

**SÍNTESE DE SUCEDÂNEOS DE GORDURA DE
LEITE HUMANO ENRIQUECIDOS EM ÁCIDOS GORDOS
POLINSATURADOS ÓMEGA-3 DO ÓLEO DE CAMELINA,
CATALISADA PELA LIPASE HETERÓLOGA DE *RHIZOPUS
ORYZAE***

Ana Rita Varanda Faustino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Co-Orientador: 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, orientadora;

- Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com o apoio técnico, científico e a amizade de algumas pessoas às quais dirijo um profundo agradecimento:

Um especial e sincero agradecimento à Professora Suzana Ferreira Dias por ter aceite o cargo de minha orientadora de mestrado, pela orientação científica, pelos conhecimentos transmitidos, pela revisão meticulosa desta dissertação e pelo seu apoio, otimismo e constante disponibilidade.

À Professora Carla Tecelão, pela co-orientação desta tese, pelos conhecimentos transmitidos no âmbito da presente tese e pela realização das análises dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa.

Ao grupo do Professor Francisco Valero da Universidade Autónoma de Barcelona, pelo fornecimento da lipase heteróloga de *Rizopus oryzae* e da metodologia para a imobilização desta lipase em ReliZyme™ OD403/S, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho. Agradeço igualmente à Lanxess (Alemanha), pelo fornecimento do suporte Lewatit VP OC 1600.

À Acenini Balieiro e à Joana Rodrigues, pela preciosa ajuda prestada no laboratório e pelo esclarecimento de inúmeras dúvidas ao longo da presente tese.

Um agradecimento muito especial a toda minha família, em particular à minha mãe, que sempre acreditou nas minhas capacidades, investiu na minha formação académica e me ajudou e apoiou incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Ao André, pela preciosa ajuda ao longo de todo o trabalho prático e por ter estado sempre e incondicionalmente do meu lado, assim como pela compreensão, paciência, apoio e conforto nas fases mais difíceis. Muito obrigada por tudo.

E por último, mas não menos importante, um sincero agradecimento a todos os meus amigos, que sempre me felicitaram nos bons momentos e me apoiaram nas piores alturas mas, principalmente, pela companhia que me fizeram e pelos momentos que me proporcionaram dentro e fora da faculdade, durante o decorrer do presente trabalho. Muito obrigada a todos.

RESUMO

Na gordura do leite materno (HMF), o ácido palmítico encontra-se principalmente na posição interna dos triacilgliceróis, enquanto os ácidos gordos (AG) insaturados ocupam as posições externas, formando uma estrutura única na Natureza.

Neste estudo, pretendeu-se produzir substitutos de HMF ricos em AG polinsaturados ómega-3, por acidólise enzimática da tripalmitina com AG provenientes do óleo de camelina, em reator descontínuo e meio livre de solvente.

Testou-se a lipase comercial “Lipozyme RMIM” e a lipase recombinante não comercial de *Rhizopus oryzae* (rROL), ambas imobilizadas, termoestáveis e 1,3-seletivas. Obteve-se maior incorporação molar para “Lipozyme RMIM” (50,3%), seguida da rROL em Lewatit VPOC1600 (43,3%) e da rROL em ReliZyme OD403/S (19,5%), após 24h a 60°C. Selecionou-se a rROL em Lewatit, como alternativa às lipases comerciais.

Com este biocatalisador (5% m/m), a incorporação molar aumentou com a atividade da água e atingiu-se uma situação de *quasi*-equilíbrio após 24h de reação.

Modelou-se a acidólise catalisada pela rROL em função da temperatura (58°C-72°C) e da razão molar tripalmitina:AGL (1:1,2-1:6,8) pela metodologia das superfícies de resposta. O consumo de tripalmitina diminuiu com o aumento de ambos os fatores.

O consumo de tripalmitina aumentou de 62% (5% de rROL) para 88% com 8 e 10% de rROL, assim como a formação de novos triacilgliceróis.

Palavras-chave: acidólise, ácidos gordos polinsaturados ómega-3, lipases, lípidos estruturados, metodologia das superfícies de resposta, substitutos da gordura do leite materno.

ABSTRACT

In human milk fat (HMF), palmitic acid is mostly esterified at the internal position of triacylglycerols, while unsaturated fatty acids (FA) are at the external positions, creating a single structure in Nature.

This study aims at the production of HMF substitutes rich in omega-3 polyunsaturated FA, by enzyme-catalyzed acidolysis of tripalmitin with FA of camelina oil, in batch reactor and solvent-free media.

An immobilized commercial lipase ("Lipozyme RM IM™") and a non-commercial heterologous *Rhizopus oryzae* lipase (rROL) were tested, as thermostable and *sn*-1,3 selective lipases. After 24h reaction at 60°C, molar incorporations of 50.3% for "Lipozyme RM IM™", 43.3% for rROL in Lewatit VPOC1600 and 19.5% for rROL in ReliZyme OD403/S were obtained. rROL immobilized in Lewatit was selected as an alternative to commercial lipases. With this biocatalyst (5% m/m), the molar incorporation increased with the water activity and *quasi*-equilibrium was attained after 24 hours reaction.

Response Surface Methodology was used to model the acidolysis reaction catalysed by rROL, as a function of temperature (58°C-72°C) and molar ratio tripalmitin:FFA (1:1.2-1:6.8). Tripalmitin consumption decreased with the increase of both factors.

Tripalmitin consumption increased from 62% (5% biocatalyst load) to 88% with 8 or 10% loads, as well as the formation of new triacylglycerols.

Keywords: acidolysis, human milk fat substitutes, lipases, omega-3 polyunsaturated fatty acids, response surface methodology, structured lipids.

LONG ABSTRACT

Functional foods are foods that, consumed in the daily diet, can bring additional benefits to health and human welfare, besides the basic nutritional effects.

The human milk is an example of natural and functional food. It is considered as the gold standard of infant nutrition. It provides, not only the energy and nutrients essential for proper growth and development of the infants, but also has many other building functions. Thus, breastfeeding in the first months of life, is fundamental in the immune, neurological, cognitive, psychomotor and emotional development of the newborn, while it strengthens the mother-child bond.

However, some children cannot be breastfed for many reasons which are inherent to the mother's inability. In these situations, it is necessary to prepare milk formulations capable to provide the nutritional components to healthy infant's growth. Thus, it is important that these milk formulations have the same lipidic composition as that found naturally in human milk fat (HMF).

The total lipid content of human breast milk varies (3–5 %), which 98 % are triacylglycerols (TAG), 1.3 % are phospholipids and 0.4 % is cholesterol.

In TAG molecules, the long chain fatty acids are predominant, such as oleic (30-45 %), palmitic (15-25 %), linoleic (10-25 %) and stearic (4-8 %) acids. Also, small amounts of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA), such as EPA (eicosapentaenoic acid (C20:5); 0.07-0.18 %), DHA (docosahexenoic acid (C22:6); 0.15-0.60 %) and alfa-linolenic (C18:3; 0.5-1.7 %) are found. Both percentages of saturated and unsaturated fat acids are around 50%, depending of many factors such as the diet of the mother.

In HMF, palmitic acid, the major saturated fatty acid, is mostly esterified at the internal position of TAGs (*sn*-2), while unsaturated fatty acids are at the external positions (*sn*-1 e *sn*-3), creating a single structure in nature. In vegetable oils and in ruminant milk fat, the positions of fatty acids in TAGs are generally the opposite.

During digestion of human milk, by the action of the *sn*-1,3 selective pancreatic lipase, the unsaturated fatty acids are easily absorbed in infant's intestine as free fatty acids (FFA). During digestion of vegetable oils or ruminant's milk fat, saturated fatty acids are released by the pancreatic lipase. In reaction with calcium and other divalent cations, saturated fatty acids form insoluble soaps (e.g. calcium palmitate), which are excreted as hard stool, resulting in constipation problems and unavailability of both palmitic acid and minerals to the infants. Thus, the use of vegetable oils and ruminant milk fat as human milk fat substitutes (HMFS) in infant formulas should be avoided.

Therefore, the production of HMFS that reproduces, as closely as possible, the structure and composition of human milk, is a challenge for food industry. In this context, the use of enzyme-catalysis offers many advantages over the conventional methods using inorganic catalysts, due to the stereo and regio-selectivity and specificity of lipases. Furthermore, lipase-

catalyzed reactions are carried out under mild conditions of pressure and temperature, which results in reduction of pollution effects and costs associated with the process.

The production of modified TAG in their fatty acid composition is currently performed by the reaction between an ester and a FFA. The HMFS produced by enzymatic route are among the most important structured lipids for the Food Industry. The use of 1,3 selective lipases for the production of HMFS will maintain the palmitic acid in the internal position of acilglycerols which is nutritionally desirable and it is not possible by the chemical route.

For these reasons, the search for lipases capable to catalyze reactions for the production of structured lipids with specific functional properties significantly increased during the last decades, having been progressively replacing the commonly used inorganic catalysts.

Nowadays, the commercial product named "Betapol" is used as HMFS in infant formulas. It is formed by TAGs mainly OPO (oleic acid in external positions and the palmitic acid in internal position of TAG), obtained by interesterification of natural vegetable oils, catalyzed by a *sn*-1,3 specific lipase. This product is produced by "Lipid Nutrition" (Netherlands). More recently, a similar product, named InFat, is produced by Advanced Lipids (Sweden).

The omega-3 PUFA enrichment in infant milk formulations, mainly in DHA and EPA, has known benefits in structural, functional, neurological and cognitive development of children.

This study aims at the production of HMFS rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids, by enzyme-catalyzed acidolysis of tripalmitin with FFA of camelina oil, in stirred-reactor batch, solvent-free media and at atmospheric pressure.

The commercial lipase from *Rhizomucor miehei* "Lipozyme RM IMTM" and a non-commercial heterologous lipase from *Rhizopus oryzae* (rROL) were tested. Both lipases are thermostable, *sn*-1,3 selective and were used immobilised. After 24 hours reaction at 60°C, the highest molar incorporations were observed with "Lipozyme RM IMTM" (50.3%) and rROL in Lewatit VP OC 1600 (43.3%), in contrast with rROL in ReliZyme OD403/S (19.5%). rROL immobilized in Lewatit was selected as biocatalyst, which is a low cost non-commercial biocatalyst that has not been extensively studied.

The effect of the initial water activity (a_w) of rROL immobilized in Lewatit VP OC 1600 in its catalytic activity was investigated. Four different values of a_w - 0.56, 0.75, 0.81, 0.92 – were tested. The molar incorporation increased with the increase of water activity.

Time-course reaction was performed with rROL and a situation of *quasi*-equilibrium was attained after 24 hours reaction.

Modeling of acidolysis reaction catalysed by rROL, as a function of temperature (58°C-72°C) and molar ratio tripalmitin:FFA (1:1,2-1:6,8) was performed using Response Surface Methodology. The highest tripalmitin consumption was achieved at 60°C with a molar ratio tripalmitin:FFA of 1:2. The tripalmitin consumption decreased with the increase of both factors.

All previous assays were made using a load of lipase of 5%. Using larger loads of biocatalyst (8% and 10%), tripalmitin consumption increased, as well as the formation of new triacylglycerols. However, due to the current price of lipases, it should be chosen a load of lipase of 8%, because the increase of new TAG reached by changing the load of lipase from 8% to 10% cannot compensate the increase in costs related to the lipase and the respective support.

In both cases, the costs for the purification of new TAG will always be high, because many secondary reaction products are formed during acidolysis reaction catalysed by rROL immobilized in Lewatit VP OC 1600.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LONG ABSTRACT	iv
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Enquadramento do tema.....	1
1.2. Objetivos e plano geral da dissertação.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos.....	6
2.2. Fração lipídica do leite materno.....	8
2.2.1. Composição.....	8
2.2.2. Estrutura dos triacilgliceróis.....	10
2.2.3. Importância nutricional.....	11
2.3. Produção de lípidos estruturados.....	13
2.3.1. Lípidos estruturados: definição.....	13
2.3.2. Métodos de produção.....	14
2.3.2.1. Interesterificação química.....	15
2.3.2.2. Interesterificação enzimática.....	16
2.3.2.2.1. A biocatálise como opção ao método convencional químico.....	16
2.3.2.2.2. Mecanismo de interesterificação enzimática.....	19
2.3.2.2.3. Imobilização de lipases.....	21
2.3.2.2.4. Parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade enzimáticas.....	23
2.3.2.2.5. A biocatálise aplicada à síntese de sucedâneos de gordura de leite materno.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Materiais.....	34
3.1.1. Biocatalisadores.....	34

3.1.2. Suportes	34
3.1.2.1. Lewatit VP OC 1600	34
3.1.2.2. Relizyme OD403/S	35
3.1.3. Substratos.....	36
3.1.4. Reagentes e outros materiais	37
3.1.5. Equipamentos.....	38
3.2. Métodos	39
3.2.1. Preparação dos ácidos gordos livres	39
3.2.2. Imobilização da rROL em Lewatit VP OC 1600	41
3.2.3. Imobilização da rROL em Relizyme OD403/S.....	42
3.2.4. Interesterificação enzimática.....	43
3.2.4.1. Estudo da influência da atividade da água do biocatalisador na reação de acidólise.....	45
3.2.4.2. Ensaio cinético de acidólise.....	46
3.2.4.3. Ensaio de modelação e otimização da reação de acidólise.....	46
3.2.5. Análise dos produtos de reação.....	50
3.2.6. Avaliação do grau de incorporação molar nos triacilgliceróis.....	53
3.2.7. Estudo da cinética da reação	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Atividades catalíticas e seleção do biocatalisador.....	61
4.2. Influência da atividade da água da rROL na reação de acidólise	63
4.3. “Time-course” da reação de acidólise catalisada pela rROL.....	67
4.4. Modelação e otimização das condições reacionais para a rROL.....	70
4.5. Influência da carga de enzima na cinética da reação de acidólise catalisada pela rROL	76
5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
5.1. Conclusões gerais	82
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da reação de acidólise enzimática entre um TAG e moléculas de um determinado ácido gordo livre	20
Figura 2 – Representação esquemática da reação de acidólise enzimática entre os AG polinsaturados ômega-3 de cadeia longa obtidos do óleo de camelina e a tripalmitina, utilizando uma lipase <i>sn</i> -1,3 específica	32
Figura 3 – Montagem de um sistema de refluxo.....	39
Figura 4 – (A) Obtenção da fase aquosa; (B) Extração dos ácidos gordos livres.....	40
Figura 5 – Evaporação no <i>n</i> -hexano num evaporador rotativo de vácuo.....	41
Figura 6 – Processo de imobilização da rRol em Lewatit VP OC 1600.	42
Figura 7 – Demonstração esquemática do papel do glutaraldeído na imobilização enzimática ..	42
Figura 8 – Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm ³) sob agitação magnética.....	43
Figura 9 – Reatores em série aquecidos por banho termostático.....	44
Figura 10 – Equilíbrio das lipases a diferentes valores de a_w	45
Figura 11 – Matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”) para duas variáveis, X_1 e X_2	48
Figura 12 – Representação esquemática da deposição de amostra numa placa de TLC.	50
Figura 13 – Placas em tina cromatográfica.....	51
Figura 14 – Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel, sendo visíveis os diferentes grupos de compostos que constituem o meio reacional.....	51
Figura 15 – (A) Representação esquemática da etapa de separação das fases orgânica e aquosa; (B) Etapa de separação das fases orgânica e aquosa.....	52
Figura 16 – Exemplo de um cromatograma obtido de uma amostra de ésteres metílicos resultante da reação de acidólise entre a palmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina e identificação dos picos mais relevantes.....	54
Figura 17 – Exemplo de “peak list” de uma amostra de ésteres metílicos resultante da reação de acidólise entre a palmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina	55
Figura 18 – Cromatogramas A e B relativos, respetivamente, aos tempos 0h e 24h de uma determinada reação de interesterificação realizada	57
Figura 19 – Curva de calibração para a tripalmitina	59
Figura 20 – Curva de calibração para o ácido cáprico	60
Figura 21 – Incorporação molar dos AGL do óleo de camelina na tripalmitina (PPP), consumo de PPP e PPP residual, ao longo de 48 horas de acidólise catalisada pela rROL em Lewatit, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP.....	68
Figura 22 – (A) Superfície de resposta ajustada à quantidade de tripalmitina consumida por acidólise com AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL em Lewatit, em função da temperatura do meio reacional e da razão molar PPP:AGL e (B) respetiva projecção.....	72

Figura 23 – Relação entre os valores de tripalmitina consumida preditos pelo modelo (% m/m) e os observados experimentalmente (% m/m)73

Figura 24 – Valores obtidos para o grau de conversão da tripalmitina em novos TAG para cada carga de lipase estudada78

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Composição em ácidos gordos (%) do leite materno	9
Quadro 2 – Principais propriedades físicas e químicas de Lewatit VP OC 1600	34
Quadro 3 – Principais propriedades físicas e químicas de Relizyme OD403/S.....	35
Quadro 4 – Composição em ácidos gordos (%) do óleo de camelina utilizado	36
Quadro 5 – CCRD usada nos ensaios de acidólise entre a tripalmitina (PPP) e AGL do óleo de camelina	49
Quadro 6 – Valores de incorporação dos ácidos gordos livres (AGL) do óleo de camelina na tripalmitina (PPP) para as diferentes lipases usadas, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP	61
Quadro 7 – Dados relativos à pesagem das amostras referentes ao pré-equilíbrio da rROL imobilizada em Lewatit a diferentes valores de a_w	64
Quadro 8 – Valores de incorporação dos ácidos gordos livres (AGL) do óleo de camelina na tripalmitina (PPP) para a rROL em Lewatit, a diferentes valores de atividade da água, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP	65
Quadro 9 – Matriz central compósita rotativa (CCRD) utilizada na modelação da acidólise e na otimização das condições reacionais e valores de tripalmitina consumida (% m/m) para cada ensaio, após 24h de reação, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit.....	70
Quadro 10 – Resultados dos efeitos e respetivos valores de p para as variáveis testadas na cinética da reação de acidólise entre a tripalmitina e AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit	71
Quadro 11 – Valores relativos ao consumo de tripalmitina (PPP) (% m/m) para cada carga de lipase usada, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2	76
Quadro 12 – Valores relativos à formação de novos TAG para cada carga de lipase utilizada, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2	77
Quadro 13 – Composição do meio reacional (% m/m) no tempo zero e após 24 horas de reação de acidólise entre a tripalmitina e AGL do óleo de camelina, para cada carga de lipase estudada, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Nota prévia: Nesta tese, optou-se por utilizar algumas abreviaturas na língua inglesa, por serem as utilizadas na literatura da especialidade.

AG – Ácidos gordos

AGL – Ácidos gordos livres

ALA – “Alfa-linolenic acid” – ácido alfa-linolénico

ARA – “Arachidonic acid” – ácido araquidónico

a_w – Atividade da água

CCRD - “Central Composite Rotatable Design” – matriz central compósita rotativa

DAG – Diacilgliceróis

DHA – “Docosahexenoic acid” - Ácido docosa-hexenóico

EPA – “Eicosapentaenoic acid” - Ácido eicosa-pentenóico

HMF – “Human milk fat” – gordura do leite materno

HMFS – “Human Milk Fat Substitutes” – substitutos da gordura do leite materno

LCFA – “Long chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia longa

MAG – Monoacilgliceróis

MCFA – “Medium chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia média

MUFA – “Monounsaturated fatty acid” – ácidos gordos monoinsaturados

Omega-3 PUFA – “Omega-3 Polynsaturated Fatty Acids” – ácidos gordos polinsaturados ómega3

PUFA – “Polyunsaturated Fatty Acids” - ácidos gordos polinsaturados

R^2 – Coeficiente de determinação/ coeficiente de correlação quadrático

R^2_{aju} – Coeficiente de determinação ajustado

rROL – lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

RSM – “Response Surface Methodology” – metodologia das superfícies de resposta

SCFA – “Short-Chain Fatty acids” – ácidos gordos de cadeia curta

SFA – “Saturated Fatty Acids” – ácidos gordos saturados

SL – “Structured lipids” – lípidos estruturados

TAG – Triacilgliceróis

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Enquadramento do tema

Ao longo dos anos, o setor alimentar tem-se deparado com consumidores cada vez mais conscientes, interessados e informados em relação ao que consomem, optando por hábitos mais saudáveis. Assim, as indústrias têm procurado evoluir no fabrico de produtos de qualidade, naturais e saudáveis, o que conduziu ao desenvolvimento dos alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova conceção de alimentos, lançada no Japão na década de 80, através de um programa do governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos com uma função adicional à de nutrir, para uma população considerada como a mais velha do mundo.

Entende-se por alimentos funcionais todos os que, consumidos na alimentação quotidiana, podem trazer benefícios adicionais para a saúde e bem-estar humano, para além dos efeitos nutricionais básicos. Graças à presença de determinados componentes, estes alimentos demonstram a capacidade de regular funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, cancro e osteoporose (Souza *et al.*, 2003). São alimentos aos quais se adicionaram ou removeram componentes, por métodos tecnológicos ou biotecnológicos, de modo a proporcionar efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde. Podem ainda ser alimentos em que a natureza e/ou a biodisponibilidade de um ou mais constituintes foram modificadas. (Howlett, 2008).

O leite materno é um exemplo de alimento funcional e natural. É considerado o alimento por excelência da nutrição infantil universal (Megraud *et al.*, 1990), pois não só fornece a energia e nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento correto infantil, como também desempenha funções de proteção e imunidade. Desta forma, o aleitamento materno, nos primeiros meses de vida, é preponderante no desenvolvimento imunológico, neurológico, cognitivo, psicomotor e emocional do recém-nascido, favorecendo simultaneamente o vínculo entre mãe e filho (da Silva *et al.*, 2007).

No entanto, algumas crianças não são amamentadas, por opção ou impossibilidade por parte da mãe. Assim, existiu a necessidade de encontrar uma alternativa para a alimentação destas crianças. Surgem as formulações de leite para lactentes, com o intuito de suprir as necessidades nutricionais humanas dos primeiros meses de vida (Forsyth, 1998), tendo estas que apresentar a mesma composição lipídica que a encontrada naturalmente na gordura do leite materno.

O leite humano contém entre 3 a 5 % de gordura, sendo esta responsável por cerca de 50 % do seu valor calórico total, tendo como principal função fornecer ao recém-nascido a energia que necessita, bem como alguns nutrientes e componentes necessários: é fonte de

colesterol, ácidos gordos (AG) essenciais e vitaminas lipossolúveis. (Xu, 2000; O'Shea *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2007).

A gordura do leite materno (HFM, "human milk fat") compreende, na sua composição, 98 % de triacilgliceróis (TAG), 1,3 % de fosfolípidos e 0,4 % de colesterol (Jensen, 1989). Os ácidos gordos de cadeia longa prevalecem nas moléculas dos TAG, nomeadamente os ácidos oleico (30-45 %), palmítico (15-25 %), linoleico (10-25 %) e esteárico (4-8 %) (Pande *et al.*, 2013). Tanto a percentagem de saturados como a de insaturados ronda os 50 %, dependendo de vários fatores, como por exemplo da dieta alimentar da mãe. O leite materno tem também na sua constituição pequenas quantidades de ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (omega-3 PUFA, "omega-3 polyunsaturated fatty acids"), geralmente numa percentagem inferior a 3 % do total de AG. São exemplos os ácidos eicosa-pentenóico (EPA, "Eicosapentaenoic Acid" (C20:5), 0,07-0,18 %), docosa-hexenóico (DHA, "Docosahexaenoic Acid" (C22:6), 0,15-0,60 %) e alfa-linolénico (ALA, "Alpha-Linolenic Acid" (C18:3), 0,5-1,7 %). (Akoh, 2002; Akoh e Xu, 2002).

No que diz respeito à disposição dos AG nos TAG, esta caracteriza-se por uma especial predominância dos ácidos gordos saturados, essencialmente ácido palmítico, na posição *sn-2* enquanto os ácidos gordos insaturados se encontram preferencialmente nas posições externas dos TAG. Esta estrutura, única na natureza, é essencial para o processo digestivo do recém-nascido e para uma boa absorção dos componentes do leite. Isto porque, após a ingestão do leite, a lipase pancreática *sn-1,3* seletiva atua, quebrando as ligações e libertando os AG presentes nas posições *sn-1* e *sn-3* dos TAG, os quais são, posteriormente, absorvidos a nível do intestino grosso como ácidos gordos livres (AGL), penetrando facilmente na corrente sanguínea.

