

Produção de sucedâneos de gordura de leite humano a partir de tripalmitina e de óleo de grainha de uva, catalisada por lipases imobilizadas

Ana Cristina Fernandes Severino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento dos Alimentos

Orientadora: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Coorientadora: Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

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

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Mestrado em Engenharia Alimentar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (ISA/UL) e respetivo corpo docente pela formação universitária base de excelência;

À orientadora, professora Doutora Suzana Ferreira Dias, pela sua amizade e carinho sempre demonstrado, pela sua inteira dedicação e disponibilidade durante a realização de todo o trabalho experimental assim como pelo desenvolvimento de todo o trabalho escrito. Quero ainda agradecer por todos os seus conhecimentos transmitidos ao longo de todo o percurso académico.

À coorientadora, Doutora Carla Tecelão, por todo o carinho e apoio sempre demonstrado, pelo seu entusiasmo e motivação na aprendizagem de todos os procedimentos imprescindíveis na realização do trabalho experimental assim como pela sua dedicação e disponibilidade ao longo de toda a elaboração da dissertação.

Ao professor Pedro Louro pela sua imediata disponibilidade em colaborar com algum dos procedimentos para a concretização do trabalho experimental e também pela sua excelente prestação enquanto professor durante o meu percurso académico.

Ao professor Francisco Valero da Universidade Autónoma de Barcelona, pela sua gentileza em ceder-nos a lipase heteróloga *Rhizopus oryzae* para a realização de todo o trabalho experimental.

Aos colegas de laboratório pelo bom ambiente de trabalho e entajuda e à Dona Júlia Barata pela sua sempre disponibilidade em ajudar e a dar a conhecer a sua experiência, que revelou ser muito importante no manuseamento e conhecimento de equipamentos e utensílios de laboratório.

À Mónica Baeta pelo seu apoio incondicional desde sempre e ainda a todos os amigos e colegas de curso por todo o apoio e momentos de descontração e lazer.

Ao meu companheiro e aos meus filhos por toda a coragem que me deram para conseguir realizar todo o meu percurso académico, pelo apoio e momentos de descontração e lazer.

À minha mãe, aos meus irmãos, especialmente o Paulo Severino, pois foi quem me deu força para iniciar o meu percurso académico, por todo o apoio e momentos de descontração e lazer; ao resto da minha família e a todos os meus amigos que estiveram sempre presentes, um muito obrigada por tudo.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos por terem acreditado e facilitado o presente percurso académico.

RESUMO

O objetivo deste estudo centrou-se na síntese de lípidos estruturados sucedâneos da gordura de leite humano (*Human Milk Fat Substitutes* - HMFS) por reação de acidólise entre tripalmitina e ácidos gordos livres (*Free Fatty Acids* - FFA) provenientes do óleo de grainha de uva, em meio sem solvente, catalisada por lipases sn-1,3 selectivas.

Utilizaram-se a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RMIM e a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (*Recombinate Rhizopus oryzae Lipase* - rROL) imobilizada em dois suportes distintos (Lewatit® VPOC 1600 e Sepabeads). Após 24h de reação a 60°C e com uma razão molar (*Molar Ratio* - MR) FFA/tripalmitina de 2:1, conseguiram-se incorporações molares de ácidos de 20,5%, 19,8% e 14,4%, na tripalmitina, com a rROL imobilizada em Lewatit, Sepabeads e Lipozyme RMIM, respetivamente. Selecionou-se a rROL em Lewatit para estudos posteriores, por apresentar maior resistência mecânica sob agitação magnética.

A atividade da rROL imobilizada em Lewatit aumentou com a sua atividade da água (a_w) inicial, obtendo-se 20,5% de incorporação molar de FFA a uma a_w de 0,95.

Modelou-se a reação de acidólise e otimizaram-se as condições operacionais (razão molar (*Molar Ratio* - MR) e temperatura) pela Metodologia das Superfícies de Resposta (*Response Surface Methodology* - RSM). A incorporação molar aumentou na gama mais baixa de temperatura e MR (T=58°C e MR=2:1). A rROL tem potencial como biocatalisador na síntese de HMFS.

Palavras-chave: Fórmulas infantis, lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, lípidos estruturados, óleo de grainha de uva, acidólise, sucedâneos de gordura de leite humano.

ABSTRACT

The aim of this study was the production of human milk fat substitutes (HMFS) by acidolysis of tripalmitin with free fatty acids (FFA) from grapeseed oil, in solvent-free media, catalyzed by sn-1,3 selective lipases.

The commercial immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM and the recombinant *Rhizopus oryzae* lipase (rROL) immobilized on two different supports (Lewatit® VPOC 1600 and Sepabeads) were tested as biocatalysts. After 24h acidolysis at 60°C and using a molar ratio (MR) tripalmitin/FFA of 2:1, molar incorporations of 20.5%, 19.8% and 14.4% of FFA in tripalmitin were achieved with immobilized rROL in Lewatit, in Sepabeads or with Lipozyme RMIM, respectively. rROL in Lewatit was selected for subsequent studies, due to its higher mechanical resistance to magnetic stirring.

The activity of rROL immobilized on Lewatit increased with its initial water activity (a_w). The highest molar incorporation of 20.5%, was observed at an a_w of 0.95.

Modeling and optimization of reaction conditions (temperature and MR) of acidolysis were performed by response surface methodology (RSM). The highest molar incorporation were obtained at lower temperatures and molar ratios (T=58°C; MR=2:1). The rROL showed to be a feasible biocatalyst to produce HMFS

Key words: Infant formulas, heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, structured lipids, grapeseed oil, acidolysis, human milk fat substitutes.

EXTENDED ABSTRACT

In infant formulas, the fat is a very important component from the nutritional point of view due to its role in digestion and absorption by the new-born.

The production of structured lipids (SL) to be used as human milk fat substitutes (HMFS), by lipase-catalyzed acidolysis, has been greatly investigated. There are already in the market infant formulas containing LE.

The aim of this study was the production of HMFS by acidolysis of tripalmitin with free fatty acids (FFA) from grapeseed oil, in solvent-free media, catalyzed by sn-1,3 selective lipases.

The commercial immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RMIM and the recombinant *Ryzopus oryzae* lipase (rROL) immobilized on two different supports (Lewatit® VP OC 1600 and Sepabeads) were tested as biocatalysts.

After 24 h acidolysis at 60 °C and using a molar ratio (MR) tripalmitin/FFA of 2:1, molar incorporations of 20.5%, 19.8% and 14.4% of FFA in tripalmitin were achieved with immobilized rROL in Lewatit, in Sepabeads or with Lipozyme RMIM, respectively. rROL in Lewatit was selected for subsequent studies, due to its higher mechanical resistance to magnetic stirring

The effect of the initial water activity (a_w) of rROL immobilized in Lewatit® VP OC 1600 (0.56, 0.75, 0.81 and 0.92) on the acidolysis activity was evaluated. To attain these a_w values, the immobilized preparations were pre-equilibrated with the vapour phase of saturated salt solutions of known water activity, at 35 °C (Sodium bromide, $a_w = 0.56$; sodium chloride, $a_w = 0.75$; ammonium sulfate, $a_w = 0.81$ and potassium nitrate, $a_w = 0.92$). The obtained values were compared with those obtained with the enzyme used immediately after immobilization at a_w value of 0.95.

Using the biocatalyst at different a_w values, the following molar incorporation of FFA were obtained: 6.8 % with the rROL at a_w of 0.56, 8.6 % at a_w of 0.75; 9.4 % at a_w of 0.81 and 14.6 % at a_w of 0.92.

A time-course experiment was carried out along 24h using the rROL immobilized in Lewatit at an initial a_w of 0.95. After 8 h reaction, a quasi-equilibrium was attained.

Modeling and optimization of reaction conditions (temperature between 58 °C and 72 °C and MR FFA/tripalmitin between 1.2:1 and 6.8:1) of acidolysis were

performed by response surface methodology (RSM) using rROL immobilized in Lewatit at the original water activity of 0.95. Reactions were carried out for 8 h following a central composite rotatable design. The analysis of the obtained results showed that the highest incorporations of free fatty acids from grapeseed oil in tripalmitin were obtained at the lowest temperature (58 °C) and MR tested (2:1). The high values of both determination coefficient ($R^2 = 0.867$) and adjusted R^2 ($R^2_{\text{adjust}} = 0,760$) indicate a good fit of the model to the experimental values. When this model was validated using the predicted best reaction conditions, 22.7 % of molar incorporation of FFA was obtained, which is very close to the value predicted by the model (23%).

Finally, under the optimized conditions, the effect of biocatalyst load (5, 8 and 10 %) on the acidolysis reaction was investigated. Molar incorporations of 22.7 %, 30.2 % and 31.9 % were obtained with 5 %, 8 % and 10 % of biocatalyst, respectively. These results show an increase in FA incorporation with the biocatalyst load. However, for loads higher than 8 %, the incorporation values became approximately constant indicating a kinetic control of the process.

The fatty acid composition of human milk fat was not very different from that of the obtained HMFS, concerning the composition of major fatty acids. However, the amounts of palmitic acid (total and at pos-2) and linoleic acid are higher in this HMFS while the amount of oleic acid is lower than the contents in HMF. Even though, the final composition of the produced SL is adequate to be used in infant milk formulas.

Grapeseed oil is an interesting oil to be used for HMFS production due to its high content of linoleic acid, which is an important FA in HMF.

This study shows that rROL is a biocatalyst with a great potential to be used for the production of human milk fat substitutes.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
EXTENDED ABSTRACT.....	iv
Índice Geral	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJETIVOS	xi
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. O leite humano – composição e importância.....	2
1.2. O processo de digestão da gordura de leite humano.....	5
1.3. Fórmulas infantis	5
1.4. Lípidos estruturados	9
1.5. Síntese de lípidos estruturados sucedâneos da gordura de leite humano	12
2. TRABALHO EXPERIMENTAL	15
2.1. Materiais.....	16
2.1.1. Substratos	16
2.1.2. Lipases	16
2.1.3. Suportes de imobilização	16
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Caracterização química do leite humano.....	17
2.2.2. Preparação dos ácidos gordos livres por saponificação.....	18
2.2.3. Imobilização da rROL em Lewatit® VP OC 1600	19
2.2.4. Imobilização da rROL em Sepabeads Relizyme OD 403/M	20
2.2.5. Preparação da rROL a diferentes valores de atividade da água	21
2.2.6. Reação de acidólise	22
2.2.7. Análise dos produtos de reação.....	23

2.2.7.1.	Separação dos acilgliceróis e ácidos gordos livres por cromatografia em camada fina.....	23
2.2.7.2.	Preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos	24
2.2.7.3.	Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos por cromatografia gasosa ...	25
2.2.8.	Ensaio de modelação e otimização da reação de acidólise.....	26
2.2.9.	Ensaio de validação do modelo.....	29
2.2.10.	Efeito da carga do biocatalisador	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1.	Caracterização de uma amostra de leite humano.....	31
3.1.1.	Avaliação da composição química	31
3.1.2.	Caracterização da componente lipídica no que respeita ao teor em ácidos gordos	32
3.2.	Composição em ácidos gordos do óleo de grainha de uva	34
3.3.	Seleção do biocatalisador	36
3.4.	Efeito da atividade da água na reação de acidólise.....	37
3.5.	Estudo da cinética da reação de acidólise	39
3.6.	Modelação da reação de acidólise e otimização das condições operacionais.....	40
3.7.	Validação do modelo	46
3.8.	Comparação do leite humano com o lípido estruturado produzido	48
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
4.1.	Conclusões.....	50
4.2.	Linhas futuras de investigação.....	51
5.	BIBLIOGRAFIA.....	52

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FA	<i>Fat Acids</i> - Ácidos Gordos
FFA	<i>Free Fat Acids</i> - Ácidos Gordos Livres
CCRD	<i>Central Composite Rotatable Design</i> - Matriz Central Compósita Rotativa
GC	<i>Gas Chromatography</i> - Cromatografia Gasosa
DAG	Diacilglicerol
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> - Éster Metílico do Ácido Gordo
HMF	<i>Human Milk Fat</i> - Gordura de Leite Humano
HMFS	<i>Human Milk Fat Substitutes</i> - Sucedâneo de Gordura de Leite Humano
MAG	Monoacilglicerol
rROL	<i>Rhizopus oryzae recombinante Lipase</i> – Lipase recombinante de <i>Rhizopus oryzae</i>
MR	<i>Molar Ratio</i> - Razão Molar
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> – Metodologia das Superfícies de Resposta
R ²	Coefficiente de Determinação
R ² _{ajust}	Coefficiente de Determinação ajustado
T	Temperatura
TAG	Triacilglicerol
TLC	<i>Thin Layer Chromathography</i> - Cromatografia em Camada Fina
SL	<i>Structured Lipid</i> - Lípido Estruturado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acidólise por via química e por via enzimática.	10
Figura 2. Comparação da estrutura do triacilglicerol em fórmulas infantis tradicionais e num sucedâneo de gordura de leite humano, o Betapol.	12
Figura 3. Cromatografia em Camada Fina. Evidência dos FFA obtidos por saponificação do óleo de grinha de uva.	19
Figura 4. Representação das diversas soluções salinas utilizadas para obtenção dos diferentes valores de a_w	21
Figura 5. Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm ³) sob agitação magnética.	22
Figura 6. Cromatografia em Camada Fina. Em evidência são apresentadas as bandas correspondentes aos MAG, DAG, FFA e TAG.	24
Figura 7. Matriz Central Compósita Rotativa.	26
Figura 8. Cromatograma obtido da análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos da gordura de leite humano por cromatografia gasosa.	32
Figura 9. Cromatograma obtido da análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos do óleo de grinha de uva por cromatografia gasosa.	34
Figura 10. Principais FFA incorporados em meio reacional com diferentes lipases.	36
Figura 11. Tendência de incorporação de todos os FFA e do ácido linoleico (C18:2), utilizando a rROL imobilizada em Lewatit [®] VP OC 1600 com diferentes a_w 's.	38
Figura 12. Incorporação molar (% mol) de todos os FFA e do ácido linoleico (C18:2) ao longo das 24 h de reação.	39
Figura 13. Superfície de resposta relativa à incorporação molar de todos os FFA na reação de acidólise em função da Temperatura (T = °C) e da Razão Molar (MR = FFA óleo de grinha de uva:tripalmitina) e a respetiva projeção.	42
Figura 14. Superfície de resposta relativa à incorporação molar do FFA C18:2 na reação de acidólise em função da Temperatura (T = °C) e da Razão Molar (MR = FFA óleo de grinha de uva:tripalmitina) e a respetiva projeção.	46
Figura 15. Incorporação molar (%) de FFA em tripalmitina utilizando diferentes quantidades de rROL imobilizada em Lewatit [®] VP OC 1600.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do leite de mulheres chinesas, nas diferentes fases de lactação, expresso em g de componente por 100 mL de leite.	2
Tabela 2. Composição em ácidos gordos do colostro, leite de transição e do leite maduro, expresso em % (m/m).	4
Tabela 3. Regiodistribuição dos principais FA na gordura de leite humano, expressa em g de FA por 100 g de leite.	5
Tabela 4. Composição nutricional padrão das fórmulas infantis.	7
Tabela 5. Composição em FA da gordura de diferentes leites, expressa em % molar.	8
Tabela 6. Regiodistribuição dos FA na posição sn-2 na gordura de diferentes leites, expressa em % molar.	9
Tabela 7. Casos de estudo na produção de HMFS em meios isentos de solvente.	11
Tabela 8. Representação dos diferentes pontos da matriz CCRD.	28
Tabela 9. Composição química de uma amostra de leite humano*, expressa em g de componente por 100 mL de leite.	31
Tabela 10. Composição em FA de diferentes leites humanos: mãe portuguesa (a), mães dinamarquesas (b), mães espanholas (c); NI - não identificado.	33
Tabela 11. Representação dos cálculos efetuados, para obter a composição em FA expressa em % mássica e % molar do óleo de grainha de uva.	35
Tabela 12. Incorporação do ácido linoleico (C18:2) e de todos os FFA, expressa em % molar nas reações de acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit ou Sepabeads e pela lipase comercial Lipozyme RM IM.	37
Tabela 13. Massa perdida (%) da rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600.	38
Tabela 14. Experiências da Matriz Central Compósita Rotativa em função das variáveis Temperatura (T) e MR de FFA de óleo de grainha de uva/tripalmitina e as incorporações (%molar) de todos os FFA e apenas do FFA C18:2, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600.	40
Tabela 15. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8592$ e $R^2_{ajust}=0,6831$, para a incorporação de todos os FFA.	41
Tabela 16. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8586$ e $R^2_{ajust}=0,7455$, para a incorporação de todos os FFA.	41
Tabela 17. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8766$ e $R^2_{ajust}=0,7225$, para a incorporação do ácido linoleico (C18:2).	44
Tabela 18. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8665$ e $R^2_{ajust}=0,7597$, para a incorporação do ácido linoleico (C18:2).	44
Tabela 19. Comparação dos FA do leite humano* e do lípido estruturado, em % molar.	48

ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJETIVOS

O desenvolvimento tecnológico na indústria alimentar tem evoluído nas últimas décadas em diversos ramos, nomeadamente na produção de fórmulas infantis para lactentes, tendo especial cuidado em vários componentes adicionados.

