987).

O quadro 10 sumariza a diminuição em percentagem da absorvância em cada comprimento de onda.

Quadro 10-Variação percentual de absorvância dos óleos bruto e após tratamentos de adsorção

	445 nm	495 nm	560 nm	595 nm	625 nm
Valores de absorvância nos respetivos comprimentos de onda (solução de óleo a 1%)					
Óleo bruto	1,851	0,948	0,318	0,322	0,332
Variação percentual de absorvância (1% sol)					
Óleo após 1º T	Sem efeitos de remoção				
Óleo após 2º T	73,7	78,0	59,7	58,5	65,3
Óleo D	82,8	84,5	71,4	73,8	77,8

A quantidade de compostos que absorvem radiação na gama de 445 nm-495 nm é bastante superior ao verificado para os restantes c.d.o. analisados.

Efetivamente, o OBA, que apresenta o mesmo tipo de pigmentos que o azeite, tem um espectro de absorvância UV/Vis com picos máximos entre 350 nm e 500 nm e também no intervalo 650 nm-700 nm, não contemplado nesta análise (Lapcikova *et al.*, 2018) .

Como verificado pelas características cromáticas, o primeiro tratamento não apresentou benefícios na remoção dos pigmentos. O tratamento a 90 °C/45 min garantiu uma diminuição de pelo menos ≈59% para todos os comprimentos de onda avaliados, sendo a diminuição mais evidente a 495 nm (78,0%). A absorção de radiação eletromagnética na região espectral 300-550 nm é característica dos carotenoides, sendo que a radiação de 445 nm é absorvida por corpos de cor amarela e 495 nm pode ser um pico de absorção máxima para corpos laranja-vermelho (Koplík, 2013; Popova, 2017). O óleo descorado apresenta menos 84,5% de absorvância a 495 nm, e ocorreu menor remoção de

pigmentos a 560 nm (71,4%). A gama de 500-560 nm é absorvida por corpos de cor verde enquanto os c.d.o. de 595 nm e 625 nm ocupam a zona do espectro visível que é absorvida por corpos azuis-verdes (Koplík, 2013).

A posição de absorção máxima e coeficientes de absorção específica dos compostos depende do tipo de solvente. Na determinação colorimétrica utilizou-se tetracloreto de carbono, semelhante a clorofórmio (Popova, 2017). De acordo com Popova (2017), o β -caroteno apresenta um espectro de absorvância com picos máximos próximos de 450 nm e 500 nm. No nosso caso, utilizando o clorofórmio como solvente, a absorvância máxima foi próxima de 460 nm. Segundo Patterson (1992), o β -caroteno absorve na faixa dos 420-475 nm, onde se encaixa o c.d.o. de 445 nm. Assim, assumiu-se que os comprimentos de onda 445 nm e 495 nm correspondem a pontos de espectro de absorção dos carotenoides e informam que houve remoção destes compostos ou oxidação dos mesmos. Além disso, 445 nm poderá corresponder ao pico de absorção de β -caroteno, do qual houve uma redução de 73,7% e 82,8%, no segundo e terceiro tratamento, respetivamente. Já de acordo com Moyano *et al.*, (2010) os carotenoides maioritários têm como locais de absorção máxima 424, 448 e 476 nm para o caso da luteína e 454 nm e 480 nm para o caso do caroteno. Assim, 445 nm pode corresponder também ao pigmento luteína de cor amarela.

Os comprimentos de onda de 560 nm, 595 nm e 625 nm são menos interessantes para a análise de remoção de pigmentos do OBA bruto pois não correspondem a pigmentos maioritários do mesmo. A sua remoção foi menos eficiente, mas a sua presença inicialmente era também menor.

A remoção das clorofilas não se encontra contemplada porque estas localizam-se tipicamente na região dos 670 nm. A clorofila *a* apresenta um pico na região dos 430 nm e um segundo pico entre 660 e 685 nm enquanto a clorofila *b* tem um máximo entre 640 e 650 nm (Britton, 1983). Já a feofitina *a* tem um primeiro pico a 407 nm e um de menor intensidade a 666 nm (Moyano *et al.*, 2010). Visualmente, o óleo final apresenta tons amarelos e acastanhados que poderão resultar ainda da presença de carotenos ou da isomerização e degradação destes por processos oxidativos, aumentando a presença de xantofilas (Rodriguez-Amaya, 1999), e também da transformação dos compostos clorofilinos em seus derivados como a feofitina *a* que traduz-se macroscopicamente na alteração dos tons verdes para tons castanhos (Moyano *et al.*, 2010).

A remoção das clorofilas é muito importante dado que envolvem aspetos relacionados com as propriedades finais do óleo e o seu papel oxidativo, enquanto a remoção dos carotenos tem como objetivo um aspeto mais apelativo do produto comercial (Patricio *et al.*, 2014).

O óleo descorado (após todos os tratamentos) revelou ter $0,93 \pm 0,03$ mg/kg de feofitina *a*. Relativamente ao óleo bruto ocorreu uma remoção de 98,8% no teor de clorofila total.

Verificou-se que o conjunto de tratamentos foi eficiente na remoção de pigmentos, mantendo o nível de qualidade do óleo semelhante ao inicial. Com intuito de melhoria, os tratamentos térmicos realizados deveriam ter sido realizados de forma independente, permitindo obter um efeito não-cumulativo. Além disso, poderia ter sido aplicada para a avaliação da cor do óleo o método proposto por Escolar *et al.* (1997), que consiste na avaliação da absorvância de amostras de óleo puro nos

comprimentos de onda 480 nm e 670 nm. Estes correspondem aos valores máximos de absorvância dos componentes maioritários do espectro visível, uma combinação de clorofilas e carotenoides.

4.3. Avaliação do rendimento da imobilização enzimática

4.3.1. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica tem sido relacionada com a atividade de síntese das lipases e a sua medição é uma ferramenta que pode servir para avaliar a sua aplicação em processos de bioconversão em produtos de valor acrescentado, por reações de acidólise, alcoólise ou interesterificação (Yamane, 1987). Contudo, a atividade hidrolítica é frequentemente independente da atividade de interesterificação das lipases (Yahya *et al.*, 1998).

Inicialmente, foram analisadas tanto as lipases comerciais na forma imobilizada, Lipozyme RM IM e Novozym 435, como as lipases comerciais de formulação líquida que se pretendiam imobilizar. Para as lipases imobilizadas os valores de atividade hidrolítica apresentam-se em relação a uma quantidade mássica (U/g) e para as formulações líquidas os valores determinados são apresentados em termos volúnicos (U/ml).

O quadro 11 apresenta a média da atividade hidrolítica das preparações comerciais mencionadas. Os ensaios decorreram em duplicado e como tal apresentam-se os coeficientes de variação associados à média dos valores encontrados.

Quadro 11-Atividade hidrolítica das enzimas comerciais

<u>Lipase imobilizadas</u>	Atividade hidrolítica (U/g)	coeficiente de variação (%)
Lipozyme RM IM	39	0
Novozym 435	≈0	0
<u>Lipases líquidas</u>	(U/ml)	
Lipozyme CALBL	90	5,0
Novozym 388	1020	13,9
Novozym 735	560	10,1

Legenda: Os ensaios realizaram-se a 30 °C e a um pH neutro, recorrendo a solução tampão fosfato de sódio. A quantidade de ácidos gordos livres hidrolisada foi avaliada por titulação com NaOH 0,1 M e comparada a um branco de azeite sem ação de enzima.

Nas condições selecionadas, as lipases imobilizadas demonstraram baixa atividade hidrolítica. Os fatores temperatura, substrato utilizado e o pH influenciam a atividade determinada (Bassan *et al.*, 2016). Bassan *et al.*, (2016) demonstraram o efeito do substrato na atividade hidrolítica, verificando variação do pH e temperatura ótimos consoante o substrato (óleo de grainha de uva ou azeite virgem extra).

As lipases líquidas apresentaram atividade hidrolítica superior, sendo a mais elevada a de Novozym 388 que corresponde à lipase de *Rhizomucor miehei* (Asano *et al.*, 2015), tal como a presente na Lipozyme RM IM. A menor atividade hidrolítica das formulações líquidas corresponde à enzima

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Lipozyme CALBL, a mesma enzima que se encontra imobilizada em Novozym 435 (lipase de *Candida antarctica*).

Os coeficientes de variação associados às médias encontradas revelam a existência de variabilidade associada aos vários passos da determinação. A goma arábica, utilizada para manter a estabilidade da interface água-óleo necessária para a atividade hidrolítica, pode ser adsorvida à superfície das gotículas de azeite em emulsão, dificultando a ação das lipases; a temperatura pode sofrer variação entre reatores em ao longo do processo; também a velocidade de agitação por ímãs poderá representar fonte de variabilidade, sendo que velocidades superiores permitem que haja maior área interfacial (Yamane, 1987). Para minimização de erros, utilizou-se o mesmo azeite nas várias determinações. A titulação com base forte, apesar de um método simples, é fonte de erros de aleatórios dado que facilmente pode haver uma incorreta interpretação de alteração de cor (Kardash & Tur'yan, 2005). Além disso, verifica-se que no método utilizado, pequenas variações de volume originam grande variação do valor final. Assim, uma opção mais cautelosa teria sido a utilização de uma solução de hidróxido de sódio menos concentrada, de modo a facilitar a interpretação do ponto de viragem.

O quadro 12 sumariza a atividade hidrolítica do imobilizado final e a comparação com a solução de lipase inicial, através do rendimento de imobilização em termos de atividade hidrolítica. Para relacionar a atividade hidrolítica final e da lipase líquida inicial foi tido em conta o volume de solução enzimática por grama de suporte, utilizado durante a imobilização.

Quadro 12-Valores de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização nos suportes

	Lewatit VP OC 1600			Accurel MP 1000		
	L. CALBL	N. 388	N. 735	L.CALBL	N. 388	N. 735
A.H. do imobilizado (CV %)	16,4	13,3	6,7	17,2	43,7	6,9
(U/g)	(83,2)	(72,4)	(0)	(85,1)	(11,9)	(4,9)
Rendimento de imobilização (%)	16,1	13,0	6,6	16,9	42,8	6,9

Legenda: "N." representa Novozym; "L." representa Lipozyme. Siglas: A.H.-atividade hidrolítica; CV-coeficiente de variação

Verificou-se menor rendimento de imobilização, determinado através da atividade hidrolítica, para a lipase de Novozym 338 imobilizada no suporte de Lewatit VP OC 1600 (13%) comparado com o rendimento obtido quando esta lipase foi imobilizada em Accurel MP 1000 (42,8%). O rendimento mais baixo está associado à lipase Novozym 735 (lipase A de *Candida antarctica*) que é semelhante para ambos os suportes (6,6% e 6,9%). Lipozyme CALB L apresentou também um rendimento semelhante para os suportes de Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000. A lipase de *Rhizomucor miehei* apresentou melhor eficiência de imobilização em Accurel MP 1000, sendo este o melhor resultado (42,8%). As perdas de atividade hidrolítica das lipases após imobilização são provocadas por efeitos de transferência de massa e também pelo procedimento de imobilização, que altera de forma inevitável o ambiente molecular natural das lipases (Secundo, 2013). A imobilização pode desencadear mecanismos que afetam a sua eficiência catalítica ou resultam na sua inativação: como o difícil acesso

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

do substrato ao centro ativo da enzima (orientação desfavorável da enzima ou limitação de difusão do substrato), perda de propriedades da enzima e alteração da sua integridade conformacional, por alta afinidade para o suporte (Mateo *et al.*, 2007; Secundo, 2013).

Outro aspeto é a estabilidade durante o armazenamento das lipases, ou seja, a manutenção da sua atividade catalítica entre o momento de produção e a sua utilização (Bule, 2014). A avaliação de atividade catalítica final não foi realizada logo após a produção dos imobilizados, o que pode explicar uma maior perda de atividade catalítica. No entanto, permite obter uma atividade mais próxima da real na altura da realização dos ensaios de acidólise.

Os valores de atividade hidrolítica dos biocatalisadores Lewatit VP OC 1600-Lipozyme CALB L e Accurel MP 1000- Lipozyme CALB L apresentam um coeficiente de variação de 83% e 85%, respetivamente. Se considerarmos apenas os valores mais baixos de atividade hidrolítica pode-se dizer que o rendimento foi de apenas 6,64% e 6,73%, respetivamente, semelhantes aos verificados para a Novozym 735. Já o biocatalisador Lewatit VP OC 1600-Novozym 388 apresenta coeficiente de variação de 72%, também bastante elevado, com valor mínimo de retenção de atividade hidrolítica de 6,34%. No caso do suporte Accurel MP 1000 a média está associada a um coeficiente de variação de 12%.

A elevada variabilidade nos resultados pode ter resultado de um processo de adsorção não-homogêneo, resultando em diferentes atividades hidrolíticas durante os ensaios. Para confirmar os resultados obtidos podia ter sido avaliada a atividade hidrolítica do filtrado, e, por subtração descoberta a atividade hidrolítica remanescente.

4.3.2. Determinação da proteína imobilizada pelo método de Bradford

O quadro 13 revela a proteína, em mg, presente nas soluções enzimáticas iniciais e o rendimento de imobilização para o suporte de Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000, respetivamente, resultando este da diferença entre a proteína inicial e no filtrado.

Quadro 13-Rendimento de imobilização em Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000 em proteína

Solução	Massa de proteína (mg) solução inicial*	Massa de proteína (mg) imobilizada	Rendimento de imobilização (%)
Lipozyme CALBL em Lewatit VP OC 1600	7,52 ± 0,21	6,22 ± 0,06	82,7
Novozym 388 em Lewatit VP OC 1600	0,92 ± 0,05	0,30 ± 0,04	32,9
Novozym 735 em Lewatit VP OC 1600	2,30 ± 0,01	2,02 ± 0,04	87,7
Lipozyme CALBL em Accurel MP 1000	7,22 ± 0,48	6,61 ± 0,53	91,2
Novozym 388 em Accurel MP 1000	1,08 ± 0,01	0,30 ± 0,05	28,0
Novozym 735 em Accurel MP 1000	1,77 ± 0,01	1,54 ± 0,04	86,6

*Valores relativos a proteína de volume de solução por grama de suporte de imobilização

Os resultados obtidos demonstram que o rendimento de imobilização em proteína foi elevado para as lipases A e B de *Candida antarctica*, em ambos os suportes. Para o suporte de Lewatit VP OC 1600, a imobilização mais eficiente foi a de Novozym 735 (87,7%) e para o caso de Accurel MP 1000, foi a de Lipozyme CALBL (91,2%). A lipase de *Rhizomucor miehei* (Novozym 388), apresentou rendimentos de imobilização em proteína semelhantes para os dois suportes de imobilização e inferiores a 35%.

Verificou-se que a proteína presente na solução enzimática inicial era inferior nos casos das lipases Novozym 735 e Novozym 388 à verificada para Lipozyme CALB L. A baixa concentração de proteína revelou-se problemática durante a leitura espectrofotométrica para as soluções iniciais e, principalmente, para o filtrado. Este filtrado é obtido antes da adição de glutaraldeído. Assim, após esta etapa, pode ter ocorrido dessorção do soluto, após o contacto com glutaraldeído e através da lavagem com solução-tampão, lixiviando alguma proteína (Costa *et al.*, 2013).