No fabrico de fórmulas comerciais para lactentes, recorre-se frequentemente à utilização de óleos vegetais ou de leite de ruminantes como substitutos da gordura de leite materno (HMFS, "Human Milk Fat Substitutes"). Em ambos, contrariamente ao observado no leite materno, o ácido palmítico e os restantes ácidos gordos saturados encontram-se predominantemente esterificados nas posições *sn-1* e *sn-3* das moléculas dos TAG, sendo libertados como AGL aquando a ação da lipase pancreática. O ácido palmítico na forma não esterificada apresenta ponto de fusão bastante superior à temperatura do corpo humano e, ao pH do intestino, facilmente origina sabões insolúveis ao reagir com o cálcio ou outros catiões bivalentes. Estes compostos são excretados sob a forma de fezes duras (Pande *et al.*, 2013). Esta pequena modificação em relação à estrutura dos TAG existentes na HFM traduz-se em problemas de obstipação no recém-nascido e numa deficiente absorção de ácido palmítico, cálcio e outros minerais.

Por esta razão, a composição e distribuição dos AG nos TAG das formulações para lactentes têm sido alvo de muita atenção recentemente, cabendo à indústria alimentar a produção de fórmulas de leite infantil que reproduzam, tanto quanto possível, a estrutura e composição do leite humano.

Neste contexto, o recurso à catálise enzimática oferece múltiplas vantagens face ao método convencional, devido às conhecidas características de regio e estereo-seletividade e especificidade das lipases. Além disso, as reações catalisadas por lipases realizam-se sob condições mais suaves de pressão e temperatura, o que se traduz na redução de efeitos poluentes e de custos associados ao processo. Por estas razões, a pesquisa de lipases capazes de catalisar reações destinadas à produção de lípidos estruturados com propriedades funcionais específicas aumentou significativamente, tendo vindo a substituir progressivamente os catalisadores inorgânicos usados comumente (Xu, 2000).

Os HMFS obtidos por via enzimática são, para a Indústria Alimentar, um dos exemplos mais importantes de TAG modificados na sua composição em AG. Na sua produção, recorre-se ao uso de lipases *sn*-1,3 seletivas com o objetivo de manter o ácido palmítico na posição interna dos acilgliceróis, o que é nutricionalmente desejável e não é possível por via química.

Atualmente, são usados como HMFS em leites para bebés, produtos comerciais como o “BetapolTM” e, mais recentemente, o “InFatTM”. O primeiro é produzido pela Lipid Nutrition, na Holanda, enquanto o segundo é fabricado pela Advanced Lipids, empresa que resultou da fusão entre a Enzymotec (Israel) e a AAK (Suécia). Ambos os produtos consistem em TAG fundamentalmente do tipo OPO (ácido oleico nas posições externas e o ácido palmítico na posição interna do TAG) obtidos por interesterificação de gorduras vegetais ricas em ácido palmítico na posição *sn*-2, catalisada por uma lipase *sn*-1,3 específica.

Têm sido efetuados muitos estudos com lipases imobilizadas como catalisadores, no sentido de produzir sucedâneos nutricionalmente mais completos e mais análogos à HMF que os sucedâneos já existentes. Os trabalhos de investigação publicados sobre este tema descrevem a utilização de sistemas reacionais, em presença ou ausência de solvente orgânico, cuja composição obedece, na sua maioria, a um padrão característico com três elementos fundamentais: (i) uma fonte de ácido palmítico, (ii) lipases imobilizadas com seletividade *sn*-1,3 como biocatalisador e (iii) ácidos gordos livres (em reações de acidólise) ou esterificados ao esqueleto de glicerol (em reações de interesterificação).

Já foram obtidos HMFS contendo os ácidos palmítico, oleico, esteárico e linoleico (Sahín *et al.*, 2005a), PUFA de cadeia longa e ácidos gordos essenciais (Mukherjee e Kiewitt, 1998; Nielsen *et al.*, 2006), ácido gama-linolénico (Sahín *et al.*, 2005b) e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (Sahín *et al.*, 2006).

A incorporação de ómega-3 PUFA nas formulações para lactentes, em particular de DHA e EPA, tem benefícios conhecidos no desenvolvimento estrutural, funcional, neurológico e cognitivo das crianças (Nagachinta *et al.*, 2013; Pande *et al.*, 2013).

Pretende-se que os estudos desenvolvidos no âmbito da presente tese sejam um contributo importante para o avanço na investigação sobre a síntese enzimática de lípidos estruturados, com vista a uma possível produção à escala industrial.

1.2. Objetivos e plano geral da dissertação

O objetivo principal da presente tese consistiu na produção de lípidos estruturados semelhantes à HMF, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados ômega-3, através de reações de acidólise enzimática utilizando a tripalmitina (PPP) como fonte de ácido palmítico e um concentrado de ácidos gordos ômega-3 PUFA, obtido por saponificação do óleo de camelina.

As reações foram todas realizadas em reator descontínuo, num meio livre de solvente e à pressão atmosférica. A temperatura, a razão molar entre os substratos, a carga de enzima e a duração dos ensaios não se mantiveram sempre constantes, sofrendo alterações em alguns ensaios. No entanto, de um modo geral, os ensaios decorreram a 60°C, durante 24 horas, utilizando uma razão molar PPP:AGL de 1:2 e uma carga de lipase de 5 % em relação à massa de tripalmitina. Na maioria dos casos foram realizados ensaios em duplicado.

Numa primeira fase do trabalho, as reações supracitadas foram catalisadas por diferentes preparações de lipases termoestáveis imobilizadas, com seletividade *sn*-1,3, com vista a seleccionar o biocatalisador com melhor atividade de acidólise, medida em termos da incorporação molar de ácidos gordos nos triacilgliceróis.

A maioria dos estudos de produção de lípidos estruturados são efetuados recorrendo a lipases comerciais imobilizadas. No entanto, o preço elevado das preparações comerciais de lipases imobilizadas dificulta o seu uso à escala industrial. Assim, com vista a explorar biocatalisadores com propriedades capazes de competir com os biocatalisadores comerciais, testou-se, para além da lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme RM IM"), uma lipase não comercial, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris* e posteriormente imobilizada em dois suportes distintos: Lewatit VP OC 1600 e ReliZyme OD403/S. Selecionou-se, de entre as três preparações enzimáticas referidas, a que demonstrou melhores resultados em termos de incorporação molar. Os resultados obtidos encontram-se no capítulo 4.1. e todos os ensaios subsequentes foram realizados usando a enzima escolhida como biocatalisador.

Investigou-se o efeito da atividade da água (a_w) do biocatalisador escolhido na sua atividade de acidólise. Para tal, realizou-se o pré-equilíbrio da lipase imobilizada a quatro valores distintos de a_w (0,56, 0,75, 0,81 e 0,92) e repetiram-se as reações de acidólise entre a tripalmitina e os AGL, mantendo-se as condições usadas na primeira fase deste estudo. Selecionou-se o valor de a_w para o qual se obteve os melhores resultados em termos de incorporação molar, mantendo-o constante nos ensaios seguintes. Os resultados obtidos encontram-se inseridos no capítulo 4.2.

Foi igualmente objetivo deste estudo investigar ao fim de quanto tempo se atingia uma situação de *quasi*-equilíbrio no sistema considerado. Assim, foi realizado um ensaio "time

course”, com a duração de 48 horas, mantendo as mesmas condições dos ensaios anteriores. Para cada hora, calculou-se a incorporação molar obtida e as quantidades de tripalmitina consumida e residual. Os resultados obtidos encontram-se presentes no capítulo 4.3.

Modelou-se a reação de acidólise e otimizaram-se as condições operacionais pelo Método das Superfícies de Resposta (RSM - “Response Surface Methodology”) para o biocatalisador selecionado, em função dos parâmetros reacionais temperatura e razão molar PPP:AGL, com vista a avaliar se estes parâmetros tinham efeitos significativos no consumo de PPP. Os resultados podem ser observados no capítulo 4.4.

Por fim, investigou-se o efeito da carga de enzima na cinética da reação de acidólise em causa, nas condições anteriormente otimizadas. Para tal, testaram-se cargas de lipase correspondentes a 8 % e 10 % em relação à massa de tripalmitina e, para cada caso, foi quantificado o consumo de tripalmitina, a formação de MAG, DAG e TAG e a variação de ácido palmítico livre e dos restantes AGL no decorrer da reação. Os resultados foram comparados com os obtidos para a carga de 5 % utilizada nos ensaios anteriores e encontram-se presentes no capítulo 4.5.

A finalizar esta dissertação, encontra-se um capítulo de conclusões gerais e perspetivas para trabalhos futuros (capítulo 5).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos

A designação lípidos abrange uma família muito extensa e variada de macromoléculas, razão pela qual não é possível defini-los exatamente. De uma forma geral, podem definir-se como macromoléculas heterogêneas caracterizadas por terem fraca solubilidade em água mas elevada solubilidade em determinados solventes orgânicos como éter etílico, álcool, hexano, clorofórmio e acetona. Todos os lípidos contêm nas suas moléculas carbono, hidrogénio e oxigénio e, em alguns casos, encontra-se também fósforo, azoto e enxofre. Os lípidos formam, juntamente com os glúcidos e as proteínas, o grupo de compostos mais frequente em alimentos, tanto vegetais como animais.

Os alimentos ricos em lípidos são muitas vezes rotulados de produtos com efeitos nefastos para a saúde, pois uma elevada ingestão de gordura na dieta total encontra-se associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, obesidade e alguns tipos de cancro. Contudo, os lípidos têm um papel vital nos produtos alimentares, por razões sensoriais, nutricionais e funcionais (Chu *et al.*, 2002).

A nível sensorial, os consumidores são atraídos pelo *flavour*, textura e aroma dos alimentos ricos em gordura. As gorduras interagem com outros componentes no desenvolvimento e na produção da textura e das sensações na boca, que advêm da lubrificação dos alimentos. Assim, os lípidos têm um papel importante na qualidade dos alimentos, que não deve ser desvalorizado (Chu *et al.*, 2002).

Em termos nutricionais e funcionais, os lípidos são constituintes essenciais da dieta alimentar porque, para além do seu elevado valor energético (cerca de 9 kcal/g, ou seja, mais elevado que o dos glúcidos e das proteínas), são veículos de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e de ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e linolénico) (Willis e Marangoni, 1999). Muitos estudos revelam as funcionalidades desta classe de nutrientes, que podem ser usados como alimentos funcionais ou componentes de alimentos funcionais (Campos, 1998). Estão já comprovados os efeitos benéficos que o consumo de determinados óleos e gorduras têm no crescimento, manutenção da saúde e prevenção de doenças em crianças e adultos (Willis e Marangoni, 1999).

No que respeita à composição, os óleos ou gorduras, de origem vegetal ou animal, são constituídos por TAG em cerca de 97 %. Os TAG são formados a partir de reações de esterificação entre uma molécula de glicerol e três moléculas de AG, com o estabelecimento de três ligações do tipo éster.

Cada molécula de AG é constituída por uma cadeia hidrocarbonada com comprimento variável, saturada ou insaturada, ligada a um grupo carboxilo (-COOH).

São as características dos AG presentes na molécula de glicerol que definem as propriedades físicas e químicas das gorduras, o destino metabólico e os seus benefícios para a saúde (Osborn e Akoh, 2002).

Quanto ao número de ligações duplas ou insaturações, os diferentes AG dos TAG podem apresentar entre zero a seis sendo, segundo este critério, classificados em (i) ácidos gordos saturados (SFA, "Saturated fatty acids"), se não possuem ligações duplas, (ii) monoinsaturados (MUFA, "Monounsaturated fatty acids"), se possuem apenas uma ligação dupla e (iii) polinsaturados (PUFA, "Polyunsaturated fatty acids"), se apresentam duas ou mais ligações duplas.

Os SFA apresentam ligações simples entre os vários átomos de carbono, o que confere à molécula uma estrutura linear mais estável e menos suscetível ao processo de oxidação lipídica. As gorduras ricas nestes AG apresentam um ponto de fusão elevado, encontrando-se no estado sólido à temperatura de 20° C. São associadas ao aumento do nível de produção de lipoproteína de baixa densidade (LDL, "Low Density Lipoprotein" – usualmente apelidado de "colesterol mau"). Pelo contrário, as gorduras mais ricas em MUFA e PUFA são normalmente encontradas no estado líquido à temperatura de 20° C e crêem-se mais "saudáveis" pois elevam o nível de lipoproteína de alta densidade no sangue (HDL, "High Density Lipoprotein" – usualmente denominado "colesterol bom").

Relativamente ao comprimento da cadeia, os vários AG podem apresentar entre quatro a vinte e quatro átomos de carbono podendo, por este motivo, ser classificados em (i) ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, "Short chain fatty acid"), se contêm entre dois a seis átomos de carbono, (ii) ácidos gordos de cadeia média (MCFA, "Medium chain fatty acid"), se apresentam seis a doze átomos de carbono e, (iii) ácidos gordos de cadeia longa (LCFA, "Long chain fatty acid"), se são constituídos por mais de 14 carbonos nas suas moléculas, quer sejam ácidos saturados ou insaturados (Osborn e Akoh, 2002).

Devido ao baixo tamanho molecular e curto comprimento da cadeia carbonada, os SCFA são voláteis e solúveis em água. Consequentemente, são mais rapidamente absorvidos no estômago e no intestino delgado do que outros ácidos gordos. Os SCFA estão presentes principalmente na gordura do leite de vaca e têm um conteúdo calórico baixo, o que é benéfico no sentido de reduzir a obesidade (Campos, 1998).

Os MCFA são os principais constituintes dos óleos de palmiste e de coco. Estes ácidos gordos são transportados preferencialmente pela veia porta para o fígado, onde são rapidamente metabolizados como glucose, devido à sua solubilidade ser superior à dos LCFA. Uma vez que os MCFA não são facilmente re-esterificados num novo TAG, não têm tendência a acumular-se no corpo sob a forma de gordura, sendo úteis no controlo da obesidade. No entanto, o seu consumo pode potenciar o aumento dos níveis de colesterol no sangue.

Por fim, os LCFA encontram-se maioritariamente nos óleos vegetais e de animais marinhos. Dado o comprimento da sua cadeia carbonada, os LCFA são absorvidos e

metabolizados mais lentamente que os SCFA e MCFA (Sellapan e Akoh, 2001; Osborn e Akoh, 2002). Não podem ser absorvidos ou transportados no sangue, devido à sua hidrofobicidade. Por essa razão, agrupam-se em micelas, capazes de entrar nas células intestinais, onde são formados os quilomicra, que são segregados no sistema linfático e entram por fim no sistema circulatório.

Existem diversos tipos de LCFA e alguns têm um papel bastante relevante para o organismo humano. São exemplos os ácidos gordos polinsaturados ômega-3 e ômega-6, devido às suas propriedades nutricionais, fisiológicas e físicas (c.f. 2.2.3.). Por essa razão, são usados na produção de lípidos estruturados, como os sucedâneos de gordura de leite materno.

Concluindo, as moléculas dos diversos AG diferem pela sua composição química, nomeadamente ao nível do número de carbonos e do grau de insaturação das suas ligações.

Contudo, estes dois fatores não são os únicos que diferenciam os AG: duas gorduras que contêm qualitativamente e quantitativamente os mesmos AG, irão manifestar diferentes propriedades físicas, químicas e fisiológicas se os seus ácidos se encontrarem distribuídos de forma diferente nos TAG (Ucciani e Debal, 1996). A distribuição posicional dos AG, entre as posições *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3 na estrutura principal dos acilgliceróis, componentes maioritários dos lípidos, determina a qualidade nutricional e a facilidade de degradação e de absorção do óleo ou gordura pelo ser humano.

Por todas as razões citadas, a designação *lípidos* diz respeito a uma complexa mistura de compostos com grandes diferenças ao nível de reatividade química, comportamento fisiológico, metabolismo, estrutura e propriedades físicas.

2.2. Fração lipídica do leite materno

2.2.1. Composição

O leite humano é uma emulsão óleo/água, constituída aproximadamente por 87 % de água e por uma fração rica em gordura, minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas, sendo que a fração lipídica corresponde entre 3 a 5 % de toda a emulsão (Jensen *et al.*, 1992; da Silva *et al.*, 2007).

Os lípidos apresentam-se no leite na forma de glóbulos com aproximadamente 4 µm de diâmetro, sendo a emulsão óleo/água estabilizada por uma membrana (da Silva *et al.*, 2007), essencialmente composta por TAG (mas também por MAG e DAG). Apresenta igualmente na sua constituição proteínas (glicoproteínas), lípidos complexos (fosfolípidos) e substâncias associadas (colesterol, vitamina A, etc.), enzimas (fosfatase alcalina, oxidase xantina, lipase, etc.) e elementos minerais (cobre, etc.) (Chambon, 1996).

Da fração lipídica do leite materno, cerca de 98 % são TAG, 1,3 % são fosfolípidos e 0,4 % encontram-se na forma de colesterol (Jensen, 1989).

Os TAG, componentes maioritários da HMF, são compostos por AG sintetizados pela glândula mamária e refletem a qualidade da gordura ingerida (exógena) e sintetizada (endógena), assim como a genética do indivíduo quanto à capacidade para sintetizar, armazenar e utilizar os AG. Deste modo, cada bebê amamentado disfruta de uma ingestão de gordura única, tanto a nível quantitativo como qualitativo, que difere com o tempo de lactação, a genética da mãe e a sua alimentação que, por sua vez, é bastante dependente da sua cultura e país (Agostini, 2003).

Quanto à natureza dos AG presentes nos TAG, os de cadeia longa prevalecem, nomeadamente o ácido oleico, seguido pelos ácidos palmítico, linoleico, mirístico e esteárico (quadro 1). Estes cinco AG são responsáveis por mais de 80 % do total de AG presentes no leite materno, com os ácidos oleico e palmítico a contribuírem com quase 70 % do total. Em percentagens bastante menores, encontram-se ácidos gordos de cadeia curta, como os ácidos butírico e capríco, e de cadeia média como os ácidos caprílico, cáprico e láurico (Maduko *et al.*, 2007).

Quadro 1 – Composição em ácidos gordos (%) do leite materno. Fonte: Pande *et al.*, 2013.

Ácido gordo	Total	sn-2
C8:0	0,11 – 0,36	n.d.
C10:0	0,85 – 3,08	0,36 ± 0,10
C12:0	4,05 – 9,35	4,81 ± 0,81
C14:0	3,60 – 9,13	9,66 ± 1,61
C16:0	15,43 – 24,46	52,30 ± 4,44
C18:0	4,60 – 8,13	1,71 ± 0,29
C18:1 n-9	28,30 – 43,83	13,97 ± 2,74
C18:2 n-6	10,61 – 25,30	10,95 ± 2,75
C18:3 n-6	0,00 – 0,27	-
C18:3 n-3	0,41 – 1,68	0,59 ± 0,10
C20:4 n-6	0,23 – 0,75	0,67 ± 0,15
C20:5 n-3	0,07 – 0,18	-
C22:6 n-3	0,15 – 0,56	0,64 ± 0,10
SFA	34,18 – 47,48	
MUFA	32,08 – 47,34	
PUFA	13,26 – 29,15	
n-3 PUFA	0,81 – 3,06	
n-6 PUFA	12,10 – 27,77	

n.d. - não detetado; SFA - ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - ácidos gordos polinsaturados.

Tal como mostra o quadro 1, é possível encontrar no leite materno pequenas percentagens de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6. Estes AG, provenientes do tecido adiposo materno e da gordura dietética ingerida, apresentam-se ligados aos fosfolípidos, formando a camada superficial das membranas da gordura do leite (Jensen, 1989).

Dentro dos ácidos gordos polinsaturados ômega-3, são exemplos os ácidos eicosa-pentenóico (EPA, “Eicosapentaenoic Acid” - C20:5), docosa-hexenóico (DHA, “Docosahexaenoic Acid” - C22:6) e alfa-linolénico (ALA, “Alpha-Linolenic Acid” – C18:3). Nos ácidos gordos polinsaturados ômega-6, é de destacar o ácido araquidónico (ARA, “Arachidonic acid” – C20:4).

Quanto ao grau de insaturação, pode-se concluir que os TAG do leite materno são constituídos por quantidades semelhantes de ácidos gordos saturados (sendo predominante o ácido palmítico) e de ácidos gordos monoinsaturados (principalmente pelo oleico) (da Silva *et al.*, 2007).

2.2.2. Estrutura dos triacilgliceróis

A estrutura principal dos TAG do leite materno é muito particular: os ácidos gordos saturados ocupam preferencialmente a posição *sn-2*, como é o exemplo do ácido palmítico em que cerca de 53% se localiza na posição interna dos TAG (quadro 1). Pelo contrário, os ácidos gordos insaturados, como o ácido oleico, encontram-se maioritariamente nas posições externas dos TAG (*sn-1* e *sn-3*) (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Xu, 2000; Pande *et al.*, 2013).

Nas gorduras vegetais e na gordura do leite de ruminantes, deteta-se precisamente o contrário: o ácido palmítico ocupa em grande parte as posições *sn-1* e *sn-3* dos TAG, enquanto os ácidos gordos insaturados se encontram predominantemente esterificados na posição *sn-2*.

Durante a digestão, a lipase pancreática (que é regio-seletiva) corta nas posições *sn-1* e *sn-3* dos TAG. No caso dos óleos vegetais e do leite de ruminantes, o ácido palmítico é libertado como AGL. Assim, no intestino, o ácido palmítico encontra-se livre para reagir com minerais, como o cálcio ou outros catiões bivalentes, que foram ingeridos na alimentação e estão presentes no lúmen do intestino. Quando se encontra na forma não esterificada, o ácido palmítico apresenta ponto de fusão de cerca de 63° C, o que é bastante superior à temperatura do corpo humano. Ao pH do intestino, o ácido palmítico facilmente origina sabões insolúveis (por exemplo, palmitato de cálcio) ao reagir com os compostos acima referidos, que são excretados sob a forma de fezes duras (Pande *et al.*, 2013). Tal traduz-se em problemas de obstipação e numa deficiente absorção de ácido palmítico, cálcio e outros minerais nos primeiros anos de vida do Homem.

Na digestão do leite humano, os AG que se libertam são maioritariamente insaturados, como o ácido oleico, ocorrendo preservação do ácido palmítico na posição *sn-2* durante a digestão (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Xu, 2000). O monoacilglicerol 2-monopalmitina é rapidamente absorvido (Nielsen *et al.*, 2006; www.lipidnutrition.com, ref:510-1-200610) pela parede do intestino e entra no sistema circulatório (Luna *et al.*, 2007), para posterior biossíntese de TAG (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Xu, 2000). Tal resulta num aumento de absorção dos AG no intestino dos lactentes e diminui a perda de cálcio nas suas fezes (Quinlan *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1999). Assim, quanto mais ácido palmítico existir na posição beta (*sn-2*) dos TAG do leite materno, maiores são os benefícios para os lactentes.

2.2.3. Importância nutricional

O leite materno é um alimento de elevada riqueza nutricional, sendo considerado o alimento por excelência da nutrição infantil universal (Megraud *et al.*, 1990). Não só fornece a energia e nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento correto infantil, como também desempenha funções de proteção e imunidade. Desta forma, o aleitamento materno, nos primeiros meses de vida, é preponderante no desenvolvimento imunológico, neurológico, cognitivo, psicomotor e emocional do recém-nascido (Megraud *et al.*, 1990; Pande *et al.*, 2013), favorecendo simultaneamente o vínculo entre mãe e filho (da Silva *et al.*, 2007).

A fração lipídica do leite materno é responsável por cerca de 50 % do seu valor calórico total, tendo como principal função fornecer ao recém-nascido a energia que necessita, bem como alguns nutrientes e componentes necessários: é fonte de colesterol, ácidos gordos essenciais e vitaminas lipossolúveis. (Xu, 2000; O'Shea *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2007).

Assim, é de grande importância a qualidade dietética dos lípidos do leite para o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos (Luna *et al.*, 2007), sendo a gordura do leite materno essencial para os componentes estruturais das membranas celulares dos recém-nascidos (Christie, 1995).

Como foi visto anteriormente (*c.f.* 2.2.2.), os AG que constituem a fração lipídica do leite são muito ricos em cálcio e energia que são essenciais, não só para o crescimento da criança, mas também para bom funcionamento do processo digestivo no sistema gastrointestinal, reduzindo a ocorrência de cólicas e de obstipação. Além disso, têm um papel importante na absorção das diversas vitaminas e minerais.

Para uma boa saúde futura, os bebês necessitam de ingerir uma mistura de ácidos gordos saturados e insaturados na sua alimentação e o leite materno contém uma perfeita combinação de ambos. Também é importante a ingestão de AG com diversidade ao nível do tamanho da cadeia carbonada, requisito novamente satisfeito pelo leite materno.