A gordura do leite humano (*Human Milk Fat* - HMF) é um componente importante e fundamental no crescimento dos bebés, pois fornece cerca de 50 % das necessidades energéticas. No que se refere à sua configuração das posições *sn* no esqueleto do triacilglicerol (TAG) é igualmente importante que esta seja idêntica à da gordura do leite humano. Esta gordura caracteriza-se por ser constituída por TAG em que o ácido gordo saturado predominante (ácido palmítico) se encontra principalmente na posição 2, enquanto os ácidos gordos insaturados se encontram predominantemente nas posições 1 e 3 do TAG. Vários estudos já descreveram a razão pela qual esta estrutura é importante, principalmente durante o processo de digestão da gordura por parte dos recém-nascidos, pois vai ter influência na absorção de cálcio, mineral este essencial ao desenvolvimento ósseo dos bebés.

O presente trabalho visou a síntese de sucedâneos de gordura de leite humano por reação de acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres (*Free Fatty Acids* - FFA) provenientes do óleo de grainha de uva, catalisada pela (i) lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (*Rhizopus oryzae recombinante Lipase* - rROL) imobilizada em Lewatit® VP OC 1600 ou em Sepabeads Relizyme OD 403/M e pela (ii) lipase imobilizada comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM). Ambas as lipases apresentam seletividade 1,3 o que permite preservar o ácido palmítico maioritariamente na posição *sn-2* da tripalmitina e incorporar ácidos gordos insaturados do óleo de grainha de uva nas posições externas do TAG.

O óleo de grainha de uva é uma fonte rica em ácidos gordos essenciais, vitamina E, polifenóis e flavonoides. Possui na sua composição cerca de 65 % de ácido linoleico, um ácido gordo insaturado abundante na HMF.

Estudou-se o efeito da atividade termodinâmica da água (a_w) do biocatalisador na incorporação molar de ácidos gordos (*Fatty Acids* - FA) na tripalmitina. Foi igualmente objetivo deste estudo a modelação da reação enzimática, avaliando-se o efeito da razão molar (*Molar Ratio* - MR) dos substratos e da temperatura (T) da reação pela Metodologia das Superfícies de Resposta (*Response Surface Methodology* - RSM).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O leite humano – composição e importância

O leite humano é considerado o alimento ideal para o recém-nascido até aos 6 meses de vida (Goedhart and Bindels, 1994). A sua composição é única, contendo todos os nutrientes essenciais como proteínas, gorduras, glúcidos, minerais, vitaminas e substâncias fisiologicamente ativas (Zou *et al.*, 2012).

A composição do leite humano é influenciada pela etnia e hábitos alimentares por vezes condicionados pela religião (Goedhart and Bindels, 1994), e ainda por algumas características maternas, nomeadamente, a idade, o número de partos, o estado de saúde e a alimentação diária (toma de suplementos) (Yu-dong *et al.*, 2011).

As características do leite humano são ainda variáveis ao longo do período de amamentação, compreendendo 3 estágios: o colostro, o leite de transição e, por fim, o leite maduro (Ballard and Morrow, 2013).

O colostro é o primeiro fluido produzido em pequenas quantidades logo após o parto (dura de 4 a 7 dias). Este fornece ao recém-nascido componentes imunológicos como a imunoglobulina A (Ig A), lactoferrina, leucócitos e fatores de crescimento (Ballard and Morrow, 2013). O leite de transição surge entre o 5º e o 15º dia após o nascimento, acompanhando as necessidades nutricionais do bebé. O leite humano maduro, o 3º estágio de lactação, contém entre 3 % a 5 % de gordura, 0,8 % a 0,9 % de proteína, 6,9 % a 7,2 % de glúcidos, incluindo a lactose, e 0,2 % de constituintes minerais, expressos em cinzas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/392766>, 2013).

Um estudo recente evidencia a composição nutricional do leite de mulheres chinesas nas diferentes fases de lactação (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do leite de mulheres chinesas, nas diferentes fases de lactação, expresso em g de componente por 100 mL de leite.

	Lípidos	Lactose	Proteína	Sólidos totais	Cinza
Colostro	3,45	6,79	1,33	11,58	0,17
Leite de transição	3,29	6,65	1,28	11,37	0,20
Leite maduro	3,04	6,97	1,20	11,49	0,21

Adaptado de Yu-dong *et al.*, (2011).

A HMF é considerada o melhor alimento funcional para o recém-nascido pois fornece cerca de 50 % das necessidades em energia, sendo o veículo de vitaminas lipossolúveis e de ácidos gordos essenciais (Wang *et al.*, 2010). Da percentagem de gordura existente, 98 % são triacilgliceróis (TAG) (Ilyasoglu, 2013). Um TAG consiste numa molécula de glicerol esterificada a três ácidos gordos.

A composição em FA da HMF varia ao longo dos três estágios de lactação. Estas diferenças podem ser observadas na tabela 2, que faz referência à composição em FA do leite de mães dinamarquesas e espanholas. Apesar da variabilidade, verifica-se que o ácido oleico (C18:1), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido linoleico (C18:2) são os FA maioritários em qualquer dos estágios de lactação (Lopez-Lopez *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

Tabela 2. Composição em ácidos gordos do colostro, leite de transição e do leite maduro, expresso em % (m/m).

Ácidos gordos	Colostro		Leite de transição		Leite maduro	
C10:0	0,24 ^{a,1}	0,66 ^{b,2}	1,66 ^{b,2}	0,91 ^{a,1}	1,63 ^{b,2}	
C12:0	1,59 ^{a,1}	3,49 ^{b,2}	6,97 ^{b,2}	3,61 ^{a,1}	6,28 ^{b,2}	
C14:0	3,46 ^{a,1}	4,75 ^{b,2}	6,94 ^{b,2}	3,50 ^{a,1}	6,00 ^{b,2}	
C15:0	0,11 ^{a,1}	0,23 ^{b,2}	0,25 ^{b,2}	0,08 ^{a,1}	0,23 ^{b,2}	
C15:1	0,06 ^{a,1}	0,03 ^{b,2}	0,04 ^{b,2}	0,00 ^{a,1}	0,04 ^{b,2}	
C16:0	24,17 ^{a,1}	21,17 ^{b,2}	19,35 ^{b,2}	20,22 ^{a,1}	19,48 ^{b,2}	
C16:1 n-7	1,98 ^{a,1}	1,36 ^{b,2}	1,52 ^{b,2}	2,44 ^{a,1}	1,78 ^{b,2}	
C17:0	0,21 ^{a,1}	0,35 ^{b,2}	0,31 ^{b,2}	0,19 ^{a,1}	0,30 ^{b,2}	
C17:1	0,13 ^{a,1}	0,19 ^{b,2}	0,18 ^{b,2}	0,11 ^{a,1}	0,19 ^{b,2}	
C18:0	5,89 ^{a,1}	6,29 ^{b,2}	6,20 ^{b,2}	5,29 ^{a,1}	6,25 ^{b,2}	
C18:1 n-9	38,10 ^{a,1}	38,83 ^{b,2}	35,48 ^{b,2}	36,96 ^{a,1}	36,35 ^{b,2}	
C18:2 n-6	15,93 ^{a,1}	16,10 ^{b,2}	15,74 ^{b,2}	20,85 ^{a,1}	16,59 ^{b,2}	
C18:3 n-3	0,51 ^{a,1}	0,41 ^{b,2}	0,58 ^{b,2}	0,83 ^{a,1}	0,75 ^{b,2}	
C20:0	0,21 ^{a,1}	0,19 ^{b,2}	0,19 ^{b,2}	0,21 ^{a,1}	0,20 ^{b,2}	
C20:1 n-9	0,99 ^{a,1}	0,94 ^{b,2}	0,68 ^{b,2}	0,53 ^{a,1}	0,60 ^{b,2}	
C21:0	0,00 ^{a,1}	NI ^{b,2}	NI ^{b,2}	NI ^{a,1}	NI ^{b,2}	
C22:0	0,00 ^{a,1}	0,08 ^{b,2}	0,04 ^{b,2}	0,00 ^{a,1}	0,05 ^{b,2}	
C24:0	0,00 ^{a,1}	0,09 ^{b,2}	0,05 ^{b,2}	0,00 ^{a,1}	0,03 ^{b,2}	

^a leite de mães dinamarquesas, ^b leite de mães espanholas; NI – não identificado

Adaptado de ¹ Wang et al., (2010); ² Lopez-Lopez et al., (2002).

No que concerne à regiodistribuição dos principais FA nos TAG da HMF, verifica-se que o ácido gordo saturado C16:0 encontra-se, maioritariamente, na posição *sn*-2, enquanto os ácidos gordos insaturados, C18:1, C18:2 e C18:3 ocupam, preferencialmente, as posições *sn*-1 e *sn*-3 (Tabela 3) (Ilyasoglu, 2013; Innis, 2011).

Tabela 3. Regiodistribuição dos principais FA na gordura de leite humano, expressa em g de FA por 100 g de leite.

Principais FA no leite humano				
Posições no TAG	C16:0 (25%)	C18:1 (30%)	C18:2 (13%)	C18:3 (1%)
sn-1	12%	46%	15%	0,9%
sn-2	51%	12%	8,4%	0,8%
sn-3	12%	36%	17%	1,4%

Adaptado de Innis, (2011).

1.2. O processo de digestão da gordura de leite humano

O processo de digestão resulta da ação concertada das enzimas lingual, gástrica, intestinal, biliar e pancreática. Esta última, também denominada colipase-dependente, existe em quantidade muito reduzida no recém-nascido, tal como os sais biliares (Consultation, 2010).

A lipase pancreática possui seletividade *sn* 1,3 pelo que hidrolisa, preferencialmente, as posições *sn*-1 e *sn*-3 do TAG, originando ácidos gordos livres FFA e monoacilgliceróis (MAG).

Os produtos da digestão da gordura são solubilizados por sais biliares e lecitina, formando-se micelas, os quais são absorvidos através da parede do intestino (Bernback *et al.*, 1990). O ácido palmítico (C16:0), que se encontra predominantemente na posição *sn*-2 do TAG, é eficientemente absorvido como monoacilpalmitato no intestino.

A hidrólise dos TAG pela lipase pancreática depende do comprimento da cadeia carbonada do FA e do seu grau de insaturação. Está demonstrado que os FA de cadeia média são hidrolisados mais rapidamente do que os de cadeia longa (Cabrita, 2011).

1.3. Fórmulas infantis

As fórmulas infantis para lactentes surgem como uma alternativa ao leite materno, visando suprir as necessidades nutricionais do recém-nascido nos primeiros meses de vida.

De acordo com o *Decreto-lei n.º 217/2008*, publicado em diário da República a 11 de Novembro de 2008, as fórmulas infantis são consideradas os “*únicos géneros*

alimentícios transformados que satisfazem integralmente as necessidades nutritivas dos lactentes durante os primeiros meses de vida, até à introdução de uma alimentação complementar adequada e, por forma a proteger a saúde dos lactentes, importa assegurar que apenas sejam comercializados como produtos adequados para a referida utilização".

O código da Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda medidas para proteger e promover o aleitamento materno e assegurar a utilização adequada das fórmulas infantis (<http://www.anid.pt/formulas-para-lactentes-e-formulas-de-transicao.html>, 2013). Existem vários fabricantes responsáveis pelo fabrico destas fórmulas, os quais respeitam e colocam em prática os princípios e objetivos da OMS, entre os quais, a Milupa, NAN, Alfaré e Aptamil.

A segurança nutricional e a conformidade de fórmulas infantis deve ser cientificamente demonstrada por forma a assegurar o crescimento e desenvolvimento normal da criança. A Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (*European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) recomenda a composição padrão para as fórmulas infantis, indicada na tabela 4, onde se encontram estabelecidas quantidades mínimas e máximas para cada componente. Estes valores encontram-se em concordância com o descrito no *Decreto-lei n.º 217/2008*.

A gordura total recomendada (4,4 a 6,0 g/100 kcal) é equivalente a cerca de 40 a 54 % do teor de energia, sendo este valor semelhante aos encontrados normalmente no leite humano (Koletzko *et al.*, 2005).

Tabela 4. Composição nutricional padrão das fórmulas infantis.

Componente	Unidade	Mínimo	Máximo
<u>Energia:</u>	kcal/100 mL	60	70
<u>Proteínas:</u>			
Proteína do leite de vaca	g/100 kcal	1,8	3
Isolado proteico de soja	g/100 kcal	2,25	3
Proteína do leite de vaca hidrolisada	g/100 kcal	1,8	3
<u>Lípidos:</u>			
Gordura total	g/100 kcal	4,4	6
Ácido linoleico	g/100 kcal	0,3	1,2
α -Ácido linoleico	mg/100 kcal	50	NS
Razão ácido linoleico/ α -ácido linoleico			
Ácidos láurico e mirístico	% de gordura	NE	20
Ácidos gordos - <i>trans</i>	% de gordura	NE	3
Ácido erúcico	% de gordura	NE	1
<u>Glúcidos:</u>			
Total de Glúcidos	g/100 kcal	9	14
<u>Vitaminas:</u>			
Vitamina A	μ g RE/100 kcal	60	180
Vitamina D3	μ g/100 kcal	1	2,5
Vitamina E	mg α -TE/100 kcal	0,5	5
Vitamina K	μ g/100 kcal	4	2,5
Tiamina	μ g/100 kcal	60	300
Riboflavina	μ g/100 kcal	80	400
Niacina	μ g/100 kcal	300	1500
Vitamina B6	μ g/100 kcal	35	175
Vitamina B12	μ g/100 kcal	0,1	0,5
Ácido Pantoténico	μ g/100 kcal	400	2000
Ácido Fólico	μ g/100 kcal	10	50
Vitamina C	mg/100 kcal	8	30
Biotina	μ g/100 kcal	1,5	7,5
<u>Minerais e Elementos vestigiais:</u>			
Ferro (fórmula baseada na proteína e no hidrolisado do leite de vaca)	mg/100 kcal	0,3	1,3
Ferro (fórmula baseada na solado proteico de soja)	mg/100 kcal	0,45	2
Cálcio	mg/100 kcal	50	140
Fósforo (fórmula baseada na proteína e no hidrolisado do leite de vaca)	mg/100 kcal	25	90
Fósforo (fórmula baseada na solado proteico de soja)	mg/100 kcal	30	100
Razão Cálcio/ Fósforo	mg/mg	1:1	2:1
Magnésio	mg/100 kcal	5	15
Sódio	mg/100 kcal	20	60
Cloro	mg/100 kcal	50	160
Potássio	mg/100 kcal	60	160
Magnésio	μ g/100 kcal	1	50
Flúor	μ g/100 kcal	NE	60
Iodo	μ g/100 kcal	10	50
Selénio	μ g/100 kcal	1	9
Cobre	μ g/100 kcal	35	80
Zinco	mg/100 kcal	0,5	1,5
<u>Outras substâncias:</u>			
Colina	mg/100 kcal	7	50
Mio-inositol	mg/100 kcal	4	40
L-carnitina	mg/100 kcal	1,2	NE

NE – Não especificado; adaptado de Koletzko et al., (2005).

Tradicionalmente, as fórmulas infantis possuem na sua composição óleos de origem vegetal e leite de mamíferos, sendo os mais frequentes os leites de vaca, ovelha, cabra e búfala, que diferem na composição em FA (Tabela 5) bem como na regiodistribuição dos FA nos TAG, que se caracteriza pela prevalência de FA saturados nas posições externas e pelo predomínio de FA insaturados na posição central do TAG, ao contrário do que se verifica na HMF (Tabela 6).

Este padrão de regiodistribuição dos FA no esqueleto de glicerol afeta, drasticamente, a digestibilidade do leite de fórmula pelo recém-nascido. Com efeito, o ácido palmítico, que ocupa preferencialmente as posições periféricas do TAG, é libertado na forma de FFA por ação da lipase pancreática. O ácido palmítico complexa com o cálcio existente no meio, formando sabões de cálcio insolúveis, resultando numa deficiente absorção de cálcio e de ácido palmítico pelo recém-nascido.

Tabela 5. Composição em FA da gordura de diferentes leites, expressa em % molar.