Para garantir uma concentração da solução inicial superior, optou-se por dissolver as lipases líquidas num volume de solução tampão inferior ao indicado pelo método inicial. O volume de enzima líquida para imobilização foi estabelecido apenas através da avaliação da atividade hidrolítica das lipases comerciais disponíveis. Não foi realizada a determinação da proteína pelo método de Bradford anteriormente ao processo de imobilização, o que pode ter resultado na seleção de um volume enzimático inferior ao necessário para uma imobilização enzimática mais eficiente. O menor volume de lipase foi o de lipase de *Rhizomucor miehei* que revelou ter o menor rendimento de imobilização proteica. Contudo, Novozym 735 apresenta também uma quantidade de proteína baixa, mas um rendimento de imobilização elevado. Esta diferença pode resultar de uma maior afinidade desta lipase para os suportes (Yamane, 1987).

4.4. Preparação de biocatalisadores imobilizados com diferentes atividades de água

A atividade da água descreve o grau de ligação da água a um dado sistema (Tiefenbacher, 2019) e tem um papel determinante na manutenção estrutural enzimática e no seu funcionamento, afetando a catálise enzimática (Rezaei *et al.*, 2007).

O protocolo de imobilização das lipases nos suportes sintéticos incluiu operações que promovem a remoção de água da solução tampão utilizada durante a imobilização. Além disso, após a imobilização, os imobilizados permaneceram 24 h no exsiccador de modo a diminuir a atividade da água.

O quadro 14 seguinte revela os valores médios de a_w inicial dos biocatalisadores e após 24 h e 28 h no exsiccador, no caso dos biocatalisadores em Accurel MP 1000.

Quadro 14- Medição da atividade da água dos biocatalisadores (média \pm desvio padrão, n=3)

Biocatalisador	a_w (0 h)	a_w (24 h)	a_w (28 h)
N735 em Accurel MP 1000	0,98 \pm 0,02	0,91 \pm 0,00	0,37 \pm 0,04
N388 em Accurel MP 1000	0,93 \pm 0,03	0,87 \pm 0,04	0,35 \pm 0,01
LCALBL em Accurel MP 1000	0,93 \pm 0,04	0,90 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03
N735 em Lewatit VP OC 1600	0,94 \pm 0,02	0,23 \pm 0,00	-
N388 em Lewatit VP OC 1600	0,91 \pm 0,01	0,24 \pm 0,07	-
LCALBL em Lewatit VP OC 1600	0,91 \pm 0,01	0,2 \pm 0,00	-
Novozym 435	0,68 \pm 0,03	-	-

O resultado da variação de a_w quando no exsicador revela comportamentos diferentes entre suportes e lipase. As lipases imobilizadas em Accurel MP 1000 apresentam uma a_w de cerca de 0,4, ao fim de 28 h no exsicador. É possível obter uma a_w de cerca de 0,2 ao fim de 24 h quando imobilizadas em Lewatit VP OC 1600.

A a_w é um fator determinante já que é essencial a presença de água pelo menos vestigial, adsorvida à superfície da lipase (Macrae, 1983), para que a enzima seja ativa e apresente uma cinética de ativação interfacial na interface lípido-água (Miled *et al.*, 2001). Há possibilidade de alteração de conformação da enzima e sua inativação na ausência de água e por outro lado, a diminuição do rendimento da reação dado que a presença de água promove a reação de hidrólise, prejudicando o balanço entre as etapas de hidrólise e esterificação (Ujang & Vaidya, 1998). Além disso, algumas enzimas comportam-se melhor em reações de síntese quando a atividade da água é próxima de 1 (Petersson *et al.*, 2007), e outras como é o caso das lipases de *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*, têm atividade de interesterificação ótima abaixo de 0,5 (Ferreira-Dias & Fonseca, 1995).

Por inexistência do suporte de Lipozyme RM IM em laboratório, avaliou-se apenas Novozym 435, que apresentou um valor de a_w de 0,68 \pm 0,03. Este valor é elevado relativamente ao valor apresentado por Nunes *et al.* (2011) de 0,33 e 0,28 para as lipases utilizadas, Lipozyme RM IM e Novozym 435, respetivamente, a 30 °C. A exposição e equilíbrio com um ambiente com elevada humidade relativa durante o seu armazenamento poderá ter resultado no aumento indevido da atividade da água. Muitas vezes a atividade da água é designada humidade relativa de equilíbrio (Mathlouthi, 2001).

Em face da dispersão dos valores de a_w obtidos para os diferentes biocatalisadores optámos por utilizá-los com valores de a_w semelhantes de cerca de 0,8-0,9. Optou-se por colocar os biocatalisadores em Accurel MP 1000 durante 24 h no exsicador previamente ao seu uso e utilizá-las

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

diretamente, no caso de Lewatit VP OC 1600. Longe das condições ótimas para a atividade das lipases, este valor de a_w permitiu testar a atuação das lipases em condições teoricamente adversas.

Os biocatalisadores imobilizados em Lewatit VP OC 1600 foram posteriormente avaliados a $a_w=0,75$, próxima da encontrada para a Novozym 435.

4.5. Identificação do perfil de triacilgliceróis de óleo de bagaço de azeitona por cromatografia gasosa

O método de cromatografia utilizado permite a obtenção de um cromatograma em que é possível distinguir pelo seu tempo de retenção, ácidos gordos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (NP EN 14105:2011). Para identificação de picos do óleo de bagaço de azeitona, foi apenas possível utilizar dois padrões, nomeadamente, a trioleína e o ácido oleico.

De modo a identificar a composição em TAG do óleo, procedeu-se a uma análise cromatográfica de um padrão de azeite virgem extra, disponibilizada pelo Laboratório de Estudos Técnicos do Instituto Superior de Agronomia (LET-ISA). A percentagem de área dos picos correspondentes a TAG foi comparada com os resultados obtidos pelo laboratório anteriormente mencionado, por HPLC. Foi possível estabelecer uma relação entre os resultados através do número de carbonos presentes nas moléculas de TAG. O quadro 15 revela os TAG pertencentes às categorias: nº de carbonos-50,-52,-54 e a percentagem de cada em relação aos TAG totais do azeite virgem extra obtidos por HPLC pelo LET-ISA e por cromatografia gasosa capilar.

Quadro 15-Composição de azeite virgem extra em TAG C50, C52 e C54

Nº de Carbonos	TAG	Percentagem em TAG (%) por HPLC	Percentagem em TAG (%) por cromatografia gasosa	Tempo de retenção (min)
50	PLP; POP.	4,30	2,50	24,5-25,6
52	PLL _n ; PLL+P _o P _o O;POL _n +PP _o P _o +PP _o L; P _o OO; P _o OP+SP _o L+SOL _n +SP _o P _o ; POO;POS+SLS.	27,8	28,8	30,0-30,9
54	LLL; OLL _n ; OLL; OOL _n +P _o OL; OOL+L _n PP; SLL+PLO; OOO+P _o PP; SOL; SOO.	67,7	68,8	31,4-33,0

O total de percentagem de área corresponde a 99,8%, dado que alguns picos minoritários não são identificados. As percentagens obtidas para cada intervalo de tempo são semelhantes,

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

principalmente para os tempos de retenção superiores correspondentes a moléculas com número de carbono igual a 52 e 54. Ainda de acordo com o LET-ISA (2017), os componentes maioritários do azeite virgem extra foram OOO com 41,1% (54C), SOL+POO (52C) com 22,3% e OOL com 10,5%. O ácido oleico livre e trioleína foram identificados pelo padrão disponível em laboratório. Por análise cromatográfica do óleo de bagaço de azeitona obteve-se a seguinte composição (Quadro 16):

Quadro 16 – Valores relativos a componentes de interesse do óleo de bagaço de azeitona

Componente do óleo de bagaço de azeitona	Teor médio \pm desvio padrão (% , m/m)
<u>AGL</u>	18,4 \pm 0,1
C18:1 livre	10,9 \pm 0,0
<u>TAG</u>	70,5 \pm 1,1
OOO	29,4 \pm 0,3
Fração em TAG de C50	23,9 \pm 0,4
Fração em TAG de C52	31,0 \pm 0,2
Fração em TAG de C54	45,1 \pm 0,2
Fração de OOO em TAG	41,7 \pm 0,2

O valor de ácidos gordos livres é próximo do valor de acidez descoberto por titulação (20%). O ácido oleico demonstra ser o ácido gordo livre com maior expressão, correspondendo a mais de 50% dos AGL (59,7%) e a trioleína é o TAG mais abundante. Tal como no azeite virgem extra, predominam os TAG com maior número de carbonos. O pico que é identificado como trioleína por comparação com o padrão é responsável quase na totalidade pela presença de moléculas de 54 carbonos, correspondendo a 41,7% dos TAG totais.

Os TAG do azeite virgem extra e OBA estão representados nos cromatogramas seguintes (Fig. 13 a e b).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

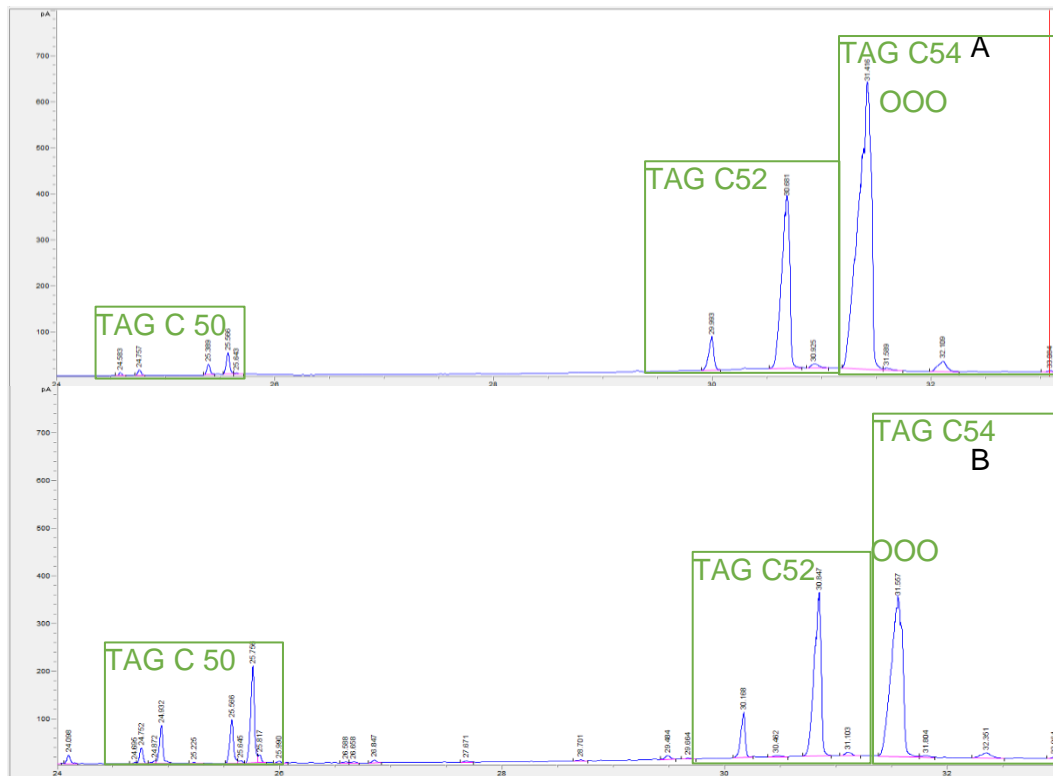


Figura 13-Picos referentes aos TAG das amostras de azeite virgem extra (a) e OBA (b)

4.6. Acidólise e interesterificação enzimática catalisada por lipases imobilizadas comerciais

A figura 14 apresenta a conversão de ácidos gordos livres de cadeia média C8:0 e C10:0 por acidólise com óleo de bagaço de azeitona bruto (B) e após adsorção (D), catalisada pela Lipozyme RM IM (50 °C).

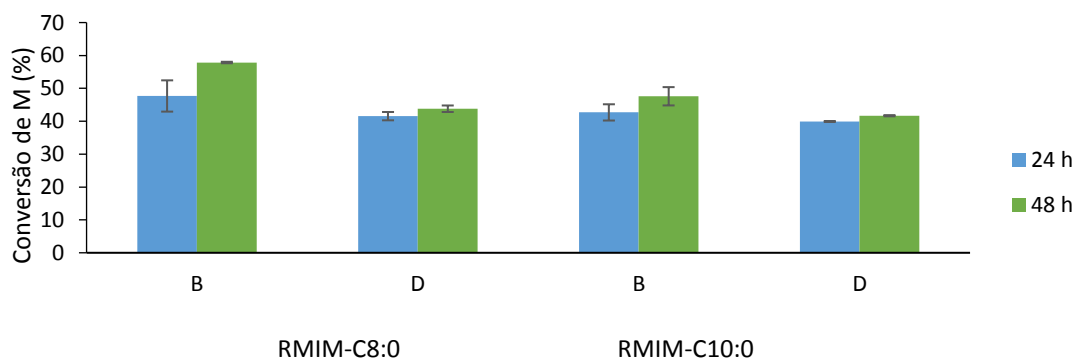


Figura 14-Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante a acidólise com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50 °C

O consumo de M foi superior quando se utilizou o OBA bruto, para ambos os ácidos gordos livres. Verificou-se uma preferência por parte da lipase para o ácido caprílico, correspondendo o melhor resultado a um consumo de 57,9% (m/m) quando se utilizou C8:0 e OBA bruto. A conversão mais baixa foi obtida pela acidólise de C10:0 com óleo descolorado (41,7% (m/m)). Diversos estudos desenvolvidos com utilização de Lipozyme RM IM, revelam a capacidade de incorporação de 44 mol-% de C8:0, em

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

óleo de colza (Wang *et al.*, 2012), 65 mol-% (Xu *et al.*, 1998) e 42,2 mol-% de C10:0 (Jennings & Akoh, 2000) em óleo de colza e óleo de farelo de arroz, respetivamente. Estes resultados foram obtidos entre os 50 °C e 60 °C de temperatura, com diferentes cargas enzimáticas e razões molares. No entanto, não é possível comparar diretamente os valores referenciados com os obtidos no presente trabalho dado que o consumo do C8:0 ou C10:0 não equivale à incorporação dos ácidos gordos (mol-%) nos MLM desejados (Quezada & Hernandez, 2011).

A figura 15 apresenta o consumo de M por acidólise de C8:0 e C10:0, e também por interesterificação com os ésteres etílicos e metílicos dos ácidos gordos mencionados, utilizando a enzima Novozym 435.

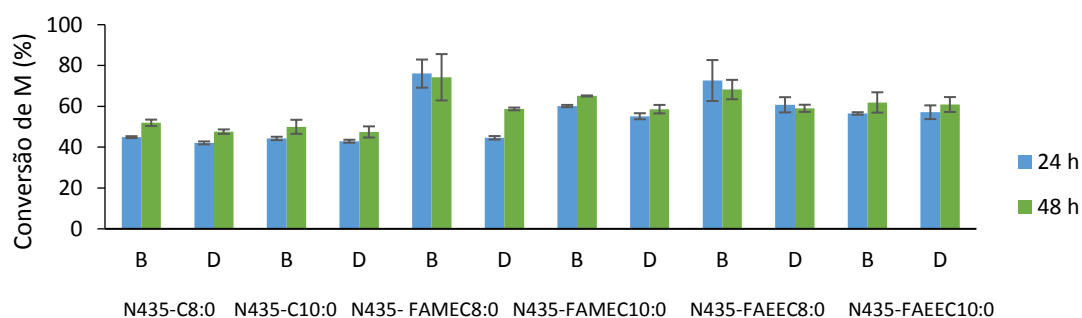


Figura 15- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) e seus ésteres metílicos e etílicos, durante reação com OBA bruto (B) ou após descoloração (D) catalisada pela lipase Novozym 435, a 50 °C

O consumo de C8:0 em óleo bruto foi ligeiramente inferior ao verificado com a lipase de *Rhizomucor miehei*, 51,9% (m/m), e ligeiramente superior quando se utilizou OBA D. Ambas as lipases utilizaram preferencialmente o C8:0 e demonstraram menor atividade em óleo descorado (47,6% (m/m) de C8:0 e 47,5% (m/m) de C10:0, com a Novozym 435). Esta tendência foi observada também durante a interesterificação com ésteres etílicos e metílicos. Os maiores valores foram obtidos pela interesterificação com FAME-C8:0 (74,2% (m/m)) e com FAEE-C8:0 (68,2% (m/m)). Em ambos os casos, o consumo mostrou-se superior às 24 h de ensaio, demonstrando que após este momento deve ter ocorrido a hidrólise de acilgliceróis formados (76,1% (m/m) (FAME-C8:0) e 72,7% (m/m) (FAEE-C8:0)).