Os SFA são maioritariamente responsáveis pela produção de energia. Um exemplo é o ácido palmítico, um dos ácidos gordos saturados que se encontra em maior quantidade no leite materno e que é responsável por cerca de 10 % da energia fornecida ao bebê (www.lipidnutrition.com, ref:540-2-200809). Os SCFA e os MCFA proporcionam uma fonte de energia de absorção rápida (Nagachinta *et al.*, 2013).

Quanto aos LCFA, é de destacar os ácidos gordos polinsaturados ômega-3 e ômega-6 que, apesar de estarem presentes em quantidades pequenas e variáveis na fração lipídica do leite materno, apresentam benefícios conhecidos e são essenciais ao recém-nascido. Constituem classes especiais de ácidos gordos particularmente importantes devido às suas propriedades nutricionais, fisiológicas e físicas (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000).

Os ácidos gordos ômega-3 são um conjunto de PUFA que quimicamente se caracterizam por possuírem uma dupla ligação no terceiro átomo de carbono, contando a partir do último

radical metilo, ou seja, do fim da molécula. São exemplos os ácidos gordos EPA e DHA, que se encontram presentes no leite materno (quadro 1).

Estes ácidos gordos apresentam um elevado potencial devido aos seus conhecidos benefícios na saúde humana (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000). Desempenham um importante papel para o correto funcionamento do sistema cardiovascular, para o controlo da pressão arterial e na prevenção de inflamações (Kremer *et al.*, 1990; Simopoulos, 1998; Basu *et al.*, 2006; Howlett, 2008).

Também apresentam benefícios na prevenção de alguns tipos de cancro e no tratamento de doenças autoimunes (ex. artrite reumatoide) (Kremer *et al.*, 1990; Weber e Leaf, 1991; Zeijdner *et al.*, 1997; Simopoulos, 1998; Helland *et al.*, 2003). Recentemente descobriu-se que podem reduzir, moderadamente, os níveis de colesterol e, significativamente, os níveis de TAG no organismo (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000).

Muitos estudos referem que o EPA, e especialmente o DHA, têm revelado ser fisiologicamente essenciais, sendo fundamentais para o desenvolvimento estrutural e funcional das crianças. Têm um papel de relevo na massa e mineralização ósseas (Innis, 2008), assim como na saúde cardiovascular (Connor *et al.*, 1992; Carlson *et al.*, 1996; Makrides *et al.*, 1996; Valenzuela B., 2009). São essenciais para as membranas estruturais, conferindo-lhes flexibilidade, fluidez e permeabilidade seletiva (Wagner e Graham, 2004).

A presença destes AG influencia positivamente o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central, encontrando-se presentes em níveis elevados no córtex pré-frontal do cérebro, especialmente o DHA, que corresponde a aproximadamente 3 % da massa cerebral. São portanto fundamentais para o desenvolvimento e proteção das funções neurológicas e cognitivas neonatais (Nagachinta *et al.*, 2013). O DHA encontra-se também em elevada percentagem nas células fotorreceptoras da retina. Estudos sobre a suplementação de DHA e neurodesenvolvimento das crianças relataram uma relação significativa entre o consumo de DHA e melhorias na acuidade visual, na memória a curto prazo e na aprendizagem, nomeadamente na compreensão de vocabulário (Nagachinta *et al.*, 2013).

Como é claro, o lactente é dependente de muitos nutrientes para alcançar um crescimento e desenvolvimento ótimos mas, nos últimos anos, tem sido dada especial atenção aos ácidos gordos ómega-3 (Bryhn, 2006).

Os ácidos gordos ómega-3 devem fazer parte da alimentação humana de forma continuada mas a sua ingestão é particularmente importante por parte da mãe durante os períodos de gravidez e de lactação, sendo considerados parte fundamental de uma dieta saudável (Ruxton *et al.*, 2007). Isto porque a capacidade individual do novo ser para produzir DHA e EPA, para o seu próprio desenvolvimento, é limitada. Assim, o feto e o lactente dependem fortemente da quantidade destes ácidos ingerida pela mãe durante a gravidez e durante a amamentação, respetivamente.

O DHA e o EPA ingeridos pela mãe são ativamente transportados através da placenta para o feto e vão, também, entrar na constituição do leite materno. Devem ser transmitidos em quantidades suficientes para compensar o rápido crescimento e desenvolvimento dos órgãos e tecidos do feto e do recém-nascido.

Alguns estudos demonstraram que crianças com 4 e 5 anos, cujas mães ingeriram ômega-3 PUFA durante a gravidez e no decorrer da amamentação, revelaram ter maior concentração, comportamento e capacidade de aprendizagem do que as crianças cujas mães não ingeriram tais nutrientes (Willis *et al.*, 1998). De igual modo, crianças amamentadas revelaram quocientes de inteligência mais elevados que as alimentadas com formulações de leite pobres em DHA.

O reconhecimento da importância dos ômega-3 PUFA na saúde humana levou a que algumas organizações governamentais e de saúde tomassem medidas para o estabelecimento de quantidades adequadas de ingestão destes ácidos gordos. Desde 1975 que a Food and Agriculture Organisation (FAO) e a World Health Organisation (WHO) defendem a importância das formulações infantis se assemelharem, tanto quanto possível, ao leite materno (Wagner e Graham, 2004) e, desde 1990, várias organizações de saúde e nutrição recomendam a inclusão de ácidos gordos ômega-3 e ômega-6 nas formulações para lactentes, especialmente de ácido araquidónico e DHA (Ward e Singh, 2005). A European Food Safety Authority (EFSA) recomenda uma ingestão adicional de 100 a 200 mg de DHA por dia para mulheres grávidas e lactantes, para além da ingestão recomendada para adultos (250 mg de ácidos gordos ômega-3 por dia) (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1461.pdf>).

Apesar das vantagens referidas, o consumo desmesurado de ácidos gordos ômega-3 pode acarretar efeitos indesejáveis, como alterações da coagulação sanguínea com tendência para a hemorragia e a dificuldade de resposta do organismo em caso de infeção. No entanto, o consumo excessivo destes ácidos é raro, uma vez que eles surgem normalmente em percentagens baixas nos alimentos.

2.3. Produção de lípidos estruturados

2.3.1. Lípidos estruturados: definição

A compreensão das propriedades nutricionais e funcionais dos lípidos tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias de modificação de óleos e gorduras, com vista a aumentar os benefícios resultantes da ingestão destes compostos (Willis *et al.*, 1998). É neste contexto que surge o interesse pela produção de lípidos estruturados (SL, “Structured lipids”), com a capacidade de combinar as características benéficas de diferentes ácidos gordos numa única molécula de TAG.

Os SL podem ser definidos como misturas de TAG (i) sintetizados, (ii) reestruturados na sua composição original, pela substituição e incorporação de novos AG, de modo a obter

produtos de elevado valor, a partir de matérias-primas de baixo custo ou (iii) modificados na distribuição posicional dos AG nas suas moléculas de glicerol, modificando-se as características reológicas das matérias gordas sem alterar a sua composição em AG, não promovendo o aparecimento de isómeros *trans* inevitáveis em reações de hidrogenação (Akoh, 1998). Atualmente existem também fosfolípidos estruturados.

Os SL podem ser sintetizados com o propósito de modificar as características físicas (ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida, consistência, etc.), químicas (como a estabilidade oxidativa) e/ou organolépticas dos óleos e gorduras onde se encontram.

Também podem ser produzidos com o fim de apresentarem uma composição particular em ácidos gordos, de modo a alcançar alguma propriedade nutricional ou funcional desejável (como valor calórico reduzido). Por esta razão, para além de serem usados na área alimentar, os SL são bastante empregues para fins medicinais e nutracêuticos, em formulações para o tratamento de determinadas doenças ou simplesmente para a manutenção da saúde (Haumann, 1994). Um exemplo é o desenvolvimento de SL ricos em ácidos gordos polinsaturados na posição *sn-2* com MCFA na posição *sn-1* e *sn-3*, para o tratamento de problemas digestivos. Estes SL, do tipo MLM, apresentam também um menor valor calórico em relação aos TAG naturais (aproximadamente 4 Kcal/g, ao invés das habituais 9 Kcal/g).

Dada a reconhecida importância dos ómega-3 PUFA, como DHA e EPA (*c.f.* 2.2.3.), há um interesse crescente na produção de SL contendo estes ácidos para posterior incorporação em diversos alimentos funcionais e suplementos alimentares.

Os substitutos da gordura de leite materno e os sucedâneos da manteiga de cacau são exemplos de lípidos estruturados, modificados na sua composição em ácidos gordos.

2.3.2. Métodos de produção

As propriedades físicas (e.g. ponto de fusão e teor de gordura cristalizada), reológicas e organolépticas das gorduras dependem, não só da composição em ácidos gordos, mas também da distribuição dos ácidos gordos nos TAG.

Inicialmente, a modificação destas características era conseguida por hidrogenação dos ácidos gordos insaturados das gorduras. No entanto, as preocupações acerca dos efeitos nefastos para a saúde dos ácidos gordos *trans*, produzidos por hidrogenação, fizeram despertar o interesse em formas alternativas de modificação de gorduras. Surgiu assim o processo de interesterificação de gorduras.

Ao contrário da hidrogenação, a interesterificação altera as propriedades das gorduras somente devido a um rearranjo molecular, alterando-se as posições dos AG nas moléculas de TAG, através da troca de grupos acilo entre TAGs. Não ocorrem modificações ao nível da natureza dos ácidos gordos da gordura e, por consequência, não há formação de ácidos gordos

trans. Deste modo, o valor nutricional das gorduras interesterificadas mantém-se inalterado relativamente às gorduras originais (Haumann, 1994).

Os SL podem ser produzidos a partir de TAG de cadeia curta, média ou longa, presentes em gorduras vegetais ou animais. Dependendo do tipo de substrato disponível, podem ser usados diferentes métodos de produção – alcoólise, acidólise e transesterificação (Lee e Akoh, 1998) – que consistem em reações de interesterificação dos ésteres com um álcool, com um ácido ou entre ésteres, respetivamente. O processo pode dar-se por via química ou enzimática.

2.3.2.1. Interesterificação química

A interesterificação química, conhecida desde 1844, é o método de interesterificação mais antigo e simultaneamente mais usado na indústria atualmente (Marangoni e Rousseau, 1995). É levada a cabo sob a influência de um catalisador químico (e.g. metóxido de sódio) que promove a libertação dos ácidos gordos das moléculas dos diferentes TAG e vai ligar-se aos radicais livres que outros ácidos gordos deixaram, no mesmo ou noutra TAG constituinte dessa gordura.

Este tipo de interesterificação modifica aleatoriamente a posição dos ácidos gordos dentro da molécula de TAG, uma vez que os catalisadores inorgânicos atuam ao acaso sobre qualquer posição dos acilgliceróis.

Esta técnica é muito importante no fabrico de margarinas e cremes para barrar, na modificação do ponto de fusão e no melhoramento da textura e estabilidade (Ghazali *et al.*, 1995; Nawar, 1996). A nível nutricional, a principal vantagem é a produção de margarinas livres de ácidos gordos *trans* (Willis *et al.*, 1998).

Outra aplicação da interesterificação química consiste no melhoramento das propriedades físicas da banha, que tende a formar cristais grosseiros, difíceis de controlar durante o armazenamento. Isto acontece porque 64 % do ácido palmítico está ligado na posição *sn-2* da molécula de glicerol. Ao tornar aleatória a distribuição posicional dos ácidos gordos da banha por interesterificação química, as propriedades físicas são melhoradas, e a banha “reorganizada” torna-se suave, com maior plasticidade (DeMan, 1999).

Os processos de interesterificação química, a nível industrial, decorrem a temperaturas da ordem dos 200° C, mas a utilização de catalisadores químicos permite que esta seja reduzida para 50-100° C (Hustedt, 1976; Soontag, 1979; Rozenaal, 1992). A reação demora entre 30 minutos a 2 horas e a concentração de catalisador (geralmente metóxido de sódio) varia entre 0,1 a 0,6 % (m/m). Concentrações mais elevadas de catalisador provocam uma maior perda de lípidos neutros, devido à formação de sabões de sódio e ésteres metílicos (Rozenaal, 1992; Nawar, 1996).

As matérias-primas utilizadas devem conter teores de água inferiores a 0,01 %, teores de AGL inferiores a 0,05 % e índice de peróxidos inferior a 1,0 de modo a não inativar o catalisador químico utilizado (Kellens, 2000).

Os catalisadores químicos apresentam atividade elevada e o método de produção é simples, rápido e não exige equipamento muito dispendioso, apesar de requerer um número relativamente elevado de operações unitárias para recuperar e purificar o produto final.

No entanto, a interesterificação química apresenta várias desvantagens: a aleatoriedade das trocas acilo, o consumo energético elevado (devido às temperaturas de reação elevadas e à baixa pressão), a degradação dos PUFA, a dificuldade de remoção do catalisador após a reação e a consequente possibilidade de contaminação química dos produtos finais (Erickson, 1995).

Devido à sua falta de especificidade, podem ocorrer reações secundárias indesejadas, originando-se produtos secundários, como sabões, monoacilgliceróis e diacilgliceróis que necessitam de ser removidos, diminuindo assim o rendimento da reação e aumentando os custos de purificação da gordura interesterificada (Erickson, 1995).

Os catalisadores químicos têm ainda a desvantagem de ser bastante reativos com a água, havendo o risco de ocorrência de explosões, mesmo em quantidades vestigiais de água. Desta forma, o óleo deve encontrar-se totalmente seco.

2.3.2.2. Interesterificação enzimática

2.3.2.2.1. A biocatálise como opção ao método convencional químico

A modificação e síntese lipídica promovida por lipases tem-se desenvolvido bastante nas últimas duas décadas (Xu, 2003) e apresenta-se muito promissora e viável, devido às potencialidades das lipases e à sua versatilidade como catalisadores de reações.

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica que se encontram presentes em todas as células vivas, participando e acelerando as reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular e apresentando funções vitais de controlo dos processos de transformação dos nutrientes em energia e material celular (Carvalho, 2011). Tal como as restantes proteínas, as enzimas são constituídas por longas cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, segundo um arranjo tridimensional.

As plantas, os animais e os microrganismos são responsáveis pela produção de enzimas. Segundo Neidleman (1991), as enzimas são utilizadas há milhares de anos pelo Homem de forma direta, pelo emprego de extratos enzimáticos brutos de origem animal ou vegetal, e de forma indireta pelo aproveitamento da ação de enzimas decorrentes do crescimento microbiano em determinados substratos.

Estima-se que, dos milhares de enzimas encontrados na natureza, aproximadamente 2.800 já estão classificados e, destes, 400 são comercializados (Faber, 2004). Das enzimas

comercializadas, cerca de 70 são lipases, quer na forma liofilizada, quer imobilizadas em suportes (Ferreira-Dias, 2004).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3.) pertencem à classe das hidrolases, família de enzimas que compreende as lipases, esterases, proteases e amilases (Kidd *et al.*, 2001). Preferencialmente, atuam sobre ésteres insolúveis em água (como triacilgliceróis) nas interfaces óleo-água, catalisando a sua hidrólise. No entanto, quando em meio orgânico com baixa atividade de água, as lipases são igualmente capazes de catalisar reações inversas às de hidrólise – esterificação – e também reações de interesterificação dos ésteres com um álcool (alcoólise), com um ácido (acidólise) ou entre ésteres (transesterificação) (Cambou e Klivanov, 1984; Zaks e Klivanov, 1985).

As lipases, tal como as restantes enzimas, podem ter múltiplas origens. São encontradas em tecidos de vários animais e plantas e podem também ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, leveduras de *Tulopsis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp, *Bacillus* sp e *Staphylococcus* sp (Campos, 2010).

As lipases de microrganismos são as mais utilizadas a nível industrial, devido à facilidade de obtenção (o que contrasta com a dificuldade de extração das lipases de animais), ao número ilimitado de microrganismos possíveis capazes de produzi-las, à grande variedade de atividade catalítica, à facilidade de manipulação genética, ao rápido crescimento dos microrganismos em meios relativamente baratos e ao facto de representarem uma fonte regular sem flutuações sazonais (Hasan *et al.*, 2006). Além disso, as lipases microbianas costumam ser as mais termoestáveis. Tudo isto proporciona uma fácil produção em escala com elevados rendimentos, compatível com as necessidades industriais.

Estas propriedades, no entanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Também podem variar em função do método e do substrato utilizados, assim como das condições do meio em que ocorre o crescimento dos microrganismos. Assim, é essencial que o crescimento dos microrganismos produtores de lipases seja bastante controlado, pois a cultura pode ser afetada por fatores como a concentração da fonte de carbono, da fonte de azoto e do oxigénio dissolvido, pH, temperatura, atividade da água, entre outros (Sharma *et al.*, 2001).

Graças a avanços na tecnologia de DNA, as lipases microbianas, antes não acessíveis comercialmente por apresentarem um baixo rendimento no processo fermentativo, apresentam agora maior atividade enzimática a um custo mais acessível, sendo atualmente produzidas por diversas indústrias como a Gist Brocades, Novozymes e Amano (Campos, 2010).

As reações catalisadas por enzimas realizam-se sob condições moderadas de temperatura e pressão (temperatura inferior a 80° C e pressão atmosférica), ao contrário dos catalisadores inorgânicos que exigem temperaturas elevadas e condições de pressão extremas. Assim, o recurso à catálise enzimática contribui para a redução dos efeitos poluentes do

processo, assim como para a redução dos custos associados ao consumo energético (Ferreira-Dias, 2004).

As lipases não necessitam de cofatores e os produtos resultantes do seu uso são vistos como “naturais” pelos consumidores.

Em condições otimizadas, atuam tanto em meios microaquosos como em meios com elevada atividade da água (Xu, 2000). Podem ser usadas tanto na presença de solvente orgânico como na sua ausência (meio fundido).

Contrariamente aos catalisadores inorgânicos, as lipases apresentam, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, uma elevada seletividade, no que respeita (i) à classe dos lípidos: tri-, di- e monoacilgliceróis, ésteres do colesterol, ésteres do retinol, ésteres metílicos dos ácidos gordos; (ii) à posição dos AG nos acilgliceróis; (iii) às características dos AG (nomeadamente tamanho da cadeia carbonada e grau de saturação/insaturação); (iv) a um isômero ótico ou, ainda, (v) a alguma combinação destas situações (Jensen *et al.*, 1990). A seletividade própria das lipases vai permitir eliminar reações secundárias indesejáveis, obtendo-se maior rendimento em produto, bem como um produto final com maior grau de pureza, facilitando as operações subsequentes de purificação do produto final ou de remoção dos subprodutos. As lipases seletivas representam um alvo aliciante para o desenvolvimento comercial e industrial das suas aplicações, uma vez que nenhum método químico tem igual capacidade, nem há previsões para que a venha a ter (Xu, 2000).

As lipases podem ser de dois tipos, consoante a especificidade da enzima para a posição do éster primário. Podem (i) não apresentar especificidade em relação à posição dos ácidos gordos, atuando ao nível das três posições da molécula de acilglicerol (ii) ter seletividade *sn*-1,3 e hidrolisar, preferencialmente, as ligações éster nas posições externas dos TAG, deixando inalterada a posição interna *sn*-2.

Se for utilizada uma lipase não específica para catalisar a interesterificação, os triacilgliceróis produzidos serão semelhantes aos obtidos por interesterificação química, uma vez que a trocas acilo ocorrerão aleatoriamente. No entanto, se for usada uma lipase *sn*-1,3 específica como catalisador da reação, a migração de grupos acilo está confinada às posições *sn*-1 e *sn*-3, e assim é produzida uma mistura de TAG que seria impossível obter através da interesterificação química (Macrae, 1983). Este grupo de lipases, de que são exemplo a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (“Lipozyme RM IM”) e a lipase não comercial de *Rhizopus oryzae*, ganhou notoriedade nas últimas duas décadas, devido à grande variedade de produtos comercializáveis com aplicações nutricionais, medicinais e alimentares, passíveis de ser obtidos através de reações de catálise promovidas por estas enzimas (Torres *et al.*, 2002). Os sucedâneos de gordura de leite materno são um exemplo.

Por todas as razões supracitadas, a modificação enzimática de óleos e gorduras para a produção de SL com propriedades funcionais específicas, tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Pesquisas demonstraram que existe uma vasta variedade de lipases específicas

passíveis de serem utilizadas na produção de SL, devido à sua quimio, regio, e estéreo-seletividade.

Contudo, o uso de lipases não apresenta exclusivamente aspetos positivos pois, se assim fosse, já se encontrariam largamente usadas a nível industrial.

A principal limitação do uso de lipases prende-se com os custos operacionais elevados, mas a aplicação de lipases tem sido dissuadida devido a outras razões, como taxa de reação lenta, instabilidade, rápida perda da atividade catalítica, impossibilidade de regeneração, variação na qualidade dos produtos, dificuldade de remoção da enzima (quando livre) dos produtos e consequente contaminação dos produtos com resíduos de proteína.

À semelhança de qualquer processo enzimático, a utilização de lipases está restringida a uma estreita gama de temperaturas e de valores de pH (quando em meio aquoso). Além disso, a reação pode ser inibida por elevadas concentrações de substratos e/ou produtos e a enzima pode sofrer inativação por ação de metais pesados e de certos compostos como sejam produtos de oxidação dos lípidos, ácidos gordos livres, solventes, etc. (c.f. 2.3.2.2.4.).

Apesar destas limitações, devido aos avanços que se têm observado ao nível da catálise enzimática à escala laboratorial e aos processos já implementados à escala industrial, somos levados a acreditar que, num futuro próximo, os processos por catálise inorgânica sejam substituídos pela via enzimática, com claros benefícios do ponto de vista nutricional e ambiental (Ferreira-Dias, 2004).

2.3.2.2.2. Mecanismo de interesterificação enzimática

Quando se utiliza uma lipase *sn*-1,3 seletiva como catalisador, o mecanismo de interesterificação enzimática inicia-se com a reação entre um TAG e uma molécula de enzima, originando uma molécula de acilo-enzima e uma de *sn*-1,2(2,3)-diacilglicerol (Semériva *et al.*, 1976). Este DAG é o intermediário chave no esquema da reação.

A formação de um TAG modificado ocorre quando um complexo acilo-enzima sofre um ataque nucleófilo por uma molécula de DAG. De forma a obter o produto desejado, o DAG deve reagir com um complexo acilo-enzima que contenha o grupo acilo a incorporar no TAG (Chapus *et al.*, 1976).

O mecanismo de interesterificação (seja acidólise, alcoólise ou transesterificação), quando catalisado por lipases, envolve a combinação da hidrólise de ésteres no TAG seguida de re-esterificação (Xu, 2000). Assim, a otimização das reações de interesterificação resulta do balanço entre as taxas das reações de hidrólise e de esterificação.

O teor de água no sistema reacional é um fator crucial que determina a extensão da reação. Um teor de água elevado desloca o equilíbrio químico no sentido da hidrólise; um baixo teor em água desloca a reação no sentido da interesterificação. A concentração de água no meio reacional deve ser mantida no mínimo, no sentido de desencorajar a ocorrência da hidrólise parcial dos produtos e a formação de acilgliceróis, como os mono e diacilgliceróis. No entanto, o

teor de água no meio reacional deve ser suficientemente elevado para impedir a desativação da enzima (c.f. 2.3.2.2.4. Atividade da água).

Mesmo recorrendo a lipases *sn*-1,3 específicas, pode dar-se a migração de grupos acilo no processo global de produção de SL, com conseqüente formação de TAG indesejáveis, o que exerce um papel importante na deterioração da qualidade dos SL (Kim e Akoh, 2005). Em geral, a migração de grupos acilo ocorre em menor extensão em sistemas contínuos e livres de solvente (Moreno *et al.*, 2004; Kim e Akon, 2006; Lopez-Hernandez *et al.*, 2007). O tempo de reação deve ser o mais curto possível, uma vez que as migrações dos grupos acilo durante o processo reacional são proporcionais ao tempo de reação (Xu, 2003).

A produção de TAG modificados na sua composição em ácidos gordos tem sido habitualmente efetuada por acidólise, catalisada por lipases *sn*-1,3 específicas, tal como se realizou no presente trabalho.

A acidólise é uma reação em que os ácidos gordos livres são trocados pelos ácidos que se encontram no éster (figura 1).