Ácidos gordos	Leite materno	Leite de vaca	Leite de búfala	Leite de burra	Leite de ovelha
C12:0	6,74	3,90	2,74	2,89	4,10
C14:0	8,54	11,76	10,84	7,52	9,37
C16:0	23,83	30,43	34,64	31,24	25,35
C16:1 n-7	2,00	1,88	3,59	1,95	1,09
C18:0	6,09	7,5	8,10	8,31	9,64
C18:1 n-9	33,43	17,94	18,00	31,77	21,54
C18:2 n-6	10,57	1,12	1,56	5,53	2,62
C18:3 n-3	0,05	0,13	0,42	0,51	1,11
C20:0	0,25	0,36	0,25	0,16	0,20
C20:1 n-9	0,24	NI	0,34	0,42	0,14
C22:0	0,13	0,07	0,12	NI	NI
C24:0	0,09	0,05	0,04	0,17	0,17

Adaptado de Zou et al., (2013).

Tabela 6. Regiodistribuição dos FA na posição sn-2 na gordura de diferentes leites, expressa em % molar.

Ácidos gordos	Leite materno	Leite de vaca	Leite de búfala	Leite de burra	Leite de ovelha
C16:0	52,66	32,03	39,23	27,12	27,60
C18:1 n-9	9,99	13,21	15,70	30,71	19,85
C18:2 n-6	6,85	2,07	1,98	7,57	4,96

Adaptado de Zou et al., (2013)

Recentemente, a síntese de lípidos estruturados sucedâneos da gordura de leite humano, incorporados em fórmulas infantis, permitiu ultrapassar as limitações associadas ao consumo de fórmulas infantis tradicionais.

1.4. Lípidos estruturados

Os lípidos estruturados (*Structured Lipid* - SL) são TAG que sofreram modificação por incorporação de novos FA ou por reestruturação das posições dos FA no esqueleto de glicerol (Sahin et al., 2005).

Os SL podem ser produzidos por via química ou por enzimática, a partir de reações de interesterificação, esterificação, alcoólise e acidólise. Na via química utilizam-se metais alcalinos como catalisadores não seletivos, isto é, hidrolisam de forma indiscriminada as ligações éster no TAG. O processo requer temperaturas reacionais elevadas, entre 70 °C e 150 °C (Xu, 2000). A via enzimática oferece múltiplas vantagens face à síntese química, nomeadamente, pela seletividade do biocatalisador e pelas condições operacionais moderadas de pressão e temperatura, com consequentes benefícios a nível económico (Cabrita 2011; Xu, 2000).

A figura 1 compara a interesterificação por via química, que conduz à formação de novos TAG com distribuição aleatória dos ácidos gordos no esqueleto de glicerol com a interesterificação enzimática utilizando lipases com selectividade sn-1,3 (Xu, 2000).

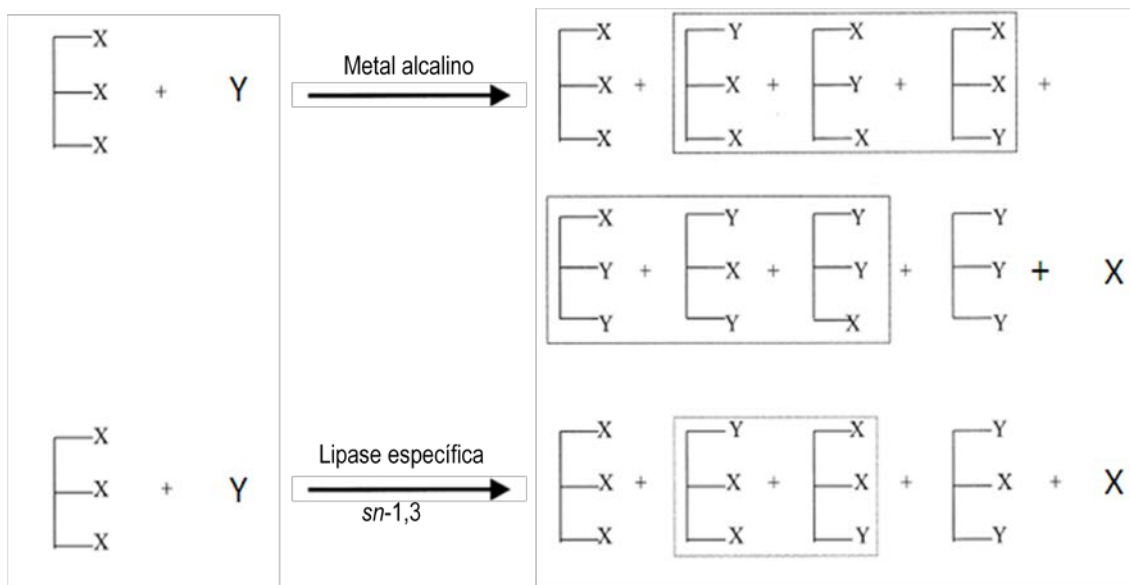


Figura 1. Acidólise por via química e por via enzimática.

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 and Akoh, 2002), de sucedâneos da manteiga de cacau (Liu *et al.*, 2007), de triacilgliceróis ricos em ácidos gordos de cadeia média (Pérignon *et al.*, 2014) e de sucedâneos de gordura de leite humano (Tabela 7). As propriedades funcionais dos SL têm justificado a sua utilização na síntese de sucedâneos da gordura do leite humano (*Human Milk Fat Substitutes - HMFS*) para incorporação em fórmulas infantis pois mimetizam a fração lipídica do leite materno, no que respeita à composição e regiodistribuição dos FA nos TAG, melhorando a qualidade do produto alimentar fornecido ao recém-nascido (Sahin *et al.*, 2005).

Diversos estudos referenciam a utilização de diferentes matérias-primas na produção de HMFS como, por exemplo, a banha de porco e o óleo de soja (Nielsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2003), o óleo de avelã (Sahin *et al.*, 2006), a manteiga (Sorensen *et al.*, 2010), tripalmitina e ácido oleico (Tecalão *et al.*, 2012b), banha e ácido palmítico (Simões *et al.*, 2013), entre outros.

Tabela 7. Casos de estudo na produção de HMFS em meios isentos de solvente.

Lipase	Substratos	Condições da reação	Referência
Lipozyme RM IM	Ácido oleico : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipozyme TL IM	Ácido oleico : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Novozym 435	Ácido oleico : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipase aciltransferase	Ácido oleico : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipozyme RM IM	Ômega-3 PUFA : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipozyme TL IM	Ômega-3 PUFA : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Novozym 435	Ômega-3 PUFA : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipase aciltransferase	Ômega-3 PUFA : Tripalmitina	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2010
Lipozyme TL IM	Óleo de soja : Tripalmitina	T = 65 °C MR = 2:1	Teichert and Akoh, 2011
Novozym 435	Óleo de soja : Tripalmitina	T = 65 °C MR = 2:1	Teichert and Akoh, 2011
Novozym 435	Óleo de avelã : (ácido docosahexanóico : ácido araquidónico)	T = 60 °C MR = 1:0,1(3:2)	Turan <i>et al.</i> , 2012
rROL	Tripalmitina e ácido oleico	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2012a
Carica papaya latex	Tripalmitina : ácido oleico	T = 60 °C MR = 2:1	Tecelão <i>et al.</i> , 2012b
Lipozyme TL IM	Tripalmitina : azeite virgem extra : óleo de linhaça	T = 56,7 °C MR = 2,67:1	Ilyasoglu, 2013
Novozym 435	Oleína de palma : DHA e GLA	T = 60 °C MR = 0,5:1	Nagachinta and Akoh, 2013
Lipozyme TL IM	Tripalmitina : FFA de azeite virgem extra : ácido de docosahexaenóico	T = 65 °C MR = 1:3:2	Pande <i>et al.</i> , 2013
rROL	Ômega-3 PUFA : Banha de porco	T = 40 °C MR = 3:1	Simões <i>et al.</i> , 2013

1.5. Síntese de lípidos estruturados sucedâneos da gordura de leite humano

A indústria, com o objetivo de inovar e melhorar os produtos alimentares disponíveis no mercado, assegurando a qualidade dos mesmos, disponibiliza atualmente fórmulas infantis para lactentes nas quais o tipo de gordura adicionada se assemelha à HMF. A finalidade é fornecer à criança uma fórmula infantil em que a gordura adicionada seja um sucedâneo, ou seja, um sucedâneo de gordura de leite.

Os HMFS podem ser sintetizados por via enzimática, recorrendo à utilização de lipases com seletividade *sn*-1,3. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de acilgliceróis na interface óleo/água no entanto, em meio orgânico ou com baixa atividade da água, são eficientes catalisadores em reações de esterificação e interesterificação (Tecelão *et al.*, 2012b). As lipases podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, e são conhecidas pela sua função fisiológica na digestão e absorção de lípidos. A utilização de lipases tem ganho expressão face aos catalisadores químicos, devido, nomeadamente, à sua seletividade e condições operacionais moderadas (Pérignon *et al.*, 2014).

A comercialização do primeiro HMFS, obtido por catálise enzimática, remonta a 1995 e adotou a designação de “Betapol” que consiste, essencialmente, em TAG do tipo OPO, isto é, com ácido oleico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e ácido palmítico na posição central do TAG. O Betapol resulta da interesterificação de óleos vegetais catalisada por uma lipase seletiva 1,3 (<http://www.betapol.com/en/betapol-your-natural-partner>, 2013) e possui uma regiodistribuição de FA no TAG semelhante à da HMF, contrastando com as fórmulas infantis tradicionais (Figura 2).

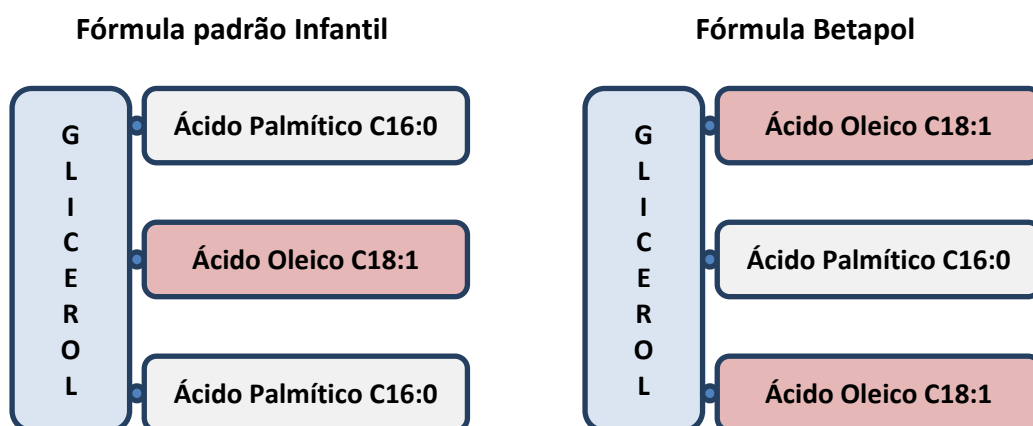


Figura 2. Comparação da estrutura do triacilglicerol em fórmulas infantis tradicionais e num sucedâneo de gordura de leite humano, o Betapol. Adaptado de <http://www.betapol.com/en/what-science-shows>.

Um exemplo mais recente de HMFS é o “Infat” produzido pela AAK em Karlshamn, na Suécia (<http://advancedlipids.com/en-US/Content.aspx?did=131&miid=45&sel=0>, 2013). Na síntese de lípidos estruturados e de HMFS, em particular, utilizam-se, preferencialmente, lipases imobilizadas em detrimento da sua forma livre, pois o processo de imobilização evita a solubilização da lipase e posterior contaminação do produto (com mais relevância no setor alimentar), confere maior estabilidade operacional ao biocatalisador, possibilitando a sua reutilização e minimizando os custos associados ao processo (Guillén *et al.*, 2011).

Alguns exemplos de lipases 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”. É ainda de referir que no que respeita à atividade das lipases imobilizadas, esta depende de vários fatores como a própria lipase, o tipo de suporte e o procedimento de imobilização. Quanto à imobilização de enzimas existem vários métodos, tais como: separação por membranas; microencapsulação; entrelaçamento em polímeros; por ligação covalente; imobilização por adsorção (Madalozzo, 2011).

No método de separação por membranas a enzima encontra-se separada do meio reacional por uma membrana semipermeável, contrariamente ao método de microencapsulação em que a enzima se encontra confinada no interior de micelas formando um sistema emulsionado. O entrelaçamento em polímeros consiste em aprisionar as enzimas entre malhas de um polímero (Madalozzo, 2011). O método de imobilização por ligação covalente consiste em “ligar” a enzima ao suporte inerte através de ligações químicas covalentes, enquanto a imobilização por adsorção consiste na adsorção da enzima a um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas. Este tipo de imobilização origina uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, contudo não provoca perda da atividade catalítica (Madalozzo, 2011). Existem vários suportes disponíveis salientando-se polímeros sintéticos como: “Accurel[®] MP 1000”, “Eupergit[®] C”, a “Lewatit[®] VP OC 1600” e “Sepabeads” (Tecelão *et al.*, 2012a).

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 (a_w) (Guillén *et al.*, 2011; Pérignon *et al.*, 2013; Sahin *et al.*, 2005).

No que diz respeito ao valor ótimo de pH, este varia consoante a origem da lipase. No caso de origem fúngica o pH ótimo encontra-se 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).

A temperatura é outro fator muito importante, frequentemente estudado. A maioria das lípases funcionam a condições de temperatura constantes, sendo o intervalo de temperatura ótimo entre 30 a 50 °C para lipases microbianas. Estas são termicamente mais estáveis comparativamente com lipases de origem vegetal ou animal. É ainda de referir que a imobilização das enzimas pode permitir uma estabilização térmica entre 60 a 70 °C (Soumanou *et al.*, 2013).

Por sua vez, a atividade termodinâmica da água dá indicação sobre a quantidade de água não ligada ou livre disponível como reagente. Assim sendo, em reações anidras é fundamental controlar a a_w do catalisador, pois vai determinar o desempenho deste. Na maioria das preparações lipásicas a a_w ótima para reações de interesterificação encontra-se geralmente entre 0,25 e 0,45. A reação enzimática para a síntese de HMFS compreende, frequentemente, como substratos uma fonte de TAG ricos em ácido palmítico na posição sn-2 (por exemplo, tripalmitina ou banha), uma fonte de FFA rica em ácidos gordos mono e polinsaturados (por exemplo, óleo de soja e óleo de avelã) e lipases com seletividade 1,3 (Sahin *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2013; Soumanou *et al.*, 2013).

2. TRABALHO EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

2.1.1. Substratos

Leite Materno - O leite materno foi disponibilizado por uma mãe portuguesa de 28 anos, com 7 meses de lactação.

Óleo de gralha de uva - O óleo de gralha de uva (Huilerie Émile Noël, Pont-Saint-Esprit, França), utilizado como fonte de FFA na reação de acidólise, foi adquirido numa loja de produtos naturais.

Tripalmitina - A tripalmitina ($MM = 807,35 \text{ g mol}^{-1}$), com grau de pureza superior a 85 %, utilizada como fonte de ácido palmítico na reação de acidólise, foi adquirida à *Tokyo Chemical Industry Co.Ltd* (TCI), Europa, Bélgica.

2.1.2. Lipases

Lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) - A rROL é uma lipase produzida pelo fungo *Rhizopus oryzae* e expressa numa estirpe recombinante de *Pichia pastoris*, pelo grupo do Prof. Francisco Valero, da Universidade autónoma de Barcelona. Esta lipase apresenta seletividade *sn*-1,3. Foram utilizados 2 lotes diferentes, com diferentes atividades hidrolíticas:

Lote FB19/11/10 JMB: 178,8 UA/mg de pó (utilizado nos ensaios de selecção do suporte);

Lote PIC130710 CAJ-B: 78 UA/mg de pó (utilizado nos restantes ensaios).

Lipozyme RM IM - A Lipozyme RM IM é uma preparação comercial da lipase de *Rhizomucor miehei*, imobilizada numa resina sintética e produzida pela Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Trata-se de uma lipase termoestável e com selectividade *sn*-1,3.

2.1.3. Suportes de imobilização

Lewatit® VP OC 1600 - A Lewatit® VP OC 1600 é um suporte macroporoso, de forma esférica e com uma aparência branca opaca. É um polímero de ésteres metacrílicos, com uma dimensão de poro de 15 nm. Foi oferecido por Lenntech, Lanxess Energizing Chemistry, Holanda.

Sepabeads Relyzime OD 403/M - A Sepabeads Relyzime OD 403/M é um polímero constituído por ésteres metacrílicos, com uma aparência branca opaca e tem uma dimensão mínima de poro de 10 nm. Foi fornecido pela Resindion, Itália.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização química do leite humano

A caracterização química do leite humano incidiu na quantificação do teor de gordura, de proteína bruta e de resíduo seco.