É importante ter em conta que a reação de acidólise, como outras promovidas por lipases, é responsável pela formação de acilgliceróis parciais, ou seja, moléculas de glicerol esterificadas com ácidos gordos, em que não ocorreu a esterificação com todos os grupos hidroxilo. Ou seja, o consumo de M pode resultar na incorporação destes em monoacilgliceróis e diacilgliceróis (Cheong *et al.*, 2012).

O rendimento em novos TAG (% m/m) obtido por acidólise catalisada pela lipase Lipozyme RM IM (Fig. 16) e Novozym 435 (Fig. 17) corresponde à razão entre o produto formado e o total do reagente fornecido no ponto inicial da reação (Davis & Davis, 2003).

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

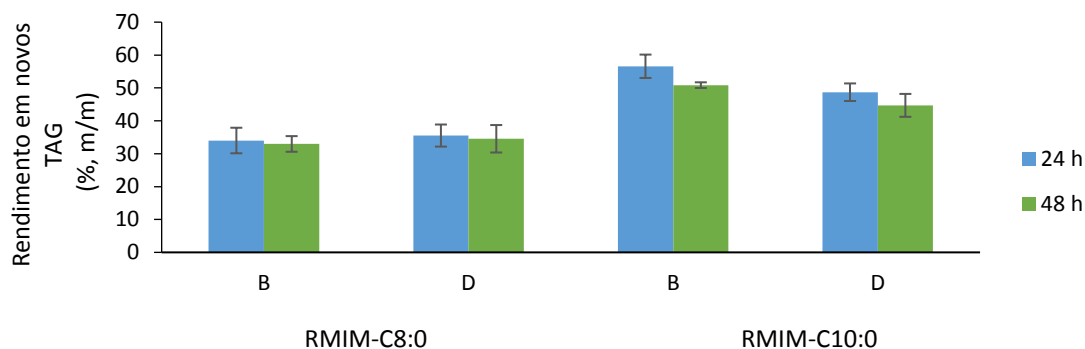


Figura 16-Rendimento em novos TAG (% m/m) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante a acidólise com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50 °C

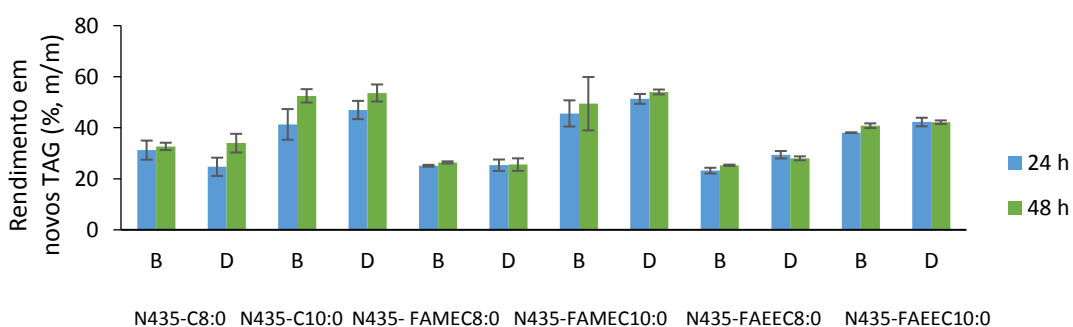


Figura 17- Rendimento em novos TAG (% m/m) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) ou interesterificação com seus ésteres metílicos e etílicos catalisada pela lipase Novozym 435, a 50°C

Contrariamente ao verificado pelo consumo de M (%), embora haja maior conversão de C8:0 em acilgliceróis, a formação de novos TAG foi superior quando se utilizou C10:0 e seus ésteres. Nunes *et al.* (2011) verificaram que, utilizando as lipases Lipozyme RM IM e Novozym 435 em reações de acidólise de ácido caprílico ou cáprico com azeite virgem, houve sempre maior incorporação do ácido cáprico. A preferência por ácidos gordos de cadeia mais longa é uma característica das lipases em contraste com as esterases (Sharma *et al.*, 2001).

No caso de Lipozyme RM IM pode-se dizer que o equilíbrio da reação ocorreu após 24 h, em que se obteve maior rendimento em TAG a partir de OBA B e C10:0 (56,6 % (m/m)). O pior rendimento em TAG obteve-se a partir de C8:0 e óleo bruto (33,0% (m/m), às 48 h). A maior atividade hidrolítica de Lipozyme RM IM pode desencadear a hidrólise dos TAG mais rapidamente, atingindo-se um máximo mais cedo, mas promover a degradação dos produtos formados após as 24 h.

Quanto à Novozym 435, as reações foram no geral mais lentas, obtendo maior rendimento ao final de 48 h. Verificou-se que os rendimentos obtidos são semelhantes entre o OBA B e OBA D e também semelhantes aos obtidos com Lipozyme RM IM. Após 48 h, observou-se um rendimento em novos TAG (% m/m) de 52,5% (m/m) e 53,6% (m/m), para os sistemas com C10:0 e OBA B e OBA D, respectivamente. Isto demonstra que a concentração de pigmentos no óleo não afetou a atividade das lipases utilizadas.

Os sistemas onde houve maior consumo, neste caso, de ésteres, correspondem a um menor rendimento em TAG. Os ésteres resultam da condensação do grupo carboxilo do ácido com o grupo hidroxilo do álcool, etanol no caso dos ésteres etílicos e metanol nos ésteres metílicos (Jackson, 2014). Assim, nestas reações ocorre a libertação dos ácidos gordos e só depois estes podem reagir com os esqueletos de glicerol, o que pode ter tornado a reação mais lenta e originado rendimentos menores durante o tempo de reação analisado. É importante dizer que nestes casos analisou-se o consumo dos ésteres, que são inicialmente hidrolisados, e não o consumo dos ácidos gordos livres que deles resultam. Possivelmente, se tivéssemos em conta o consumo de ácidos gordos livres poderíamos ter encontrado um menor consumo ao verificado para os ésteres, o que explicaria a menor produção de TAG.

Comparando a utilização do ácido cáprico e o seu respetivo éster etílico, obtiveram-se rendimentos inferiores com FAEE-C10 no óleo bruto (40,8% (m/m)) e no óleo descorado (42,2% (m/m)). A utilização dos ésteres etílicos e metílicos na produção de lípidos estruturados origina um produto secundário que teria de ser eliminado posteriormente, o etanol ou o metanol (Jackson, 2014). A utilização de ésteres metílicos não é interessante no caso de lípidos estruturados destinados ao consumo humano dado que o metanol apesar de estar presente em pequenas quantidades em algumas bebidas alcoólicas, é considerado tóxico para os humanos (McMartin *et al.*, 1980; Paine & Davan, 2001). Já o etanol é considerado seguro e mais interessante para a indústria alimentar (Dawidowicz & Olszowy, 2013).

A ausência de padrões TAG mistos no laboratório não permite a identificação dos TAG formados através do t_r associado. Além disso, não foi possível estudar a distribuição regioespecífica dos ácidos gordos nos lípidos estruturados. Assim, os novos picos que representam novos TAG formados ao fim de um tempo t de acidólise podem resultar da esterificação de outros ácidos gordos presentes na composição do óleo de bagaço de azeitona e não dos ácidos gordos de cadeia média fornecidos. Não podemos afirmar que o rendimento obtido corresponda a triacilgliceróis dietéticos MLM, dado não termos conhecimento da distribuição dos ácidos gordos no esqueleto de glicerol e se houve a capacidade de manter o ácido gordo de cadeia longa na posição *sn*-2 da molécula de TAG. Para obter esta informação seria necessário proceder a uma separação da fração dos TAG por cromatografia em camada fina (TLC); recuperar a fração mencionada da placa de TLC; hidrolisar os TAG por ação catalítica da lipase pancreática; separar a fração de *sn*-2 MAG por TLC e proceder à sua metilação e quantificação na forma de FAME (Ferreira-Dias *et al.*, 2018).

Sabe-se que a lipase de *Rhizomucor miehei* apresenta seletividade para as ligações *sn*-1 e *sn*-3 (Ortiz *et al.*, 2019), ou seja, hidrolisa e origina a substituição dos ácidos gordos que ocupam estas posições, mantendo a composição da posição interna de TAG. Ainda assim, há a possibilidade de fenómenos de migração de grupos acilo no processo de produção de lípidos estruturados e formação de TAG indesejáveis (Kim & Akoh, 2005). A Novozym 435 é apresentada como uma lipase não específica ou de regioesletividade variável (*sn*-1,3 preferencial) que pode em algumas condições originar uma modificação aleatória da posição dos ácidos gordos nas moléculas de TAG (Akoh, 2005; Ortiz *et al.*, 2019). Contudo, para um sistema azeite virgem + C8:0/ C10:0; razão molar: 1:2, temperatura

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

a 45 °C e 5% de carga de enzima, a Novozym 435 comportou-se como uma lipase *sn*-1,3 regioselectiva (Nunes *et al.*, 2011). Este sistema é similar ao utilizado por Nunes *et al.* (2011) e por isso Novozym 435 poderá comportar-se de igual forma.

Se verificarmos a percentagem de novos TAG face ao total dos TAG do produto final com Lipozyme RM IM (Fig. 18), a diferença entre os resultados obtidos nos sistemas com C8:0 e C10:0 é muito menor do que o observado no rendimento de formação de novos TAG. O produto final com menor percentagem de novos TAG em relação ao total de TAG presentes resulta do sistema com C8:0 e óleo descorado, 64,6%, e a maior percentagem corresponde ao sistema de C10:0 e óleo bruto, com 72,8% de novos TAG na sua composição total de TAG. O elevado valor de percentagem de novos TAG em relação aos TAG totais associado a C8:0 comparativamente aos rendimentos em novos TAG, demonstra que grande parte da sua composição em TAG corresponde a novos TAG, contudo pode também revelar que o total de TAG da amostra corresponde a uma quantidade baixa, o que faz com que os novos TAG representem uma grande fração destes. Assim, apesar do elevado consumo de C8:0 e de trioleína, estes são incorporados em acilgliceróis parciais.

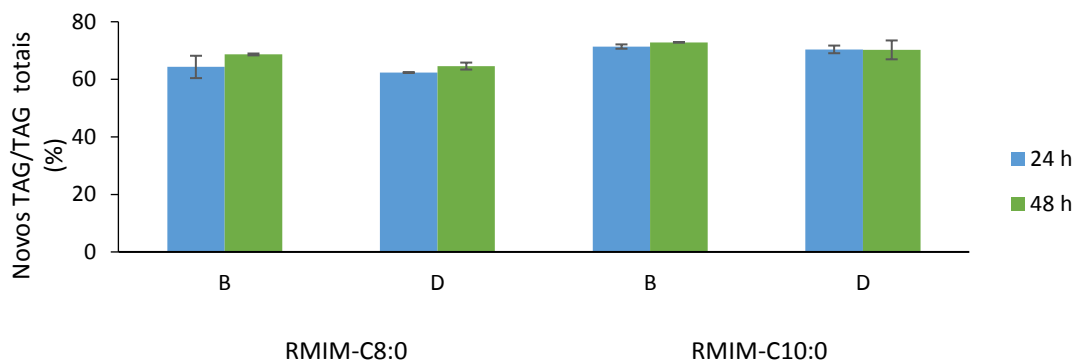


Figura 18- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela lipase Lipozyme RM IM, a 50°C

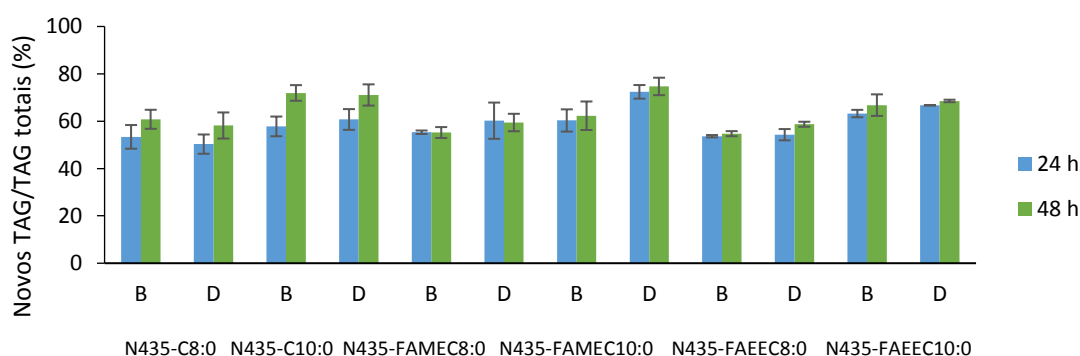


Figura 19- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise com ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) ou interesterificação com seus ésteres metílicos e etílicos catalisada pela lipase Novozym 435, a 50 °C

A percentagem de novos TAG em relação aos TAG totais associada aos ensaios com Novozym 435 (Fig. 19) revela uma diferença percentual entre os sistemas com ácido cáprico e caprílico superior

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

ao que acontece com Lipozyme RM IM. Ainda assim, o mesmo raciocínio poderá ser aplicado a esta enzima. A menor percentagem de novos TAG corresponde ao ensaio com óleo bruto e éster etílico de C8:0, mostrando que para o período de 48 h é vantajoso utilizar o ácido gordo livre. A maior fração de novos TAG foi conseguida pela utilização de FAME-C10:0 com óleo descorado (74,7%), às 48 h de ensaio. Este valor não justifica a sua utilização, dado que utilizando C10:0 com óleo bruto obtém-se 71,9% de novos TAG/TAG totais, com menor custo e dificuldades no processo relativas a descoloração do OBA e remoção do metanol resultante da hidrólise do éster metílico, um álcool não adequado para a produção alimentar (McMartin *et al.*, 1980; Paine & Davan, 2001; Antonopoulos *et al.*, 2006).

A temperatura é um dos vários fatores que condicionam a especificidade das lipases para o substrato e a sua atividade catalítica (Singh *et al.*, 2019). A Novozym 435 tem uma temperatura ótima entre 30 °C e 60 °C (Novozymes Biopharma DK A/S, 2014). Estudou-se qual o impacto do aumento de 10 °C de temperatura nas reações de acidólise enzimática com a lipase de *Candida antarctica*, mantendo as restantes condições da reação, nomeadamente, a razão molar e carga enzimática. Optou-se por realizar a acidólise de OBA bruto ou descorado com C8:0 ou C10:0, em duplicado (Fig.20).