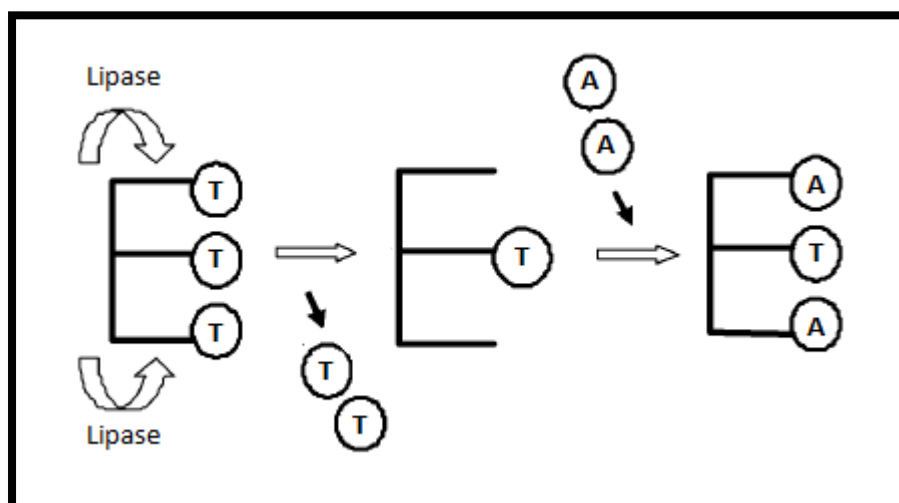


Figura 1 – Representação esquemática da reação de acidólise enzimática entre um TAG (TTT) e moléculas de um determinado ácido gordo livre (A) (adaptado de Da Silva *et al.*, 2009).

A acidólise enzimática é uma reação reversível e que compreende uma etapa de hidrólise, seguida de esterificação. Os novos ácidos gordos são incorporados nos triacilgliceróis do sistema, até que seja atingido o equilíbrio. A taxa de equilíbrio é função de vários parâmetros, como a temperatura de reação, a carga da enzima, teor de água e o sistema reacional. Na presença de inibidores da reação, o tempo para alcançar o equilíbrio poderá ser mais longo, o que é desfavorável pois favorece a migração de grupos acilo (Xu, 2003).

Ao contrário da acidólise química, que tem tido poucas aplicações devido à não especificidade posicional, a via enzimática tem mostrado particular importância para produção de vários produtos de valor acrescentado, dos quais são exemplo os sucedâneos de leite materno.

Também é especialmente importante quando se pretende incorporar um determinado ácido gordo ou um grupo de ácidos gordos específico, como é o caso do enriquecimento de óleos vegetais e óleos de peixe com quantidades elevadas de EPA e DHA, com o intuito de aumentar as suas propriedades funcionais (Huang e Akoh, 1994). Adachi *et al.*, (1993) usaram a lipase *sn*-1,3 específica de *Pseudomonas* sp. para enriquecer o óleo de sardinha em concentrações totais de EPA e DHA, de 29 para 44,5 % (m/m). Outro exemplo importante da utilização da interesterificação enzimática é a produção de SL do tipo MLM, de baixo valor calórico (Nunes *et al.*, 2012).

2.3.2.2.3. Imobilização de lipases

As reações que envolvem catalisadores numa fase sólida são bastante importantes no bioprocessamento. Algumas bactérias e fungos produzem naturalmente flocos, aglomerados ou *pellets* macroscópicos, enquanto outros microrganismos crescem como biofilmes nas paredes dos reatores ou formam lamas, como acontece nos processos de tratamento de resíduos. Muitas fermentações que ocorrem em alimentos tradicionais envolvem microrganismos ligados a partículas sólidas. Se as enzimas não formam aglomerados nem se ligam a superfície sólidas espontaneamente, podem ser induzidas a fazê-lo, utilizando técnicas de imobilização (Doran, 1995).

A imobilização de lipases apresenta muitas vantagens em bioprocessos de larga escala, revelando-se uma solução viável para ultrapassar a maioria das desvantagens das lipases enumeradas em 2.3.2.2.1.

Em poucas palavras, a imobilização consiste na fixação de enzimas a um suporte. Assim sendo, a manipulação é facilitada, bem como a separação da enzima dos produtos, permitindo uma recuperação mais simples (através de filtração) e eficaz comparativamente à da enzima livre, diminuindo a possibilidade de contaminação dos produtos com enzima residual. A imobilização permite ainda a reutilização das lipases em ensaios sucessivos e a sua utilização em reatores contínuos, o que contribui para a redução dos custos do biocatalisador e do tratamento de efluentes, aumentando a viabilidade económica dos processos enzimáticos (Knežević *et al.*, 2004). Isto é bastante vantajoso, visto que o preço de mercado das lipases é ainda muito elevado, quando comparado com o dos catalisadores inorgânicos.

A imobilização diminui a interferência de inibidores e aumenta frequentemente o tempo de meia vida e a estabilidade operacional das enzimas em faixas amplas de temperatura e pH, o que facilita a intensificação do processo (Knežević *et al.*, 2004).

Além disso, os bioprocessos podem ser mais facilmente controlados, nomeadamente no que toca ao tempo da reação e ao microambiente. Uma escolha criteriosa do suporte de imobilização vai permitir criar no microambiente as condições adequadas à reação e à enzima, nomeadamente (i) concentrações de substratos elevadas, mas não inibitórias, (ii) concentração

de produto baixa, (iii) atividade de água reduzida, de modo a favorecer reações de síntese e (iv) proteção contra os efeitos de toxicidade do solvente orgânico. (Ferreira-Dias, 2004).

No entanto, alcançar um sistema de lipase imobilizada eficiente não é uma tarefa fácil, pois não existe um método geral de imobilização nem um suporte universal. Os critérios de seleção do suporte e da técnica de imobilização são, em grande parte dependentes do tipo de lipase e das suas características, do tipo de sistema de reação (meio aquoso, solvente orgânico ou sistema de duas fases), das condições do processo (como pH, temperatura e pressão), do objetivo de imobilização e do tipo de bioreator a usar (reator descontínuo de mistura completa, reator contínuo do tipo tanque agitado, reator com membrana, coluna, reator tubular, etc.) (Knežević *et al.*, 2004).

Existem inúmeros suportes, bastante diferentes no que diz respeito a características como área superficial, porosidade, tamanho das partículas, compressibilidade, resistência ao atrito e custo. Alguns exemplos são: carvão ativado, polietileno ativado, alginato de cálcio, celulose, sílica, resinas sintéticas, entre muitos outros. Obviamente todos os suportes têm que ser inertes e adequados para uso alimentar.

Quantos às técnicas de imobilização, estas encontram-se englobadas em duas categorias: imobilização por ligação a suportes sólidos (por adsorção, ligação covalente ou ligação iónica) ou imobilização por inclusão (ou confinamento) em matrizes, cápsulas ou microcápsulas. A possibilidade de combinação de duas ou mais técnicas é também possível (Knežević *et al.*, 2004). Os materiais e metodologias utilizados na imobilização devem ser adequados para a produção de enzimas imobilizadas com qualidade alimentar. Além disso, o processo de imobilização escolhido deve ser reproduzível, economicamente viável e não deve necessitar de muitos recursos para a sua execução (Christensen *et al.*, 2003).

Apesar da imobilização puder aumentar a estabilidade operacional da enzima, a atividade residual da enzima imobilizada é, em regra, mais fraca que a da respetiva enzima nativa, devido a perdas de atividade causadas durante o procedimento de imobilização e ainda por efeitos de transferência de massa. Por outras palavras, de toda a enzima que é posta em contacto com o suporte, nem toda fica imobilizada e, da enzima que se liga ao suporte, parte pode sofrer mudanças na sua conformação, o que poderá alterar a sua eficiência catalítica. Devido à aleatoriedade da interação enzima-substrato, a região do centro ativo pode apresentar-se numa posição menos acessível ao substrato, após imobilização (impedimento estérico). Uma vez que em termos de economia de processo, tanto a estabilidade operacional como a atividade dos biocatalisadores são importantes, o aumento da primeira devido à imobilização da enzima pode compensar a referida perda de atividade, resultando num benefício global.

Como as lipases atuam ao nível das interfases, a imobilização em suportes sólidos pode ser vantajosa, na medida em que aumenta a área interfacial de contacto enzima-substrato.

No entanto, durante a imobilização pode existir a possibilidade de inativação da lipase e o risco de se atingirem concentrações inibitórias de substratos e/ou produtos no microambiente.

Tem-se testado a imobilização de diferentes lipases com resultados animadores em termos de estabilidade operacional e de retenção de atividade. São exemplos as lipases de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*.

2.3.2.2.4. Parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade enzimáticas

Como foi referido em 2.3.2.2.1., os biocatalisadores apresentam bastantes vantagens comparativamente aos catalisadores químicos convencionais. No entanto, o elevado custo das lipases comerciais, sejam imobilizadas ou não imobilizadas, juntamente com a sua baixa estabilidade operacional, apresentam-se como as maiores limitações para o seu uso na indústria alimentar, devendo ser ultrapassadas para que a catálise enzimática se torne mais competitiva.

Entende-se por estabilidade enzimática a capacidade das enzimas de manter a sua capacidade ou atividade catalítica, sob diferentes condições da reação ao longo do tempo. Por sua vez, a atividade enzimática é dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas (Campos, 1998).

A perda de atividade é um processo gradual e natural que afeta todas as enzimas e, portanto, as lipases não são exceção. A velocidade de perda de atividade de uma enzima é determinada pelo tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que é definido como o tempo necessário para que a atividade da enzima seja reduzida a metade do seu valor original (Rosevear *et al.*, 1987).

Para desempenhar a sua função biológica, as enzimas (tal como a generalidade das proteínas) devem estar nos seus estados nativos, com as suas estruturas primária, secundária, terciária ou, se for o caso, quaternária, íntegras. Na presença de alguns fatores, pode haver destruição dessa integridade, provocando o fenómeno conhecido como desnaturação proteica, o que ocasiona por sua vez a perda de atividade, de forma reversível ou irreversível.

Existem vários fatores que influenciam a atividade e a estabilidade das enzimas, e neste caso em particular das lipases, como: a temperatura, o pH (quando em meio aquoso), a atividade da água, a agitação, a pressão, a composição do meio reacional (concentração do substrato, razão molar entre substratos, etc.) e a concentração de enzima, assim como a presença de solventes orgânicos, de cofatores, de agentes oxidantes e de compostos inibidores da atividade enzimática (como produtos de oxidação lipídica, ácidos gordos livres, pigmentos e iões metálicos) (Wisdom *et al.*, 1987; Linfield, 1988; Posorske *et al.*, 1988; Wang e Gordon, 1991, Correia e Ferreira-Dias, 1998).

Segue-se uma breve explicação relativa à influência de alguns dos principais fatores que influenciam a atividade e estabilidade operacional das lipases: temperatura, atividade da água, produtos de oxidação dos lípidos e ácidos gordos livres.

Temperatura

A temperatura é considerada o fator com maior importância na atividade catalítica das enzimas. É um parâmetro que se deve ter em consideração sempre que se pretende aumentar a velocidade de uma reação enzimática pois, na grande maioria dos casos, existe uma relação de proporcionalidade direta entre a velocidade das reações e a temperatura a que estas decorrem, até certo valor de temperatura.

Ao longo do acréscimo de temperatura, observa-se um efeito conjugado do aumento da velocidade da reação e da aceleração da taxa de desnaturação da enzima (ou do decréscimo da estabilidade proteica) (Malcata *et al.*, 1990). A atividade da enzima para uma vasta gama de temperaturas é, então, determinada pela conjugação destes dois efeitos simultâneos mas contraditórios.

Quando a temperatura atinge a temperatura ótima da enzima, a velocidade da reação é máxima. A temperatura ótima é uma característica própria de cada enzima e situa-se geralmente próximo da temperatura normal das células do organismo onde a enzima atua. Por exemplo, no Homem, as enzimas têm, em geral, uma temperatura de atuação entre os 35° C e os 40° C.

Para valores de temperatura superiores à ótima, a velocidade da reação decresce (Campos, 1998). Um aumento de temperatura para valores extremos pode levar à perda de atividade por inativação reversível ou mesmo irreversível, devido à ocorrência de desnaturação completa e irreversível das lipases, isto é, a perda da conformação original cataliticamente competente (Martinek *et al.*, 1981; Ahern e Klibanov, 1985).

O mecanismo físico que explica a inativação enzimática pelo aumento da temperatura baseia-se num aumento da energia dos átomos, o que faz com que estes tenham maior tendência para se moverem. Se a energia for suficiente para quebrar as fracas ligações que mantêm a estrutura proteica, dá-se a desnaturação da enzima (Bailey e Ollis, 1986). Por outro lado, as enzimas, quando sujeitas a baixas temperaturas, ficam também inativas, devido à falta de energia de ativação para provocar o choque entre as moléculas da enzima e as do substrato.

Não é fácil determinar a temperatura à qual uma dada enzima vai sofrer desnaturação mas, para a maioria das enzimas, a termodesnaturação inicia-se a 40-50° C, acentuando-se a 55° C (Bailey e Ollis, 1986). No entanto, existem enzimas termorresistentes que apresentam elevada estabilidade térmica e só desnaturam a temperaturas mais elevadas, como as preparações comerciais das lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme RM IM") e de *Candida Antarctica* ("Novozym 435"), o que as torna adequadas para a modificação de gorduras na ausência de solventes orgânicos (Osório *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2013).

Turner *et al.* (1995) demonstrou que a temperatura à qual uma proteína desnatura é influenciada pela atividade da água (a_w): a temperatura de desnaturação é mais elevada para menores valores de a_w . Assim, enzimas que requerem baixa a_w para a sua atividade catalítica, permanecem ativas a temperaturas elevadas, sendo mais difícil de ocorrer o fenómeno de desnaturação.

A inativação térmica é um aspeto importante a ter em conta na utilização a longo prazo de lipases num bioreator, já que a viabilidade económica do processo industrial de interesterificação enzimática depende do período de vida útil do biocatalisador utilizado, que por sua vez está diretamente relacionado com a temperatura da reação e a termo-resistência da enzima (Bailey e Ollis, 1986). Desta forma, sugere-se que a temperatura de funcionamento de um reator contínuo onde decorra a reação de interesterificação seja aumentada a uma taxa que compense a diminuição da atividade enzimática, permitindo que o sistema mantenha uma atividade catalítica aproximadamente constante (Malcata *et al.*, 1990).

Atividade da água

A atividade da água (a_w) é uma medida da água disponível num sistema para atuar como solvente, permitindo reações químicas, enzimáticas e microbiológicas. Corresponde à relação entre a pressão de vapor de água desse sistema e a pressão de vapor de água pura no ar saturado à mesma temperatura (Parker e Birch, 1983).

As lipases são enzimas que apresentam uma cinética de ativação interfacial na interface lípido-água. Este fenómeno ocorre devido às características estruturais únicas desta classe de enzimas. O centro ativo das lipases é coberto e protegido por uma cadeia oligopeptídica helicoidal (“lid”) de natureza hidrofóbica. Quando esta encontra uma interface lípido-água, sofre uma alteração na conformação, abrindo-se e expondo o centro ativo, permitindo a catálise (Winkler *et al.*, 1990). O centro ativo fica acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface (Jarger e Reetz, 1998).

A água participa, direta ou indiretamente, no estabelecimento de forças intermoleculares (pontes de hidrogénio e forças de Van der Waals) cruciais para a manutenção da conformação nativa e cataliticamente ativa do biocatalisador, indispensável à sua atividade (Klibanov, 1986). Desta forma, a água é uma variável muito importante pois é capaz de determinar a velocidade da reação, o rendimento do produto final, a especificidade do biocatalisador, a estabilidade térmica e, possivelmente, a estabilidade operacional do biocatalisador (Yamane, 1988).

Assim, a remoção total da água de uma preparação enzimática desnatura drasticamente a conformação da enzima, desativando-a. Para manter a atividade dos biocatalisadores, é essencial a presença de água, mesmo que em quantidades vestigiais, até porque desempenha um papel fundamental no mecanismo de catálise (Zaks e Klibanov, 1985).

O valor de a_w de um sistema determina a hidratação da lipase e, conseqüentemente, a sua atividade catalítica e a posição do equilíbrio nas reações catalisadas por enzimas hidrolíticas, como é o caso das lipases, já que a reação de hidrólise compete com as reações de interesterificação e de esterificação. Se a água se encontrar em quantidades vestigiais adsorvida às partículas do biocatalisador (o que corresponde a um meio orgânico quase anidro, com a_w muito baixa), são favorecidas as reações de interesterificação e de esterificação; se a água estiver presente em maior quantidade, constituindo uma fase separada da fase orgânica (valores

de a_w elevados) é favorecida a reação de hidrólise (Yamane, 1988). Isto porque as lipases são enzimas capazes de catalisar tanto reações de síntese como de hidrólise.

A a_w influencia também o rendimento das reações de interesterificação em meio orgânico (Bloomer *et al.*, 1991; Valivety *et al.*, 1992), pois enquanto um valor elevado de a_w proporciona a obtenção de uma quantidade considerável de DAG, MAG e de AGL, mas um balanço final de TAG baixo (taxa de interesterificação baixa), um valor de a_w baixo proporciona um rendimento final de TAG elevado.

Tendo em conta que o mecanismo da interesterificação catalisada por lipases envolve o processo de hidrólise dos grupos éster nos TAG, seguido de re-esterificação (Soumanou *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003), é necessário que a água esteja presente pelo menos em quantidades vestigiais, adsorvida às partículas da lipase (sistema microaquoso) (Macrae, 1983). A otimização da reação resulta do balanço entre as reações de esterificação e a hidrolítica.

Quando se utiliza uma determinada lipase para catalisar uma reação de interesterificação, é necessário conhecer o valor de a_w necessário para se obter a atividade máxima, pois diferentes enzimas apresentam exigências diferentes em relação à a_w que necessitam para manter um nível apreciável de atividade catalítica. Nesse sentido, já foram realizados vários estudos onde se investigou a influência deste parâmetro na reação de interesterificação. Em geral, as lipases apresentam maior atividade na esterificação e na interesterificação dos lípidos em meios de a_w entre 0,2 e 0,5 ou mesmo em meios quase isentos de água (a_w de 0,064 a 0,11), dependendo do biocatalisador utilizado e das condições da reação (Bloomer *et al.*, 1992; Parvaresh *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 1992; Ferreira-Dias e da Fonseca, 1995; Osório *et al.*, 2001; Adlercreutz *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Petersson *et al.*, 2007). Contudo, algumas lipases apresentaram o seu máximo de atividade na esterificação ou interesterificação a valores de a_w superiores a 0,5 e, em alguns casos, a valores de a_w próximos de 1, onde seria de esperar que ocorresse apenas a reação de hidrólise (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Petersson *et al.*, 2007; Pires-Cabral *et al.*, 2007).

A estabilidade enzimática aumenta notoriamente em meios com baixa a_w e, por sua vez, decréscimos de a_w fazem aumentar a temperatura de desnaturação. Assim, é possível a ocorrência de biotransformações a temperaturas mais elevadas que as usadas nas soluções aquosas convencionais (Adlercreutz *et al.*, 2002). Estas descobertas fizeram com que o leque de aplicações potenciais das lipases se expandisse, tornando-as muito promissoras. No entanto, ainda existe uma grande lacuna relativamente ao conhecimento do comportamento enzimático em meio não aquoso.

Produtos de oxidação dos lípidos

Os lípidos, durante o seu acondicionamento e manuseamento à temperatura ambiente, estão sujeitos a reações de oxidação, induzidas pela presença de oxigénio. No entanto, algumas

gorduras são mais suscetíveis à oxidação que outras, consoante (i) o grau de insaturação (quanto mais insaturada for, maior a sua suscetibilidade à oxidação), (ii) a presença de antioxidantes, (iii) a presença de pró-oxidantes, como os metais (ferro e cobre, por exemplo) e (iv) outros fatores, como a exposição à luz, que favorece a fotoxidação.

A auto-oxidação trata-se de um processo espontâneo e inevitável. O oxigénio reage maioritariamente com os ácidos gordos insaturados, ao nível das suas duplas ligações, que funcionam como o centro ativo pelo qual se inicia a reação de oxidação. Como resultado, há formação de hidroperóxidos (produtos de oxidação primária) que, do ponto de vista da deterioração do cheiro e sabor do alimento, não são importantes.

Com o decurso da reação, os hidroperóxidos podem dar origem a produtos de oxidação secundária, produtos oriundos da sua decomposição, como aldeídos, cetonas (α -dicetonas ou cetonas α insaturadas), álcoois, hidrocarbonetos e ácidos gordos de cadeia curta. Estes compostos já são responsáveis pelo desenvolvimento de “*off-flavours*”, designadamente o cheiro a ranço, o que tem uma implicação direta no valor comercial do produto, por ser uma importante causa de depreciação ou rejeição para o consumidor ou para o transformador industrial (Frankel, 1995).

Alem disso, a atividade e a estabilidade das lipases diminuem na presença de produtos de oxidação, nomeadamente dos hidroperóxidos, que provocam a polimerização das lipases (Correia e Ferreira-Dias, 1998).

Assim, a utilização de gorduras polinsaturadas, em que as longas cadeias de ácidos gordos polinsaturados são muito suscetíveis à oxidação, pode levar a uma diminuição da atividade e da estabilidade operacional das lipases quando utilizadas em reatores contínuos (Osório *et al.*, 2006). O principal desafio na incorporação de TAG enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados em produtos alimentares é manter a sua estabilidade oxidativa, de modo que as características sensoriais sejam aceitáveis, sem desenvolvimento de *off-flavour* durante a produção ou armazenamento (Ferreira-Dias, 2009).

Para evitar ou retardar a oxidação dos lípidos, recorre-se usualmente à remoção do oxigénio, à utilização de um gás inerte no espaço de cabeça dos depósitos, à adição de antioxidantes ou ao uso combinado de alguns destes métodos. Também se devem controlar as temperaturas de processamento e de armazenamento, pois temperaturas elevadas favorecem todo o conjunto de reações referido, o que faz com que a termoxidação, ou oxidação a temperatura elevada, se processe mais rapidamente que a auto-oxidação.

Ácidos gordos livres

Tal como os produtos de oxidação lipídica, também os ácidos gordos livres funcionam como inibidores da atividade enzimática.

Como foi referido anteriormente, os AGL podem ser formados durante a oxidação dos lípidos como compostos secundários. No entanto, a sua principal proveniência é a hidrólise

(enzimática ou química) de óleos e gorduras, que conduz ao aparecimento não só de AGL como também de glicerol e de glicéridos parciais (MAGs e DAGs), em quantidades variáveis consoante a hidrólise seja parcial ou completa.

A formação de AGL leva imediatamente a uma alteração das características organolépticas do produto. Uma vez libertado um ácido gordo, a reação de hidrólise prossegue, se subsistir água no meio, até que se libertem os três ácidos gordos do glicerol, o que vai originar uma diminuição do pH do meio.

Cada enzima possui um valor de pH ótimo ou uma faixa de pH ótimo de atividade, onde a sua atividade é máxima; para a maioria das enzimas localiza-se entre 4,5 e 8,0. Mudanças extremas de pH podem alterar o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos da enzima que são essenciais à catálise, alterando-se a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas, o que se traduz geralmente na perda completa da atividade para a maioria das enzimas (Campos, 1998).

O efeito inibitório resultante do uso de elevadas concentrações de ácidos gordos livres como substrato nas reações de acidólise é uma das razões que tem limitado a aplicação prática das lipases nalguns sistemas (Dünhaupt *et al.*, 1992). No entanto, o pH apenas tem significado na fase aquosa de sistemas bifásicos aquoso-orgânico ou na fase aquosa que banha a lipase imobilizada (microambiente), alterando a atividade e a estabilidade enzimáticas. Fora estas situações, existem estudos que demonstram que os teores de ácidos gordos livres existentes nos meios reacionais sujeitos a interesterificação parecem não ter qualquer efeito negativo na estabilidade da enzima (Holm e Cowan, 2008).

2.3.2.2.5. A biocatálise aplicada à síntese de sucedâneos de gordura de leite materno

Conhecendo as propriedades nutricionais e anti-infecciosas da gordura do leite materno, percebe-se facilmente que este é o alimento ideal para os primeiros meses de vida de uma criança. Por este motivo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a UNICEF recomendam o aleitamento materno em exclusivo nos primeiros seis meses de vida e têm promovido campanhas no sentido de sensibilizar a opinião pública para a importância da amamentação. Todavia, algumas crianças não são amamentadas, seja por opção ou por impossibilidade por parte da mãe, por fatores de índole cultural, socioeconómica e/ou de saúde, como baixa produção de leite, estado nutricional ou condição de saúde desfavorável e morte durante ou após o parto.

Assim, a necessidade de encontrar uma alternativa para a alimentação destas crianças deu origem às formulações de leite para lactentes, com o intuito de suprir as necessidades nutricionais humanas dos primeiros meses de vida (Forsyth, 1998). A fração lipídica presente nestas formulações deve-se assemelhar o mais possível, em composição e em estrutura, à gordura existente no leite materno (*c.f.* 2.2.1.), de modo a evitar deficiências a nível nutricional, funcional, imunológico, neurológico, cognitivo e psicomotor no recém-nascido não amamentado.