Preparou-se a amostra de leite de acordo com a norma portuguesa (NP) 403. Para o efeito, colocou-se a amostra, previamente acondicionada em saco esterilizado (Medela), em banho-maria, a 38 °C e homogeneizou-se.

A determinação da gordura foi realizada de acordo com a NP 469, em duplicado. Colocou-se a amostra em butirómetros, munidos de rolha apropriada, e adicionou-se, aproximadamente, 10 mL de ácido sulfúrico para promover a digestão da matéria sólida. Após agitação, adicionou-se aproximadamente 1 mL de álcool amílico e centrifugou-se cerca de 10 min a 1000 rpm. O álcool amílico facilitou a separação de fases. Por fim, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, retirou-se a gordura para um tubo de ensaio que foi devidamente fechado para análise dos FA por cromatografia gasosa.

A determinação do resíduo seco regeu-se pela NP 475. Para o efeito, colocou-se numa cápsula de aço inoxidável 25 g de areia e manteve-se numa estufa a $101 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Deixou-se arrefecer a cápsula e adicionou-se, com precisão, 5 g de leite. Colocou-se, novamente, na estufa durante 3 horas. Deixou-se arrefecer em exsiccador e pesou-se. Efetuaram-se ciclos de secagem de 30 minutos até que a diferença de massa entre duas pesagens consecutivas fosse igual ou inferior a 0,5 mg.

No que respeita à proteína bruta, esta foi determinada de acordo com a NP 1986, pelo método de Kjeldahl, que compreendeu três fases: a mineralização do azoto pelo ácido sulfúrico concentrado, alcalinização dos produtos da reação, destilação e titulação do amoníaco libertado, para obtenção do teor de azoto.

A determinação da composição em ácidos gordos foi feita na forma de éster metílico do ácido gordo (*Fatty Acid Methyl Ester* - FAME) por cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC) (secção 2.2.7.3.) após metilação da gordura de acordo

com o método rápido descrito no Jornal Oficial das Comunidades Europeias, N^o L 248/47, 1991.

A composição em ácidos gordos em posição-2, nomeadamente a percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo, foi determinada no Laboratório de Estudos Técnicos do ISA, segundo o Regulamento (CEE) n^o 2568/91, de 9 de Agosto de 2012. Esta técnica baseia-se no seguinte: a amostra de gordura é sujeita à ação hidrolítica da lipase pancreática com selectividade sn-1,3, com formação de 2-monoacilgliceróis (2-MAG). A percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo na fração dos 2-MAG foi determinada, após metilação, por cromatografia gasosa capilar.

2.2.2. Preparação dos ácidos gordos livres por saponificação

A saponificação consiste na hidrólise de ésteres de glicerol por ação de bases alcalinas fortes (como o hidróxido de potássio, KOH) originando sais de ácidos carboxílicos (vulgarmente designados sabões) e glicerol.

A saponificação do óleo de grainha de uva processou-se de acordo com o método descrito por Sahin *et al.*, (2005).

Pesaram-se, aproximadamente, 25 g de óleo de grainha de uva, 5,75 g de hidróxido de potássio (Laborspirit) e mediu-se 11 mL de água destilada e 66 mL de solução aquosa de etanol 96% (Fisher Scientific). Misturaram-se todos os reagentes num balão de fundo redondo de 250 mL, agitando até à dissolução do hidróxido de potássio.

Posteriormente, colocou-se o balão de fundo redondo em banho-maria (a 100 °C), numa placa de aquecimento (Velp Scientifica), com um condensador adaptado de forma a manter a solução em refluxo durante 1 hora. Terminado o tempo, deixou-se arrefecer a mistura e adicionaram-se 50 mL de água destilada, transferindo-se a solução para uma ampola de decantação.

A fase insaponificável foi extraída com 2 x 100 mL de *n*-hexano (Fisher Scientific). Desprezou-se o *n*-hexano e adicionou-se uma solução aquosa de HCl 3M até obtenção de um valor de pH de 1,0.

Posteriormente, adicionou-se 50 mL de hexano, para extrair os FFA, e colocou-se sulfato de sódio anidro (Panreac Quimica Sau) para secar a fase orgânica.

A solução foi transferida para um balão de vidro cónico com auxílio de um funil e papel de filtro (Whatman), para remover o sulfato de sódio anidro, e procedeu-se à

evaporação do *n*-hexano num evaporador rotativo (Buchi), com banho de água a 40 °C e pressão inicial de 400 mbar, diminuindo progressivamente até 200 mbar.

Confirmou-se a presença exclusiva de FFA por cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromathography* - TLC), como descrito no ponto 3.2.7.1. (Figura 3).

Os FFA obtidos foram conservados em frasco de vidro escuro, onde se fez borbulhar azoto para minimizar a oxidação, a -18 °C até utilização.

Preparação da solução de HCl 3 M: Mediram-se 65 mL de ácido clorídrico 38% que se transferiram para um balão volumétrico de 250 mL. Perfez-se o volume com água destilada.

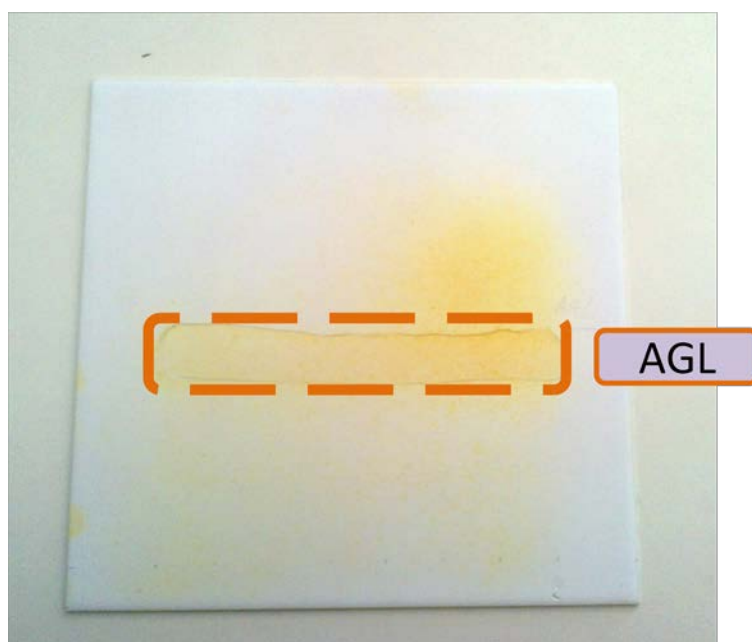


Figura 3. Cromatografia em Camada Fina. Evidência dos FFA obtidos por saponificação do óleo de grainha de uva.

2.2.3. Imobilização da rROL em Lewatit® VP OC 1600

A imobilização da rROL em Lewatit® VP OC 1600 processou-se de acordo com a metodologia descrita por Tecelão *et al.* (2012b). Dissolveu-se 1g da lipase em 200 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, adicionaram-se 4 g do suporte e deixou-se em agitação magnética suave durante 18 h.

Posteriormente, filtrou-se a solução a vácuo, utilizando um balão e um funil de Buckner, no qual se colocou um papel de filtro, adaptados a uma bomba de vácuo

(KNF Neuberger Laboport). Juntou-se 100 mL de solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) ao filtrado e colocou-se a solução, novamente, em agitação magnética durante 2 h.

Por último, filtrou-se a solução a vácuo e lavou-se a enzima imobilizada com 50 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. Deixou-se secar, mantendo a bomba de vácuo ligada cerca de 10 min.

Preparação da solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0: Pesaram-se 6,5 g de di-hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Panreac Quimica Sau) e 7,11 g de hidrogenofosfato dissódico (Na_2PO_4) (Chem-Lab). Dissolveram-se com água destilada e transferiram-se as soluções para balões volumétricos de 500 mL, perfazendo o volume com água destilada. Para a obtenção da solução final mediu-se 305 mL da solução de Na_2PO_4 , num balão volumétrico de 500 mL e perpez-se com a solução de NaH_2PO_4 .

Preparação da solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v): Mediu-se 108 mL de solução tampão fosfato 0,1 M e 12 mL de glutaraldeído (Merck), para um balão Erlenmeyer de 250 mL.

2.2.4. Imobilização da rROL em Sepabeads Relizyme OD 403/M

A imobilização da rROL em Sepabeads Relizyme OD 403/M foi realizada de acordo com o seguinte protocolo fornecido por Albert Canet, da Universidade Autónoma de Barcelona.

Pesou-se 1 g da enzima e dissolveu-se em 30 mL de solução tampão fosfato 5 mM. Deixou-se em agitação magnética num reator de parede dupla, com banho de refrigeração a 4 °C (Neslab RTE-200), durante 25 min.

Pesou 4,5 g de suporte e adicionaram-se a 700 mL de solução água-acetona (Fisher Scientific) (50/50 v/v). Deixou-se em agitação durante 25 min. Posteriormente, filtrou-se a vácuo e lavou-se o suporte com cerca de 200 mL de água destilada para remover a acetona.

Adicionou-se o suporte à solução da enzima e deixou-se em agitação magnética, a 4 °C, durante 7 h. Filtrou-se a solução a vácuo e lavou-se o filtrado com 250 mL de solução tampão fosfato 5 mM. Manteve-se a bomba de vácuo ligada durante 1 h para secar o filtrado e deixou-se 24 h num exsiccador com sílica gel.

Preparação da solução tampão fosfato 5 mM: Pesou-se 0,7098 g de hidrogenofosfato dissódico anidro, dissolveu-se em água destilada e transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1000 mL. Acertou-se o pH a 7,0 com hidróxido de sódio (Fisher Scientific).

2.2.5. Preparação da rROL a diferentes valores de atividade da água

Pré-equilibrou-se a rROL, já imobilizada em Lewatit® VP OC 1600, a diferentes valores de atividade da água (a_w): 0,56, 0,75, 0,81 e 0,92, de acordo com Greenspan, (1977).

Para o efeito, colocou-se uma determinada quantidade de enzima num copo que foi, por sua vez, inserido num frasco com uma solução salina sobressaturada: brometo de sódio ($a_w = 0,56$), cloreto de sódio ($a_w = 0,75$), sulfato de amónio ($a_w = 0,81$) e nitrato de potássio ($a_w = 0,92$). Colocou-se o frasco numa estufa (Binder) a 35 °C permitindo assim a evaporação de água até se dar o equilíbrio entre a humidade da enzima e a da solução salina. A figura 4 indica as diversas soluções salinas utilizadas para obtenção dos diferentes valores de a_w .

Efetuaram-se pesagens diárias, numa balança analítica (Shimduz AW 220), para avaliar a massa de água perdida relativamente ao dia anterior. Quando as massas registadas em dias consecutivos diferissem em menos de 5% considerava-se atingido a humidade relativa de equilíbrio entre a enzima e a solução salina.



Figura 4. Representação das diversas soluções salinas utilizadas para obtenção dos diferentes valores de a_w .

2.2.6. Reação de acidólise

A reação de acidólise entre a tripalmitina e os FFA do óleo de grainha de uva realizou-se em descontínuo, à pressão atmosférica, em reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm³), sob agitação magnética, tapado com uma rolha envolvida em alumínio, de forma a minimizar oxidações (Figura 5). A temperatura foi assegurada por um banho termostatzado em circuito fechado, fazendo passar água à temperatura desejada pela camisa do reator.

A tripalmitina e os FFA do óleo de grainha de uva, utilizados a diferentes razões molares (FFA do óleo de grainha de uva/tripalmitina) ao longo do trabalho laboratorial, foram termostatzados a 60 °C antes da adição do biocatalisador.

Utilizaram-se como biocatalisadores (i) rROL imobilizada em Lewatit[®] VP OC 1600, (ii) rROL imobilizada em Sepabeads Relizyme OD 403/M e (iii) a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM, à concentração de 5% (m/m) relativamente à massa de tripalmitina. As quantidades pesadas foram, aproximadamente, 3,5 g de tripalmitina, 2,75 g de FFA do óleo de grainha de uva e 0,175 g do biocatalisador, salvo indicação em contrário. Estas massas de tripalmitina e FFA correspondem a uma razão molar FFA/tripalmitina de 2:1, expressa em ácido linoleico livre.

Periodicamente, retiraram-se amostras do meio reacional que eram filtradas para tubos de plástico, com o auxílio de um funil e papel de filtro (Whatman), vedadas com parafilme e conservadas a -18 °C até posterior análise.

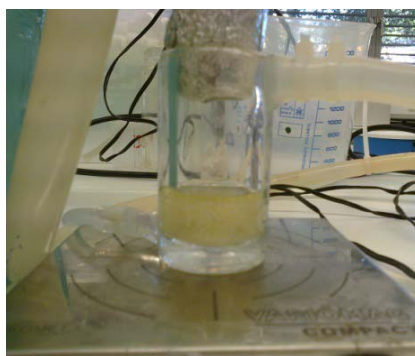


Figura 5. Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm³) sob agitação magnética.

2.2.7. Análise dos produtos de reação

2.2.7.1. Separação dos acilgliceróis e ácidos gordos livres por cromatografia em camada fina

A TLC compreende uma fase estacionária, composta por uma fina camada de adsorvente (por exemplo, sílica gel) colocada sobre um material rígido e inerte, como uma placa de vidro. A outra fase é uma fase móvel que vai ascender na fase estacionária por capilaridade e favorecer a separação dos compostos desejados (Mendham *et al.*, 2008).

As amostras do meio reacional, que se encontravam congeladas, foram colocadas em estufa (W.C. Heraeus GMBH, Hanau), a 70 °C, para fundirem. Pesou-se, aproximadamente, 0,06 g de amostra para um balão volumétrico de 10 mL e fez-se o volume com clorofórmio (Fisher Scientific).

Com uma micro-seringa de 100 µL, depositaram-se 200 µL da solução em banda contínua na placa de sílica gel 20x20 cm (Merck), a 1,5 cm da base da placa e a cerca de 3 cm das laterais.

A placa foi colocada na tina cromatográfica e a eluição da fase móvel ocorreu até 1,5 cm do topo da placa. Posteriormente, removeu-se a placa da tina, deixou-se evaporar o eluente e pulverizou-se com uma solução etanólica de diclorofluoresceína, para conseguir visualizar as bandas dos MAG, DAG, FFA e TAG sob luz UV (Figura 6).

Preparação do eluente: Misturaram-se 70 mL de *n*-hexano (Fisher Scientific), 30 mL de éter etílico (Chem-Lab) e 1,5 mL de ácido acético (Fisher Scientific).

Preparação da solução de diclorofluoresceína: Pesou-se 0,1 g de diclorofluoresceína (Fluka) e dissolveu-se em 50 mL de etanol a 96 % (Fisher Scientific).

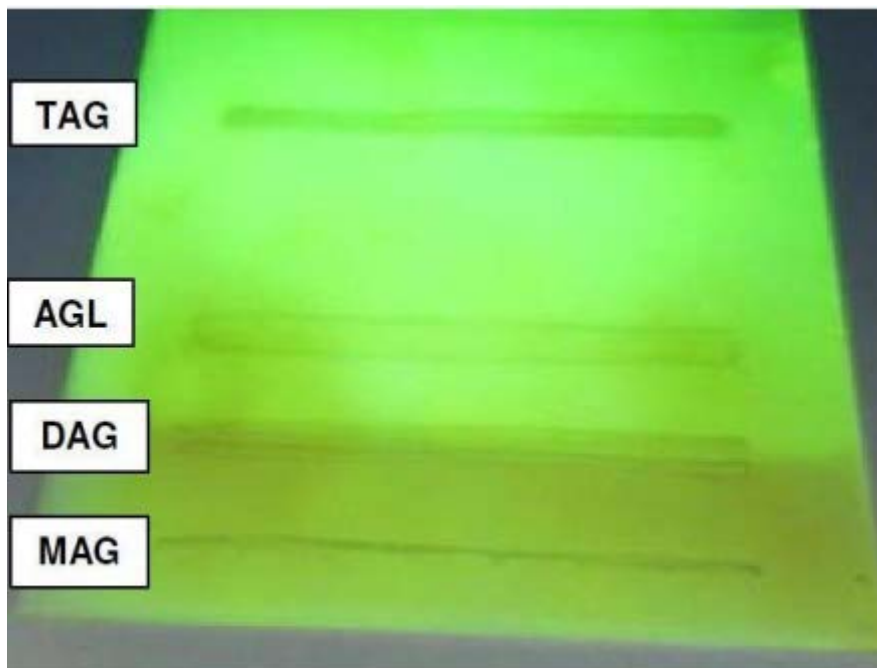


Figura 6. Cromatografia em Camada Fina. Em evidência são apresentadas as bandas correspondentes aos MAG, DAG, FFA e TAG.