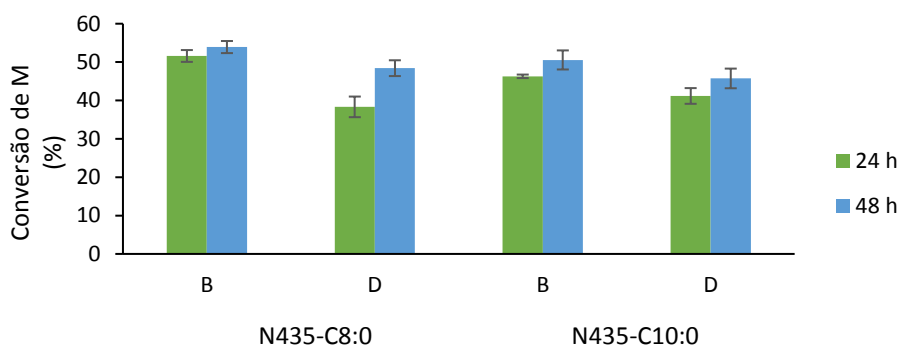


Figura 20- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante a acidólise de OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada pela Novozym 435, a 60 °C

Como aconteceu durante os ensaios de acidólise decorridos a 50°C, na figura 20 observa-se que ocorre maior conversão de C8:0 e quando é utilizado OBA B. O consumo de M foi superior no sistema C8:0- óleo B, ao fim de 48 h (53,9% (m/m)) enquanto a conversão de ácido cáprico foi de 50,6% (m/m). Comparativamente aos resultados a 50 °C, a maior variação verifica-se para o maior resultado e corresponde a um aumento de apenas 2%. Relativamente ao rendimento em TAG (% (m/m)) (Fig. 21), o rendimento de formação de novos TAG foi menor para o ensaio onde houve maior consumo do M que se pretendeu incorporar (C8:0-B), 27,9% (m/m), resultado inferior ao obtido a 50 °C. O aumento de temperatura provocou diferenças superiores ao nível do rendimento de novos TAG obtido com os dois diferentes óleos. Continuou-se a observar maior formação de novos TAG com o C10:0 como MCFA. Com o óleo D, obteve-se um rendimento de 53,5% (m/m), semelhante ao que aconteceu a uma temperatura inferior (53,6% (m/m)). Já com o óleo bruto, o rendimento foi de 42,9% (m/m), cerca de menos 10% do que foi conseguido a 50 °C. Ou seja, o aumento da temperatura da reação de acidólise catalisada por Novozym 435, foi desvantajoso quanto a rendimento em novos TAG quando se utilizou o OBA B.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

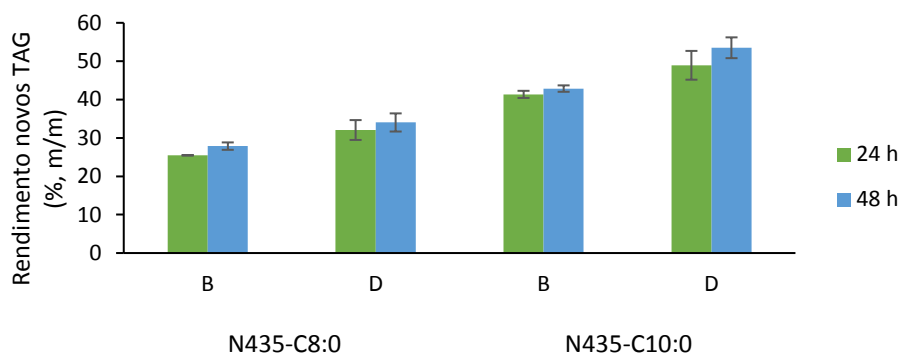


Figura 21- Rendimento em novos TAG (% m/m) obtidos por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada por Novozym 435, a 60 °C

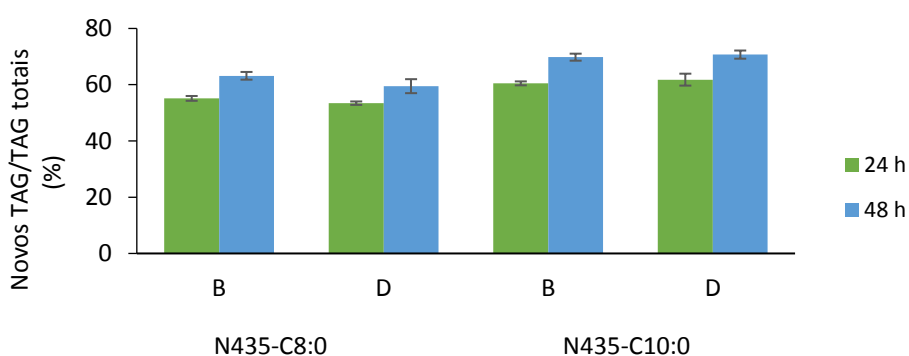


Figura 22- Novos TAG/TAG totais (%) obtidos por acidólise de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) com OBA bruto (B) ou após descoloração (D), catalisada por Novozym 435, a 60 °C

Analisando a composição em TAG das amostras finais, verifica-se que de igual forma houve uma maior fração de novos TAG nos ensaios com C10:0, mas as diferenças entre óleo B e D são reduzidas. Além disso, há uma maior aproximação entre os ensaios com os dois AGL (Fig. 22). Conclui-se que a utilização de Novozym 435 para produção de MLM a partir de OBA e ácidos gordos de cadeia média não foi beneficiada pelo aumento de temperatura.

4.7. Avaliação dos ensaios de acidólise enzimática catalisados por biocatalisadores imobilizados em laboratório

4.7.1. Avaliação de reações de acidólise enzimática por lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos a a_w 0,9

As seguintes figuras mostram a conversão de ácido caprílico ou cáprico obtida por acidólise com OBA bruto ou OBA descorado (Fig. 23 a e b), a 50 °C, com os biocatalisadores imobilizados em Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

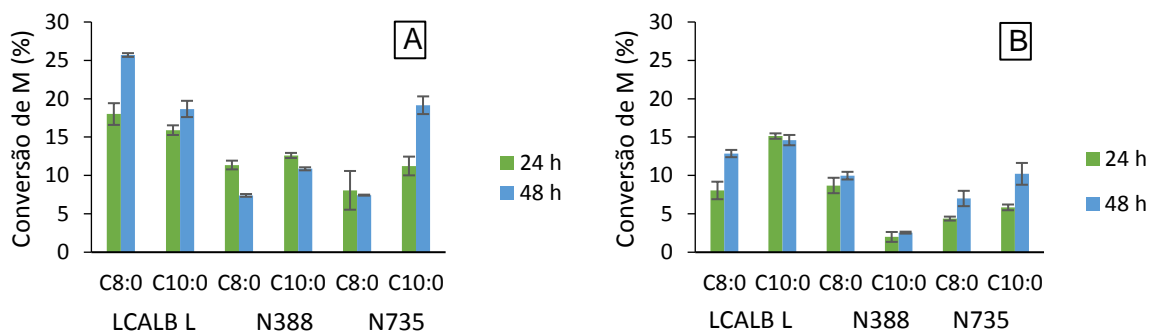


Figura 23- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA bruto (A) ou descorado (B), catalisada pelas lipases imobilizadas em Lewatit VP OC 1600

Analisando a conversão de M, nos sistemas com suporte Lewatit VP OC 1600, compreende-se que o grau de conversão foi menor do que o atingido com as preparações comerciais. O melhor resultado é conseguido pela acidólise de C8:0 e OBA B, catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (25,7%). Comparativamente à sua homóloga Novozym 435, existe uma diferença de 26,2%, o que significa que ocorreu cerca de metade da conversão de ácido caprílico. Utilizando a mesma lipase e C10:0, às 48 h ocorreu uma conversão de 18,7%. A lipase A, originária da mesma espécie, permitiu converter 19,2% de C10:0.

Houve uma conversão superior quando se utilizou o óleo bruto, à exceção do sistema Novozym 388-C8:0 às 48 h, em que ambos os resultados não atingem os 10%. Para as reações catalisadas por esta lipase em OBA B, houve uma diminuição de conversão entre as 24 h e 48 h, indicando que os produtos formados podem ter sofrido hidrólise. Para OBA D, tal não se verificou. Para o óleo descorado, o resultado mais elevado corresponde à reação catalisada por Lipozyme CALB L, em presença de C10:0, obtendo às 24 h pouco mais de 15% de conversão. Lipozyme CALB L apresentou-se como a formulação com maior carga de proteína imobilizada e também maior atividade hidrolítica e, reúne no geral as conversões mais altas. Já a preparação Novozym 388 tem a menor carga proteica, o que explica as baixas conversões de C8:0 ou C10:0.

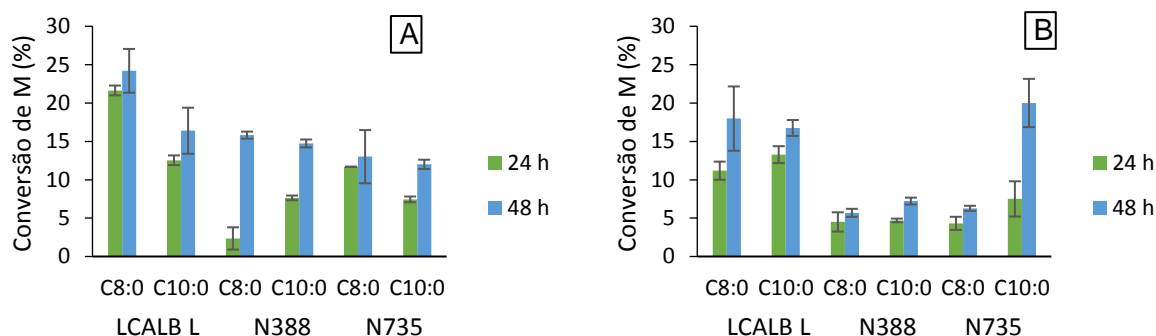


Figura 24- Conversão de ácido caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA bruto (A) ou descorado (B), catalisada pelas lipases imobilizadas em Accurel MP 1000

Quando em óleo bruto, os mesmos biocatalisadores imobilizados em Accurel MP 1000, apresentam de novo maior conversão na reação catalisada por Lipozyme CALB L no sistema C8:0-OBA B, com 24,2% ao fim de 48 h (Fig. 24a). Comparativamente a Novozym 435, há uma diferença de

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

conversão relativa menor do que 50% (46,6%). Com este suporte, voltou-se a verificar uma maior conversão quando o ácido cáprico foi utilizado, tal como acontecia com as lipases comerciais imobilizadas.

Comparando o grau de conversão atingido com os óleos B e D (Figura 24b), há no geral uma preferência pelo óleo bruto. O melhor resultado com o óleo D ocorreu na acidólise com C10:0, por ação de Novozym 735 (20,0%).

A conversão foi principalmente limitada para Novozym 388, quando se utilizou este óleo. Se quando em óleo bruto a enzima tinha a capacidade de converter apenas no máximo 1/3 do obtido por Lipozyme RM IM, a acidólise com óleo D sofreu uma diminuição de 87% e 82%, para C8:0 e C10:0 respetivamente. Não é possível distinguir uma tendência para um dos AGL utilizados.

Como verificado através da avaliação da atividade hidrolítica, diferentes amostras de um mesmo biocatalisador demonstraram grau de atividade distintos, possivelmente por diferentes condições de atividade da enzima no suporte. Podemos discutir que a concentração de substrato para os imobilizados pode ter criado um microambiente desfavorável para a atuação da enzima (Correia & Ferreira-Dias, 1998), que a atividade hidrolítica da enzima não é exata e ainda que revela que a atividade hidrolítica não é necessariamente semelhante à de interesterificação.

A utilização dos biocatalisadores líquidos imobilizados nos suportes hidrofóbicos resultou em rendimento em novos TAG baixos. Quando se utilizou óleo bruto, os biocatalisadores em Lewatit VP OC 1600 não permitiram obter rendimentos acima dos 10% (Fig. 25a).

A lipase Novozym 735 gerou um rendimento de 7,5% quando catalisou a acidólise com C10:0, sendo este o melhor resultado. A Novozym 388 continuou a revelar uma capacidade quase inexistente na catálise da acidólise, provavelmente devido à baixa carga proteica presente no biocatalisador. Quando em óleo descorado, apenas a lipase Novozym 735 apresentou alguma atividade quando catalisou a substituição por C8:0, com rendimento de 10,3% às 48 h (Fig. 25b). As restantes lipases geraram rendimentos em novos TAG abaixo de 1%.

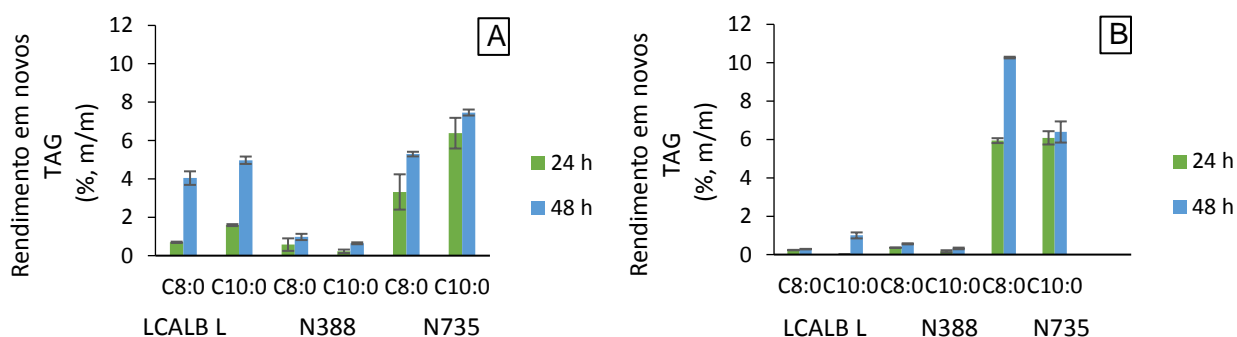


Figura 25- Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) com OBA bruto (A) ou descorado (B) catalisada pelas lipases imobilizadas em Lewatit VP OC 1600

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

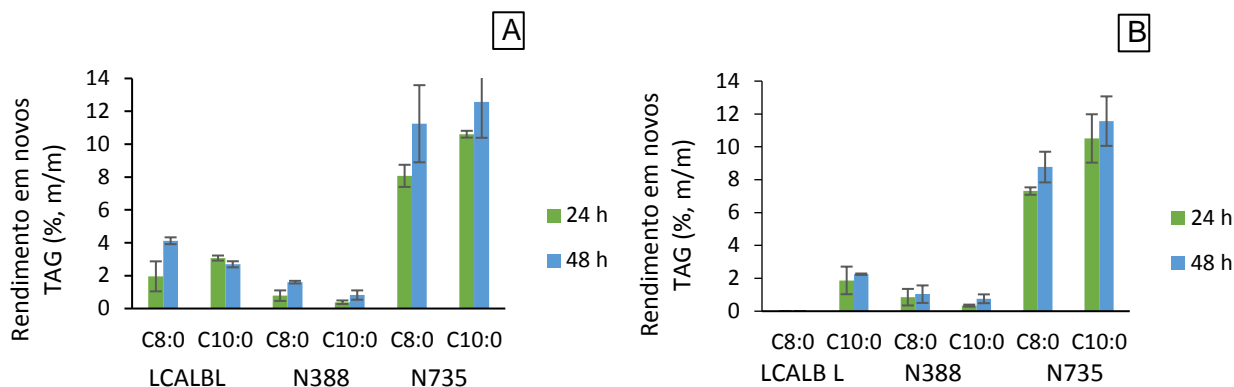


Figura 26-Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) com OBA bruto (A) ou descorado (B) catalisada pelas lipases imobilizadas em Accurel MP 1000

Nos ensaios associados com lipases imobilizadas em Accurel MP 1000, continuou a haver melhor performance por parte de Novozym 735 (Fig. 26a). Com óleo bruto, foi possível obter 11,3% (m/m) e 12,6% (m/m) de novos TAG, com C8:0 e C10:0, respetivamente. Com o óleo descorado os rendimentos foram de 8,8% (m/m) e 11,6% (m/m) para os dois AGL discriminados anteriormente (Fig.26b).