A maioria das fórmulas infantis disponíveis no mercado é obtida a partir de óleos vegetais ou de leite de ruminantes, cuja estrutura dos TAG difere da estrutura dos TAG presentes na HMF (c.f. 2.2.2.). Por essa razão, apesar destes suplementos apresentarem teores em ácido palmítico muito similares aos encontrados no leite materno, a sua distribuição estereoespecífica na posição *sn-2* dos TAG é consideravelmente baixa. Esta tem sido reportada como a principal razão para a ineficiente absorção da gordura do leite.

Assim, é necessário criar fórmulas de leite infantil passíveis de serem comercializadas e que possibilitem ultrapassar os condicionalismos expostos.

Como as gorduras disponíveis na natureza não possuem estrutura semelhante à desejada, a alternativa passa pela utilização de gorduras modificadas ou lípidos estruturados. De facto, a HMF pode ser sintetizada artificialmente para a produção de fórmulas infantis com manutenção de suas propriedades físicas, químicas e nutritivas (Da Silva *et al.*, 2009).

Atualmente, já existem no mercado HMFS produzidos por catálise enzimática. Estas gorduras produzidas em laboratório são exemplos de lípidos estruturados. Um exemplo é o Betapol®, produzido pela Lipid Nutrition, Wormerveer, na Holanda, uma filial da IOI Corporation Berhad, na Malásia (<http://www.lipidnutrition.com>).

O Betapol® é composto por triacilgliceróis fundamentalmente do tipo OPO (1,3-di-oleoil 2-palmitoilglicerol) com o ácido oleico nas posições externas (*sn-1* e *sn-3*) e o ácido palmítico na posição interna do TAG. É obtido por acidólise da tripalmitina ou de gorduras vegetais ricas em ácido palmítico na posição *sn-2* com misturas de AG ricas em ácido oleico, como os óleos de girassol e de soja (Quinlan, 1993), catalisada por uma lipase *sn-1,3* específica, geralmente a lipase de *Rhizomucor miehei*. Depois de decorrida a reação, os AGL que se encontram em excesso são removidos por destilação e a tripalmitina residual é separada por cristalização (<http://www.lipidnutrition.com>).

Mais recentemente, surgiu o InFat®, produzido de forma muito semelhante ao Betapol® mas fabricado pela Advanced Lipids, empresa que resultou da fusão entre a Enzymotec (Israel) e a AAK (Suécia). Tanto o Betapol® como o InFat® são produtos comerciais usados como HMFS em leites para bebés.

Mesmo tratando-se de uma gordura exclusivamente vegetal, o Betapol® possui 52 % de AG saturados, sendo rica nos ácidos láurico, palmítico, oleico e linoleico, enquanto a HMF apresenta elevados teores dos ácidos oleico, palmítico, linoleico, mirístico e esteárico e ainda vestígios de DHA e de outros ácidos gordos ómega-3 (c.f. 2.2.1.).

Têm sido efetuados vários estudos recorrendo a lipases imobilizadas como catalisadores, no sentido de produzir HMFS mais completos nutricionalmente e mais análogos à HMF do que o Betapol®.

Os HMFS podem ser obtidos pela reação de acidólise entre a tripalmitina ou banha (rica em ácido palmítico) e AGL de diferentes origens. Já foram obtidos HMFS contendo os ácidos palmítico, oleico, esteárico e linoleico (Sahín *et al.*, 2005a), PUFA de cadeia longa e ácidos

gordos essenciais (Mukherjee e Kiewitt, 1998; Nielsen *et al.*, 2006), como o ácido gama-linolênico (Sahín *et al.*, 2005b) e ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (Sahín *et al.*, 2006).

Christensen e Holmer (1993) conduziram a produção de lipídios estruturados a partir da gordura do leite de bovino, utilizando a enzima *sn*-1,3 específica de *Rhizomucor miehei*. Obtiveram uma gordura um pouco diferente da gordura do leite humano em termos da sua composição em ácidos gordos, mas com semelhante distribuição estereoespecífica na cadeia dos TAG, contendo a maior parte do ácido palmítico esterificado na posição *sn*-2.

Mukherjee e Kiewitt (1998) relataram a interesterificação enzimática entre a tripalmitina e o óleo de canola, catalisada pela lipase comercial “Lipozyme RM IM” e a lipase extraída da *Carica papaya*. Em ambas as situações obtiveram-se TAG com o ácido palmítico predominantemente esterificado na posição *sn*-2, enquanto os ácidos polinsaturados provenientes do óleo de canola foram esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-3, tal como se encontra na HMF.

No Japão, Akimoto *et al.* (1999) patentearam um método enzimático para produção de um HMFS rico em ácidos gordos polinsaturados.

Shimada *et al.* (2000) conduziram a acidólise da tripalmitina com ARA usando a lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizopus delemar*. O produto obtido, 1,3-araquidonoil-2-palmitoil-glicerol, apresentava cerca de 60 % do ARA esterificado nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e cerca de 30 % do ácido palmítico esterificado na posição *sn*-2. Demonstrou ter características favoráveis na utilização como HMFS, dada a riqueza em ARA.

Estes são apenas alguns exemplos de estudos no âmbito da produção de HMFS. Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo diversos processos e substratos, o objetivo de desenvolver lipídios estruturados semelhantes à gordura do leite humano ainda está distante de ser totalmente alcançado. Por exemplo, as formulações atuais não apresentam as quantidades necessárias de DHA e EPA, principais ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (Gamboa e Gioielli, 2006) que não podem ser sintetizados *in vivo*. Assim, o desafio atual consiste em incorporar EPA e DHA, provenientes de óleos marinhos por exemplo, nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triacilgliceróis por acidólise. Estes ácidos são muito importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso e estimulação do sistema imunológico. Além disso, devem ser conduzidas mais pesquisas para avaliar o desempenho dos SL produzidos nos recém-nascidos.

Os trabalhos de investigação publicados sobre a síntese de HMFS descrevem a utilização de sistemas reacionais, em presença ou ausência de solvente orgânico, cuja composição obedece, na sua maioria, a um padrão característico: todos referem (i) uma fonte de ácido palmítico, (ii) lipases imobilizadas com seletividade *sn*-1,3 como biocatalisador e (iii) uma fonte de AG, estejam livres ou esterificados ao esqueleto de glicerol.

Fontes de ácido palmítico

A seleção da fonte de ácido palmítico deve ser criteriosa, de forma a assegurar a localização maioritária deste ácido na posição interna do TAG. Na produção de HMFS, podem utilizar-se gorduras naturais ricas em ácido palmítico na posição *sn*-2 (como a banha, a estearina de palma e a gordura de leite) ou a tripalmitina (Tecalão, 2011).

A banha é uma gordura de baixo valor comercial e, apesar da possível variabilidade em termos de composição em AG, possui uma estrutura em TAG muito semelhante à do leite humano. Todavia, apresenta um menor teor em AG polinsaturados de cadeia longa (como os ácidos linoleico e linolénico) e questões de ordem ética, religiosa e cultural podem constituir um entrave à sua utilização na produção de HMFS. A gordura de leite de bovino assemelha-se à HMF no que respeita à composição em AG mas difere quando à sua localização nos TAG (c.f. 2.2.2.). Além disso, os HMFS obtidos a partir da gordura de leite de bovino parecem não apresentar ARA e DHA na sua composição (Mu, 2010). A estearina de palma, obtida por fracionamento do óleo de palma, possui um conteúdo em ácido palmítico superior ao do leite humano e tem sido utilizada como substrato na síntese de HMFS.

Nos estudos laboratoriais, tal como neste, utiliza-se frequentemente tripalmitina que tem o inconveniente do seu elevado custo.

Fontes de ácidos gordos

Muitas são as fontes possíveis de ser utilizadas como fontes de ácidos gordos para a síntese de HMFS. Em reações de acidólise, é necessário fazer reagir AGL com a fonte de ácido palmítico. Como fonte de AGL, pode-se recorrer a concentrados de ácidos gordos comerciais ou usar os ácidos gordos obtidos através da saponificação de óleos vegetais (como os óleos de soja, girassol, canola, grainha de uva, camelina, avelã). Em reações de troca de ésteres, o que reage com a fonte de ácido palmítico são AG esterificados ao esqueleto de glicerol, provenientes de várias gorduras naturais.

Biocatalisadores

As enzimas frequentemente utilizadas como biocatalisadores em reações de síntese de HMFS são lipases que provêm, essencialmente, de fontes microbianas e possuem regioseletividade *sn*-1,3. Estas demonstram ser bastante interessantes no desenvolvimento de HMFS pois permitem manter os ácidos gordos insaturados na posição interna dos TAG dos óleos vegetais, situação desejável do ponto de vista nutricional.

A maioria dos estudos publicados recorre à utilização das lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme RM IM"), de *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme TL IM") e de *Candida antarctica* ("Novozym 435"), comercializadas pela Novozymes, Dinamarca, a preços elevados.

Uma vez que o elevado custo das lipases se apresenta como o principal entrave à síntese de HMFS por biocatálise, muitos estudos têm sido feitos recorrendo a lipases não comerciais, como a lipase heteróloga do fungo de *Rhizopus oryzae* (Nunes *et al.*, 2012; Tecelão *et al.*, 2012a; Simões *et al.*, 2013) ou a lipase de *Carica papaya* auto-imobilizada no látex, extraída de resíduos agrícolas das plantações de papaia (Mukherjee e Kiewitt, 1998; Tecelão *et al.*, 2012b), de modo a averiguar as suas potencialidades como biocatalisadores para a síntese de HMFS.

A utilização de solvente orgânico não é recomendada porque (i) se trata da obtenção de um produto para alimentação infantil, (ii) encarece o processo e (iii) dificulta a recuperação do produto, para além de (iv) constituir uma fonte de poluição ambiental.

Em resumo, os sucedâneos de leite materno podem ser obtidos por (i) acidólise entre TAG ricos em ácido palmítico na posição *sn*-2 e AGL ou (ii) por interesterificação entre TAG, geralmente, de gorduras naturais.

No presente trabalho, fez-se reagir a tripalmitina com AG polinsaturados ómega-3 de cadeia longa (obtidos por saponificação do óleo de camelina), através de uma reação de acidólise enzimática, para a produção de sucedâneos de gordura de leite materno enriquecidos em ómega-3 PUFA, como mostra a figura 2. Como biocatalisador testou-se a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* imobilizada em dois suportes diferentes, com o objetivo de compará-la com uma lipase comercial.

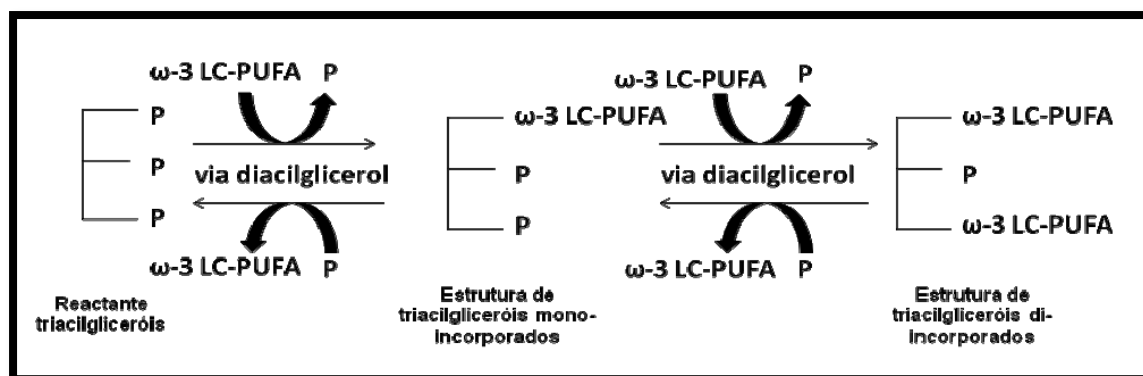


Figura 2 – Representação esquemática da reação de acidólise enzimática entre os AG polinsaturados ómega-3 de cadeia longa obtidos do óleo de camelina (ω -3 LC-PUFA) e a tripalmitina (PPP; P – ácido palmítico), utilizando uma lipase *sn*-1,3 específica (adaptado de Xu *et al.*, 2000).

Durante o tempo de permanência no reator, a reação referida vai prosseguindo da seguinte forma (figura 2):

Numa primeira fase, os ácidos gordos ómega-3 são incorporados na posição *sn*-1 do TAG tripalmitina, substituindo o ácido palmítico que aí se encontrava. Desta substituição resulta um TAG mono-incorporado, pela via diacilglicerol. Pela mesma via, outros ácidos gordos ómega-3 vão substituir o ácido palmítico da posição *sn*-3 do TAG tripalmitina. O resultado é um TAG di-

incorporado, com os ácidos gordos provenientes do óleo de camelina a ocuparem as posições *sn*-1,3, mantendo-se o ácido palmítico inalterado na posição *sn*-2 do TAG, situação favorável do ponto de vista nutricional (*c.f.* 2.2.2.). A reação pode ocorrer no sentido inverso, pela mesma via diacilglicerol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Biocatalisadores

Utilizou-se como biocatalisador a preparação comercial da lipase *sn*-1,3 seletiva de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RM IM"), uma lipase termoestável, imobilizada em resina de troca iônica, sintética e macroporosa. Esta lipase foi gentilmente cedida por Novozymes™, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca.

Recorreu-se também a uma lipase não comercial, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, produzida por sobre-expressão do gene correspondente numa estirpe mutante de *Pichia pastoris*, pelo grupo do Professor Francisco Valero da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha, conforme o procedimento descrito por Arnau *et al.* (2010). Esta enzima (rROL) foi posteriormente imobilizada em dois suportes hidrofóbicos distintos: Lewatit® VP OC 1600 (proveniente de Lanxess, Leverkusen, Germany) e ReliZyme™ OD403/S (proveniente de Resindion S.r.l., Binasco, Italy). Os procedimentos de ambas as imobilizações serão descritos nos tópicos 3.2.2. e 3.2.3.

3.1.2. Suportes

3.1.2.1. Lewatit® VP OC 1600

O suporte Lewatit® VP OC 1600 é um polímero reticulado, macroporoso e hidrofóbico, formado por ésteres metacrílicos, que se apresenta na forma de pequenos grânulos esféricos de cor branca e opaca. O quadro 2 apresenta as principais propriedades físicas e químicas deste suporte.

Quadro 2 – Principais propriedades físicas e químicas de Lewatit VP OC 1600
Fonte: Lanxess, informação do fabricante.

Grupo funcional	nenhum
Densidade	1,06 g/ml
Retenção de água (+/- 5%)	55-65 % wt.
Dimensão dos grânulos (> 80%)	0,315 – 1 mm
Área superficial	130 m ² /g
Volume dos poros	0,5 cm ³ /g
Diâmetro médio dos poros	15 nm

Lewatit VP OC 1600 permanece estável a pH compreendido entre 5 e 9 e numa gama de temperaturas entre -20° C e 100° C. Este polímero pode permanecer armazenado durante um período máximo de 2 anos, a temperaturas que podem variar entre -20° C e 40°C. É um produto seguro mas, em contacto com agentes oxidantes fortes (como o ácido nítrico), pode originar reações violentas.

Relativamente ao seu campo de aplicações, destaca-se o uso como suporte para a imobilização de enzimas, especialmente de lipases.

3.1.2.2. Relizyme™ OD403/S

Tal como o suporte anterior, também Relizyme é composto por uma matriz rígida polimérica de natureza metacrílica e hidrofóbica, apresentando-se igualmente na forma de perfeitos grânulos esféricos de cor branca e opaca. As principais propriedades físicas e químicas deste suporte encontram-se no quadro 3.

Quadro 3 – Principais propriedades físicas e químicas de Relizyme OD403/S
Fonte: Resindion S.r.l, informação do fabricante.

Grupo funcional	Octadecilo
Densidade	> 1,1 g/ml
Retenção de água (+/- 5%)	65 – 75 %
Dimensão dos grânulos	0,1 – 0,3 mm
Área superficial	n.d.
Volume dos poros	n.d.
Diâmetro médio dos poros	40-60 nm

n.d. – não disponível

Este suporte tem uma elevada estabilidade física e química e baixa tendência para fenómenos de expansão quando imerso em soluções de elevada molaridade e nos solventes comuns. Apresenta ainda excelente resistência mecano-osmótica devido à reticulação intensa e excelentes características de filtração graças à forma esférica e ao tamanho reduzido. Relizyme OD403/S permanece estável em toda a gama de pH e a temperaturas entre 2 e 60° C. Este polímero pode permanecer armazenado durante um período máximo de 6 meses, a temperatura compreendida entre 4 e 6° C.

3.1.3. Substratos

Como substratos para o presente trabalho foram utilizados: tripalmitina, da TCI Europe N.V., Bélgica, e óleo de camelina, produzido pela Ölmühle Fandler GmbH, Styria, Áustria.

A tripalmitina, $C_{51}H_{98}O_6$, apresenta-se no estado sólido, sob a forma de um pó branco, cujo ponto de fusão à pressão atmosférica ronda os 66° C. A sua massa molar é de 807,35 g mol⁻¹. A tripalmitina usada apresentava um grau de pureza em ácido palmítico superior a 85 %.

Quanto ao óleo de camelina, este é extraído das sementes oleaginosas da *Camelina sativa* L. Crantz, uma planta da família Brassicaceae, nativa do norte da Europa e da Ásia Central. Atualmente pode ser encontrada, selvagem ou cultivada como planta oleaginosa, principalmente na Europa, Ásia e América do Norte.

A composição em ácidos gordos do óleo de camelina usado neste trabalho foi avaliada por cromatografia gasosa capilar, segundo a metodologia descrita em 3.2.5. (análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar), e encontra-se no quadro 4.

Quadro 4 – Composição em ácidos gordos (%) do óleo de camelina utilizado.

	Ácido gordo	Percentagem presente no óleo de camelina	
Saturados	C14:0	0,07	9,85
	C15:0	0,02	
	C16:0	6,3	
	C17:0	0,5	
	C18:0	2,5	
	C20:0	0,03	
	C22:0	0,3	
	C24:0	0,13	
Monoinsaturados	C16:1	0,14	33,57
	C17:1	0,03	
	C18:1	18,1	
	C20:1	15,3	
Polinsaturados	C18:2	19,4	56,5
	C18:3	35,5	
	C20:2	1,6	

Para além de ser maioritariamente constituído por ácidos gordos insaturados (aproximadamente 90 %), o óleo de camelina apresenta também uma quantidade importante de vitamina E, com um teor de cerca de 110 mg/100 g, tendo simultaneamente baixos valores de ácido erúcico (1-3 %). Assim, é um óleo apropriado para consumo humano, podendo ser usado como óleo de cozinha para diversos fins.

Para além dos seus aparentes efeitos benéficos na saúde humana, é um óleo estável e resistente à oxidação, dada a elevada quantidade de antioxidantes que possui.

Pode ser igualmente usado para outros fins, nomeadamente para a alimentação animal e para a produção de biodiesel, bio lubrificante, combustível de aviões, etc.

3.1.4. Reagentes e outros materiais

Os principais reagentes e materiais de laboratório usados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- ✓ 2',7'- diclorofluoresceína, da Fluka;
- ✓ Acetona *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Ácido acético *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Ácido clorídrico 36-38 % (m/m), massa molar: 36,46 g mol⁻¹ e densidade: 1,19 kg/dm³, da Fisher Scientific;
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado, da Riedel-de-Haën;
- ✓ Clorofórmio *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Etanol 96 % (v/v), da Panreac Química S.L.U.;
- ✓ Éter de petróleo *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Éter etílico *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Hidróxido de potássio em "pellets" (97%), da Chem-Lab NV;
- ✓ Metanol Anidro *p.a.*, da J.T. Baker;
- ✓ *n*-Hexano 95 % (v/v), da Fisher Scientific;
- ✓ Sulfato de sódio anidro, da Panreac Química S.L.U.;
- ✓ Glutaraldeído 25 % p/p, da Merck.
- ✓ Miristato de metilo (> 99 %), da Fluka;
- ✓ Di-hidrogenofosfato de sódio *p.a.*, da Panreac Química S.L.U.;
- ✓ Hidrogenofosfato dissódico 12aq *p.a.*, da Chem-Lab NV;
- ✓ Piridina *p.a.*, da Panreac Química S.L.U.;
- ✓ *n*-Heptano *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Tetra-hidrofurano *p.a.*, da Sigma-Aldrich;
- ✓ Mononadecanoína (99 %), da Larodan AB;
- ✓ N-metil-N-trimetil-silil-trifluoracetamida - MSTFA (> 90 %), da TCI Europe N.V.;
- ✓ Papel de filtro para análises qualitativas, Ø125 mm, Cat No 1001 125, da WhatmanTM;

- ✓ Placas de sílica-gel 60 para a cromatografia de camada fina (TLC), de dimensões 20x20 cm e 0,25 mm de espessura, da Merck;

Os restantes reagentes utilizados foram de grau de pureza *pro analysis* e provenientes de diferentes fornecedores.

3.1.5. Equipamentos

Os principais equipamentos e utensílios usados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- ✓ Balança de precisão (máximo 183 g), modelo 870 da Kern;
- ✓ Cromatógrafo Gasoso Capilar, Finnigan TRACE GC Ultra, equipado com injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation, munido de uma coluna Trace TR-FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme e de um detetor de ionização de chama;
- ✓ Cromatógrafo Gasoso Capilar, Agilent Technologies 7820A, equipado com injetor on-column da Agilent Technologies, munido de uma coluna DB5-HT com 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de filme e de um detetor de ionização de chama;
- ✓ Estufa de secagem, RT 360, T_{máx}=220 °C, da Heraeus;
- ✓ Excicador, da Duran.
- ✓ Evaporador Rotativo de Vácuo, Rotavapor R-200, da Büchi;
- ✓ Lâmpada visível nos UV (254 nm), da CAMAG;
- ✓ Placas de agitação magnética, das marcas Variomag Compact e Velp Scientifica;
- ✓ Placa de agitação magnética com aquecimento, da Velp Scientifica;
- ✓ Reatores de vidro de parede dupla, com cerca de 25 cm³ de volume;
- ✓ Cabeça termostática, da Julabo ED;
- ✓ Banho termostático com refrigeração, modelo RTE-200, da Neslab;
- ✓ Bomba de vácuo para filtração, modelo MZ 2C, da Vacuubrand;
- ✓ Tina cromatográfica de vidro, 22x20x10 cm;

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação dos ácidos gordos livres

Os ácidos gordos livres, usados em todas as reações de interesterificação do presente trabalho prático, foram obtidos a partir do óleo de camelina, com base no método descrito por Sahin *et al.* (2005a).

Saponificaram-se 25 g de óleo de camelina juntamente com uma mistura de 5,75 g de hidróxido de potássio, 11 mL de água destilada e 66 mL de uma solução aquosa de etanol 96 % (v/v), em refluxo, num banho de água a 100° C, durante 60 minutos.

Recorreu-se a um sistema de refluxo para manter a mistura em reação à temperatura de ebulição, evitando simultaneamente que ocorressem perdas de reagente ou solvente por evaporação. Assim, utilizou-se um condensador de refluxo, adaptado por uma junta esmerilada ao balão ou erlenmeyer que continha a mistura. O vapor produzido pelo aquecimento da mistura atingiu o tubo interno do condensador e foi aí condensado, pelo contacto com a água fria que circulava pela parte externa do tubo, retornando ao balão onde se processava a reação (Fig. 3).