2.2.7.2. Preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos

A banda dos TAG, adquirida na TLC, foi delimitada e raspada para um balão de Erlenmeyer esmerilado de 100 mL, ao qual se adicionaram 5 mL de reagente de metilação. Em seguida, colocou-se o balão de Erlenmeyer em banho de água a cerca de 80 °C e adaptou-se um condensador por forma a assegurar o refluxo da solução durante 1h.

Posteriormente, retirou-se o balão do banho e deixou-se arrefecer a amostra. Adicionaram-se 10 mL de éter de petróleo (Fisher Scientific) e transferiu-se a solução para uma ampola de decantação. Agitou-se a ampola para homogeneização e deixou-se repousar até se verificar a separação das fases etérea e aquosa. A fase aquosa foi desprezada e lavou-se a fase etérea com 2 x 10 mL de água destilada. Por fim, secou-se a fase etérea com sulfato de sódio anidro (Panreac Quimica Sau) para remover eventuais vestígios de água.

Posteriormente, filtrou-se a solução diretamente para um balão de vidro cônico de 10 mL que foi colocado num evaporador rotativo (Buchi), para evaporação do éter de petróleo até à secura.

Os balões de vidro cónicos foram fechados e vedados com parafilme e conservados a -18 °C, para posterior análise por cromatografia gasosa.

Preparação do reagente de metilação: Mediram-se 75 mL de metanol anidro (Fisher Scientific) e 25 mL de hexano (Fisher Scientific) e transferiu-se para um frasco. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico (Fisher Scientific).

2.2.7.3. Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos por cromatografia gasosa

Dissolveram-se os FAME em 100 µL de *n*-hexano. Analisou-se 1 µL desta solução no cromatógrafo gasoso Finnigan TRACE GC Ultra (Thermo Electron Corporation) equipado com uma coluna capilar TR-FAME Thermo (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm filme), um injetor automático (AS 3000 da Thermo Electron Corporation, Itália) e um detetor de ionização de chama.

As temperaturas do injetor (a operar em modo *splitless*) e do detetor foram fixadas em 250 °C e 260 °C, respetivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor ao caudal de 350 mL/min e 35 mL/min, respetivamente.

O programa de temperaturas do forno foi o seguinte: 60 °C durante 1 min, seguido de aumento de 15 °C/min até 150 °C, fixando-se durante 1 min a 150 °C, seguido de um aumento de 5 °C/min até 180 °C, fixando-se durante 3 min a 180 °C, e por fim um aumento de 10 °C/min até 220 °C, fixando-se durante 1 min a 220 °C.

A percentagem molar dos FFA foi calculada com base na área do pico cromatográfico correspondente a cada FAME e na respetiva massa molar, de acordo com as equações 1, 2 e 3. Utilizaram-se padrões comerciais de FAME com o intuito de identificar os compostos através dos tempos de retenção no cromatograma.

$$\% \text{ m\acute{a}sica} = \frac{\text{\acute{a}rea do pico cromat\acute{o}grafo do \acute{e}ster met\acute{i}lico}}{\text{\acute{a}rea total dos picos cromatogr\acute{a}ficos}} \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{N\acute{u}mero de moles} = \% \text{ m\acute{a}sica} * \text{massa molar do \acute{e}ster met\acute{i}lico} \quad (\text{eq. 2})$$

$$\% \text{ molar} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de moles} * 100}{\text{n}^{\circ} \text{ total moles}} \quad (\text{eq. 3})$$

2.2.8. Ensaios de modelação e otimização da reação de acidólise

Na modelação e otimização da reação de acidólise variou-se a razão molar dos substratos e a temperatura reacional de acordo com a RSM.

Esta metodologia compreende um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos (Myers *et al.*, 2011). Desenvolvida nos anos 50, foi aplicada em vários campos como a agricultura, a indústria e a investigação científica (Álvarez *et al.*, 2009).

A matriz central compósita rotativa (*Central Composite Rotatable Design* - CCRD) é constituída por pontos fatoriais (F), pontos estrela ($2k$) e pontos centrais. Quando o valor de k é $k=2$, vão existir 4 pontos fatoriais e 4 pontos estrela a uma distância α do ponto central igual a $\alpha = \sqrt{2}$. A figura 8 ilustra a matriz fatorial com as respetivas coordenadas, o ponto central e os pontos estrela, e os 8 pontos que se encontram equidistantes, representando um círculo perfeito, de modo a obter-se a CCRD (Myers *et al.*, 2011).

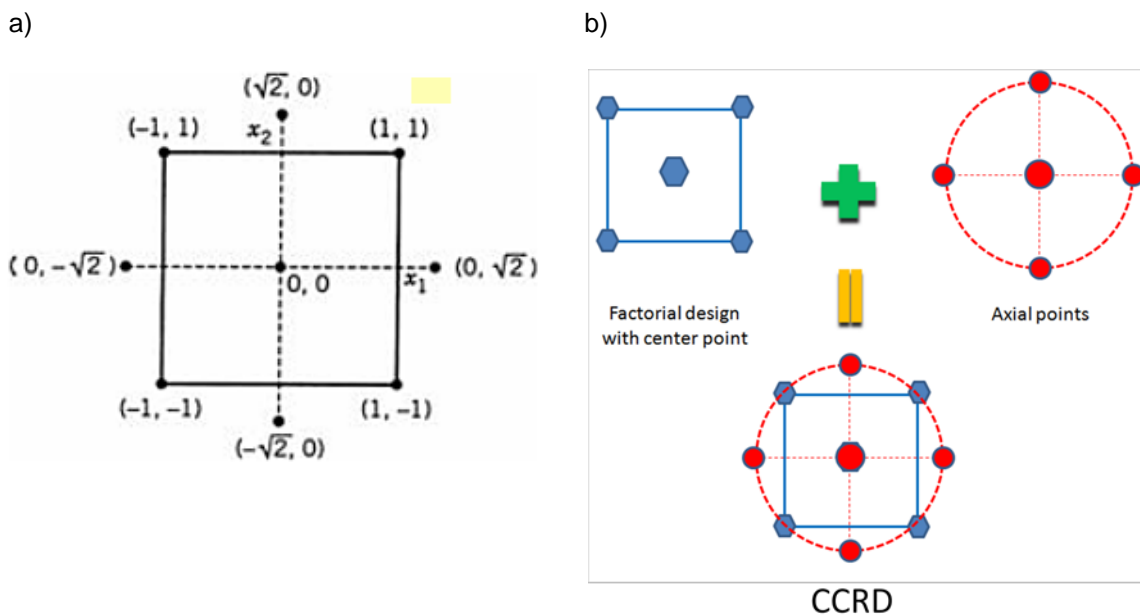


Figura 7. Matriz Central Compósita Rotativa. (a) Matriz fatorial; (b) União dos pontos fatoriais e dos pontos estrela, adaptado de <http://www.qualityinvention.com/OLlibraryPicture.php?picturename=Central%20composite%20design>.

Todos estes pontos têm o seu interesse na explicação do modelo utilizado:

- Os pontos fatoriais representam uma variância ideal para o modelo de primeira ordem ou interação entre os modelos de primeira e segunda ordem;
- Os pontos centrais garantem a informação sobre a existência de curvaturas no caso em estudo;
- Os pontos estrelas, para o caso de existirem curvaturas, são uma maneira eficiente de determinar os coeficientes de um polinómio de segundo grau para as variáveis.

A tabela 8 representa a CCRD utilizada no presente trabalho, evidenciando as 11 reações realizadas, com as variáveis utilizadas e o valor de cada uma considerado em cada ensaio, e também os pontos a que se refere cada um destes ensaios.

Cada ensaio decorreu durante 8 h e a carga do biocatalisador foi sempre de 5 % (m/m) relativa à quantidade de tripalmitina usada.

Tabela 8. Representação dos diferentes pontos da matriz CCRD.

Reação	Temperatura (°C)	Razão Molar	
1	60	2	Pontos Fatoriais
2	60	6	
3	70	2	
4	70	6	
5	58	4	Pontos Estrela
6	72	4	
7	65	1,2	
8	65	6,8	
9	65	4	Pontos Centrais
10	65	4	
11	65	4	

Foram calculados os efeitos linear e quadrático de cada elemento em estudo (temperatura e razão molar), assim como a sua interação linear. Para o efeito, utilizou-se o programa StatisticaTM software, versão 7, da Statsoft, Tulsa, EUA.

Por análise de variância (ANOVA), avaliou-se a importância destes efeitos e do ajuste de uma equação polinomial de segundo grau aos resultados experimentais obtidos.

Os coeficientes de primeira e segunda ordem foram estimados a partir dos dados experimentais, recorrendo ao princípio de estatística dos mínimos quadrados.

Para a percepção da qualidade de ajuste do modelo utilizam-se dois valores: o coeficiente de determinação (R^2) e o R^2 ajustado (R^2_{adj}). Uma maior aproximação dos valores indica um melhor ajuste do modelo, sendo valores acima de 0,75 considerados como bons, e acima de 0,9 muito bons.

2.2.9. Ensaios de validação do modelo

A validação do modelo que tem por objetivo averiguar se existe um bom ajuste do modelo aos resultados experimentais. Para tal verifica-se se o valor de incorporação molar de todos os FFA, utilizando as condições ótimas de temperatura e razão molar, ao fim das 8 h, se assemelha ao valor predito pelo modelo (*cf* eq. 4).

2.2.10. Efeito da carga do biocatalisador

Foi também alvo de estudo o efeito da carga do biocatalisador. Efetuaram-se reações de acidólise, em duplicado, nas condições ótimas preditas pelo modelo constituídas pelas quantidades de, aproximadamente, 2,5 g tripalmitina e 1,75 g de FFA de óleo de grainha de uva, fazendo variar a quantidade do biocatalisador: 5 %, 8 % e 10 % (m/m) da quantidade da tripalmitina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização de uma amostra de leite humano

3.1.1. Avaliação da composição química

A composição química de uma amostra de leite, doado por uma mãe portuguesa no 7^o mês de lactação, foi avaliada no que respeita ao teor de proteína, gordura e resíduo seco, isto é, o resíduo isento de água. Os resultados obtidos constam da tabela 9.

Num estudo desenvolvido por Yu-Dong *et al.*, (2011) em leite de mães chinesas, o teor de proteína bruta foi de 1,27 g/100 mL, o valor de gordura fixou-se em 3,04 g/100 mL e o resíduo seco em 11,49 g/100 mL. Estabelecendo uma comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, constata-se que a maior discrepância reside no teor de gordura, o que poderá justificar-se pela influência de diversos fatores, nomeadamente, a idade da mãe, a sua dieta alimentar e o momento de recolha da amostra de leite para análise (antes ou após alimentação do lactente). Com efeito, o leite fornecido no início da mamada apresenta um baixo conteúdo em gordura e elevados teores em lactose, açúcar, proteínas, vitaminas, minerais e água comparativamente ao leite fornecido no final

(<http://www.medela.com/IW/en/breastfeeding/good-to-know/breastmilk-composition.html>).

Tabela 9. Composição química de uma amostra de leite humano*, expressa em g de componente por 100 mL de leite.

Componentes	Proteína bruta	Gordura	Resíduo seco
Leite maduro	0,98	5,4	12,9

*Leite doado por uma portuguesa, de 28 anos, no 7^o mês de lactação.

3.1.2. Caracterização da componente lipídica no que respeita ao teor em ácidos gordos

A composição em ácidos gordos da amostra de leite humano, foi determinada por cromatografia gasosa, após metilação, obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 9.

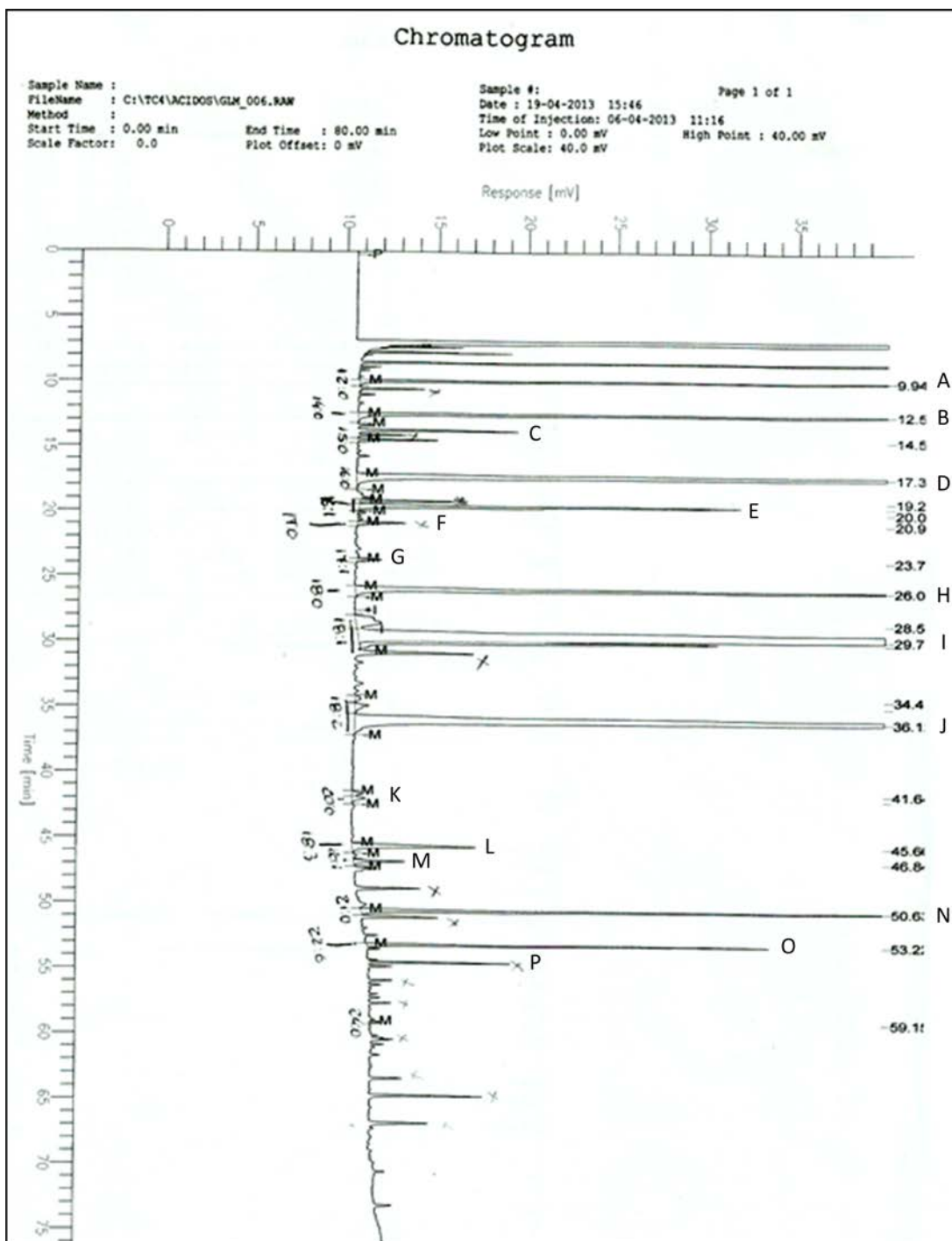


Figura 8. Cromatograma obtido da análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos da gordura de leite humano por cromatografia gasosa. A) C12:0, B) C14:0, C) C15:0, D) C16:0, E) C16:1, F) C17:0, G) C17:1, H) C18:0, I) C18:1, J) C18:2, K) C20:0, L) C18:3, M) C20:1, N) C21:0, O) C22:0 e P) C24:0.

A composição em ácidos gordos da amostra de leite humano, avaliada neste estudo, e de outros diferentes tipos de leite humano, expressa em % molar, consta da tabela 10.

Tabela 10. Composição em FA de diferentes leites humanos: mãe portuguesa (a), mães dinamarquesas (b), mães espanholas (c); NI - não identificado.

Ácido gordo	% molar		
	a, 1	b, 2	c, 3
C12:0	6,71	3,61	6,28
C14:0	8,82	3,50	6,00
C15:0	0,23	0,08	0,23
C16:0	21,52	20,22	19,48
C16:1	2,34	2,44	1,78
C17:0	0,21	0,19	0,30
C17:1	0,11	0,11	0,19
C18:0	4,88	5,29	6,25
C18:1	40,11	36,96	36,35
C18:2	15,36	20,85	16,59
C18:3	0,09	0,83	0,75
C20:0	0,98	0,21	0,20
C20:1	0,35	0,53	0,60
C21:0	3,27	NI	NI
C22:0	1,70	0,00	0,05
C24:0	0,04	0,00	0,03

¹ Leite doado por portuguesa de 28 anos, no 7º mês de lactação; adaptado de ² Wang et al., (2010); adaptado de ³ Lopez-Lopez et al., (2002).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os reportados em trabalhos anteriormente publicados sobre a composição em ácidos gordos do leite de mães dinamarquesas (Wang et al., 2010) e de mães espanholas (Lopez-Lopez et al., 2002). Constata-se que os ácidos gordos maioritários no leite humano são o oleico (C18:1), o palmítico (C16:0) e o linoleico (C18:2).