Dado que as lipases utilizadas para a imobilização em laboratório são similares às lipases comerciais utilizadas nos primeiros ensaios, o insucesso no processo das acidólises não resulta da sua atividade natural (Al-Zuhair, 2007). Ou seja, a atividade das lipases foi influenciada pelo processo de imobilização desenvolvido, pelas baixas cargas de proteína imobilizada e, principalmente, a_w elevada. A melhor performance gerada pela Novozym 735 pode resultar da sua atividade como aciltransferase, num meio com elevada atividade de água (Patkar *et al.*, 1993; Høegh *et al.*, 1995; Pfeffer, 2006).

Os resultados de percentagem de novos TAG na composição em TAG das amostras finais são semelhantes aos rendimentos em novos TAG obtidos.

De facto, o método de imobilização utilizado referido por Bule (2014), foi utilizado para a imobilização lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, que segundo Osório *et al.*(2009) quando a a_w de 0,97, tem uma atividade de interestificação semelhante à das lipases comerciais a a_w de 0,5. Para o presente trabalho é aconselhável utilizar lipases com a_w entre 0,2 e 0,5 (Osório *et al.*, 2009).

4.7.2. Avaliação de reações de acidólise enzimática catalisadas por lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos a a_w 0,75

Tendo em conta a atividade da água de Novozym 435, procedeu-se à diminuição de a_w para 0,75, submetendo os biocatalisadores no suporte Lewatit VP OC 1600 a uma atmosfera de NaCl saturada. Os ensaios decorreram apenas com óleo bruto, dado não terem sido demonstradas benefícios na utilização do óleo D. Utilizou-se a Lipozyme CALB L imobilizada em Lewatit VP OC 1600 como catalisador de acidólise com C10:0. No caso de Novozym 388, optou-se pelo ácido caprílico e Novozym 735 catalisou a acidólise com ambos os ácidos gordos. A escolha dos M utilizados deveu-se

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

aos rendimentos verificados a $a_w \approx 0,9$, em que os melhores resultados corresponderam aos de Novozym 735 e, para as outras lipases, um maior rendimento para os M seleccionados.

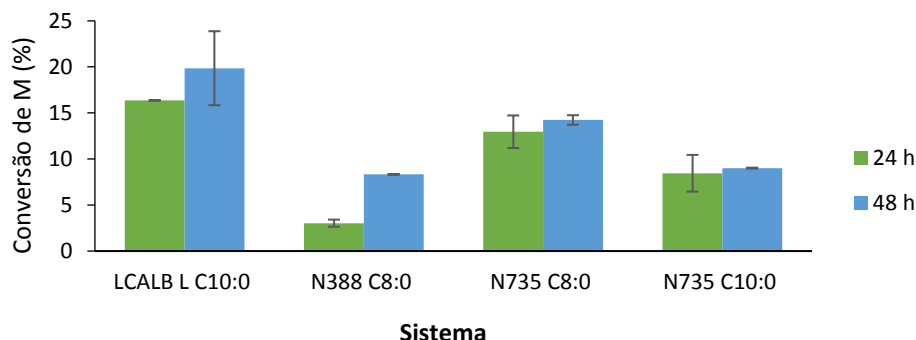


Figura 27-Conversão de ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) durante acidólise com OBA B nos sistemas seleccionados em Lewatit VP OC 1600

A diminuição de a_w não resultou no aumento da conversão de ácido caprílico ou cáprico (Fig. 27). O sistema Lipozyme CALB L-C10:0 revelou um aumento de apenas 1,2 % face ao mesmo sistema com a_w semelhante a 1, às 48 h. Com a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada os resultados foram semelhantes aos obtidos quando se utilizou o biocatalisador em Lewatit VP OC 1600, a a_w de 0,9.

A pobre conversão dos compostos que se pretendeu que integrassem os lípidos estruturados MLM originou rendimentos em novos TAG limitados (Fig. 28). O rendimento mais elevado resultou de novo de uma reação com C10:0, catalisada por Novozym 735 (7,5% (m/m)), um valor médio igual ao obtido a $a_w \approx 0,9$, com esta lipase imobilizada em Lewatit VP OC 1600.

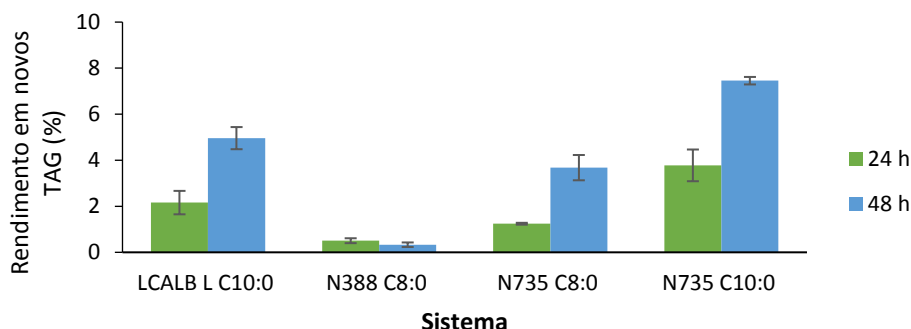


Figura 28-Rendimento em novos TAG (% m/m), por acidólise de ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) com OBA B nos sistemas seleccionados em Lewatit VP OC 1600

A diminuição de a_w de 0,9 para 0,75 não evidenciou benefícios em termos da acidólise para produção de MLM. O facto das restantes lipases serem beneficiadas por uma reduzida atividade de água faz com que fosse interessante utilizar em vez da solução saturada de NaCl, soluções que permitissem uma humidade relativa entre 0,2 e 0,5 como são os casos de CH_3COOK ($a_w=0,23$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0,33$), K_2CO_3 ($a_w=0,44$) ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0,52$) (Mathlouthi, 2001).

5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No trabalho desenvolvido no âmbito da presente dissertação, estudou-se a possibilidade da utilização do óleo de bagaço de azeitona bruto na produção de lípidos dietéticos MLM. Este resulta de um subproduto da fileira do azeite de baixo custo, permitindo valorizar um óleo que só é apto para consumo humano após refinação.

A produção dos lípidos dietéticos foi realizada por acidólise de óleo de bagaço de azeitona bruto com os ácidos gordos de cadeia média caprílico e cáprico, catalisadas por uma lipase *sn*-1,3-seletiva de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e de seletividade variável de *Candida antarctica* B (Novozym 435). Os ensaios ocorreram em descontinuo, em meio livre de solvente, durante o período de 48 h, numa razão molar TAG:M de 1:2 e a 50 °C. De modo a avaliar a influência do teor de pigmentos na atividade catalítica das lipases comparou-se o rendimento em novos TAG obtido a partir de óleo bruto e após remoção de 99% dos pigmentos clorofilinos com terras ativadas.

Ambas as lipases revelaram uma preferência por C10:0: a reação catalisada por Novozym 435, após 48 h, atingiu um rendimento em novos TAG (% m/m) de 52,5% (m/m) e 53,6% (m/m) para os sistemas com C10:0 e OBA B e OBA D, respetivamente. No caso de Lipozyme RM IM o equilíbrio da reação ocorreu até às 24 h, em que se obteve maior rendimento em TAG na acidólise de C10:0 de 56,6% (m/m) e 48,7% (m/m), com o óleo B e D, respetivamente. Como tal, a concentração de pigmentos clorofilinos não afetou o comportamento enzimático e não é necessária a sua extração.

Avaliou-se o efeito do aumento de temperatura (50 °C vs. 60 °C) das reações catalisada por Novozym 435 e a possibilidade de utilização dos ésteres metílicos e etílicos de C8:0 e C10:0 como dadores de grupo acilo. O aumento de temperatura e a substituição da fonte de ácidos gordos livres não apresentou vantagens dado que não houve aumento do rendimento em novos TAG e os resultados obtidos com os ésteres metílicos não são interessantes na indústria alimentar, devido à libertação de metanol.

Imobilizaram-se em suportes hidrofóbicos enzimas comerciais líquidas como a lipase de *Rhizomucor miehei* (Novozym 388) e as lipases B e A de *Candida antarctica* (Lipozyme CALB L e Novozym 735), análogas às enzimas comerciais utilizadas.

O rendimento em imobilização da proteína foi elevado para as lipases de *Candida antarctica*: 82,7% para Lewatit VP OC 1600-Lipozyme CALB L, 87,7% para Lewatit VP OC 1600-Novozym 735, 91,2% para Accurel MP 1000-Lipozyme CALB L e 86,6%, no caso de Accurel MP 1000-Novozym 735. Contudo, o rendimento em atividade hidrolítica rondou os 16% para Lipozyme CALB L, em ambos os suportes e os 7% para Novozym 735, em ambos os suportes. A imobilização de Novozym 388 garantiu um rendimento em proteína de 32,9% e 28,0%, quando imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e Accurel MP 1000, respetivamente, mas caracterizou-se como tendo maior atividade hidrolítica no caso de Accurel MP 1000 (42,8%). A fraca imobilização da proteína de Novozym 388 e a eventual alteração conformacional das lipases refletiu-se nos ensaios de acidólise. Além disso, a atividade da água elevada teve um papel inibitório na atividade enzimática, obtendo-se um rendimento máximo em novos

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

TAG de 12,6%. A Novozym 735 destacou-se relativamente às restantes enzimas visto que a lipase A de *Candida antarctica* tem maior atividade de aciltransferase que as restantes lipases.

A uma a_w de 0,75, a atividade das lipases não foi beneficiada indicando que a a_w deve ser otimizada ou que a baixa catálise resulta numa imobilização inadequada ou que houve perda de atividade durante o armazenamento.

Concluiu-se que é possível o aproveitamento de óleo de bagaço de azeitona, sem necessidade de refinação, para a produção de lípidos dietéticos ricos em ácidos gordos monoinsaturados.

A presente dissertação cria a possibilidade de desenvolvimento de trabalhos futuros, para os quais são apontadas as seguintes sugestões:

- A continuação do estudo do aproveitamento de subprodutos para produção de lípidos de elevado valor acrescentado;
- Estudo da influência da acidez e presença de produtos de oxidação, utilizando amostras com concentrações crescentes de AGL e produtos de degradação no OBA;
- Avaliação da atividade de Novozym 735 como aciltransferase, ao longo da escala de a_w ;
- Desenvolvimento de um método que permita a identificação dos TAG produzidos e posições dos ácidos gordos no esqueleto de glicerol, como seja a utilização de um espetrómetro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso;
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* dos MLM produzidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCUREL® (2018). Technical Information Additive loading in ACCUREL® MP/XP porous polymer carriers. Acesso a 1 de outubro de 2018, em https://www.plastic-additives.com/product/break-thru/downloads/accurel-mp_xp-loading-procedure-0518.pdf
- Aires, C. (2007). *Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extração de azeite em solos agrícolas - Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas*. Tese para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Agronómica. Universidade Técnica da Lisboa, Lisboa.
- Akoh, C. C. (1995). *Structured Lipids – enzymatic approach. Inform 6*.
- Akoh, C. C. (1998). Structured lipids. In C. C. Akoh & D. B. Min (Eds.), *Food Lipids chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 699–727). New York: Marcel Dekker Inc.
- Akoh, C. C. (2005). Enzymatic Modification of Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals. In *Handbook of Functional Lipids* (pp. 437–457). CRC Press.
- Al-Zuhair, S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges – Review. *Biofuels, Bioprod and Bioref*, 1, 57–66.
- Alcaide, E. M., García, I. M., & Ruiz, D. R. Y. (2010). Los subproductos del olivar en la alimentación de rumiantes. *Portal Veterinaria Albeitar*, 140, 32–34.
- Alves, M. D., Aracri, F. M., Cren, É. C., & Mendes, A. (2016). Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, 311.
- Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., & Siragakis, G. (2006). Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas y Aceites*, 57(1), 56–67.
- APA-PE. (2012). Olive Oil Reference Book. Disponível em: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/APP_Olive_Oil_Reference_Book.pdf
- Aparicio, R., & Harwood, J. (2013). *Handbook of olive oil: Analysis and properties. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (2^o Edition). New York: Springer Science.
- Appel, L. J. (2017). Diet and Blood Pressure. In G. L. Bakris & M. Sorrentino (Eds.), *Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease* (pp. 201–210). Elsevier.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6).
- Asano, Y., Babich, L., Ponzano, B. C., Díaz-Rodríguez, A., & Bertau, M. (2015). *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis*. Thieme.
- Ashwell, M. (2002). *Concepts of Functional Foods*. Brussels: International Life Sciences Institute.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1986). Applied enzyme catalysis. In K. Verma & C. C. Martin (Eds.), *Biochemical Engineering Fundamentals* (p.157-227). McGraw-Hill International Editions.
- Balcão, V. M., Paiva, A. L., & Xavier Malcata, F. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 392–416.
- Bassan, N., Oliveira, C. G., Santaella, N., Monti, R., & Paula, A. V. (2016). Determinação de pH e temperatura de melhor atividade para Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) em óleo de semente de uva (*Vitis sp*). In X CIGR Section IV International Technical Symposium, Gramado, RS, 24 a 27 de outubro.(pp.1-5).
- Basu, H., Pernecky, S., Sengupta, A., & Liepa, G. U. (2006). Coronary heart disease: how do the benefits of w-3 fatty acids compare with those of aspirin, alcohol/red wine, and statin drugs? *J. Am. OilChem. Soc.*, 83, 985–997.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Lercker, G. (2010). Olive Oil Stability of the Sensory Quality of Virgin Olive Oil During Storage an Overview. *Italian Food e Beverage Technology -LX*.
- Berger, T. A. (1996). Separation of a gasoline on an open tubular column with 1.3 million effective plates. *Chromatographia*, 42(1–2), 63–71.
- Bermejo, S., Ventura, C., Ribeiro, M., Henriques, M., & Laranjeira, C. (2014). *Óleos alimentares usados: caracterização físico-química para selecção de indicadores de degradação de qualidade e de melhores práticas laboratoriais disponíveis*. Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém, Portugal.
- Berry, S.(2009). Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: An overview and implications for cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, 22(1), 3–17.
- Birsoy, K., Festuccia, W. T., & Laplante, M. (2013). A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126(7), 1541–1552.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Brenneis, R., Baeck, B., & Kley, G. (2004). Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Britton, G. (1983). *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press.
- Brouns, F., & van der Vusse, G. J. (1998). Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints. *British Journal of Nutrition*, 79(2), 117–128.
- Bruscatto, M. H., Zambiasi, R. C., Crizel-Cardoso, M., Piatnicki, C. M. S., Mendonça, C. R. B., Dutra, F. L. G., & Coutinho, E. F. (2017). Chemical characterization and oxidative stability of olive oils

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

extracted from olive trees of Southern Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52, 1231–1240.

Bule, M. J. (2014). *Produção de biodiesel por catálise enzimática, em sistemas descontínuo e contínuo, a partir de óleo de cardo*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Caballero, E., Soto, C., Olivares, A., & Altamirano, C. (2014). Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilised lipases. *PLoS ONE*, 9(9).