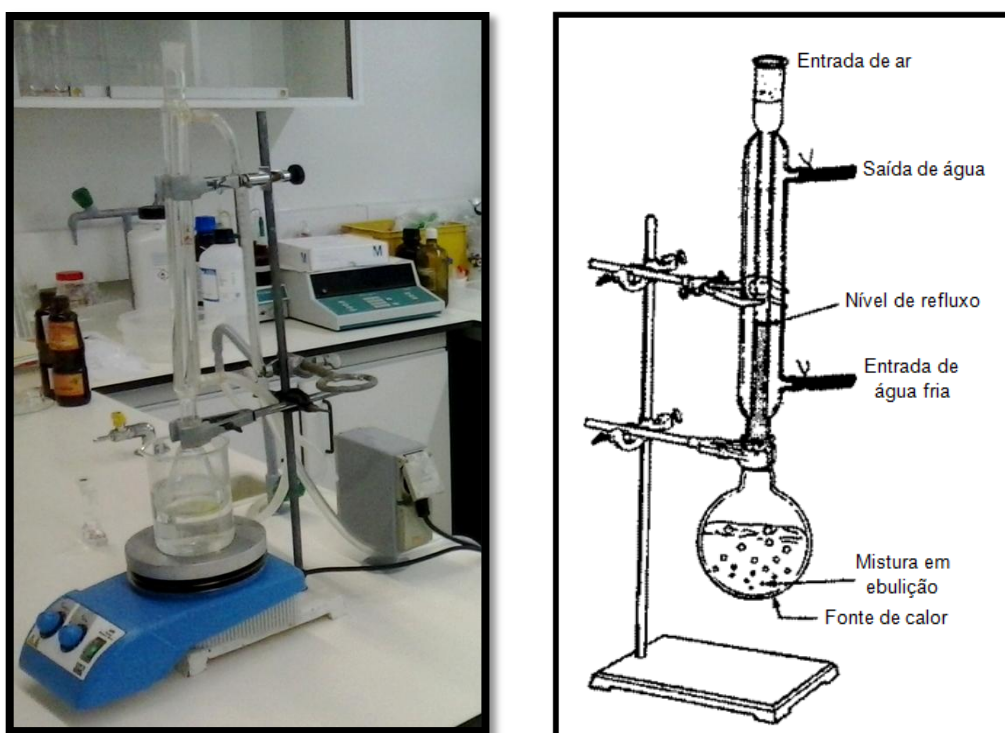


Figura 3 – Montagem de um sistema de refluxo. Fonte: Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Panamá.

Embora, teoricamente, o uso deste sistema permita um aquecimento prolongado sem perdas, pode na verdade haver fuga de vapores através da junta, se esta não estiver perfeitamente adaptada. Além disso, pode haver fuga de vapores através da extremidade

superior do condensador, que se encontra aberta, devendo-se, por essa razão, controlar o aquecimento de maneira a que o vapor alcance somente um terço da altura do tubo interno.

De seguida, adicionaram-se 50 mL de água destilada à mistura saponificada obtida e, posteriormente, esta foi transferida para uma ampola de decantação, onde a fase insaponificável foi extraída com *n*-hexano (2 x 100 mL) para ser seguidamente desprezada. A fase aquosa obtida (Figura 4 (A)), que contém a fração saponificada, foi depois acidificada com uma solução de HCl 3M, até se atingir um valor de pH de 1,0.

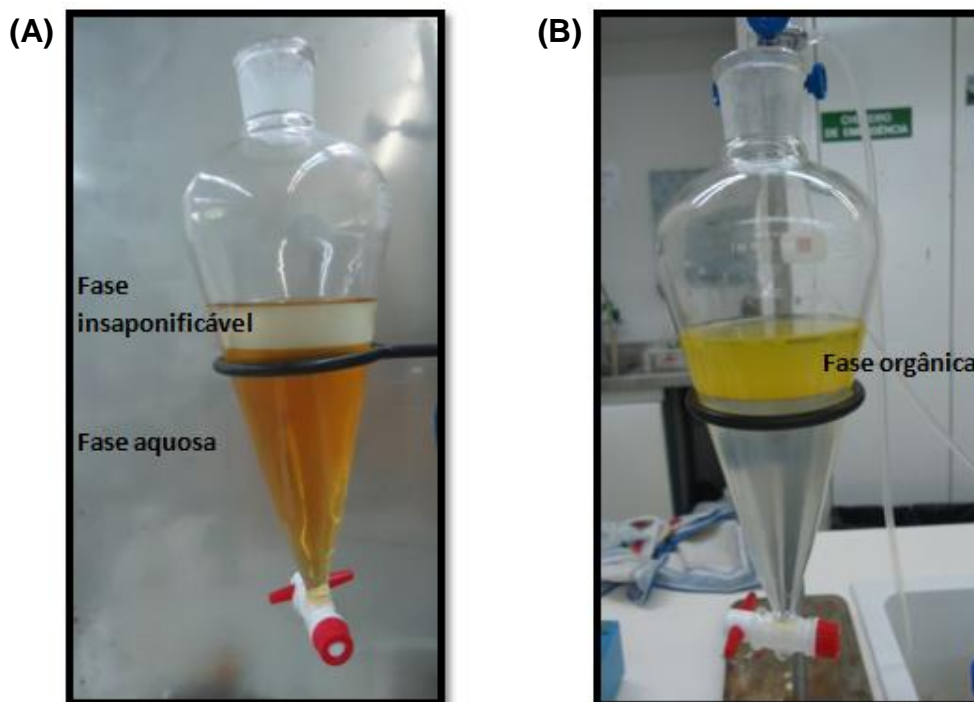


Figura 4 – (A) Obtenção da fase aquosa; (B) Extração dos ácidos gordos livres.

De seguida, procedeu-se à extração dos ácidos gordos livres com a adição de 50 mL de *n*-hexano (Figura 4 (B)), secando-se depois a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. O sulfato de sódio anidro foi removido por filtração, com o auxílio de papel de filtro e a solução foi transferida para um balão de vidro periforme de 10 mL. O *n*-hexano foi evaporado no evaporador rotativo a 40° C e a pressão inferior a 200 mbar (Figura 5).

Por forma a comprovar a eficiência do processo, confirmou-se a presença de ácidos gordos livres, através da técnica de cromatografia em camada fina (*c.f.* 3.2.5.).

Os ácidos gordos obtidos foram guardados em frasco de vidro âmbar, onde foi adicionado azoto gasoso como gás inerte, e foram depois armazenados a -18° C até ao momento da sua utilização.



Figura 5 – Evaporação no *n*-hexano num evaporador rotativo de vácuo.

3.2.2. Imobilização da rROL em Lewatit® VP OC 1600

A lipase não comercial heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) foi imobilizada em Lewatit® VP OC 1600. Para tal, juntou-se a enzima e o suporte, numa proporção de 0,25 g de rROL por grama de suporte, com 200 mL de uma solução tampão de fosfato (pH=7,0; 0,1M). O processo de imobilização decorreu a temperatura ambiente, durante 18 horas, sob agitação magnética suave (Figura 6).

Para a elaboração da solução tampão de fosfato (pH=7,0; 0,1M), preparou-se uma solução A (6,95 g de NaH₂PO₄ em 500 mL de água destilada) e uma solução B (7,11 g de Na₂HPO₄ em 500 mL de água destilada). De seguida, transferiram-se 305 mL da solução B para um balão volumétrico de 500 mL, perfazendo o volume com solução A.

Posteriormente, a enzima imobilizada foi separada da restante solução por filtração a vácuo e foi depois colocada em contacto com 100 mL de solução tampão de fosfato (pH=7,0; 0,1M) contendo 2,5 % (v/v) de glutaraldeído, durante duas horas, a temperatura ambiente e agitação magnética suave. A adição de glutaraldeído tem o objetivo de promover uma ligação mais intensa entre a enzima e o substrato, evitando que ocorra a libertação da enzima livre para o meio reacional, aquando a sua utilização. Por outras palavras, o glutaraldeído vai impedir que a imobilização enzimática seja um processo reversível, formando-se uma rede ou malha reticular como mostra a figura 7.



Figura 6 – Processo de imobilização da rRol em Lewatit VP OC 1600.

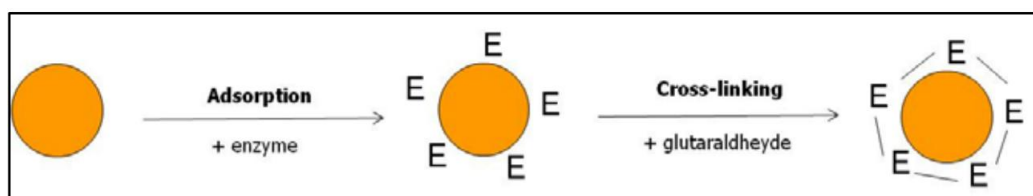


Figura 7 – Demonstração esquemática do papel do glutaraldeído na imobilização enzimática.
Fonte: Resindion S.R.L. – informação do fornecedor.

A enzima imobilizada foi novamente recolhida por filtração a vácuo e lavada com solução tampão de fosfato (pH=7,0; 0,1M) (2 x 50 mL), com o objetivo de remover a enzima livre (Tecelão *et al.*, 2010).

A rROL imobilizada foi seca a pressão reduzida durante aproximadamente 10 minutos e guardada em recipientes plásticos a 4° C, até ao momento da sua utilização.

3.2.3. Imobilização da rROL em Relizyme OD403/S

A metodologia para a imobilização da rROL em Relizyme™ OD403/S é da autoria de Albert Canet, do departamento de Engenharia Química da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha, e foi gentilmente fornecida pelo professor Francisco Valero, docente da referida universidade.

Primeiramente, dissolveu-se a lipase liofilizada em 60 mL de solução tampão de fosfato (pH=7,0; 5 mM), com agitação magnética suave a 4° C, por um período de 20 a 30 minutos. O tampão referido foi preparado com 0,7098 g de hidrogeno fosfato dissódico anidro e água

destilada até perfazer um litro de solução, ajustando o pH com HCl ou NaOH até ao valor pretendido.

Simultaneamente, realizou-se o pré-tratamento do suporte, que consistiu em juntar 700 mL de uma solução de água e acetona (50/50 v/v) a 4,5 g de Relizyme OD403/S, sob agitação magnética suave durante o mesmo período de tempo que a agitação da solução que continha a enzima, mas desta vez à temperatura ambiente. Usou-se agitação magnética suave para evitar a fratura do suporte. Posteriormente, separou-se o suporte da solução por filtração a vácuo e lavou-se o suporte repetidas vezes com água destilada, para remover vestígios de acetona.

De seguida, deu-se o processo de imobilização, colocando-se o suporte pré-tratado em contacto com a solução da enzima, sob agitação lenta a 4^o C. Após um período de 4 a 7 horas, separou-se a lipase imobilizada da solução por filtração a vácuo. A lipase foi lavada com 300 mL da solução tampão de fosfato (a mesma solução que havia sido usada para a solubilização da lipase) e seca a vácuo durante 30 a 60 minutos. Para completar a secagem, a enzima foi colocada cerca de 18 horas num exsiccador e armazenada a 4^o C até ao momento da sua utilização.

3.2.4. Interesterificação enzimática

Todos os ensaios no âmbito do presente trabalho prático foram realizados em sistema descontínuo e em meio livre de solvente, à pressão atmosférica e sob agitação magnética, durante 24 horas, à temperatura de 60^o C, excetuando os ensaios de modelação e otimização da reação de interesterificação que decorreram a diversas temperaturas (*c.f.* 3.2.4.3.).

As reações ocorreram em reatores cilíndricos de vidro de parede dupla, com uma capacidade de 25 cm³ (Figura 8).



Figura 8 – Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm³) sob agitação magnética.

A manutenção da temperatura durante a reação foi conseguida através da existência de um circuito fechado, com circulação de água a 60° C no interior da parede dupla do reator. O aquecimento da água foi feito através de um banho termostatizado, como se apresenta na figura 9:



Figura 9 – Reatores em série aquecidos por banho termostatizado.

A maioria dos ensaios foram realizados em duplicado e o meio reacional foi constituído por 3,90 g de tripalmitina e 2,75 g de concentrado de ácidos gordos livres do óleo de camelina, ou quantidades equivalentes, de forma a respeitar uma razão molar tripalmitina:ácidos gordos livres de 1:2., à exceção dos ensaios de modelação e otimização da reação de interesterificação (c.f. 3.2.4.3.).

Depois das respetivas quantidades de tripalmitina e de AGL serem pesadas e adicionadas ao reator, esperou-se que a mistura estivesse completamente fundida, para então adicionar a enzima imobilizada, na proporção de 5 % (m/m), em relação à massa de tripalmitina. Os reatores foram vedados com rolhas de borracha revestidas a folha de alumínio, a fim de minimizar reações de oxidação durante o processo.

Depois de decorrida a reação, recolheu-se a totalidade do meio reacional e filtrou-se em papel de filtro, para a remoção do biocatalisador. Uma vez que a tripalmitina solidifica à temperatura ambiente, a filtração deu-se numa estufa, a 60° C.

O meio filtrado foi armazenado a -18° C, em frascos de plástico e devidamente identificados, até ao momento da sua análise.

Os ensaios de interesterificação por acidólise enzimática foram realizados com todas as preparações enzimáticas a testar (“Lipozyme RM IM”, rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e rROL imobilizada em Relizyme OD403/S) nas condições previamente descritas.

3.2.4.1. Estudo da influência da atividade da água do biocatalisador na reação de acidólise

Dada a importância que a atividade da água (a_w) apresenta no decorrer de uma reação enzimática, realizaram-se ensaios a diferentes valores de atividade da água usando a lipase não comercial *sn*-1,3 seletiva rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600.

Antes de dar início às reações de acidólise, foi necessário realizar o equilíbrio da lipase a diferentes valores de a_w . Para tal, o biocatalisador foi colocado em copos de vidro que por sua vez foram guardados em frascos de vidro hermeticamente fechados contendo diferentes soluções salinas saturadas e incubados numa estufa a 35° C, como pode ser observado na figura 10. A saturação das soluções é condição essencial para que as trocas de massa ocorram na extensão desejada. A temperatura da estufa foi escolhida de modo a evitar desnaturação enzimática durante o pré-equilíbrio da a_w .



Figura 10 – Equilíbrio das lipases a diferentes valores de a_w .

Foram usadas 4 soluções salinas distintas e cada uma delas foi posta em contacto com enzima imobilizada (cerca de 4x1,7 g, quantidade suficiente para realizar quatro ensaios em duplicado). Os sais utilizados foram de brometo de sódio ($a_w = 0,56$; T= 30° C), cloreto de sódio ($a_w = 0,75$; T= 30° C), sulfato de amónio ($a_w = 0,81$; T= 30° C) e nitrato de potássio ($a_w = 0,92$; T= 30° C) (Pérignon *et al.*, 2013).

Este procedimento tem por base que, ao colocar uma enzima (neste caso com valor inicial de a_w de 0,946, a 30° C, determinado por um sensor de humidade Rotronic Hygroskop DT) em contacto com as referidas soluções salinas, ocorrerão trocas de massa, nomeadamente perda de água por parte da enzima, até que se atinja o equilíbrio, altura em que a enzima

apresenta o mesmo valor de a_w que a solução circundante, cessando-se as trocas de massa. Assim, a enzima de cada valor de a_w foi pesada no dia zero e nos dias subsequentes, de forma a avaliar a perda de massa (%) ao longo do tempo, até se atingir uma massa constante.

Após o equilíbrio da enzima a diferentes valores de a_w , os ensaios de interesterificação por acidólise enzimática decorreram nas condições previamente descritas (c.f. 3.2.4.).

3.2.4.2. Ensaio cinético de acidólise

Como foi referido anteriormente, a atividade das enzimas utilizadas nas reações de acidólise foi avaliada em termos da percentagem de incorporação molar de ácidos gordos nos triacilgliceróis da tripalmitina, ao fim de 24 horas de reação. No entanto, a realização de um ensaio ao longo do tempo pode mostrar-se igualmente vantajosa, pois fornece informação adicional sobre as propriedades dos biocatalisadores e a cinética da reação.

Para perceber como ocorre o mecanismo de incorporação dos ácidos gordos nos TAG da tripalmitina ao longo do tempo e investigar quando é atingida uma situação de *quasi*-equilíbrio da reação, foi realizado um ensaio a 60° C durante 48 horas, mantendo as condições reacionais referidas em 3.2.4. e utilizando como biocatalisador a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 com a atividade da água de 0,946.

Foram retiradas amostras aos seguintes tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48 h, recolhendo-se cerca de 2 mL de meio reacional em cada tempo. Para tal, utilizou-se o dobro da massa dos substratos e de biocatalisador em relação ao referido em 3.2.4 (ou seja, 7,8 g de tripalmitina, 5,5 g de AGL e 0,66 g de enzima imobilizada).

3.2.4.3. Ensaios de modelação e otimização da reação de acidólise

Fundamentos da metodologia das superfícies de resposta

A Metodologia das superfícies de resposta (“Response Surface Methodology”, RSM) consiste numa combinação de métodos estatísticos e matemáticos, útil para determinar a influência de cada variável numa determinada variável resposta, dentro de um grupo mais ou menos vasto de fatores testados em simultâneo, com o objetivo de modelar e otimizar os processos em causa, encontrando uma ou mais combinações do conjunto experimental de fatores que levarão a uma resposta ótima (Myers e Montgomery, 2002; Lumor e Akoh, 2005).

O recurso à RSM é bastante frequente na área industrial. O seu uso no delineamento experimental possibilita a obtenção de resultados estatisticamente aceitáveis com um número reduzido de experiências, o que proporciona economias de tempo e de custos (Montgomery; 1997; Myers e Montgomery, 2002), bem como melhorias no desempenho e/ou qualidade de produtos e processos industriais.

Assim, a RSM tem sido largamente utilizada na otimização de reações de produção de SL por vários investigadores (Shieh *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2000; Osório *et al.*, 2001; Kim e Akon, 2005; Sahín *et al.*, 2005b; Osório *et al.*, 2009; Tecelão *et al.*, 2012a; Simões *et al.*, 2013). Tal deve-se ao facto de não existirem ainda modelos teóricos capazes de prever, completamente, para um sistema complexo, os efeitos das características da enzima, transferências de massa e calor, fatores de estabilidade, da termodinâmica da água, etc. Outra razão prende-se com o facto de estes fatores poderem ter uma interação simultânea, o que influencia a resposta desejada (Xu, 2003).

Através da RSM obtêm-se equações polinomiais em função das variáveis definidas como significativas para a variável resposta, que graficamente correspondem a superfícies intituladas “superfícies de resposta”.

Quando são utilizados modelos fatoriais, a modelação das condições reacionais é efetuada por polinómios de primeira ordem e, portanto, descritos graficamente por uma superfície plana (Osório *et al.*, 2001). Quando a estas matrizes se adicionam pontos centrais e/ou pontos estrela, é possível avaliar a curvatura da superfície de resposta e ajustar modelos não lineares aos resultados experimentais, uma vez que cada fator é testado em cinco níveis (valores) diferentes.

A matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”, CCRD) é uma das mais utilizadas na RSM (Montgomery, 1997). É constituída por uma matriz fatorial, por um conjunto de pontos estrela e um conjunto de repetições do ponto central.

A matriz fatorial 2^k , em que k representa o número de variáveis, corresponde aos pontos extremos, pontos que irão definir a zona de interesse. Graficamente, são os vértices de um quadrado cujo centro é a origem (0, 0), e os extremos inferior e superior são -1 e 1 (Montgomery, 1997), no caso de se considerarem apenas dois fatores.

Os pontos estrela são pontos exteriores à matriz fatorial, mas dentro do domínio experimental, representados por $(-\alpha, \alpha)$. Cada variável tem dois pontos estrela, situados nos eixos de referência, a uma distância de $2^{k/4}$. No caso de duas variáveis, $\alpha=\sqrt{2}$. Estes pontos permitem testar a aplicabilidade do modelo (Montgomery, 1997), diminuem a influência dos pontos centrais no resultado final, assim como o erro que a região de interesse possa trazer, caso tenha sido mal definida.

O ponto central (0, 0) corresponde ao único ensaio a ser repetido, de modo a permitir estimar a variância do erro experimental, que se considera constante ao longo de todo o domínio experimental. Deverão, pois, existir várias repetições deste ponto (Montgomery, 1997).

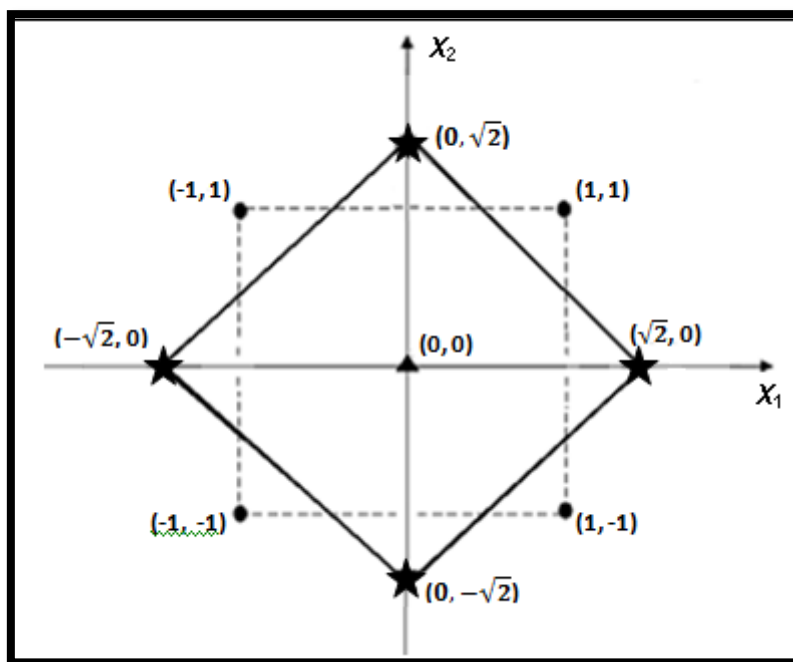


Figura 11 - Matriz central compósita rotativa ("Central Composite Rotatable Design") para duas variáveis, X_1 e X_2 . Os círculos representam os pontos da matriz fatorial, as estrelas os pontos estrela e o triângulo as repetições do ponto central (adaptado de Montgomery; 1997).

Para a elaboração de um delineamento experimental eficaz, devem ser feitos estudos preliminares que permitam identificar as variáveis que atuam no processo, a região de interesse, o ponto central e os níveis em que irão variar os fatores que influenciam o processo.

Com o recurso a este método, obtêm-se equações polinomiais que traduzem a resposta ou variável dependente, Y , em função das variáveis de decisão ou variáveis independentes, X_i . Assim, origina-se uma superfície de resposta com dimensão $(k+1)$, sendo k o número de variáveis X_i . Quando em presença de duas variáveis, X_1 e X_2 , teremos:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \text{ (Eq.1)}$$

em que: b_1 e b_2 são os coeficientes lineares, b_{11} e b_{22} os coeficientes quadráticos e b_{12} o coeficiente linear de interação X_1X_2 .

O ponto ótimo da variável resposta Y descobre-se calculando os valores máximos ou mínimos da função polinomial, através da sua derivatização parcial em ordem a X_1 e X_2 e igualização de cada uma destas equações a zero.

O ajuste do modelo aos resultados experimentais pode ser avaliado pelo coeficiente de determinação R^2 , sendo R o coeficiente de correlação entre as variáveis independentes. O valor de R^2 , multiplicado por 100, dá a percentagem de informação contida nos dados que é explicada pelo modelo. A inclusão de inúmeras variáveis X_i , mesmo que estas tenham um reduzido poder explicativo sobre a variável resposta Y , faz aumentar o valor de R^2 , o que incentiva a inclusão

indiscriminada de variáveis. Para combater esta tendência, deve-se recorrer ao R^2_{aju} , coeficiente de determinação ajustado, quando se pretende estudar a aplicabilidade de um modelo. O valor de R^2_{aju} é calculado a partir do valor de R^2 , de acordo com a eq. 2 (Wiesberg, 1985). A inclusão de variáveis com pouco poder explicativo prejudica o valor do R^2_{aju} , na medida em que k aumenta, sem isso aumentar substancialmente o valor de R^2 :

$$R^2_{aju} = 1 - [(n-1)/(n-k)] \times (1 - R^2) \text{ (Eq.2)}$$

em que: n é o número de ensaios e k o número de variáveis X_i no modelo.

Tanto o valor de R^2 como o de R^2_{aju} variam entre 0 e 1 e, quanto maior a proximidade à unidade, maior o ajuste do modelo à realidade. O R^2_{aju} é sempre inferior ao R^2 .

Procedimento experimental

Recorreu-se à Metodologia das Superfícies de Resposta para modelar e otimizar as condições da reação catalisada pela enzima que apresentou maior atividade de acidólise nos ensaios anteriores. De acordo com a CCRD utilizada, fizeram-se variar dois fatores: a temperatura da reação (a variar entre 58° C e 72° C) e a formulação do meio reacional, dada pela razão molar tripalmitina:AGL (a variar entre 1:1,2 e 1:6,8).

Quadro 5 - CCRD usada nos ensaios de acidólise entre a tripalmitina (PPP) e AGL do óleo de camelina.

Ensaio	T (°C)	RM PPP:AGL	
1	60	1:2	Matriz Fatorial $2^k = 2^2$
2	60	1:6	
3	70	1:2	
4	70	1:6	
5	57,93	1:4	Pontos Estrela $\alpha = \sqrt{2}$
6	72,07	1:4	
7	65	1:1,2	
8	65	1:6,8	
9	65	1:4	Repetições do ponto central
10	65	1:4	
11	65	1:4	

Os ensaios foram conduzidos de forma aleatória mas todos sob condições semelhantes, de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.2.4., para a compreensão das interações entre estas duas variáveis e os seus efeitos na reação de acidólise.