3.2. Composição em ácidos gordos do óleo de gralha de uva

Determinou-se a composição em ácidos gordos do óleo de gralha de uva por cromatografia gasosa cujo cromatograma se encontra na figura 10.

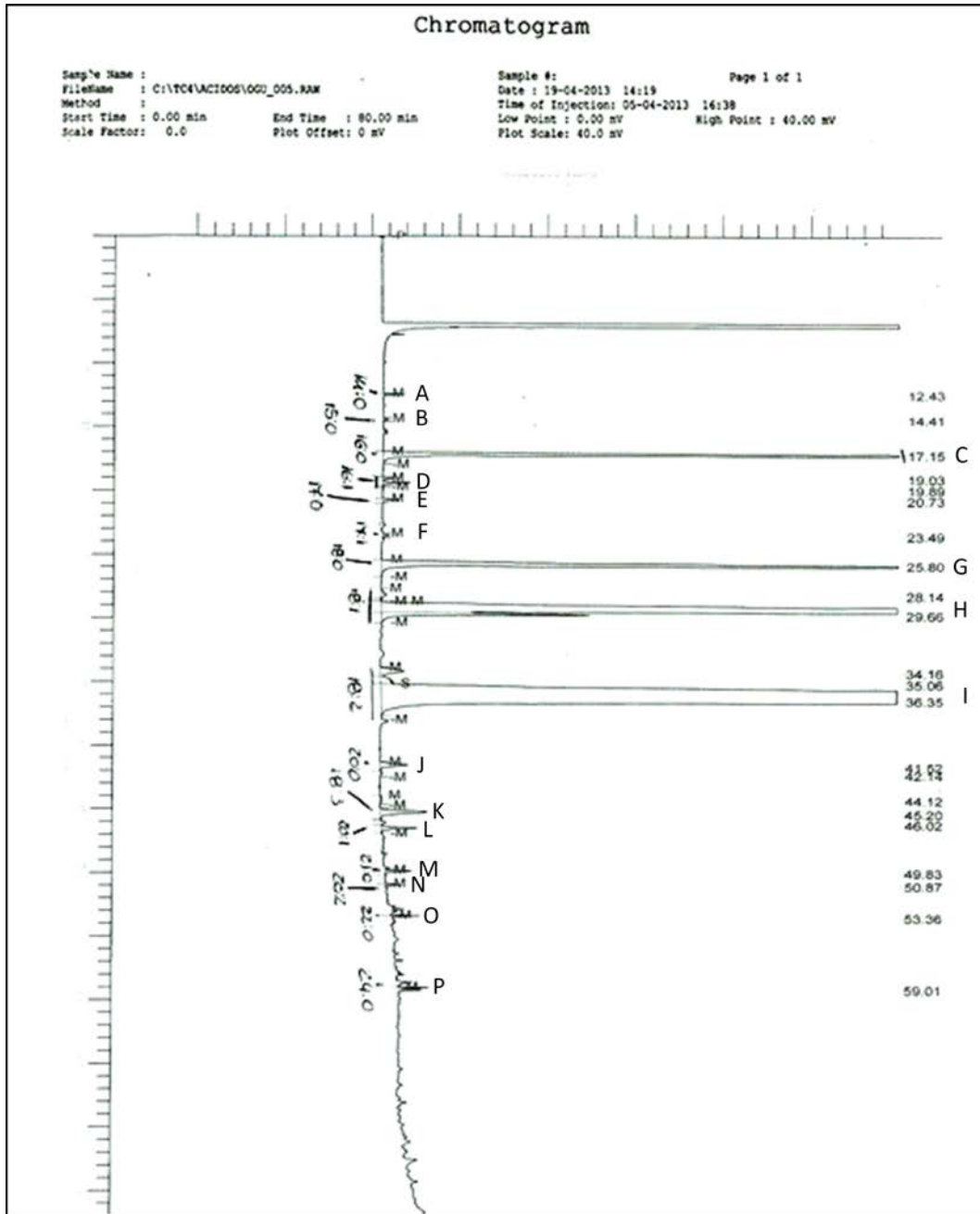


Figura 9. Cromatograma obtido da análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos do óleo de gralha de uva por cromatografia gasosa. A) C14:0, B) C15:0, C) C16:0, D) C16:1, E) C17:0, F) C17:1, G) C18:0, H) C18:1, I) C18:2, J) C20:0, K) C18:3, L) C20:1, M) C21:0, N) C20:2, O) C22:0 e P) C24:0.

A composição em ácidos gordos do óleo de grainha de uva, expressa em percentagem mássica e percentagem molar consta na tabela 12.

Tabela 11. Representação dos cálculos efetuados, para obter a composição em FA expressa em % mássica e % molar do óleo de grainha de uva.

	Área	Peso molecular éster metílico	%mássica	Nº moles	%molar
C14:0	5359,69	242,4	0,000	0,110016	0,00038
C15:0	1375,84	256,4	0,012	2,987235	0,01020
C16:0	988000	270,5	8,366	2263,121	7,72943
C16:1	16068,60	268,5	0,136	36,53472	0,12478
C17:0	8163,68	284,5	0,069	19,66762	0,06717
C17:1	3222,65	282,5	0,027	7,709302	0,02633
C18:0	543000,00	298,5	4,598	1372,548	4,68779
C18:1	142164,68	296,5	1,204	356,9438	1,21910
C18:2	9975300	294,5	84,471	24876,81	84,96397
C20:0	24286,11	326,6	0,206	67,16726	0,22940
C18:3	46269,97	292,5	0,392	114,6063	0,39143
C20:1	25494,38	324,6	0,216	70,07716	0,23934
C21:0	10465,49	340,6	0,089	30,18476	0,10309
C20:2	4328,94	326,6	0,037	11,9724	0,04089
C22:0	7236,1	354,6	0,061	21,72835	0,07421
C24:0	8356,27	382,7	0,071	27,08036	0,09249
Soma	11809092		100,0	29279,25	100

O ácido linoleico (C18:2) é o ácido gordo maioritário com 84,96 %, seguido do ácido palmítico (C16:0) com 7,73 %, do ácido esteárico (C18:0) presente em 4,69 % e do ácido oleico (C18:1) com 1,22%. Os restantes ácidos, mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanóico (C17:0), heptadecenóico (C17:1), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), gadoleico (C20:1), eicosadienóico (C20:2), heneicosanóico (C21:0), beénico (C22:0) e lignocérico (C24:0), estão presentes em quantidades vestigiais. Segundo Kikalishvili *et al.*, (2012),

o óleo de grainha de uva é constituído por 65 % de ácido linoleico, 17 % de ácido oleico, 8 % de ácido palmítico, 4,4 % de ácido esteárico, 1,5 % de ácido linolénico e 0,6 % de ácido araquidónico. Esta composição difere do óleo analisado no presente estudo, embora a identificação dos ácidos gordos maioritários seja coincidente. A diferença pode residir no facto de as uvas pertencerem a castas distintas, o que poderá influenciar a composição em FA do óleo.

3.3. Seleção do biocatalisador

A incorporação molar (expressa em %mol) dos FFA do óleo de grainha de uva na tripalmitina, para os diferentes biocatalisadores estudados, consta da figura 11.

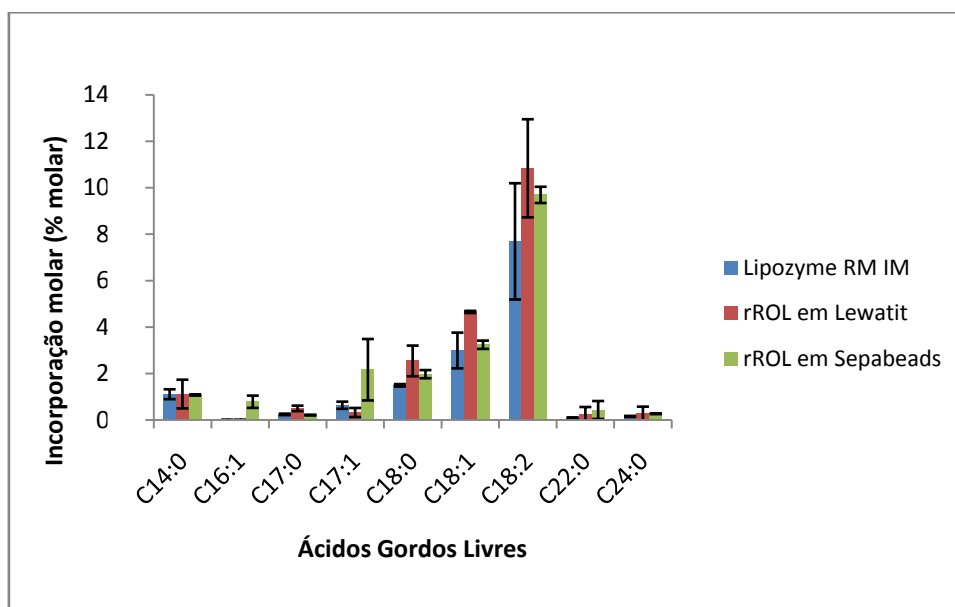


Figura 70. Principais FFA incorporados em meio reacional com diferentes lipases. As barras representam o desvio padrão.

É de referir que o ácido palmítico é um ácido gordo resultante, maioritariamente, da tripalmitina, razão pela qual não foi considerado no gráfico acima para não interferir na interpretação dos restantes FFA. Os maiores valores de incorporação molar na tripalmitina, quer para a totalidade dos FFA como para o ácido linoleico (o FA maioritário no óleo de grainha de uva), foram alcançados quando se utilizou a rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600 seguido da rROL em Sepabeads Relizyme OD 403/M como biocatalisadores da reação de acidólise (Tabela 12).

Tabela 12. Incorporação do ácido linoleico (C18:2) e de todos os FFA, expressa em % molar nas reações de acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit ou Sepabeads e pela lipase comercial Lipozyme RM IM.

	rROL em Lewatit	rROL em Sepabeads	Lipozyme RM IM
FFA C18:2	10,8 ± 0,021*	9,7 ± 0,003*	7,7 ± 0,025*
Todos os FFA	20,5 ± 0,001*	19,8 ± 0,018*	14,4 ± 0,034*

*SD – Desvio padrão

As características do suporte de imobilização nomeadamente, a composição química da matriz, a sua área específica, o diâmetro médio do poro e o seu custo, condicionam a sua seleção. Tecelão *et al*, (2012) descreveram o estudo da reação de acidólise entre a tripalmitina e o ácido oleico catalisada pela rROL imobilizada em diferentes suportes: Accurel[®] MP 1000, Eupergit[®] C e Lewatit[®] VP OC 1600. Os valores mais expressivos de incorporação molar de ácido oleico foram alcançados com rROL imobilizada em Lewatit[®] VP OC 1600, tal como observado no presente estudo. Face aos resultados obtidos, os ensaios reaccionais subsequentes foram realizados utilizando tripalmitina, os FFA do óleo de grainha de uva e a rROL imobilizada em Lewatit[®] VP OC 1600 como biocatalisador.

3.4. Efeito da atividade da água na reação de acidólise

A atividade enzimática é influenciada por vários fatores, entre os quais a temperatura, o pH e a atividade termodinâmica da água (a_w) (Pérignon *et al.*, 2013; Xu, 2000). O efeito da a_w na atividade da rROL foi alvo de estudo neste trabalho. Para o efeito, pré equilibrou-se a lipase em diferentes soluções salinas sobressaturadas, como descrito em 3.2.3.1. Na tabela 13 encontram-se os valores de percentagem mássica de água perdida ao longo do tempo até obtenção do valor de a_w desejado. Observou-se que ao fim de 2 dias de contacto com a solução salina, a rROL imobilizada em Lewatit[®] VP OC 1600 alcançou a a_w de 0,56 e de 0,76, correspondendo a uma perda de cerca de 45 % da massa inicial. Os valores de a_w de 0,81 e 0,92 foram alcançados ao final de 4 e 3 dias correspondendo a uma perda de 43 % e 32 % da massa inicial, respetivamente.

Tabela 13. Massa perdida (%) da rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600.

a_w	Dia 1 %massa perdida	Dia 2 %massa perdida	Dia 3 %massa perdida	Dia 4 %massa perdida	%total massa perdida
0,56	44,77	0,48	---	---	45
0,75	42,90	4,56	---	---	45
0,81	20,81	17,96	11,46	0,85	43
0,92	11,13	7,89	8,44	---	32

Utilizou-se a rROL a diferentes valores de a_w como biocatalisador na reação de acidólise entre a tripalmitina e os FFA do óleo de grainha de uva.

A figura 12 mostra a tendência de incorporação molar, quer de todos os FFA como do ácido linoleico, em função dos diferentes valores da a_w do biocatalisador.

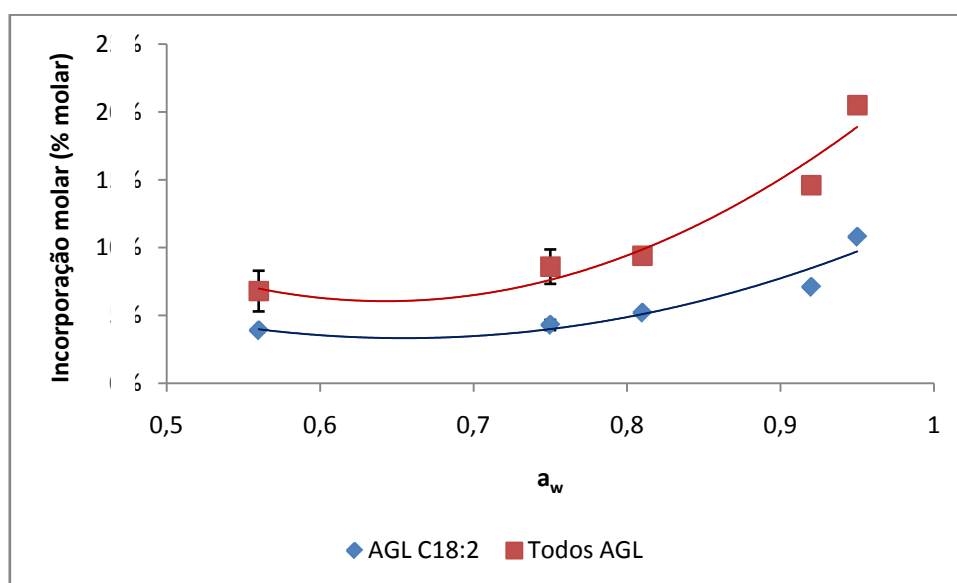


Figura 81. Tendência de incorporação de todos os FFA e do ácido linoleico (C18:2), utilizando a rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600 com diferentes a_w 's. As barras representam o desvio padrão.

Constata-se que a percentagem de incorporação molar dos FFA é mais elevada quando no meio reacional se utiliza rROL a uma a_w de 0,95, contrariamente ao que se verifica nas reações de interesterificação em que o ótimo se encontra entre 0,25 e 0,45. Pérignon *et al.* (2013) estudaram a influencia da atividade termodinâmica da água (valores de a_w de 0,75, 0,55, 0,44, 0,33, 0,22 e 0,11) na reação de

interesterificação entre a tricaprilina e a trimiristina, a 60°C, catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosa* ou pela lipase B de *Candida antarctica*. Verificou-se que a uma a_w mais elevada, de 0,95, a formação de novos TAG foi mais expressiva.

3.5. Estudo da cinética da reação de acidólise

Estudou-se a incorporação molar de FFA na tripalmitina ao longo do tempo de reação. Pretendeu avaliar-se o tempo necessário para atingir-se um estado de *quasi-equilibrium*, isto é, de estabilização da incorporação de FFA, aspeto fundamental para otimizar e economizar custos do processo. A figura 13 permite visualizar o comportamento de incorporação molar dos FFA ao longo do tempo.