Camacho Paez, B., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., Esteban Cerdán, L., & Molina Grima, E. (2003). Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(4), 461–470.

Cambou, B., & Klibanov, A. M. (1984). Preparative Production of Optically Active Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media. *Journal of the American Chemical Society*, 106(9), 2687–2692.

Campos, L. (2005). *Entender a bioquímica, 5ª edição. Entender A Bioquímica, 5ª Edição*. Lisboa: Escolar Editora.

Carey, F. (2000). Lipids. In *Organic chemistry* (pp. 1015). University of Virginia: McGraw-Hill.

Carlier, H., Bernard, A., & Caselli, C. (1991). Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction, Nutrition, Development*, 31(5), 475–500.

Carrín, M. E., & Crapiste, G. H. (2008). Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture. *Journal of Food Engineering*, 84, 243-249

Carvalho, N. B., Lima, Á. S., & Soares, C. M. F. (2015). Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*.

Casas-Godoy, L., Marty, A., Sandoval, G., & Ferreira-Dias, S. (2013). Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 20–27.

Castro, A. (2003). *Ciência e tecnologia: A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos*. Portugal: tipografia tadinense. Instituto Piaget.

Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP) (2000). *Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive*. Barcelona, Espanha. Disponível em: [www.cprac.org > docs > oli_fr](http://www.cprac.org/docs/oli_fr)

Chang, R., & Goldsby, K. (2013). *Química* (11ª Ed.). McGraw Hill.

Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2013). Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 35–56.

Cheong, L., Guo, Z., Lue, B.M., Miklos, R., Song, S., Panpipat, W., & Xu, X. (2012). 2 - Surface active

- lipids as encapsulation agents and delivery vehicles. In *Lipids in Nanotechnology* (pp. 15–51). AOCS Press.
- Christensen, M. S., Hoy, C. E., Becker, C. C., & Redgrave, T. G. (1995). Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: Dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *American Journal of Clinical Nutrition*, *61*(1), 56–61.
- COI. (2018). MARKET NEWSLETTER - SEPTEMBER 2018. COI. Disponível em <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/698-year-2018-news/1165-market-newsletter-september-2018>
- Colleone, V. V. (2002). Aplicações clínicas dos ácidos graxos de cadeia média. In R. Curi, C. Pompéia, C. K. Miyasaka, & J. Procopio (Eds.), *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. (pp. 439–454). São Paulo: Manole.
- Correia, A. C., & Ferreira-Dias, S. (1998). The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. In A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra, & P.J. Halling (Eds.), *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (pp. 71-76.). Amsterdam: Elsevier Science.
- Costa, C. M., Osório, N. M., Canet, A., Rivera, I., Sandoval, G., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2018). Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *120*(1).
- Costa, H. C. B., Romão, B. B., Ribeiro, E. J., & Miriam, M. (2013). Glutaraldehyde Effect in the Immobilization Process of Alpha-Galactosidase from *Aspergillus niger* in the Ion Exchange Resin Duolite A-568. *Chemical Engineering Transactions*, *32*, 1105–1110.
- Davis, E. M., & Davis, R. J. (2003). Chapter 1-The Basics of Reaction Kinetics for Chemical Reaction Engineering. In S. Jeans, S. & M. Larkovic (Eds.), *Fundamentals of Chemical Reaction Engineering* (p. 41). New York: McGraw-Hill.
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2013). The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *European Food Research and Technology*, *236*(6), 1099–1105.
- Decker, E. A. (1996). The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition. *Nutrition Reviews*, *54*(4 Pt 1), 108–110.
- Decombaz, J., Arnaud, M. J., Milon, H., Moesch, H., Philippossian, G., Thelin, A. L., & Howald, H. (1983). Energy metabolism of medium-chain triglycerides versus carbohydrates during exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *52*(1), 9–14.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, *48*(10), 1532–

1552.

- DiNicolantonio, J. J., & O'Keefe, J. H. (2018). Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. *Open Heart*, 5(2), e000946.
- Dodge, J. A., Richardson, T. I., & Wallace, O. B. (2006). Endocrine modulating agents. In J.B. Taylor & D. J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (Vol. 7, pp. 149–181). Oxford: Elsevier.
- Doran, P. M. (1996). *Bioprocess Engineering Principles* (Edições Ha). London: Academic Press.
- Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., & Přenosil, J. E. (2003). *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, 2nd edition. Weinheim: Wiley-VCH.
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), 2–3.
- Erickson, M. C. (2002). Chemistry and Function of Phospholipids. In Casimir C Akoh e D. B. Min (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Second Edition). New York: Marcel Dekker Inc.
- Erickson, M. D. (1995). Chapter 16 – Interesterification. In D. R. Erickson (Ed.), *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization* (pp. 277–296). AOCS Press and United Soybean
- Escolar, D., Haro, M., Ayuso, J., & Ruíz, A. (1997). Propuesta de un nuevo metodo rápido y preciso para determinar el color del aceite de oliva virgen. Jaen, Spain.: Expoliva'97.
- Eskin, M., & Shahidi, F. (2015). *Bioquímica de Alimentos*. Elsevier Editora Ltda.
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648–656.
- Faria, E. A., Leles, M. I. G., Ionashiro, M., Zuppa, T. O., & Antoniosi Filho, N. R. (2002). Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. *Eclética Química*, 27, 111–119.
- Faust, S. D., & Aly, O. M. (1987). Adsorption processes for water treatment. Stoneham, Massachusetts, USA: Butterworth Publishers, Ltd.
- Feltes, M. M. C., Oliveira Pitol, L., Correia, J. F. G., Grimaldi, R., Blockc, J. M., & Ninow, J. L. (2009). Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. *Grasas y Aceites*, 60(2), 168–176.
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos. Química de los alimentos* (2ª ed.). Zaragoza: Acríbia.
- Fernández Díez, M. J., & Garrido Fernández, A. (1971). Ripe Black Olives. I. Colour as a criterion for maturity in fresh fruits and in the final product. *Grasas y Aceites*, 22, 193–199.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Ferreira-Dias, S., & Fonseca, M. M. R. (1995). Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: effect of the water activity. *Bioprocess Engineering*, 12(6), 327–337.
- Ferreira-Dias, S. (2010). Enzymatic production of functional fats. In *Food Fermentation Biotechnology* (Vol. 2, pp. 981–1014).
- Ferreira-Dias, S., Osório, N. M., Rodrigues, J., & Tecelão, C. (2019). Structured Lipids for Foods. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 357–369). Elsevier.
- Ferreira-Dias, S., Osório, N., & Tecelão, C. (2018). Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Lipids at Laboratory Scale: Methods and Protocols. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 1835, pp. 315–336).
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., & Valero, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3).
- Figueiredo, F., Castanheira, É., Marques, P., Ramos, A., Almeida, A., Ramalhosa, E. & Freire, F. (2014). *Avaliação de Ciclo de Vida do Azeite e Óleos Vegetais*. Disponível em: http://www2.dem.uc.pt/CenterIndustrialEcology/projects/Outputs%20Ecodeep/Relatorios/Ecodeep_relatorio%20fileira%20azeite%20e%20oleos%20vegetais.pdf
- Freire, F., Figueiredo, A., & Ferrão, P. (2001). Modelling high temperature, thin layer, drying kinetics of olive bagasse. *Journal of Agricultural and Engineering Research*, 78(4), 397–406.
- Freitas, M. (2007). *Avaliação do potencial energético dos resíduos sólidos dos lagares do Alentejo*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Olivicultura, Azeite e Azeitona de Mesa. Instituto Superior de Agronomiam, Universidade de Lisboa.
- Galanakis, C. (2019). *Lipids and Edible Oils: Properties, Processing and Applications*. Academic Press.
- Gariso, S. (2011). *Estudo do Efeito de Reutilizações Sucessivas de Óleos de Fritura sobre Parâmetros de Qualidade*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar, Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém.
- Giese, J. (1996). *Fats, Oils and Fat Replacers. Special Report*.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: Chemistry and occurrences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 678–690.
- Goldberg, I. (2012). *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Springer US.
- Goli, S. A. H., Kadivar, M., Keramat, J., & Fazilati, M. (2008). Conjugated linoleic acid (CLA) production and lipase-catalyzed interesterification of purified CLA with canola oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 400–404.
- Gomes, T., & Caponio, F. (1997). Evaluation of the State of Oxidation of Crude Olive-Pomace Oils. Influence of Olive-Pomace Drying and Oil Extraction with Solvent. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 45(4), 1381–1384.

Guillén, M., Benaiges, M. D., & Valero, F. (2011). Immobilization and stability of a *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*: Comparison between native and recombinant variants. *Biotechnology Progress*, 27(5), 1232–1241.

Guilliams, T. G. (2000). Fatty Acids: essencial therapeutic. *The Standard*, 3, 1–8.

Gunstone, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1535–1549.

Gunstone, F. D. (2006). *Modifying lipids for use in food. Modifying Lipids for Use in Food*. Cambridge, UK: Published by Woodhead Publishing Limited.

Gupta, R., Rathi, P., & Bradoo, S. (2003). Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 635–644.

Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8(12), 1881–1887.

Halling, P. J., Finney, J. L., Ho, M. W., Franks, F., & Littlechild, J. A. (2004). What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 359, pp. 1287–1297).

Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1–2), 7–20.

Harper, C. R., Edwards, M. J., DeFilippis, A. P., & Jacobson, T. A. (2006). Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 83–87.

Hasselmann, M., & Kummerlen, C. (1998). Les lipides intraveineux: Aspects qualitatifs. *Nutrition Clinique et Metabolisme*, 12(1 SUPPL.), 117–126.

Helland, I. B., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O. D., & Drevon, C. A. (2003). Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*, 111(1), e30–e99.

Hernell, O., & Bläckberg, L. (1982). Digestion of human milk lipids: Physiologic significance of sn-2 monoacylglycerol hydrolysis by bile salt-stimulated lipase. *Pediatric Research*, 16(10), 882–885.

Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2003). Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Recent advances and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 14(12), 499–506.

Hinojosa, A. R., & Méndez, M. V. R. (2004). Orujos de dos fases almacenados en balsas. *Grasas y Aceites*, 55(3), 251–258.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Høegh, I., Patkar, S., Halkier, T., & Hansen, M. T. (1995). Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botany*, *73*, S869–S875.
- Holm, H. C., & Cowan, D. (2008). The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Holman, R. T. (1961). How essential are fatty acids? *JAMA*, *178*, 930–933.
- Howlett, J. (2008). *Functional Foods: From science to health and claims*. Brussels, Belgium: International Life Sciences Institute, ILSI Europe.
- Huang, K. H., & Akoh, C. C. (1996). Enzymatic synthesis of structured lipids: Transesterification of triolein and caprylic acid ethyl ester. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*(2), 245–250.
- IPES-Food. (2017). What makes urban food policy happen? Insights from five case studies. Disponível em http://www.ipes-food.org/images/Reports/Cities_full.pdf
- Minguez-Mosquera, M., & Lourdes, G. G. (1995). Anomalous transformation of chloroplastic pigments in gordal variety olives during processing for table olives. *Journal of Food Protection*, *58*(11), 1241–1248.
- Jackson, R. S. (2014). 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine. In R.S. Jackson (Ed.), *Wine Science (Fourth Edition)* (pp. 347–426). San Diego: Academic Press.
- Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., Madhavi, D. L., Rajalakshmi, D., & Narasimhan. (1996). In D. L. Madhevi, S. S. Deshpande, D. L. Salunkhe (Eds.), *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* (p. 5). New York: Marcel Dekker Inc.
- Jandacek, R. J., Whiteside, J. A., Holcombe, B. N., Volpenhein, R. A., & Taulbee, J. D. (1987). The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. *American Journal of Clinical Nutrition*, *45*(5), 940–945.
- Jenkins, D. J. A., Chiavaroli, L., Wong, J. M. W., Kendall, C., Lewis, G. F., Vidgen & E. Lamarche, B. (2010). Adding monounsaturated fatty acids to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne*, *182*(18), 1961–1967.
- Jennings, B. H., & Akoh, C. C. (1999). Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*(10), 1133–1137.
- Jennings, B. H., & Akoh, C. C. (2000). Lipase-Catalyzed Modification of Rice Bran Oil To Incorporate Capric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(9), 4439–4443.
- Jennings, B. H., & Akoh, C. C. (2001). Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. *Food Chemistry*, *72*(3), 273–278.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Jensen, M. M., Christensen, M. S., & Høy, C. E. (1994). Intestinal absorption of octanoic, decanoic, and linoleic acids: Effect of triglyceride structure. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38(2), 104–116.
- Jensen, R. (1992). Lipids in Human Milk and Infant Formulas. *Annual Review of Nutrition*, 12(1), 417–441.
- Jeukendrup, A. E., Saris, W. H., & Wagenmakers, A. J. (1998a). Fat metabolism during exercise: a review--part II: regulation of metabolism and the effects of training. *International Journal of Sports Medicine*, 19(5), 293–302.
- Jeukendrup, A. E., Saris, W. H., & Wagenmakers, A. J. (1998b). Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *International Journal of Sports Medicine*, 19(4), 231–244.
- Kardash, E., & Tur'yan, Y. I. (2005). Acid value determination in vegetable oils by indirect titration in aqueous-alcohol media. *Croatica Chemica Acta*, 78(1), 99–103.
- Karleskind, A. (1996). *Oils e Fats Manual- a comprehensive treatise* (Vol 1). New Jersey: Lavoisier Publishing Inc.
- Kim, B. H., & Akoh, C. C. (2005). Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: Optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8033–8037.
- Kim, H. B., & Akoh, C. C. (2006). Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5132–5141.
- Kiril Mert, B., Yonar, T., Yalili Kiliç, M., & Kestioğlu, K. (2010). Pre-treatment studies on olive oil mill effluent using physicochemical, Fenton and Fenton-like oxidations processes. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1–3), 122–128.
- Kiritsakis, A. K. (1992). *El aceite de oliva*. A.Madrid Vicente.
- Kiritsakis, A., & Markakis, P. (1988). Olive Oil: A Review. *Advances in Food Research*, 31(C), 453–482.
- Knezevic, Z., Siler-Marinkovic, S., & Mojovic, L. (2004). Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta Periodica Technologica*, (35), 151–164.
- Konishi, H., Neff, W. E., & Mounts, T. L. (1993). Chemical interesterification with regioselectivity for edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(4), 411–415.
- Koplík, R. (2013). Ultraviolet and visible spectrometry Theoretical overview.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139.
- Kresge, N., D. Simoni, R., & L. Hill, R. (2010). JBC Historical Perspectives: Lipid Biochemistry. *The*

Journal of Biochemistry, H1.