A massa de biocatalisador foi igualmente mantida constante nos ensaios, representando 5 % (w/w) da massa do substrato não variável, a tripalmitina.

Realizou-se um total de 11 ensaios, cada um com duração de 24 horas, entre os quais 3 foram repetições do ponto central, como é visível no quadro 5. Não se efetuaram duplicados.

3.2.5. Análise dos produtos de reação

Técnica de cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (TLC) é uma técnica cromatográfica de separação de misturas de compostos não-voláteis. Devido à relativa rapidez e simplicidade de operação, é um excelente método para a análise qualitativa dos produtos de reação do presente trabalho.

Assim, para determinar a quantidade de ácidos gordos incorporados nos triacilgliceróis da tripalmitina, seguiu-se o seguinte procedimento para cada amostra recolhida, após a reação de interesterificação:

Dissolveram-se 0,06 g de meio reacional em 10 mL de clorofórmio *p.a.*, depositando-se de seguida 200 μ L desta solução em banda contínua numa placa de TLC de sílica gel (fase estacionária), a cerca de 1,5 cm do bordo inferior desta, como mostra a figura 12.

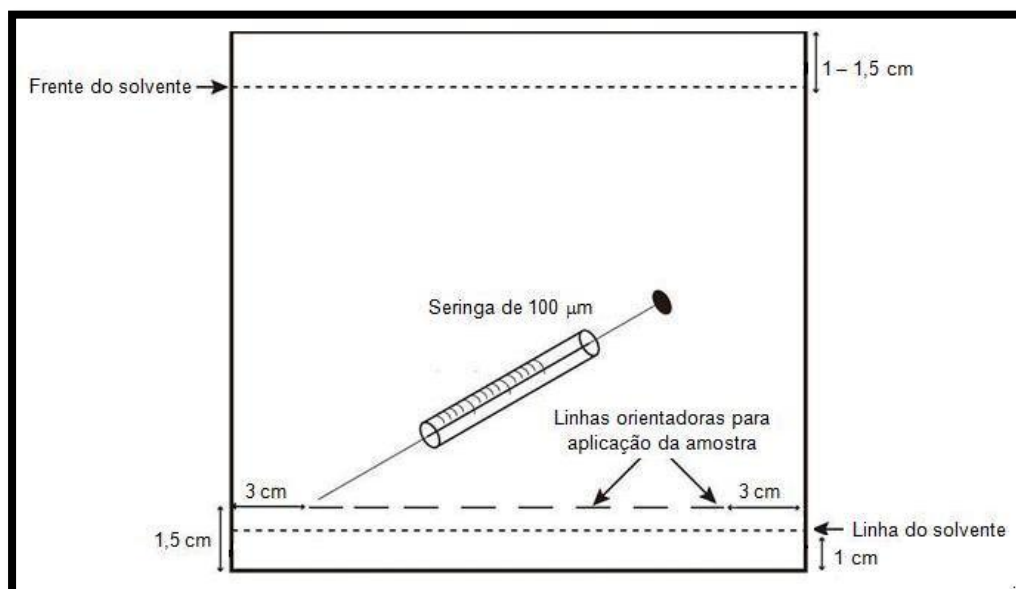


Figura 12 – Representação esquemática da deposição de amostra numa placa de TLC.

A placa foi colocada em posição vertical, dentro de uma tina cromatográfica de vidro tapada (figura 13), contendo 100 mL de solução eluente (fase móvel) constituída por n-hexano, éter etílico e ácido acético, numa proporção de 70:30:1,5 (v/v/v), respetivamente.



Figura 13 – Placas em tina cromatográfica.

Ao longo de cerca de 45 minutos, o eluente ascendeu ao longo da placa por capilaridade, sendo a separação conseguida porque os diferentes grupos de compostos percorrem a placa de TLC a velocidades distintas, consoante a maior ou menor afinidade para com a fase estacionária. A placa foi removida da tina antes da frente de solvente atingir o topo da fase estacionária e deixou-se secar durante uns minutos, a temperatura ambiente.

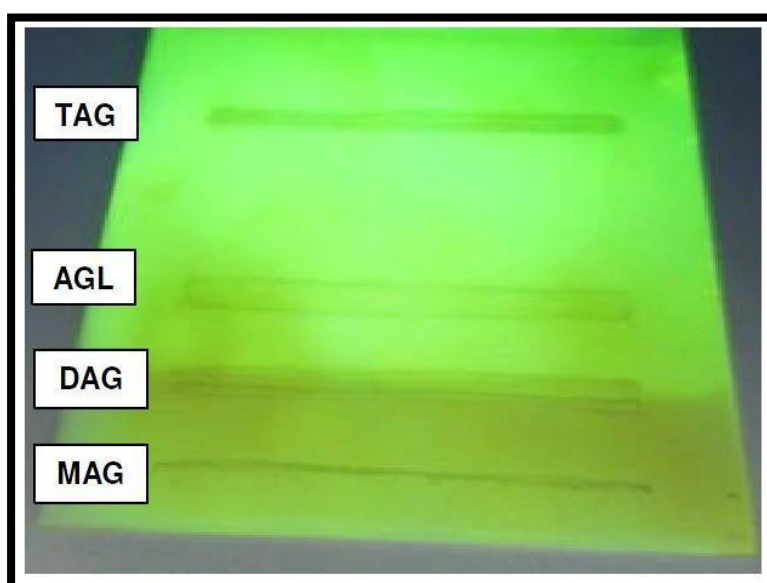


Figura 14 - Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel, sendo visíveis os diferentes grupos de compostos que constituem o meio reacional.

De seguida, a placa foi pulverizada com aproximadamente 0,2 % (m/v) de uma solução reveladora de 2':7' – diclorofluoresceína em etanol a 95 % (v/v) e observada à luz ultravioleta a 254 nm. Foram identificados os vários grupos de compostos (triacilgliceróis, ácidos gordos livres, diacilgliceróis e monoacilgliceróis), por comparação com padrões de referência, conforme indicado na figura 14.

Método de metilação para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

Para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME), seguiu-se o método de metilação descrito no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* de 1991, N°L248/47:

Raspou-se a banda de sílica gel da placa de TLC referente aos TAG com o auxílio de uma espátula e adicionaram-se aos TAG 5 mL de reagente de metilação. Este é composto por metanol anidro, *n*-hexano e ácido sulfúrico concentrado numa proporção de 75:25:1 (v/v/v) respetivamente, sendo o ácido sulfúrico sempre adicionado em último lugar, por induzir a ocorrência de uma reação exotérmica.

A metilação deu-se num balão de Erlenmeyer esmerilado ao qual foi adaptado um tubo condensador de refluxo, tal como ocorreu durante a saponificação (Figura 3). A mistura esteve em ebulição sob refluxo durante 60 minutos, num banho de água a cerca de 80° C.

Decorrido este período de tempo, adicionaram-se 10 mL de água destilada e 10 mL de éter de petróleo e a mistura resultante foi transferida para uma ampola de decantação, a qual foi agitada vigorosamente para permitir a separação das duas fases distintas na decantação - a fase etérea ou orgânica (em cima) e a fase aquosa (em baixo) – deixando-se simultaneamente sair algum ar para aliviar a pressão interna da ampola, como mostra a figura 15 (A).

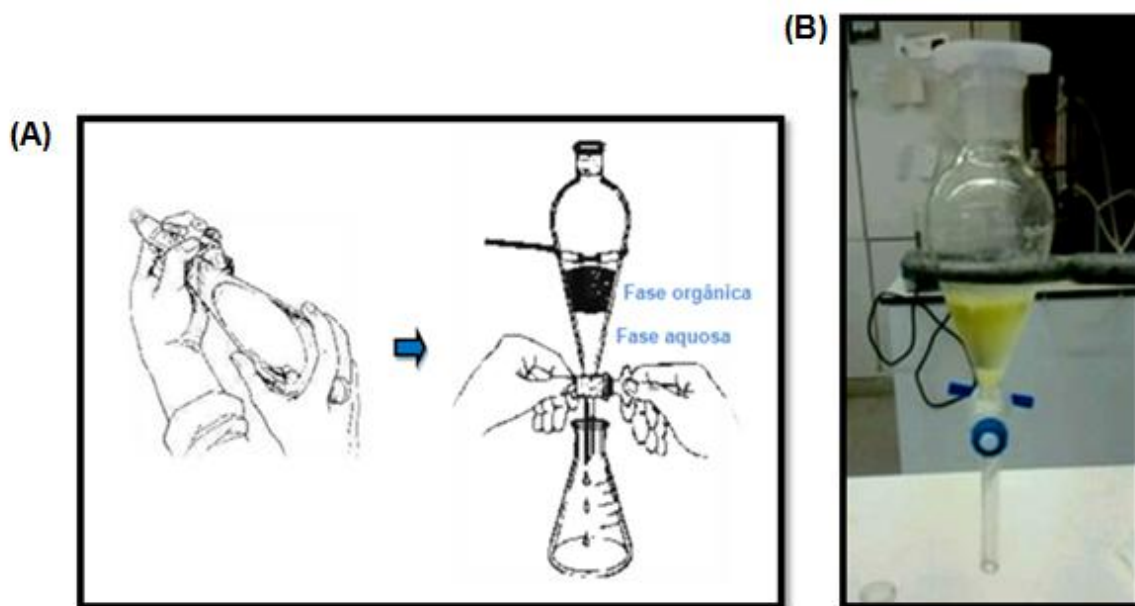


Figura 15 – (A) Representação esquemática da etapa de separação das fases orgânica e aquosa (Fonte: Departamento Académico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Panamá); (B) Etapa de separação das fases orgânica e aquosa.

Removeu-se e desprezou-se a fase aquosa (Figura 15 (B)), recuperando-se somente a camada superior (fase orgânica), que foi lavada duas vezes com água destilada (2 x 10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro.

O sulfato de sódio anidro foi removido por filtração em papel, obtendo-se assim o extrato metilado que foi transferido para um balão de vidro periforme de 10 mL para evaporação do solvente no evaporador rotativo, a 30° C e pressão inferior a 200 mbar.

Por fim, congelou-se a amostra contida no balão de vidro periforme, até ao momento da análise dos FAME por cromatografia gasosa.

Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar

O resíduo seco obtido no evaporador rotativo, após evaporação do solvente, foi dissolvido em 100 µL de uma solução de 0,1 % (m/v) de miristato de metilo (padrão interno) em *n*-hexano, sendo posteriormente 1 µL desta solução analisada por cromatografia gasosa.

As análises foram efetuadas num Cromatógrafo Gasoso do modelo Finnigan TRACE GC Ultra gas chromatograph (Thermo Electron Corporation), munido de uma coluna capilar Thermo TR-FAME (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm filme), um injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation (a operar em modo *splitless*) e um detetor de ionização por chama.

As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se a 250° C e 260° C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás transportador, a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 350 mL/min e 35 mL/min, respetivamente.

Para a análise das amostras, o programa de temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 60° C durante 1 min; aumento para 150°C a uma taxa de 15° C/min; manutenção da temperatura a 150° C durante 1 min; aumento para 220°C a uma taxa de 5° C/min; patamar final a 220° C durante 10 min.

3.2.6. Avaliação do grau de incorporação molar nos triacilgliceróis

O grau de incorporação molar de ácidos gordos nos triacilgliceróis da tripalmitina, como resultado das reações de acidólise entre esta e os ácidos gordos provenientes do óleo de camelina, foi calculado para a maioria das amostras do presente estudo, como forma de avaliar a atividade enzimática em cada caso e, conseqüentemente, proceder a comparações entre as diferentes amostras.

Da análise cromatográfica das diferentes amostras, obtiveram-se os respetivos cromatogramas e “peak lists”, com os tempos de retenção (em minutos) dos compostos presentes nas amostras e as áreas dos picos dos mesmos (Figuras 16 e 17).

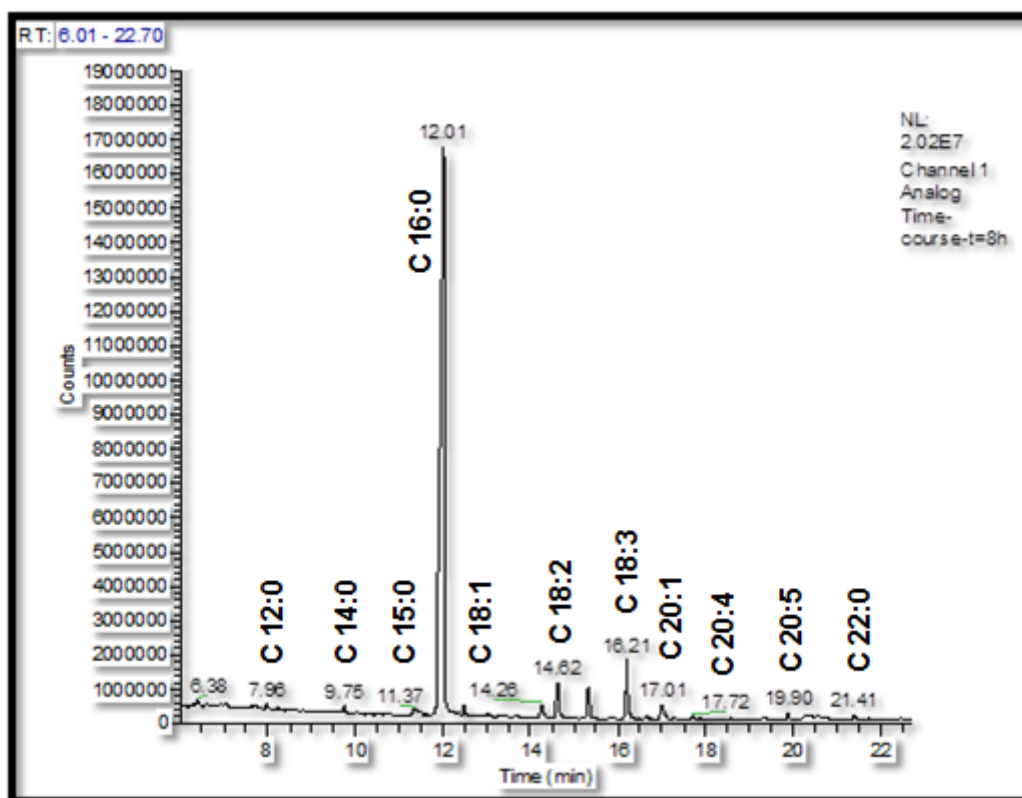


Figura 16 – Exemplo de um cromatograma obtido de uma amostra de ésteres metílicos resultante da reação de acidólise entre a palmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina e identificação dos picos mais relevantes.

Primeiramente, fez-se corresponder a cada pico o respetivo ácido gordo livre, de acordo com o seu tempo de retenção, por comparação com padrões de referência.

Através das áreas dos picos (%) apresentadas na “peak list”, calculou-se a percentagem mássica e a percentagem molar (expressa em mol-%) de incorporação nos triacilgliceróis, para cada ácido gordo.

A percentagem mássica é calculada através da razão entre a área do pico de um AGL e o somatório das áreas dos picos de todos os AGL presentes nessa amostra.

Para calcular a percentagem molar, começou-se por calcular o número de moles para cada AGL, definido como a razão entre a percentagem mássica e a massa molar do respetivo AGL. Depois, calculando a razão entre o número de moles desse AGL e o somatório do número de moles de todos os AGL presentes na amostra, determinou-se a percentagem molar para cada AGL.

Para determinar a incorporação molar total de AGL nos triacilgliceróis numa determinada amostra, fez-se o somatório dos valores de percentagem molar obtidos para cada AGL, sendo descontadas as percentagens molares do ácido palmítico e dos restantes ácidos gordos presentes na composição da tripalmitina, que se consideraram ser todos os que apresentam um número de carbonos inferior a 16, assim como o ácido C16:1.

PEAK LIST						
Time-course-t=8h.raw						
RT: 0.00 - 31.99						
Number of detected peaks: 26						
Apex RT	Start RT	End RT	Area	%Area	Height	%Height
6,38	6,32	6,44	545593,3	0,42	130442,5	0,5
7,96	7,94	8,05	613206,8	0,47	207291,9	0,79
9,75	9,68	9,85	776066,7	0,59	219590,4	0,83
10,78	10,73	10,84	164725,6	0,13	51001,48	0,19
11,36	11,26	11,42	847650,6	0,65	128122,5	0,49
12,01	11,79	12,15	1,05E+08	80,12	19883054	75,48
12,48	12,42	12,69	1006098	0,77	325574,8	1,24
13,04	12,98	13,12	398974,5	0,3	115851,7	0,44
13,37	13,32	13,48	244020,4	0,19	46797,17	0,18
14,26	14,17	14,38	1884601	1,44	396734,6	1,51
14,62	14,5	14,79	4649765	3,55	1015282	3,85
15,32	15,25	15,43	3411822	2,61	887478,8	3,37
15,84	15,77	15,94	267421,3	0,2	43786,19	0,17
16,21	16,11	16,34	6107393	4,67	1717824	6,52
16,65	16,59	16,75	296687,6	0,23	57846,92	0,22
17,01	16,91	17,15	2270528	1,73	418776,1	1,59
17,72	17,65	17,75	201370,7	0,15	49555,63	0,19
17,87	17,84	17,91	162027,1	0,12	55691,91	0,21
18,23	18,2	18,28	74040,5	0,06	22684,4	0,09
18,58	18,52	18,63	121301,2	0,09	37035,47	0,14
19,34	19,25	19,46	410249,8	0,31	70009,88	0,27
19,9	19,84	19,95	577698,3	0,44	210109,7	0,8
20,3	20,2	20,38	311924,2	0,24	51878,82	0,2
20,55	20,49	20,61	88058	0,07	23943,14	0,09
21,41	21,34	21,5	522971,8	0,4	155816	0,59
21,74	21,69	21,79	72844,91	0,06	20761,96	0,08

Figura 17 – Exemplo de “peak list” de uma amostra de ésteres metílicos resultante da reação de acidólise entre a palmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina.

3.2.7. Estudo da cinética da reação

Procedimento experimental

As reações de interesterificação efetuadas com o objetivo de estudar a cinética da reação foram realizadas nas condições referidas em 3.2.4., de modo semelhante ao das reações usadas para avaliação do grau de incorporação molar de AG nos TAG.

De forma a compreender a cinética da reação, procedeu-se de acordo com o seguinte método (adaptado da norma europeia EN 14105, Abril de 2011), para as várias amostras, após reação de acidólise:

Dissolveram-se 0,05 g de meio reacional a analisar em 10 mL de hexano. Desta mistura, transferiram-se 0,5 mL para um balão de vidro periforme de 10 mL para evaporação do solvente no evaporador rotativo, a 40° C e pressão de 78 mbar.

Ao resíduo seco obtido, adicionaram-se 400 μL da solução do padrão interno para monoacilgliceróis (PI Mono C19), 200 μL de piridina e 200 μL de N-metil-N-trimetil-silil-trifluoroacetamida (MSTFA). Os reagentes devem ser adicionados segundo a ordem referida, agitando-se vigorosamente as amostras e mantendo-as protegidas de humidade. Seguiu-se um tempo de espera de 15 minutos, à temperatura ambiente.

A solução do PI Mono C19 foi preparada diluindo $50 \pm 0,1$ mg de monononadecanoína em 20 mL de tetra-hidrofurano. Entre utilizações, esta solução deve ser armazenada a 4° C, mantendo-se estável durante 3 meses.

Após os 15 minutos referidos, juntaram-se 4 mL de *n*-heptano à mistura, sendo posteriormente 1 μL desta solução analisada por cromatografia gasosa.

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso capilar, Agilent Technologies 7820A, equipado com injetor on-column da Agilent Technologies, munido de uma coluna DB5-HT com 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 μm de filme e de um detetor de ionização de chama.

As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se a 83° C e 380° C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás transportador, a um caudal de 2,2 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 300 mL/min e 30 mL/min, respetivamente.

Para a análise das amostras, o programa de temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 50° C durante 4 min; aumento para 180° C a uma taxa de 15° C/min; manutenção da temperatura a 180° C durante 10 min; aumento para 230° C a uma taxa de 7° C/min; manutenção da temperatura a 230° C durante 17 min; aumento para 370° C a uma taxa de 10° C/min; patamar final a 370° C durante 43 min.

Análise dos resultados das amostras

Da análise cromatográfica das amostras, obtiveram-se os respetivos cromatogramas e “peak lists”, com os tempos de retenção (em minutos) dos compostos presentes nas amostras e as áreas dos picos dos mesmos, tal como referido em 3.2.6.

Pelo estudo dos cromatogramas e das respetivas “peak lists”, é possível retirar uma série de informações importantes acerca da cinética da reação, como quantificar o consumo de tripalmitina, a variação de outros compostos presentes na amostra (como o ácido palmítico livre e os restantes AGL) e a formação de novas espécies (MAG, DAG e TAG).

Primeiramente, fez-se corresponder a cada pico de interesse o respetivo composto ou espécie de compostos, de acordo com o seu tempo de retenção, por comparação com padrões de referência.

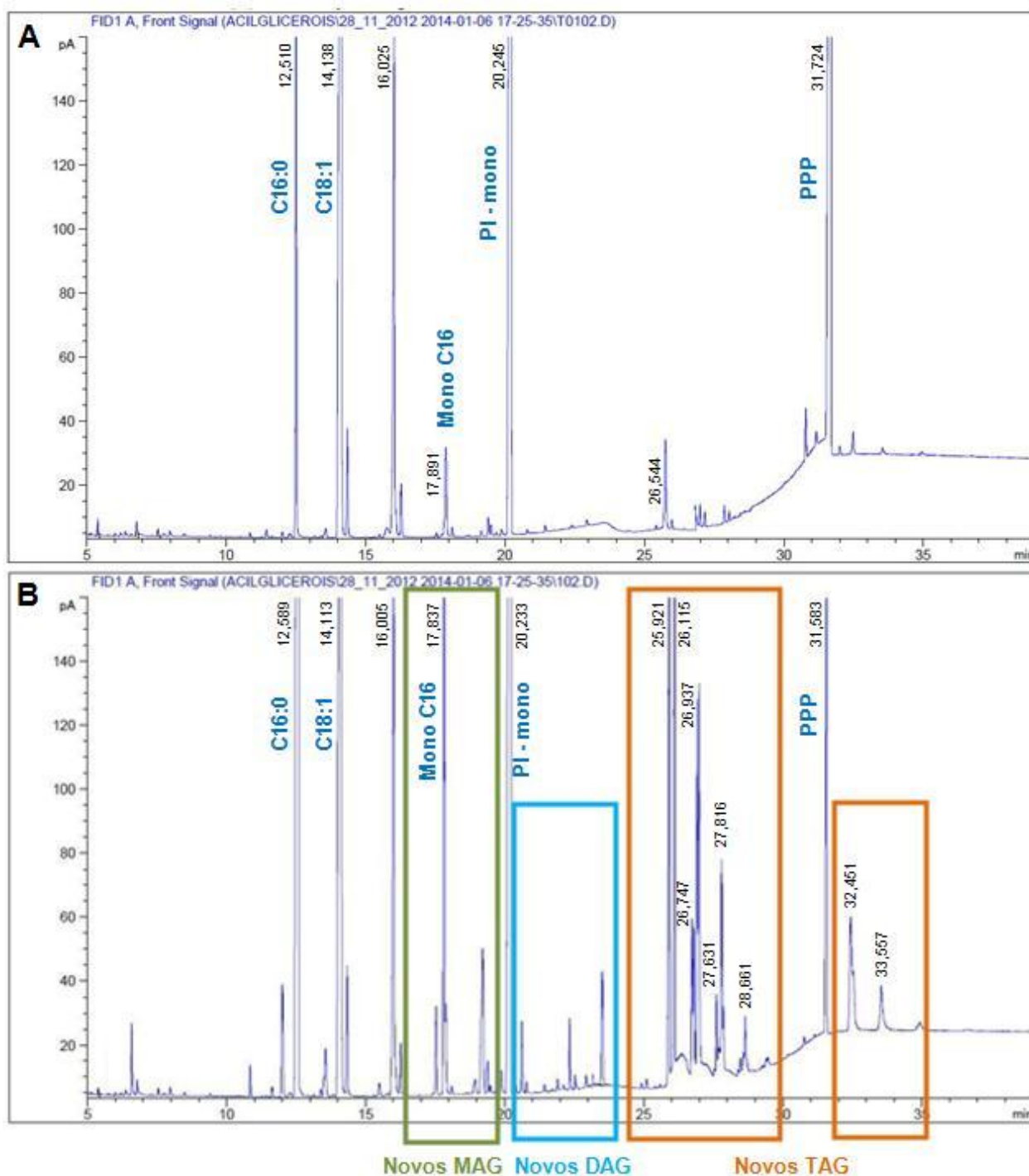


Figura 18 - Cromatogramas A e B relativos, respetivamente, aos tempos 0h e 24h de uma determinada reação de interesterificação realizada (C16:0 – ácido palmítico; C18:1 – ácido oleico; Mono C16 – monopalmitina; PI-mono – padrão interno de monoacilgliceróis; PPP – tripalmitina).