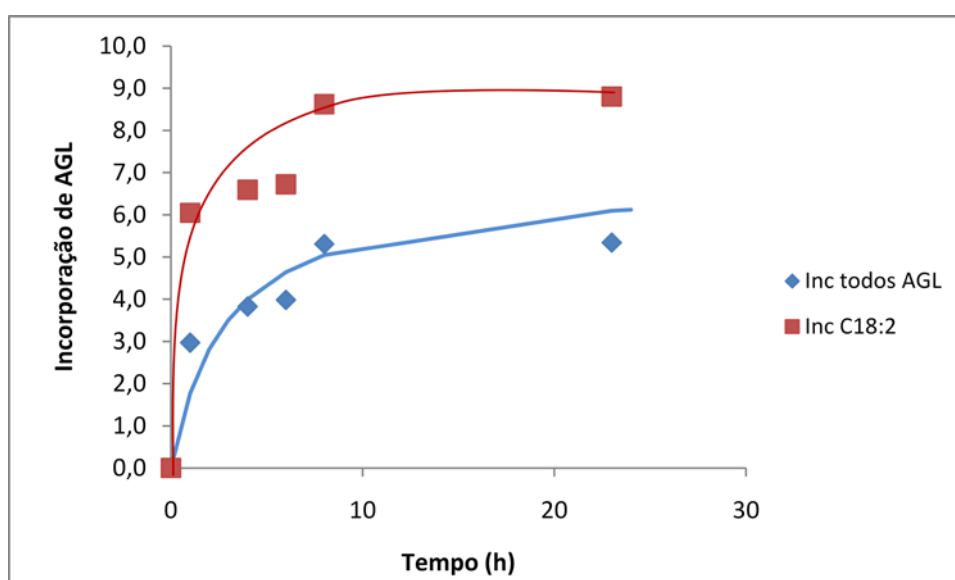


Figura 92. Incorporação molar (% mol) de todos os FFA e do ácido linoleico (C18:2) ao longo das 24 h de reação.

Verifica-se que ao final de 8 h atingiu-se um estado de equilíbrio com 8,6 % de incorporação molar de todos os FFA e de 5,3 % de incorporação do ácido maioritário C18:2. Estes valores de incorporação são muito inferiores aos alcançados nos ensaios anteriores (Tabela 12), porque se utilizou uma rROL de atividade hidrolítica 2,3 vezes inferior (secção 2.1.2.). Apesar de não haver uma correspondência direta entre a atividade hidrolítica e a de acidólise da rROL, valores mais baixos de atividade hidrolítica, traduzem-se sempre em menores atividades de acidólise (Nunes *et al.*, 2012).

Num estudo desenvolvido por Tecelão *et al.*, (2012) sobre a reação de acidólise entre a tripalmitina e o ácido oleico, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit® VP

OC 1600, verificou-se um equilíbrio de incorporação do ácido oleico após 6 h de reação, em condições operacionais similares à do presente estudo, isto é, com razão molar 2:1 (ácido oleico/tripalmitina) e a 60 °C. No estudo de Pérignon *et al*, (2013) com o biocatalisador lipase de *Thermomyces lanuginosus* que se encontrava a a_w de 0,75, observaram-se maiores quantidades de novos TAG formados e a estabilização de formação de novos TAG ocorreu às 10h de reação. No entanto, entre as 7 h e as 10 h, os valores também foram muito próximos.

3.6. Modelação da reação de acidólise e otimização das condições operacionais

Com o intuito de modelar a reação de acidólise e otimizar as condições operacionais, estudou-se o efeito das variáveis temperatura e razão molar na incorporação de FFA do óleo de grainha de uva na tripalmitina, de acordo com um conjunto de 11 reações descritas na matriz central compósita rotativa apresentada anteriormente na tabela 8. Os resultados obtidos constam da tabela 14.

Tabela 14. Experiências da Matriz Central Compósita Rotativa em função das variáveis Temperatura (T) e MR de FFA de óleo de grainha de uva/tripalmitina e as incorporações (%molar) de todos os FFA e apenas do FFA C18:2, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600.

Experiência	T (°C)	MR (FFA/tripalmitina)	Inc. de todos os FFA (%molar)	Inc. do FFA C18:2 (%molar)
1	60	2:1	22,8	14,5
2	60	6:1	6,3	2,4
3	70	2:1	3,0	0,5
4	70	6:1	8,6	5,6
5	58	4:1	6,0	2,0
6	72	4:1	2,8	0,0
7	65	1,2:1	14,1	8,3
8	65	6,8:1	4,2	1,9
9	65	4:1	5,49	0,94
10	65	4:1	7,50	1,18

O resultado obtido na reação 11 foi desprezado por não ser concordante com as reações 9 e 10 efetuadas nas mesmas condições (repetição do ponto central).

Calcularam-se os efeitos linear e quadrático de cada fator, bem como a sua interação, na incorporação de FFA do óleo de gralha de uva na tripalmitina (Tabela 15).

Tabela 15. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8592$ e $R^2_{ajust}=0,6831$, para a incorporação de todos os FFA.

Variáveis	Efeito	Valor de p
Temperatura (L)	-5,50637	0,08643
Temperatura (Q)	-0,39834	0,90750
Razão Molar (L)	-6,22518	0,06277
Razão Molar (Q)	4,35166	0,24786
Temperatura x Razão Molar	11,05	0,03257

Considera-se que uma variável tem um efeito significativo na resposta quando o valor de $p < 0,05$. Da análise da tabela 15, verifica-se que os termos linear e quadrático para ambas as variáveis não apresentam um efeito significativo na resposta, ao contrário da sua interação, Temperatura x Razão Molar ($p = 0,03257$). Numa primeira análise, optou-se por rejeitar apenas o termo quadrático de T por apresentar o maior valor de p ($p = 0,90750$), tendo-se obtido os resultados constantes na tabela 16.

Tabela 16. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8586$ e $R^2_{ajust}=0,7455$, para a incorporação de todos os FFA.

Variáveis	Efeito	Valor de p
Temperatura (L)	-5,50637	0,052862
Razão Molar (L)	-6,22518	0,035638
Razão Molar (Q)	4,35166	0,143277
Temperatura x Razão Molar	11,05	0,015829

De acordo com a tabela 16, o efeito linear da MR é agora significativo, mas o efeito quadrático não pois $p > 0,05$ ($p = 0,143277$). O efeito da interação das variáveis, T x MR, manteve-se significativo ($p = 0,015829$) e o efeito linear de T foi considerado, igualmente, significativo pois o valor de p é próximo de 0,05. O sinal positivo ou negativo no termo quadrático de uma variável fornece informação sobre a curvatura da superfície de resposta, que será côncava ou convexa, respetivamente. A incorporação

de FFA do óleo de grainha de uva na tripalmitina, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600, em função da temperatura reacional e da razão molar dos substratos, pode ser representada por uma superfície concava descrita por uma equação polinomial do 2º grau:

$$Inc (\% \text{ molar})_{\text{ todos os AGL}} = 200,98 - 2,76T - 41,99RM + 0,57RM^2 + 0,55TxRM \text{ (eq. 4)}$$

Os valores obtidos para R^2 e R^2_{Adj} foram de 0,8586 e de 0,7455, respetivamente. Quanto maior for a aproximação dos dois valores, maior será a semelhança entre os valores preditos pelo modelo e os dados obtidos experimentalmente. Na figura 14 estão representadas a superfície de resposta, relativa à incorporação molar de todos FFA na tripalmitina, em função de T e da MR, e a sua respetiva projeção.

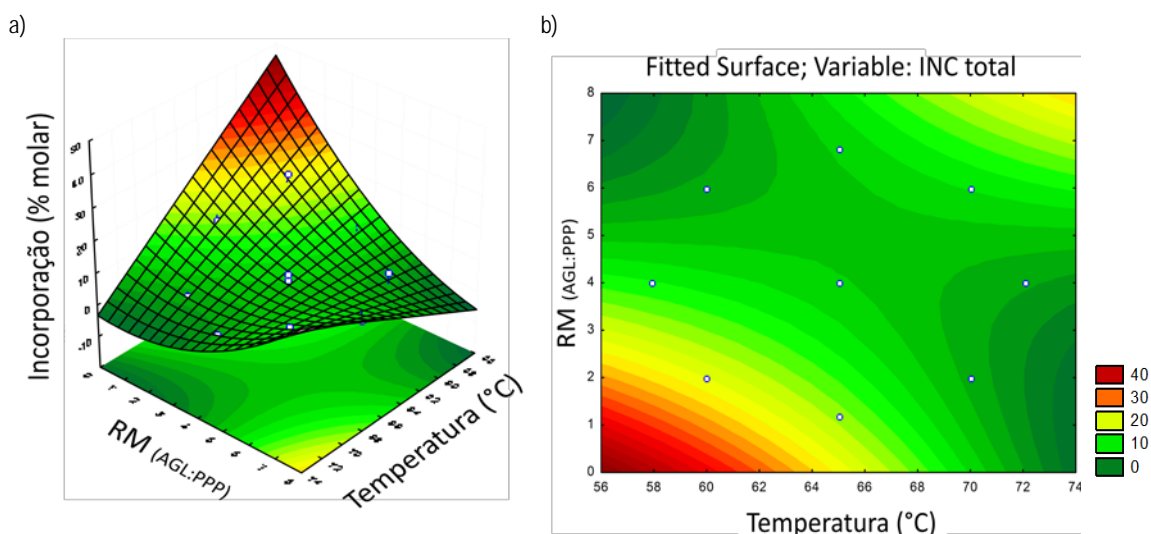


Figura 103. Superfície de resposta relativa à incorporação molar de todos os FFA na reação de acidólise em função da Temperatura ($T = ^\circ\text{C}$) e da Razão Molar ($MR = \text{FFA } \text{óleo de grainha de uva}:\text{tripalmitina}$) (a), e a respetiva projeção (b).

Observa-se que os valores mais elevados de incorporação molar foram alcançados na gama de T e de MR mais baixa. A temperatura dos ensaios reacionais desenvolvidos no presente estudo esteve fortemente condicionada pela temperatura de fusão da tripalmitina, cerca de 58°C , que constituiu a temperatura mínima testada. Temperaturas mais elevadas podem favorecer a atividade enzimática por diminuição da viscosidade do meio e, conseqüentemente, favorecer a transferência de massa no

meio reacional (Xu *et al.*, 2000). Por outro lado, temperaturas elevadas podem conduzir à desnaturação enzimática.

Guillén *et al.*, (2011) estudaram alguns parâmetros que afetam a atividade enzimática da rROL e da lipase nativa de *Rhizopus oryzae* (nROL): o efeito iônico, a temperatura e o pH. Concluíram que a temperatura ótima para a rROL variou de 30 °C, quando utilizada uma concentração de tampão de 400 mM de Tris-HCl, para 40 °C, quando utilizada uma concentração de 200 mM do mesmo tampão. Tecelão *et al.* (2010b) revelaram que maiores incorporações de ácido oleico numa reação de acidólise entre tripalmitina e ácido oleico, catalisada pela lipase de *Carica papaya* autoimobilizada no seu latex, ocorreram à T de 60 °C e a uma MR de 6:1 (ácido oleico/tripalmitina).

Assim sendo, os 58 °C sugeridos pelo modelo estão de acordo com os resultados obtidos por Tecelão *et al.*, (2012b).

No que respeita à razão molar, Yang *et al.*, (2003) confirmaram que elevadas razões molares deslocam o equilíbrio reacional no sentido da formação de produtos, o que se traduz num aumento da incorporação de grupos acilo nos TAG. No entanto, Zou *et al.*, (2011) verificaram que à medida que decorria um aumento da razão molar do substrato diminuía o conteúdo em ácido palmítico, numa reação isenta de solventes, a 60 °C e na qual os substratos eram a estearina de palma e uma mistura de ácidos gordos.

É ainda de referir que a presença de elevados teores de FFA no meio reacional pode provocar um efeito inibitório na atividade da enzima e conduzir a que a reação demore mais tempo a atingir equilíbrio (Xu *et al.*, 2000).

De acordo com a equação 4, a percentagem molar de incorporação sugerida pelo modelo, em que T igual a 58 °C e a MR igual a 2:1 (FFA de óleo de grainha de uva/tripalmitina) é de 23 %. Este valor é muito semelhante ao que se obteve experimentalmente na reação da experiência 1 (22,8 %), apresentado anteriormente na tabela 14, para a incorporação de todos os FFA, em que as condições das variáveis são as mais semelhantes, ou seja, T = 60 °C e MR = 2:1 (FFA de óleo de grainha de uva/tripalmitina). Considerou-se um bom modelo tendo em conta a semelhança de valores. Como o ácido linoleico (C18:2) é o ácido maioritário no óleo de grainha de uva e com maiores quantidades de incorporação, procedeu-se, também, ao estudo da sua incorporação, através do programa StatisticaTM, para perceber qual o nível de importância da razão molar e da temperatura.

Seguem-se as tabelas 17 e 18 que apresentam os valores dos efeitos linear (L) e quadrático (Q) com respectivos valores de p de cada variável em estudo, fundamentais para fazer uma análise dos dados deste modelo.

Tabela 17. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8766$ e $R^2_{ajust}=0,7225$, para a incorporação do ácido linoleico (C18:2).

Variáveis	Efeito	Valor de p
Temperatura (L)	-3,40711	0,115314
Temperatura (Q)	1,28865	0,596972
Razão Molar (L)	-4,01274	0,077437
Razão Molar (Q)	5,38865	0,074485
Temperatura x Razão Molar	8,6	0,023157

Tabela 18. Efeitos linear (L) e quadrático (Q) das variáveis Temperatura (T) e MR, com $R^2=0,8665$ e $R^2_{ajust}=0,7597$, para a incorporação do ácido linoleico (C18:2).

Variáveis	Efeito	Valor de p
Temperatura (L)	-3,40711	0,083613
Razão Molar (L)	-4,01274	0,051945
Razão Molar (Q)	5,38865	0,050616
Temperatura x Razão Molar	8,6	0,012025

Todos os resultados obtidos para a incorporação de todos os FFA são idênticos aos resultados obtidos para a incorporação do ácido linoleico. Observando a tabela 18 os efeitos lineares e quadráticos das duas variáveis não são significativos ($p > 0,05$), mas a sua interação (T x MR) sim ($p < 0,05$), e como tal apenas se rejeitou o efeito quadrático da MR que tinha um $p = 0,596972$ e procedeu-se a uma nova análise estatística. Na tabela 19 já se verificaram melhores resultados, o efeito linear e quadrático da MR foram considerados significativos ($p < 0,05$) dado a sua proximidade do valor, com $p = 0,051945$ e $p = 0,50616$, respetivamente.

Quanto ao efeito linear da T continuou a não ser significativo ($p > 0,05$), apresentando um valor de $p = 0,083613$, contudo não se rejeitou esta variável pois,

como já foi referido, a sua interação tem um efeito significativo ($p < 0,05$), não fazendo sentido a rejeição.

Relativamente aos valores de R^2 (0,8665) e R^2_{ajust} (0,7597) tiveram também uma boa aproximação o que revelou uma boa relação linear entre valores preditos pelo modelo e os valores observados experimentalmente. A partir do modelo estatístico obteve-se uma superfície de resposta para a percentagem molar de incorporação do FFA C18:2, descrita por uma equação polinomial de 2º grau seguinte:

$$Inc (\%)_{AGL C18:2} = 149,43 - 2,06T - 33,79RM + 0,60RM^2 + 0,43(TxRM) \text{ (eq. 5)}$$

De acordo com a equação 5, a percentagem molar de incorporação sugerida pelo modelo, em que T é igual 58 °C e a MR igual a 2:1 (FFA de óleo de grainha de uva/tripalmitina), é de 14,65 %. Este valor é muito semelhante ao que se obteve experimentalmente na reação da experiência 1 da tabela 14 (14,5 %) para a incorporação do FFA C18:2, em que as condições das variáveis são as mais semelhantes, ou seja, T igual a 60 °C e MR de 2:1. É portanto, como seria de esperar, um bom modelo tendo em conta a semelhança de valores e o resultado obtido para a percentagem de incorporação de todos os FFA.

Na figura 15 que se segue, estão representadas a superfície de resposta relativa à incorporação molar do FFA C18:2 na reação de acidólise em função da Temperatura e da Razão Molar (FFA óleo de grainha de uva/tripalmitina), e a sua respetiva projeção. Como seria de esperar, tendo por base a análise feita para a percentagem de incorporação de todos os FFA, obteve-se maior incorporação do FFA C18:2 para valores mais baixos, quer da T, assim como da MR testados.