- Kubow, S. (1990). Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology*. Vol 1. pp.1-163. Cambridge.
- Kubow, S. (1996). The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(10), 530–541.
- Laane, C., Boeren, S., & Vos, K. (1985). On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends in Biotechnology*.
- Laboratório de Estudos Técnicos (LET-ISA). (2017) Folha de Resultados-Triglicéridos com Propionitrilo. Documento disponibilizado internamente. Lisboa.
- Lapcikova, B., Valenta, T., Lapcik, L., & Fuksová, M. (2018). Thermal aging of edible oils: Spectrophotometric study. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12, 372–378.
- Lee, J. H., & Lee, K. T. (2006). Structured lipids production. In C. C. Akoh (Ed.), *Handbook of Functional Lipids* (pp. 489–512). USA: CRC Press.
- Lee, K. T., & Akoh, C. C. (1998). Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 495–499.
- Lindon, J. C., Tranter, G. E., & Koppenaal, D. (2016). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed.). Academic Press.
- Lísa, M., & Holčapek, M. (2008). Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1198–1199(1–2), 115–130.
- Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier.
- Liu, K. J., Chang, H. M., & Liu, K. M. (2007). Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. *Food Chemistry*, 100(4), 1303–1311.
- Lumor, S. E., & Akoh, C. C. (2005). Incorporation of γ -linolenic and linoleic acids into a palm kernel oil/palm olein blend. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(7–8), 447–454.
- Macrae, A. R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(2), 291–294.
- Madalozzo, A. D. (2011). *Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de Rhizopus oryzae*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP). (2007). *Olivicultura – Diagnóstico sectorial*.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., & Amundson, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.
- Marangoni, A., & Rousseau, D. (2002). The Effects of Interesterification on the Physical Properties of Fats. In A. D. Marangoni & S. S. Narine(Eds.), *Physical Properties of Lipids* (pp. 479–564). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Marques, C. (2015). *Análise comparativa de azeites virgem extra de vários DOP: caracterização reológica, físico-química e cromatográfica*. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
- Martin, A. J. P., & Synge, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, 35(12), 1358 LP – 1368.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463.
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12(7), 409–417.
- Mattson, F. H., & Jandacek, R. J. (1991). Distribution among tissues of intravenously administered sucrose octaoleate. *Lipids*, 26(9), 750–753.
- Mcardle, W., Katch, F., & Katch, V. (1999). *Sports e exercise nutrition*. (Wilkins, Ed.). USA: Lippincott.
- McGrady, J. (1993). Fats and Oils. *Presented at the IFT Short Course, "Ingredient Technology July 9-10*. Chicago.
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology 2nd ed. (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications,.
- Méndez, A. I., & Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18(5), 521–529.
- Mendoza, J., Casado, F., Gómez, M., Román, F., Moyano, M., Cert, A., Ruiz-Méndez, M. V. (1996). Características de los aceites de primera y segunda centrifugación. *Grasas y Aceites*, 47, 163–
- Menoncin, S., Domingues, N. M., Freire, D. M. G., Oliveira, J. V., Di Luccio, M., Treichel, H., & Oliveira, D. (2009). Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Food Science and Technology*, 29, 440–443.
- Miled, N., Beisson, F., Caro, J., Caro, A., Arondel, V., & Verger, R. (2001). Interfacial catalysis by lipases. In *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* (Vol. 11, pp. 165–171).

- Monteiro, C. A. (1996). A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. In D. C. Cyrillo (Ed.), *Delineamento da pesquisa na nutrição humana aplicada* (pp. 41–56). São Paulo, IPE/USP.
- Moral, P. S., & Méndez, M. V. R. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*, 57(1), 47–55.
- Morales-Medina, R., Munio, M., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2017). Development of an up-grading process to produce MLM structured lipids from sardine discards. *Food Chemistry*, 228, 634–642.
- Morales, M. A. & Przybylski, R. (2000). Olive Oil Oxidation. In R. Aparicio & J. Hardwood (Ed.), *Handbook of Olive Oil – Analysis and properties*. (pp. 459–490). Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Moreno, P., Medina, A. R., Rubio, F. C., Páez, B. C., & Grima, E. M. (2004). Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: Analysis of three different operation modes. *Biotechnology Progress*, 20(4), 1044–1052.
- Moretto, E., & Fett, R. (1998). *Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais*. São Paulo: Varela.
- Moretto, E., Fett, R., Gonzaga, L. V., & Kuskoski, E. M. (2002). *Introdução à ciência de alimentos*. (E. da UFSC, Ed.) (1.ed.). Florianópolis.
- Moyano, M. J., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2010). The color of olive oils: The pigments and their likely health benefits and visual and instrumental methods of analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Mu, H., & Høy, C. E. (2001). Intestinal absorption of specific structured triacylglycerols. *Journal of Lipid Research*, 42(5), 792–798.
- Mu, H., & Høy, C. E. (2000). Effects of different medium-chain fatty acids on intestinal absorption of structured triacylglycerols. *Lipids*, 35(1), 83–89.
- Nagelkerke, N. J. D. (1991). A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*, 78(3), 691–692.
- Navarra, G., Cannas, M., D’Amico, M., Giacomazza, D., Militello, V., Vaccaro, L., & Leone, M. (2011). Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence. *Food Chemistry*, 126(3), 1226–1231.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). *Olive processing waste management. Literature review and patent survey* (2nd Ed). Elsevier.
- Nicklas, T. A., Hampl, J. S., Taylor, C. A., Thompson, V. J., & Heird, W. C. (2004). Monounsaturated Fatty Acid Intake by Children and Adults: Temporal Trends and Demographic Differences. *Nutrition Reviews*, 62(4), 132–141.
- Norma Portuguesa NP-903. Gorduras e óleos comestíveis: determinação do índice de acidez e da acidez. Método titrimétrico (1987). Lisboa: CT39 (IQA). IPQ.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Norma Portuguesa NP-937. Gorduras e óleos comestíveis. Determinação da cor dos óleos e suas características cromáticas. (2ª edição) (1987). Lisboa: IPQ.
- Norma Portuguesa NP-970. Gorduras e Óleos Comestíveis. Absorvências no ultravioleta. (1986). Lisboa: CT39 (IQA). IPQ.
- Novozymes. (2016). Lipases for biocatalysis. Disponível em https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Lipases.pdf
- Novozymes Biopharma DK A/S. (2014). Immobilized lipases for biocatalysis.
- Norma Portuguesa NP EN 14105:2011 Derivados de óleos e gorduras Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) Determinação do teor de glicerol livre e total de mono-, di- e triglicéridos (método de referência). (2011).
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., & Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993–998.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Guillén, M., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2012). Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 265–268.
- O'Brien, R. D. (2009). *Fat and Oil: Formulating and Processing for Applications*. New York (3^o Edition). Boca Raton: CRC Press.
- Olimerca, R. (2019). Precios y mercado. Referencias de precios de aceites de oliva, aceites vegetales y derivados. Acessado a 4 de outubro de 2019. Disponível em <https://www.olimerca.com/precios/tipoInforme/1>
- Ortega, A., Palomar, J. M., Mata, J. E., Cruz, F., & Montoro, V. (2001). Automatic control of extractors. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 20, 139–149.
- Ortega, R. M. (2006). Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, 9, 1136-1140.
- Ortiz, C., Ferreira, M. L., Barbosa, O., dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.*, 9(10), 2380–2420.
- Osborn, H. T., & Akoh, C. C. (2002). Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 93–120.
- Osório, N. M., Fonseca, M., & Ferreira-Dias, S. (2006). Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(7), 545–553.
- Osório, N. M., Dubreucq, E., da Fonseca, M., & Ferreira-Dias, S. (2009). Lipase/acyltransferase-

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

catalysed interesterification of fat blends containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 120–134.

- Paine, A., & Davan, A. D. (2001). Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human e Experimental Toxicology*, 20(11), 563–568.
- Palomer, X., González-Clemente, J. M., Blanco-Vaca, F., & Mauricio, D. (2008). Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10(3), 185–197.
- Palou, A., & Bonet, M. L. (2007). 4 - Controlling lipogenesis and thermogenesis and the use of ergogenic aids for weight control. In W. C. Henry (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 58–103). Woodhead Publishing.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29 (Pt 2), 119–131.
- Patkar, S. A., Bjorking, F., Zundel, M., Schulein, M., Svendsen, A., Heldt Hansen, H. P., & Gormsen, E. (1993). Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 32(1), 76–80.
- Patricio, J. S., Hotza, D., & Noni Júnior, A. D. (2014). Argilas adsorventes aplicadas à clarificação de óleos vegetais. *Cerâmica*, 60(354), 171–178.
- Patterson, H. B. W. (1992). *Bleaching and Purifying Fats and Oils: Theory and Practice*. *Bleaching and Purifying Fats and Oils: Theory and Practice* (2nd Ed.). Urbana, EUA: American Oil Chemists' Society.
- Pêcego, J. G. (2014). *Implementação do Método Laboratorial de Determinação do Teor de Clorofila em Óleos Vegetais e Otimização do Processo de Refinação para a sua Remoção*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.
- Pedreschi F., Moyano, P., Knaack, K. & Granby, K. (2005). Color Changes and Acrylamide Formation in Fried Potato Slices. In: *Food Res Intl*, 38:1-9.
- Pekkaniview, M. (1975). World food consumption patterns. In M. Rechaigl Jr (Ed.), *Man, food and nutrition*. (pp. 16–33). Ohio: Ed. CRC Press.
- Peña, F., Cárdenas, S., Gallego, M., & Valcárcel, M. (2003). Direct sampling of orujo oil for determining residual hexane by using a ChemSensor. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(6), 613–618.
- Pérignon, M., Lecomte, J., Pina, M., Renault, A., Simonneau-Deve, C., & Villeneuve, P. (2012). Evaluation of *Rhizopus oryzae* lipase for the determination of regiodistribution in triacylglycerols with medium chain fatty acids. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 89–96.

- Perrin, J. L. (1996). Determination of Alteration. In A. Karleskind (Eds.), *Oils and Fats Manual* (pp. 1205–1213). London, Paris e New York: Association Française pour l'Étude des Corps Gras.
- Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (2007). A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2), 235–241.
- Petrakis, C. (2006). 9 - Olive Oil Extraction. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil* (Second Edition), pp. 191–223). AOCS Press.
- Pfeffer, J., Richter, S., Nieveler, J., Hansen, C. E., Rhlid, R. B., Schmid, R. D., & Rusnak, M. (2006). High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Pinheiro, M. V. S., & Penna, A. L. B. (2004). Substitutos De Gordura : Tipos e Aplicações em Produtos Lácteos. *Alimento e Nutrição*, 15, 175–186.
- Pokorný, J., Kalinová, L., & Dysseler, P. (1995). Determination of total chlorophyll pigments in crude vegetable oils : Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report). *Pure e Appl. Chem.*, 67(10), 1781–1787.
- Popova, A. (2017). Spectral characteristics and solubility of beta-carotene and zeaxanthin in different solvents. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Des Sciences: Sciences Mathématiques et Naturelles*, 70, 55–62.
- Psaltopoulou, T., Kosti, R. I., Haidopoulos, D., Dimopoulos, M., & Panagiotakos, D. B. (2011). Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids in Health and Disease*, 10, 127.
- Quezada, N., & Hernandez, E. M. (2011). Synthesis and Properties of Structured Lipids with Omega-3s. In *Omega-3 Oils: Applications in Functional Foods* (pp. 129–150).
- Rahmani, M., & Csallany, A. S. (1991). Chlorophyll and β -carotene pigments in moroccan virgin olive oils measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(9), 672–674.
- Ramírez, M., Amate, L., e Gil, A. (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development*, 65(SUPPL. 2), S95–S101.
- Reetz, M. T. (2002). Lipases as practical biocataysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 145–150.
- Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L248.
- Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de dezembro de 2013 , que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial Da União Europeia*,

L338.

- Regulamento Delegado (UE) n.º 2015/1830 da Comissão, de 8 de julho de 2015, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L266.
- Rezaei, K., Jenab, E., & Temelli, F. (2007). Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Critical Reviews in Biotechnology*.
- Ribeiro, M. H. L., Lourenço, P. A. S., Monteiro, J. P., & Ferreira-Dias, S. (2001). Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. *European Food Research and Technology*, 213(2), 132–138.
- Rincón, B., Bujalance, L., Feroso, F. G., Martín, A., & Borja, R. (2013). Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics. *Bioresource Technology*, 140, 249–255.
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S133–S138.
- Rodrigues, H. G., Vinolo, M. A. R., Magdalon, J., Fujiwara, H., Cavalcanti, D. M. H., Farsky, S. H. P., Curi, R. (2010). Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids*, 45(9), 809–819.
- Rodrigues, J. M. (2011). *Produção enzimática de lípidos estruturados, ricos em ácidos gordos polinsaturados ómega-3, em reactor de alta pressão*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1997). *Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods*. *Health and Nutrition*.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49(3 Suppl 1), 38S-47S.
- Ruiz-Méndez, M. V., & Dobarganes, M. C. (1999). Olive oil and olive pomace oil refining. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*, 6, 56–60.
- Ruiz-Méndez, M. V., Romero, C., Medina, E., García, A., De Castro, A., & Brenes, M. (2013). Acidification of Alperujo paste prevents off-odors during their storage in open air. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(3), 401–406.
- Sahin, N., Akoh, C. C., & Karaali, A. (2005). Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5779–5783.
- Sakurai, H., & Pokorný, J. (2003). The development and application of novel vegetable oils tailor-made

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

for specific human dietary needs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(12), 769–778.

Sancho-Madriz, M. F. (2003). Preservation of food. In B. Caballero e P. M. Finglas. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition, pp. 4766–4772). Oxford: Academic Press.

Sanders, T. (2017). Polyunsaturated Fatty Acid Status in Vegetarians. In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (pp. 667–681).

Santos, S. (2016). Óleos alimentares usados : selecção de indicadores de *degradação da qualidade* , *no domínio da prevenção* , *sua requalificação e valorização*. Dissertação de Mestrado na Área de Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém.

Sebadelhe, C. S. M. (2008). *Contribuição do sector do azeite para a produção do biodiesel*. Dissertação de mestrado para obtenção do grau de Mestre em Olivicultura, Azeite e Azeitona de mesa. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Secundo, F. (2013). Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6250–6261.

Sellappan, S., & Akoh, C. C. (2000). Enzymatic acidolysis of tristearin with lauric and oleic acids to produce coating lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(11), 1127–1134.

Senanayake, S. P.J.N., & Shahidi, F. (2002). Structured lipids via lipase-catalyzed incorporation of eicosapentaenoic acid into borage (*Borago officinalis* L.) and Evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 477–483.

Senanayake, S. P. J. N., & Shahidi, F. (2005). Bailey's Industrial Oil and Fat Product. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Product*, (pp. 555–584). New York, USA: John Wiley e Sons.

Severino, A. (2014). *Produção de sucedâneos de gordura de leite humano a partir de tripalmitina e de óleo de grainha de uva, catalisada por lipases imobilizadas*. Dissertação de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662.

Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., & Tominaga, Y. (1996). Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(4), 299–303.

Silva, F. A. M. ., Borges, M. F. M. ., & Ferreira, M. A. . (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22(1), 94–103.

Simões, T. (2011). *Síntese enzimática de lípidos estruturados sucedâneos de gordura de leite humano*,

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria.

Simopoulos, A. P. (1998). Overview of evolutionary aspects of omega 3 fatty acids in the diet. In E. A.P Simopoulos (Ed.), *The Return of ω -3 Fatty Acids into the Food Supply*. (Vol. 83, pp. 1–11). Basel (Switzerland): World Rev. Nutr. Diet.

Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine e Pharmacotherapy = Biomedecine e Pharmacotherapie*, 56(8), 365–379.

Simopoulos, Artemis P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3), 128.

Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Chapter 1 - Microbial Enzymes—An Overview. In R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 1–40). Elsevier.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*, 51(3), 456–467.

Small, D. M. (1991). The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 11, 413–434.

Soares, C. M. F., Castro, H. F., Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.*

Soares, F., Osório, N. M., Silva, R. C., Gioielli, L. A., & Ferreira-Dias, S. (2013). Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 413–428.

Soriguer, F., Moreno, F., Rojo-Martinez, G., Garcia-Fuentes, E., Tinahones, F., Gomez-Zumaquero, J. M. Morcillo, S. (2003). Monounsaturated n-9 fatty acids and adipocyte lipolysis in rats. *The British Journal of Nutrition*, 90(6), 1015–1022.

Soto, C. G., Chamy, R., & Zuniga, M. E. (2004). Effect of enzymatic application on borage (*Borago officinalis*) oil extraction by cold pressing. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 37(2), 326–331.

Soumanou, M. M., Pérignon, M., & Villeneuve, P. (2013). Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*.

Sousa, V., Campos, V., Nunes, P., & Pires-Cabral, P. (2018). Incorporation of capric acid in pumpkin seed oil by sn-1,3 regioselective lipase-catalyzed acidolysis. *OCL*, 25(3).

Strem Chemicals Inc. (n.d.). Novozyme doc. Disponível em:

https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3123tech.pdf

- Tecelão, C., Guillén, M., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2012). Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 104–110.
- Thomson, A. B., Keelan, M., Garg, M. L., & Clandinin, M. T. (1989). Intestinal aspects of lipid absorption: in review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(3), 179–191.
- Tiefenbacher, K. F. (2019). Glossary of Terms in Wafers, Waffles and Adjuncts. *The Technology of Wafers and Waffles II*, 325–411.
- Tiosso, P. C., Carvalho, A. K. F., Castro, H. F., Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (2014). Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.
- Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2009). *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis. The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Turan, S., Karabulut, I., & Vural, H. (2006). Effects of reaction parameters on the incorporation of caprylic acid into soybean oil for production of structured lipids. *Journal of Food Lipids*, 13(3), 306–317.
- Turner, N. A., Duchateau, D. B., & Vulfson, E. N. (1995). Effect of hydration on thermostability. *Biotechnology Letters*, 17(4), 371–376.
- Ujang, Z., & Vaidya, A. M. (1998). Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(3), 318–322.
- Valenzuela, A. (2009). Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper functioning of neuronal cells: Their role in mood disorders. *Grasas y Aceites*, 60(2), 203–212.
- Valenzuela Díaz, F. R., & Souza Santos, P. (2001). Studies on the acid activation of Brazilian smectitic clays. *Quimica Nova*, 24(3), 345–353.
- Varela, F. (2012). *Hidrotratamento de óleo de bagaço de azeitona bruto na produção de biocombustíveis líquidos*. Dissertação de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Ventura, C. (2014). *Óleos Alimentares - Selecção de Indicadores de Degradação da Qualidade para Óleos Alimentares Usados*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém.
- Vieira, T. (2016). *Degradação química de azeites virgens extraídos das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki*. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Beja.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., & Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 9(4–6), 113–148.

- Waddell, W. R., Geyer, R. P., Clarke, E., & Stare, F. J. (1954). Function of the reticuloendothelial system in removal of emulsified fat from blood. *The American Journal of Physiology*, 177(1), 90–94.
- Wan, J. P. (2000). Properties of Fats and Oils. In R. O'Brien, W. E. Farr, P. J. Wan (Ed.), *Introduction to Fats and Oils Technology* (pp. 20–49). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Wang, Y., & Gordon, M. H. (1991). Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1693-695.
- Wang, Y., Xia, L., Xu, X., Xie, L., & Duan, Z. (2012). Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 707–712.
- Weil, J. H. (2000). *Bioquímica Geral* (2ª Edição). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Williams, C. M. (2001). Beneficial nutritional properties of olive oil: Implications for postprandial lipoproteins and factor VII. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 11(4 SUPPL.), 51–56.
- Willis, W. M., Lencki, R. W., & Marangoni, A. G. (1998). Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 639–674.
- Wisdom, R. A., Dunnill, P., & Lilly, M. D. (1987). Enzymic interesterification of fats: Laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(9), 1081–1085.
- Wu, J. C., Low, H. R., Leng, Y., Chow, Y., Li, R., Talukder, M. M. R., & Choi, W. J. (2006). Ketoprofen resolution by enzymatic esterification and hydrolysis of the ester product. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(3), 211–214.
- Xu, X., Baichen, S., Høy, C. E., & Adler-Nissen, J. (1998). Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: Preliminary study on incorporation and acyl migration. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 301–308.
- Xu, X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(4), 287–303.
- Xu, X. (2003). Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(6), 289–304.
- Xu, X. (2004). Biocatalysis for Lipid Modifications. In N. T. Dunford e H. B. Dunford (Eds.), *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing* (p.239-263). Champaign: AOCS Press.
- Xu, X, R. H. Skands, A., E. Høy, C., Mu, H., Balchen, S., & Adler-Nissen, J. (1998). Production of Specific-Structured Lipids by Enzymatic Interesterification: Elucidation of Acyl Migration by Response Surface Design. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 1179–1186.

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

- Yahya, A. R. M., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7–8), 438–450.
- Yamane, T. (1987). A Comparison of Assays on Hydrolytic Activity of Lipase with and without Surfactant. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 36(6), 402–408.
- Yang, S. C., Lin, S. H., Chang, J. S., & Chien, Y. W. (2017). High fat diet with a high monounsaturated fatty acid and polyunsaturated/saturated fatty acid ratio suppresses body fat accumulation and weight gain in obese hamsters. *Nutrients*, 9(10).
- Yang, T. H., Jang, Y., Han, J. J., & Rhee, J. S. (2001). Enzymatic synthesis of low-calorie structured lipids in a solvent-free system. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(3), 291–296.
- Yaqoob, P. (1998). Monounsaturated fats and immune function . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* .
- Zschau, W. (2000). Bleaching. In P. J. Wan, R. D. O'Brien, W. E. Farr (Ed.), *Introduction to Fats and Oils Technology* (2nd ed., pp. 158–178.). Champaign, IL, USA: AOCS Press.

ANEXOS

Anexo I- Composição das categorias de azeite e óleo de bagaço de azeitona

Categoria	Composição de ácidos gordos (a)						Total dos isómeros transoleicos (%)	Total dos isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocérico (%)		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05
2. Azeite virgem	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05
3. Azeite lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10
4. Azeite refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30
5. Azeite (b)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35

(a) Teores de outros ácidos gordos (%): palmítico: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; heptadecanóico: ≤ 0,30; heptadecenóico: ≤ 0,30; esteárico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 2,50-21,00.

(b) Constituído por azeites refinados e azeites virgens.

Figura I-Composição de ácidos gordos de categorias de azeite e óleo de bagaço de azeitona (Fonte: Regulamento Delegado (UE) 2015/1830)

Anexo II- Características categorias de óleos provenientes da azeitona

Quadro I- Características dos óleos de bagaço de azeitona

(Regulamento Delegado (UE) 2015/1830)

<i>Categoria</i>	<i>Acidez (%)</i>	<i>Índice de peróxidos meq O₂/kg</i>	<i>Ceras mg/kg</i>	<i>K₂₃₂</i>	<i>K₂₇₀</i>
Óleo de bagaço de azeitona bruto	-	-	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 ⁽¹⁾	-	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤0,3	≤5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	-	≤2,00
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,0	≤15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	-	≤1,70

(1) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e a percentagem de eritrodíol e uvaol for superior a 3,5 %

Anexo III- Avaliação estatística de igualdade de médias de acidez de amostras de OBA B e mistura

Realizou-se um teste t de Student de amostras emparelhadas dado que estas não são independentes porque resultam do mesmo lote. O teste tem como hipótese nula a igualdade de médias e alternativa que as médias são distintas. Caso o valor zero esteja dentro do intervalo de confiança e o valor de p seja superior a 0,05, não se rejeita a hipótese nula.

Quadro II - Teste t de amostras emparelhadas, com n=3, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05.

Par	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
OBA1 - OBA2	0,234	0,699	-1,500	1,969	0,581	0,620
OBA1 - OBA3	0,046	0,024	-0,013	0,105	3,368	0,078
OBA1 - OBA4	-0,412	0,590	-1,878	1,055	-1,208	0,350
OBA1 - Mistura	-0,189	0,496	-1,421	1,044	-0,659	0,578
OBA2 - OBA3	-0,188	0,706	-1,942	1,566	-0,462	0,690
OBA2 - OBA4	-0,646	0,823	-2,691	1,399	-1,359	0,307
OBA2 - Mistura	-0,423	0,457	-1,555	0,709	-1,607	0,249
OBA3 - OBA4	-0,458	0,614	-1,983	1,067	-1,292	0,326
OBA3 - Mistura	-0,235	0,516	-1,518	1,048	-0,787	0,514
OBA4 - Mistura	0,22316	0,368	-0,690	1,137	1,051	0,403

Anexo IV-Comparação estatística de igualdade de médias de K_{232} e K_{270} do OBA bruto

Realizou-se um teste t de Student de amostras emparelhadas dado que estas não são independentes porque resultam do mesmo lote. O teste tem como hipótese nula a igualdade de médias e alternativa que as médias são distintas. Caso o valor zero esteja dentro do intervalo de confiança e o valor de p seja superior a 0,05, não se rejeita a hipótese nula.

Quadro III-Teste t de amostras emparelhadas do parâmetro K_{232} , $n=3$, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05.

Par	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
OBA1 - OBA2	-0,089	0,200	-0,587	0,409	-0,770	0,522
OBA1 - OBA3	-0,377	1,106	-3,125	2,372	-0,590	0,615
OBA1 - OBA4	0,275	0,164	-0,133	0,683	2,898	0,101
OBA1 - Mistura	-0,802	0,034	-0,886	-0,719	-41,33	0,001
OBA2 - OBA3	-0,288	1,120	-3,070	2,495	-0,445	0,700
OBA2 - OBA4	0,364	0,318	-0,425	1,152	1,984	0,186
OBA2 - Mistura	-0,713	0,202	-1,214	-0,213	-6,128	0,026
OBA3 - OBA4	0,651	1,252	-2,458	3,761	0,901	0,463
OBA3 - Mistura	-0,426	1,073	-3,091	2,239	-0,687	0,563
OBA4 - Mistura	-1,077	0,195	-1,560	-0,594	-9,594	0,011

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Quadro IV- Teste t de amostras emparelhadas do parâmetro K_{270} , $n=3$, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05.

Par	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
OBA1 - OBA2	-0,404	0,211	-0,928	0,121	-3,313	0,080
OBA1 - OBA3	-0,299	0,056	-0,437	-0,161	-9,320	0,011
OBA1 - OBA4	-0,082	0,096	-0,322	0,157	-1,480	0,277
OBA1 - Mistura	-0,373	0,062	-0,527	-0,218	-10,400	0,009
OBA2 - OBA3	0,105	0,218	-0,438	0,647	0,831	0,494
OBA2 - OBA4	0,321	0,208	-0,196	0,839	2,673	0,116
OBA2 - Mistura	0,031	0,216	-0,506	0,568	0,248	0,827
OBA3 - OBA4	0,217	0,151	-0,158	0,591	2,489	0,131
OBA3 - Mistura	-0,074	0,118	-0,366	0,218	-1,085	0,391
OBA4 - Mistura	-0,290	0,038	-0,383	-0,197	-13,41	0,006

Anexo V-Estatísticas de grupo e teste-t para comparação de médias de acidez livre do óleo bruto e óleos após adsorção

Quadro V-Estatística do grupo de dados de acidez das amostras de óleo

Amostras	n	Média (%)	Desvio padrão
Óleo bruto	3	20,3	0,21
Óleo após 1.ºT	3	20,3	0,28
Óleo após 2.ºT	3	20,7	0,04
Óleo D	3	20,9	0,44

Realizou-se um teste t de Student de amostras emparelhadas dado que as amostras correspondem ao mesmo óleo, antes e após um dado tratamento. O teste tem como hipótese nula a igualdade de médias e alternativa que as médias são distintas. Caso o valor zero esteja dentro do intervalo de confiança e o valor de p seja superior a 0,05, não se rejeita a hipótese nula.

Quadro VI- Teste t de amostras emparelhadas do parâmetro acidez, n=3, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05

Par de amostras	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
Óleo bruto-Óleo após 1ºT	-0,077	0,351	-0,948	0,795	-0,377	0,742
Óleo bruto-Óleo após 2ºT	-0,463	0,197	-0,953	0,026	-4,077	0,055
Óleo bruto-Óleo D	-0,646	0,441	-1,742	0,450	-2,536	0,127
Óleo após 1ºT-Óleo após 2ºT	-0,387	0,249	-1,006	0,232	-2,688	0,115
Óleo após 1ºT-Óleo D	-0,569	0,720	-2,357	1,219	-1,370	0,304
Óleo após 2ºT-Óleo D	-0,182	0,472	-1,355	0,990	-0,669	0,572

Anexo VI-Estatística de grupo e teste-t de comparação de médias de amostras emparelhadas dos parâmetros coeficientes de extinção K_{232} e K_{270} das amostras de óleo

Realizou-se um teste t de Student de amostras emparelhadas dado que as amostras correspondem ao mesmo óleo, antes e após um dado tratamento. O teste tem como hipótese nula a igualdade de médias e alternativa que as médias são distintas. Caso o valor zero esteja dentro do intervalo de confiança e o valor de p seja superior a 0,05, não se rejeita a hipótese nula.

Quadro VII-Estatística de grupo de coeficiente de extinção a 232 nm, das amostras de óleo

Amostras	n	Média (K_{232})	Desvio padrão
Óleo bruto	3	6,98	0,15
Óleo após 1.ºT	3	6,23	0,31
Óleo após 2.ºT	3	6,66	0,20
Óleo D	3	6,97	1,03

Quadro VIII-Teste t de amostras emparelhadas do parâmetro coeficiente de extinção a 232 nm, n=3, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05

Par de amostras	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
Óleo bruto-Óleo após 1ºT	0,749	0,165	0,339	1,159	7,856	0,016
Óleo bruto-Óleo após 2ºT	0,321	0,342	-0,529	1,171	1,624	0,246
Óleo bruto-Óleo D	0,011	1,144	-2,830	2,853	0,017	0,988
Óleo após 1ºT-Óleo após 2ºT	-0,428	0,496	-1,661	0,805	-1,494	0,274
Óleo após 1ºT-Óleo D	-0,738	1,242	-3,824	2,349	-1,028	0,412
Óleo após 2ºT-Óleo D	-0,309	0,870	-2,471	1,852	-0,616	0,601

Produção de lípidos estruturados dietéticos por catálise enzimática, a partir de óleo de bagaço de azeitona

Quadro IX-Estatística de grupo de coeficiente de extinção a 270 nm, das amostras de óleo

Amostras	n	Média (K_{270})	Desvio padrão
Óleo bruto	3	2,22	0,11
Óleo após 1.ºT	3	2,38	0,14
Óleo após 2.ºT	3	2,89	0,13
Óleo D	3	2,69	0,36

Quadro X- Teste t de amostras emparelhadas do parâmetro coeficiente de extinção a 270 nm, n=3, 2 graus de liberdade e nível de significância de 0,05

Par de amostras	Média da diferença	Desvio padrão	Intervalo de confiança da diferença, 95%		t	p-value (bicaudal)
			Inferior	Superior		
Óleo bruto-Óleo após 1ºT	-0,155	0,123	-0,460	0,149	-2,197	0,159
Óleo bruto-Óleo após 2ºT	-0,665	0,225	-1,213	-0,118	-5,226	0,035
Óleo bruto-Óleo D	-0,471	0,344	-1,325	0,383	-2,372	0,141
Óleo após 1ºT-Óleo após 2ºT	-0,510	0,265	-1,169	0,149	-3,329	0,08
Óleo após 1ºT-Óleo D	-0,316	0,461	-1,460	0,829	-1,187	0,357
Óleo após 2ºT-Óleo D	0,194	0,310	-0,575	0,963	1,087	0,391