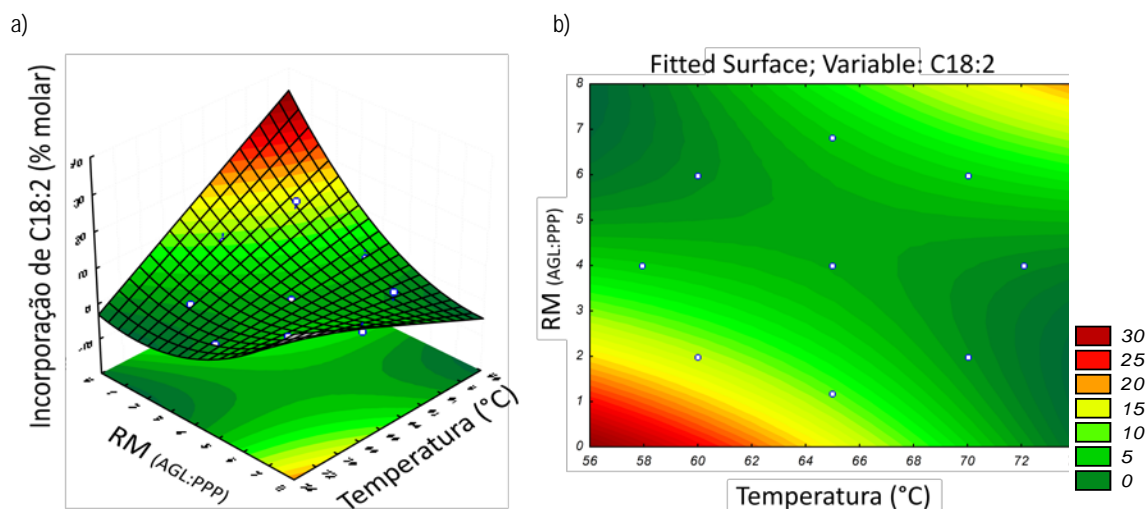


Figura 114. Superfície de resposta relativa à incorporação molar do FFA C18:2 na reação de acidólise em função da Temperatura ($T = ^\circ\text{C}$) e da Razão Molar ($MR = \text{FFA } \text{óleo de gralha de uva}:\text{tripalmitina}$) (a), e a respectiva projeção (b).

3.7. Validação do modelo

A fim de validar o modelo, as reações de acidólise foram efetuadas nas condições ótimas obtidas pela matriz RSM, ou seja, utilização de 5% da rROL, relativamente à quantidade da massa de tripalmitina, T de $58\text{ }^\circ\text{C}$, MR de 2:1 (FFA do óleo de gralha de uva/tripalmitina) e durante 8 h.

O valor de incorporação molar de todos os FFA foi de 22,7 %, mostrou-se muito próximo do valor predito pelo modelo, de 23 % (obtido a partir da eq. 5), o que valida o modelo. Foram ainda realizadas outras reações, nas condições ótimas de temperatura e razão molar e durante 8h, mas com quantidades de enzimas diferentes, 8 % e 10 %.

A figura 16 ilustra os resultados, depois de efetuados os cálculos, das incorporações dos FFA obtidos quando se fez variar a quantidade de enzima de 5 %, 8 % e de 10 %.

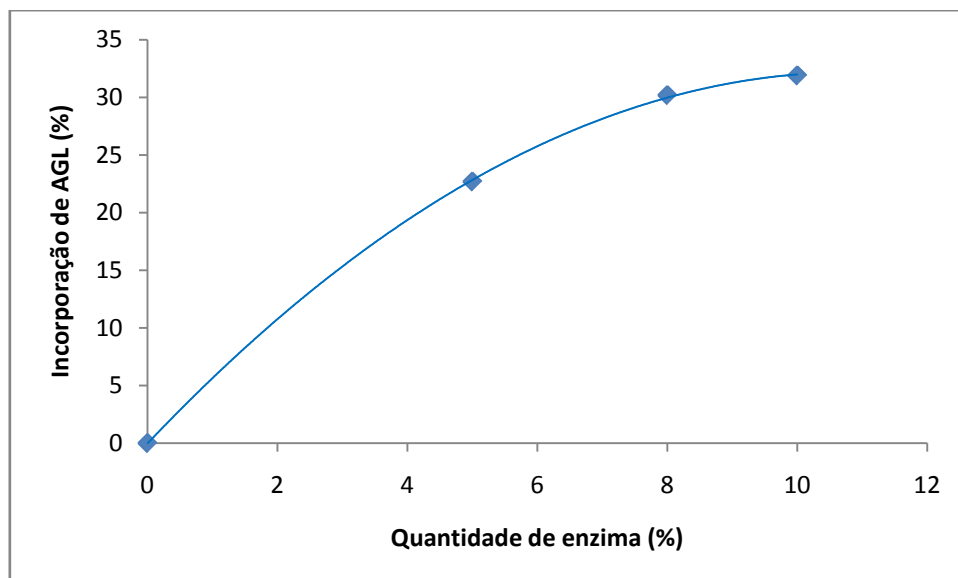


Figura 125. Incorporação molar (%) de FFA em tripalmitina utilizando diferentes quantidades de rROL imobilizada em Lewatit® VP OC 1600.

Analisando a figura 16 verificou-se uma tendência crescente de incorporação de todos os FFA, quando se fez variar a quantidade de enzima utilizada em cada reação, ou seja, ao aumentar a quantidade de enzima, a incorporação de todos os FFA também aumentou. No entanto, o aumento da carga de 8 % para 10 % traduziu-se apenas num pequeno acréscimo na percentagem de incorporação, o que indica que estamos numa situação de equilíbrio cinético da reação.

Em trabalhos similares foram registados resultados semelhantes, como em Nunes *et al.*, (2011) que estudou a variação da carga de rROL imobilizada em Eupergit® em reações de acidólise entre ácido cáprico e azeite virgem, a uma T de 40 °C e durante 48 h. Verificou-se que, um aumento da carga do biocatalisador de 5 % para 10 % causou maiores incorporações de ácido cáprico até às 24 h de reação. No entanto, a partir das 24 h de reação, ocorreu uma estabilização de incorporação em ambas as situações, isto é, quer para o meio reacional que tinha apenas 5 % da rROL assim como para o que tinha 10 %. Este resultado sugere que o tempo de reação é importante tendo sido necessário para o caso experimental aumentar o tempo de reação para a verificação de que a variação da carga do biocatalisador apenas vai influenciar na velocidade da reação, sendo que para reações com maiores cargas de enzima, a velocidade da reação enzimática vai ser maior.

3.8. Comparação do leite humano com o lípido estruturado produzido

A tabela 19 apresenta os FA em posição 2 da gordura do leite humano doado pela portuguesa de 28 anos, com 7 meses de lactação e faz uma comparação dos seus principais FA com os principais FA do SL produzido neste trabalho experimental.

Tabela 19. Comparação dos FA do leite humano* e do lípido estruturado, em % molar.

Ácidos gordos	FA posição 2 leite humano	FA Leite humano*	FA Lípido estruturado
C14:0	NI	8,82	1,12
C16:0	63,76	21,52	38,08
C17:0	NI	0,21	0,50
C17:1	NI	0,11	0,32
C18:0	NI	4,88	2,54
C18:1	28,25	40,11	4,65
C18:2	1,90	15,36	10,84
C22:0	NI	1,70	0,25
C24:0	NI	0,04	0,26

*Leite doado por uma portuguesa, de 28 anos, no 7º mês de lactação; NI – não identificado.

Verificou-se que os FA que existem em maiores quantidades destacam-se em ambas as gorduras, com algumas diferenças, com a particularidade de que o ácido C18:1 é o que tem um valor de percentagem molar cerca de 10 vezes superior no leite humano, comparativamente ao LE. O SL foi obtido através de tripalmitina com óleo de grainha de uva e relembrando a composição do óleo de grainha de uva, o ácido C18:2 é o que existe em maiores quantidades (65 %) enquanto o ácido C18:1 representa apenas 17 %. Tal explica porque na composição do SL a composição em ácido C18:1 ser um valor tão baixo.

Relativamente à composição dos FA em posição 2, no leite humano, verifica-se que o ácido palmítico representa cerca de 64 % do total de FA esterificado nessa posição, enquanto o ácido oleico representa apenas 28 %.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. Conclusões

Com este estudo foi possível verificar que a rROL é um biocatalisador com grande potencial na produção de lípidos estruturados. Para ambas as preparações de rROL testadas verificaram-se incorporações maiores de FFA comparativamente a lipases comerciais. Foi igualmente importante o estudo de alguns dos fatores que influenciam a atividade do biocatalisador.

Constatou-se que a condição ótima da atividade da água para a rROL foi a uma a_w de 0,95, nas reações de acidólise efetuadas com os substratos tripalmitina e óleo de grainha de uva na ausência de solvente e a 60 °C. Verificou-se ainda que às 8 h de reação, a incorporação molar dos FFA estabilizou.

Quanto à modelação e otimização da acidólise, através da matriz RSM, as condições ótimas de temperatura e razão molar sugeridas pelo modelo são T igual a 58 °C e MR de 2:1 (FFA de óleo de grainha de uva/ tripalmitina).

No que diz respeito à utilização do óleo de grainha de uva foi importante, pois é um óleo bastante rico em ácido linoleico (C18:2), sendo este um dos ácidos gordos polinsaturados maioritários na gordura do leite humano.

Por fim, a comparação da composição em ácidos gordos da gordura do leite humano, doado pela mãe portuguesa, com os ácidos gordos do lípido estruturado produzido revelou-se não muito diferente, na medida em que os ácidos maioritários foram os mesmos.

Conclui-se assim que este SL pode ser uma mais-valia na sua utilização como HMFS, com a possibilidade de integração nas fórmulas infantis. No que respeita aos baixos teores de ácido oleico neste LE, pode-se compensar pela mistura deste SL com SL obtidos a partir da acidólise de tripalmitina com o ácido oleico, catalisada pela rROL em Lewatit[®] VP OC 1600 (Tecalão *et al.*, 2012a).

4.2. Linhas futuras de investigação

Como propostas futuras de investigação propõe-se a continuação do estudo produção de lípidos estruturados para substituição da gordura do leite humano, em vários aspetos:

- Otimização das condições da rROL, verificando sempre a sua atividade hidrolítica e tentando encontrar relação com a sua atividade de acidólise;
- Realização de ensaios cinéticos para verificação do efeito da carga do biocatalisador, ao longo da reação;
- Determinação dos ácidos gordos na posição *sn-2* dos produtos obtidos, para confirmação da seletividade da rROL.
- Estudo de possíveis custos associados à realização deste projeto de forma a coloca-lo em prática, seguindo a ordem de acontecimentos, ou seja, realização do projeto em laboratório, depois à escala piloto e no fim à escala industrial.

5. BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ, M. J.; ILZARBE, L.; VILES, E.; TANCO, M. (2009) The Use of Genetic Algorithms in Response Surface Methodology. *Quality Technology & Quantitative Management* **6**, 295-307.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* **60**: 49-74.
- BERNBACK, S.; BLACKBERG, L.; HERNELL, O. (1990) The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *J Clin Invest*, **85**: 1221-6.
- CABRITA, P. (2011) *Produção de Triacilgliceróis Estruturados Catalisada por Lipases Imobilizadas*. Tese de Doutorado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 84.
- CONSULTATION, R. O. A. E. (2010) Fats and fatty acids in human nutrition. *FAO Food and Nutrition Papers*, pp. 180.
- GOEDHART, A. C.; BINDELS, J. G. (1994) The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: recent findings and possible applications. *Nutr Res Rev*, **7**: 1-23.
- GREENSPAN, L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. , **81A**: 89-96.
- 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**: 1232-1241.
- ILYASOGLU, H. (2013) Production of human fat milk analogue containing α -linolenic acid by solvent-free enzymatic interesterification. *LWT - Food Science and Technology*, **54**: 179-185.
- INNIS, S. M. (2011) Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Adv Nutr*, **2**: 275-83.
- KOLETZKO, B.; BAKER, S.; CLEGHORN, G.; NETO, U. F.; GOPALAN, S.; HERNELL, O.; HOCK, Q. S.; JIRAPINYO, P.; LONNERDAL, B.; PENCHARZ, P.; PZYREMBEL, H.; RAMIREZ-MAYANS, J.; SHAMIR, R.; TURCK, D.; YAMASHIRO, Y.; ZONG-YI, D. (2005) Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **41**: 584-99.
- LIU, K.; CHANG, H.; LIU, K. (2007) Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. *Food Chemistry*, **100**: 1303-1311.
- LOPEZ-LOPEZ, A.; LOPEZ-SABATER, M. C.; CAMPOY-FOLGOSO, C.; RIVERO-URGELL, M.; CASTELLOTE-BARGALLO, A. I. (2002) Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. *Eur J Clin Nutr*, **56**: 1242-54.
- MADALOZZO, A. D. (2011) *Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de Rhizopus oryzae*. Tese de Mestrado em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp. 149.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. (2008) Análise Química Quantitativa, *Vogel*, **6**, pp. 138.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. (2011) Response Surface Methodology, *Wiley*, **3**, pp. 704.
- NAGACHINTA, S.; AKOH, C. C. (2013) Production and Characterization of DHA and GLA-Enriched Structured Lipid from Palm Olein for Infant Formula Use. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **90**: 1141-1149.
- NIELSEN, N. S.; YANG, T.; XU, X.; JACOBSEN, C. (2006) Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food chemistry*, **94**: 53-60.

- NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; LUNA, D.; FERREIRA-DIAS, S. (2011) Production of MLM-Type Structured Lipids Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **88**: 473-480.
- NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. (2012) Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **89**: 1287–1295.
- 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**: 110-120.
- PANDE, G.; SABIR, J. S. M.; BAESHEN, N. A.; AKOH, C. C. (2013) Synthesis of Infant Formula Fat Analogs Enriched with DHA from Extra Virgin Olive Oil and Tripalmitin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **90**: 1311-1318.
- PÉRIGNON, M.; LECOMTE, J.; PINA, M.; RENAULT, A.; SIMONNEAU-DEVE, C.; VILLENEUVE, P. (2013) Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B Lipases in Interesterification Reactions: Effect of the Aqueous Microenvironment. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **90**: 1151-1156.
- PÉRIGNON, M.; LECOMTE, J.; PINA, M.; RENAULT, A.; SIMONNEAU-DEVE, C.; VILLENEUVE, P. (2014) Evaluation of *Rhizopus oryzae* Lipase for the Determination of Regiodistribution in Triacylglycerols with Medium Chain Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **89**: 89-96.
- 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. *J Agric Food Chem*, **53**: 5779-83.
- SAHIN, N.; AKOH, C. C.; KARAALI, A. (2006) Human Milk Fat Substitutes Containing Omega-3 Fatty Acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**: 3717-3722.
- SIMÕES, T.; VALERO, F.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S. (2013) Production of Human Milk Fat Substitutes Catalyzed by a Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase and Commercial Lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1-9**.
- SOARES, F. A. S. M.; OSÓRIO, N. M.; DA 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*, **11**: 413-428.
- SORENSEN, A. D. M.; XU, X. B.; ZHANG, L.; KRISTENSEN, J. B.; JACOBSEN, C. (2010) Human Milk Fat Substitute from Butterfat: Production by Enzymatic Interesterification and Evaluation of Oxidative Stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **87**: 185-194.
- 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*, **115**: 270-285.
- TECELÃO, C.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. (2012a) Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochemical engineering journal*, **67**: 104-110.
- TECELÃO, C.; RIVERA, I.; SANDOVAL, G.; FERREIRA-DIAS, S. (2012b) Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. *European journal of lipid science and technology*, **114**: 266-276.
- TECELÃO, C.; SILVA, J.; DUBREUCQ, E.; RIBEIRO, M. H.; FERREIRA-DIAS, S. (2010) Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **65**: 122-127.
- TEICHERT, S. A.; AKOH, C. C. (2011) Modifications of stearidonic acid soybean oil by enzymatic acidolysis for the production of human milk fat analogues. *J Agric Food Chem*, **59**: 13300-10.

- TURAN, D.; YESILCUBUK, N. S.; AKOH, C. C. (2012) Production of human milk fat analogue containing docosahexaenoic and arachidonic acids. *J Agric Food Chem*, **60**: 4402-7.
- WANG, Y. H.; MAI, Q. Y.; QIN, X. L.; YANG, B.; WANG, Z. L.; CHEN, H. T. (2010) Establishment of an evaluation model for human milk fat substitutes. *J Agric Food Chem*, **58**: 642-9.
- XU, X. (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European journal of lipid science and technology*, **102**: 287-303.
- XU, X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. (2000) Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J Agric Food Chem*, **48**: 3-10.
- YANG, T.; XU, X.; HE, C.; LI, L. (2003) Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food chemistry*, **80**: 473-481.
- YU-DONG, S.; GUO-QING, S.; ZHI-GUO, Z.; XIN, D.; XIAO-HONG, K.; ZHEN-DONG, L.; YING, M.; QING-HAI, S. (2011) The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chemistry*, **127**: 1193–1198.
- ZOU, X.; HUANG, J.; JIN, Q.; GUO, Z.; LIU, Y.; CHEONG, L.; XU, X.; WANG, X. (2013) Lipid composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes. *J Agric Food Chem*, **61**: 7070-80.
- ZOU, X. Q.; GUO, Z.; HUANG, J. H.; JIN, Q. Z.; CHEONG, L. Z.; WANG, X. G.; XU, X. B. (2012) Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization. *J Agric Food Chem*, **60**: 7158-67.
- ZOU, X. Q.; HUANG, J. H.; JIN, Q. Z.; LIU, Y. F.; SONG, Z. H.; WANG, X. G. (2011) Lipase-catalyzed preparation of human milk fat substitutes from palm stearin in a solvent-free system. *J Agric Food Chem*, **59**: 6055-63.