Pela norma europeia EN 14105, Abril de 2011, e por análise dos resultados obtidos através da técnica de cromatografia em camada fina, consideraram-se como sendo TAG todos os compostos com tempo de retenção igual ou superior a 25 minutos. Dos vários picos

detetados, apenas foi possível identificar com exatidão o pico correspondente à tripalmitina, pois apenas dispúnhamos do padrão de referência para este composto.

Os conjuntos de picos referentes aos MAG e aos DAG foram reconhecidos tendo por base o supracitado, tendo os primeiros um tempo de retenção compreendido entre aproximadamente 17,8 e 20 minutos e os segundos entre 20 e 25 minutos, aproximadamente. Destes dois grupos de compostos, apenas foi possível identificar com exatidão o pico referente à monopalmitina (Mono C16), pois apenas dispúnhamos do padrão de referência para este composto. O seu tempo de retenção é de aproximadamente 17,8 minutos.

Como dispúnhamos de padrão para os ácidos gordos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e oleico (C18:1), estes puderam ser facilmente identificados nos cromatogramas das várias amostras. Consideraram-se igualmente como AGL todos os picos com tempo de retenção inferior ao tempo de retenção da monopalmitina.

A figura 18 exhibe os cromatogramas A e B relativos, respetivamente, às amostras inicial e após 24h de uma determinada reação de acidólise realizada no âmbito do presente trabalho. Nesta figura, encontram-se referidos os tempos de retenção dos picos de maior importância, assim como a identificação do composto ou grupo de compostos em causa.

Com base na informação contida na figura 18, foi possível estudar a variação de cada grupo de compostos em causa ao longo da reação, assim como a composição do meio reacional ao fim do tempo t de acidólise.

Para cada amostra, calculou-se a massa de tripalmitina (g) presente no tempo t , pela equação da curva de calibração respetiva (figura 19), usando para tal a razão entre as áreas dos picos referentes à tripalmitina e ao padrão interno, bem como a razão entre as respetivas massas. Procedeu-se do mesmo modo para a amostra do tempo zero. O consumo de tripalmitina (g) corresponde, obviamente, à diferença entre a massa presente no tempo zero e a massa detetada no tempo t da reação. Dividindo este valor pela massa de tripalmitina no tempo zero, encontrou-se a percentagem de consumo de tripalmitina (% m/m).

Para quantificar a tripalmitina residual (% m/m) no tempo t para uma determinada amostra, ou seja, a tripalmitina que não foi consumida durante a reação, calculou-se somente a diferença entre 100% e o valor do consumo de tripalmitina obtido para essa amostra (% m/m).

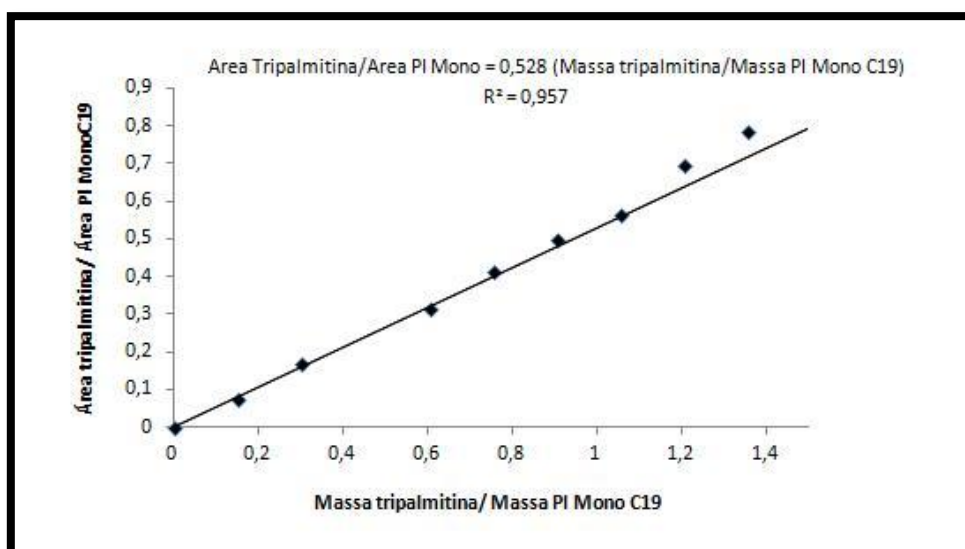


Figura 19 – Curva de calibração para a tripalmitina.

Para quantificar a formação de novos TAG, calculou-se o somatório das áreas dos picos correspondentes aos TAG, à exceção da tripalmitina, para a amostra no tempo t. Por falta de padrões e de curvas de calibração para os restantes TAG, recorreu-se novamente à equação da curva de calibração para a tripalmitina para calcular a massa referente aos TAG: com o somatório das áreas dos TAG (no lugar da área da tripalmitina), a área do padrão interno e a sua massa, calculou-se a massa de TAG para a amostra no tempo t (g). Procedeu-se de igual modo para a amostra do tempo zero. A diferença entre as massas obtidas para o tempo t e para o tempo zero corresponde à massa dos novos TAG formados durante a reação de acidólise.

Determinou-se também o grau de conversão de tripalmitina em novos TAG. Este é definido como a percentagem de reagente convertido em produto e é calculado pela razão entre a massa de novos TAG formados do decurso da reação e a massa de tripalmitina presente no tempo zero da reação.

Não foi possível a elaboração de curvas de calibração para DAG e MAG: no primeiro caso, não estava disponível padrão para DAG e, no segundo caso, a curva de calibração obtida para a monopalmitina (único MAG para o qual dispúnhamos de padrão) apresentou um valor de R^2 de cerca de 0,55, pelo que se optou por não a utilizar para a quantificação das massas de MAG.

Deste modo, recorreu-se novamente à curva de calibração da tripalmitina, para quantificação das massas de MAG e DAG. Dada a pequena importância que estes grupos de compostos apresentam para o trabalho em causa, a quantificação das suas massas foi feita em conjunto. Assim, com o somatório das áreas dos picos referentes a MAG e a DAG, a área do padrão interno e a sua massa, calculou-se a massa de MAG+DAG para a amostra no tempo t (g). Procedeu-se de igual modo para a amostra do tempo zero. A diferença entre as massas

obtidas para o tempo t e para o tempo zero corresponde à massa dos novos MAG e DAG formados no decurso da reação de acidólise.

Para quantificar a presença de AGL (à exceção do ácido palmítico) presentes numa determinada amostra, calculou-se o somatório das áreas dos picos considerados como AGL (à exceção do ácido palmítico), para a amostra no tempo t. Por falta padrões e de curvas de calibração para todos os AGL, recorreu-se à equação da curva de calibração para o ácido cáprico, representada na figura 20, para calcular a massa referente aos AGL (à exceção do palmítico). Esta é bastante semelhante à curva de calibração para o ácido caprílico (apenas existe uma ligeira variação ao nível da segunda casa decimal do declive) e, portanto, presumiu-se que as curvas de calibração para os restantes AGL seriam igualmente semelhantes. Inserindo na referida equação o somatório das áreas dos AGL (à exceção do ácido palmítico), a área do padrão interno e a sua massa, obteve-se a massa referente à totalidade dos AGL, à exceção do ácido palmítico (g). Procedeu-se do mesmo modo para a amostra do tempo zero, para determinação dos AGL presentes no início da reação.

Uma vez que a presença de ácido palmítico livre provem da hidrólise dos TAG de tripalmitina, este foi quantificado isoladamente, pela importância que apresenta no âmbito do presente trabalho. Para tal, procedeu-se de modo igual ao referido para a quantificação dos restantes AGL.

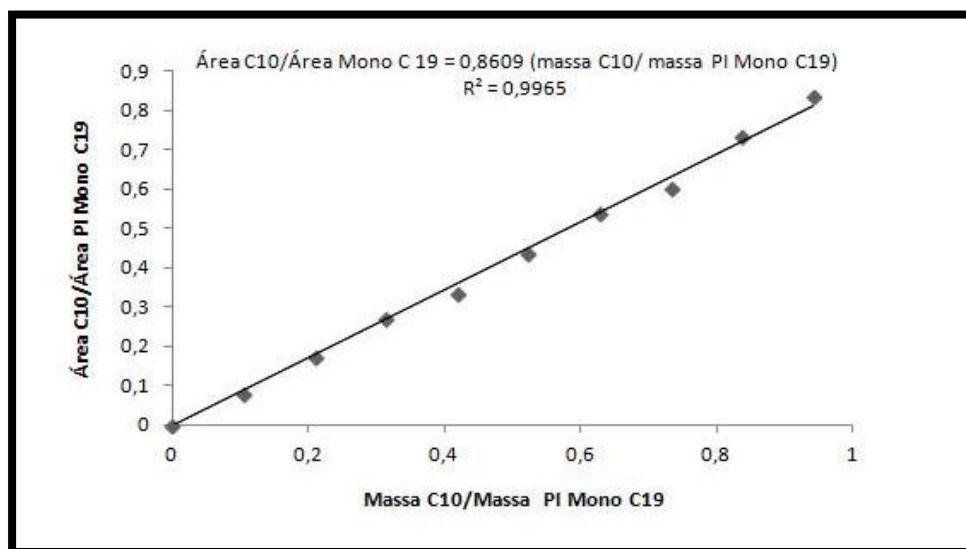


Figura 20 – Curva de calibração para o ácido cáprico (C10:0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividades catalíticas e seleção do biocatalisador

A atividade catalítica das três preparações enzimáticas em estudo (“Lipozyme RM IM”, rROL em Lewatit VP OC 1600 e rROL em Relizyme OD403/S) foi avaliada determinando-se os graus de incorporação dos ácidos gordos do óleo de camelina nos TAG da tripalmitina. As reações foram realizadas em duplicado e os graus de incorporação mássica (%) e molar (mol-%) obtidos para cada preparação enzimática são apresentados no quadro 6.

Quadro 6 – Valores de incorporação dos ácidos gordos livres (AGL) do óleo de camelina na tripalmitina (PPP) para as diferentes lipases usadas, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP.

	Incorporação mássica total (%)	Incorporação molar (mol-%)			
		Total	SFA	MUFA	PUFA
Lipozyme RM IM	54,8 ± 0,03	50,3 ± 0,03	26,5 ± 0,02	3,6 ± 0,02	20,2 ± 0,04
rRol em Lewatit VP OC 1600	46,8 ± 5,27	43,3 ± 4,31	17,8 ± 7,48	14,0 ± 2,67	11,5 ± 0,50
rRol em ReliZyme™ OD403/S	21,2 ± 0,02	19,5 ± 0,29	4,2 ± 1,04	5,3 ± 1,48	10,00 ± 0,16

Observando o Quadro 6, verifica-se que os maiores níveis de incorporação na tripalmitina, após 24 h de reação, a 60° C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2, ocorreram para a “Lipozyme™ RM IM” (Inc. Mássica: 54,8 %, Inc. Molar: 50,3 mol-%). Foram obtidos valores bastante próximos para a rROL quando imobilizada em Lewatit (Inc. Mássica: 46,8 %, Inc. Molar: 43,3 mol-%). No entanto, quando se testou esta enzima imobilizada em Relizyme, os valores de incorporação mássica e molar foram reduzidos para menos de metade (Inc. Mássica: 21,2 %, Inc. Molar: 19,5 mol-%).

Contudo, analisando somente os graus de incorporação de PUFA, constata-se que a rROL imobilizada em Relizyme parece ser o biocatalisador mais adequado à incorporação desta classe de ácidos gordos, uma vez que cerca de 51 % dos ácidos gordos incorporados por esta enzima nos TAG da tripalmitina são polinsaturados. Esta percentagem é relativamente próxima da obtida para a reação catalisada pela enzima comercial “Lipozyme™ RM IM”, cuja incorporação de PUFA representa 40 % da incorporação molar total (ou seja, Inc. Molar PUFA: 20,2 mol-%). Silva (2009) obteve um valor bastante semelhante de incorporação molar (20,8 mol-%), na reação de acidólise de tripalmitina com um concentrado de TAG enriquecidos em ómega-3 PUFA, catalisada pela “Lipozyme™ RM IM”. Mais baixo foi o valor obtido para a rROL

imobilizada em Lewatit, que ronda os 27 % em relação à incorporação molar total (ou seja, Inc. Molar PUFA: 11,5 mol-%).

Quanto aos ómega-3 PUFA, detetou-se uma incorporação molar de EPA de 0,53 mol-% no caso da rROL imobilizada em Relizyme e de 0,60 mol-% no caso da rROL imobilizada em Lewatit. Para a enzima comercial, não foi detetada qualquer incorporação deste AG. O DHA, outro ómega-3 PUFA importante (*c.f.* 2.2.3.), não se mostrava presente em nenhum cromatograma das amostras em causa. Tal pode ser justificado pelo facto do grau de incorporação ser influenciado por diferenças ao nível do comprimento da cadeia e do número de ligações duplas das moléculas. O EPA (C20:5) tem uma cadeia carbonada menor e menos ligações duplas que o DHA (C22:6). Assim, a molécula de EPA tem uma forma molecular mais simples, comparativamente com o DHA. Estas diferenças, juntamente com a especificidade das enzimas para os diferentes ácidos gordos, conduzem à diminuição da incorporação de DHA na tripalmitina, comparativamente à de EPA (Hamam e Shahidi, 2008).

A “Lipozyme™ RM IM” parece ser o biocatalisador mais adequado à produção de HMFS ricos em PUFA, por acidólise entre a tripalmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina, num sistema reacional com as condições descritas, uma vez que foi o biocatalisador que apresentou os valores mais elevados das incorporações molar e mássica, juntamente com um valor bastante elevado de incorporação de PUFA (apesar da ausência de incorporação molar de EPA e DHA). No entanto, esta é uma enzima comercial, vendida a preço elevado, o que dificulta o seu uso a nível industrial como alternativa aos catalisadores inorgânicos.

Por essa razão, e devido ao resultado promissor da incorporação molar total obtido com a rROL imobilizada em Lewatit, optou-se por este biocatalisador não comercial para os ensaios subsequentes da presente tese, apesar desta enzima mostrar a menor afinidade para a incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina, pelo menos nas condições realizadas neste estudo. Assim, desenvolveram-se estudos adicionais com este biocatalisador mas em condições reacionais diferentes, com o intuito de aumentar o rendimento do processo e otimizar as condições da reação.

Quanto à rROL imobilizada em Relizyme, apesar de mostrar bastante afinidade para com os ómega-3 PUFA, parece não apresentar grande atividade catalítica, pelo menos nas condições realizadas neste estudo, dado o baixo valor de incorporação molar total.

Resta referir que a escolha do biocatalisador devia basear-se não só na sua atividade de interesterificação (expressa pela percentagem de incorporação de AG nos TAG) mas também na sua estabilidade operacional, pois ambas as características são importantes em termos de economia de processo. No entanto, na presente tese, a escolha do biocatalisador foi feita apenas com base na comparação das atividades catalíticas das diferentes enzimas.

A avaliação da seletividade *sn*-1,3 e a determinação da composição em ácidos gordos na posição *sn*-2 dos TAG são igualmente importantes para a seleção do biocatalisador mais adequado à produção de HMFS. Trabalhos semelhantes sobre este tema, usando a rROL como

biocatalisador, confirmam a sua seletividade *sn*-1,3. É o caso de Simões *et al.* (2013), cujos TAG obtidos pela reação de interesterificação entre a banha e um concentrado comercial de AGL rico em ômega-3 PUFA, catalisada pela rROL imobilizada em Accurel MP 1000, apresentaram cerca de 80 % de ácido palmítico na posição *sn*-2 (em relação ao conteúdo total de ácido palmítico nos TAG). Esta manutenção do ácido palmítico na posição interna dos TAG é desejável do ponto de vista nutricional (*c.f.* 2.2.2.) e confirma a seletividade *sn*-1,3 da rROL.

4.2. Influência da atividade da água da rROL na reação de acidólise

Apesar da atividade de interesterificação não ser a mais elevada, optou-se por prosseguir o presente estudo com a enzima rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, uma vez que se trata de uma enzima não comercial e para a qual existem ainda poucos estudos em sistemas semelhantes.

Avaliou-se a influência da atividade da água inicial do biocatalisador na sua atividade catalítica. Para tal, procedeu-se, numa primeira fase, ao pré-equilíbrio da rROL (previamente imobilizada em Lewatit) em 4 valores distintos de a_w a 35° C: 0,56, 0,75, 0,81 e 0,92. Ao colocar a rROL (com valor inicial de a_w de 0,946, a 30° C) em contacto com soluções salinas com os referidos valores de a_w , ocorreram trocas de massa, nomeadamente perda de água por parte da enzima, até ao momento em que se atingiu uma situação de estabilidade, altura em que a enzima apresentava aproximadamente o mesmo valor de a_w que a solução circundante, cessando-se as trocas de massa. Para averiguar ao fim de quanto tempo se atingiu tal situação, foram efetuadas pesagens da enzima ao longo dos dias, calculando-se a perda de massa da mesma em relação à massa pesada no dia anterior. Os resultados encontram-se apresentados no quadro 7.

Tal como se pode observar no referido quadro, quanto mais baixo é a a_w da solução onde se encontra a rROL, mais rápido ocorre a perda de massa e portanto mais rapidamente se conclui o pré-equilíbrio. Isto porque, quanto maior a diferença entre o valor de a_w inicial da enzima e o da solução, mais favorecidas são as trocas de massa entre a enzima e o meio circundante.

Considerou-se finalizado o pré-equilíbrio da lipase quando foi detetada uma percentagem de perda de massa inferior a 5 %. No caso da lipase sujeita a a_w 0,92, optou-se por concluir o pré-equilíbrio antes de se atingir tal percentagem, pois havia a risco de inativação da lipase, por esta estar sujeita durante vários dias a uma temperatura de 35° C.

Quadro 7 – Dados relativos à pesagem das amostras referentes ao pré-equilíbrio da rROL imobilizada em Lewatit a diferentes valores de a_w .

	Dia 0	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	Massa de enzima (g)	Massa de enzima (g)	Perda de massa ** (%)	Massa de enzima (g)	Perda de massa ** (%)	Massa de enzima (g)	Perda de massa ** (%)	Massa de enzima (g)	Perda de massa ** (%)	Massa de enzima (g)	Perda de massa ** (%)
a_w 0,56	0,7600 *	0,4376	42,42	0,4392	-0,37						
a_w 0,75	1,7597	1,0054	42,87	0,9595	4,56						
a_w 0,81	1,6840	1,3336	20,81	1,0941	17,96	0,9687	11,46	0,9605	0,85		
a_w 0,92	1,6017	1,4217	11,24	1,3095	7,89	1,1990	8,44	1,0806	9,87	1,0130	6,26

* Devido a problemas ocorridos durante o pré-equilíbrio da rROL a a_w 0,56, houve necessidade de repeti-lo, pelo que se optou por usar uma menor massa de enzima, ainda assim suficiente para realizar o ensaio em duplicado.

** As perdas de massa referidas para cada dia dizem respeito à diferença entre a massa pesada nesse dia e a massa pesada no dia imediatamente anterior. Assim, a percentagem de perda de massa no caso do dia x foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Perda de massa } t_x (\%) = [(\text{Massa enzima } t_{(x-1)} - \text{massa enzima } t_x) / \text{massa enzima } t_{(x-1)}] \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Após concluído o pré-equilíbrio da rROL nos 4 valores de a_w estudados, a enzima foi usada para catalisar a reação de acidólise da tripalmitina com os AGL do óleo de camelina, mantendo as condições do ensaio anterior. As reações foram realizadas em duplicado. No quadro 8 são apresentados os graus de incorporação mássica (%) e molar (mol-%) obtidos para cada valor de a_w testado, ao fim de 24 horas de reação.

Quadro 8 – Valores de incorporação dos ácidos gordos livres (AGL) do óleo de camelina na tripalmitina (PPP) para a rROL em Lewatit, a diferentes valores de atividade da água, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP.

	Incorporação mássica total (%)	Incorporação molar (mol-%)			
		Total	SFA	MUFA	PUFA
a_w 0,56	19,1 ± 2,00	17,5 ± 1,80	0,6 ± 0,39	4,4 ± 1,19	12,6 ± 0,22
a_w 0,75	23,0 ± 2,21	21,1 ± 2,02	0,5 ± 0,87	5,0 ± 0,57	15,6 ± 3,46
a_w 0,81	41,8 ± 1,42	35,5 ± 1,28	21,8 ± 0,29	2,7 ± 0,05	11,00 ± 1,22
a_w 0,92	53,8 ± 7,08	51,4 ± 6,70	2,3 ± 0,04	11,2 ± 1,97	37,9 ± 4,7

Tal como se pode visualizar no quadro 8, o aumento gradual do valor de a_w da rROL favorece a reação de acidólise entre os AGL do óleo de camelina e a tripalmitina nas condições consideradas, o que se traduz em aumentos nos valores totais de incorporação mássica e incorporação molar. A mudança do valor de a_w de 0,56 para 0,75 provoca um aumento pouco acentuado na atividade enzimática. No entanto, quando se aumenta a a_w até 0,81, a atividade enzimática aumenta bastante, atingindo-se quase o dobro dos valores de incorporação molar e mássica relativamente aos conseguidos para a a_w de 0,75. À a_w de 0,92, atinge-se o valor máximo de atividade catalítica, que corresponde a 53,8 % de incorporação mássica total e 51,4 mol-% de incorporação molar total.

Quanto à incorporação molar de PUFA, pode concluir-se que esta acompanhou o aumento da incorporação molar total provocado pelo aumento da a_w , correspondendo a 72-74 % do valor de incorporação molar total obtido para cada a_w . Para a a_w de 0,92, registou-se uma incorporação molar de PUFA de aproximadamente 38 mol-%.

Relativamente aos ómega-3 PUFA, não se detetou novamente qualquer incorporação de DHA para nenhum dos valores de a_w analisados, o que indica que a rROL não apresenta grande afinidade ou especificidade para com este AG. Tal pode apresentar-se como uma limitação ao seu uso como biocatalisador para a produção de HMFS, uma vez que a presença de DHA é bastante importante nas fórmulas para lactentes, por ser um AG fundamental para o crescimento saudável dos recém-nascidos. Quanto ao EPA, detetaram-se os seguintes valores de

incorporação molar: 0,34 mol-%, 0,5 mol-%, 0,75 mol-% e 1,27 mol-%, respetivamente para os valores de a_w de 0,56, 0,75, 0,81 e 0,92.

Os valores do quadro 8 apresentam-se bastante promissores. No entanto, parecem não estar de acordo com o resultado obtido no ensaio anterior, para o qual se observou uma incorporação molar total de 43,3 mol-% para a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (que apresenta um valor de a_w de 0,946, medido a 30° C). Se realmente o acréscimo de a_w favorecer a reação de acidólise catalisada por esta enzima, então os valores de incorporação molar obtidos no ensaio a a_w 0,92 deveriam ser inferiores aos obtidos com a enzima a a_w 0,946, o que não se verifica. Foram realizadas várias repetições para os vários a_w em causa e os resultados mantiveram-se. Assim, estes resultados podem ser explicados pelo facto de se terem usado lotes de rROL diferentes no ensaio às a_w 0,92 e 0,946 ou, por qualquer razão, a atividade catalítica da enzima é favorecida com o acréscimo de a_w até 0,92, onde atinge um máximo e depois decresce. Para tirar estas dúvidas, poder-se-ia ter realizado um ensaio a a_w superior a 0,946.

Assim, assumiu-se que o aumento da a_w favorecia a incorporação molar e, conseqüentemente, a incorporação molar de PUFA, pelo que se usou, nos restantes ensaios da presente tese, a enzima rROL imobilizada em Lewatit no seu valor de a_w natural.

Como foi visto em 2.3.2.2.4. (Atividade da água), o grau de hidratação da lipase condiciona fortemente a natureza da reação, o seu rendimento e posição de equilíbrio: meios orgânicos quase anidros favorecem reações de esterificação e de interesterificação (o que se pretende), enquanto valores de a_w elevados favorecem a reação de hidrólise dos acilgliceróis. De facto, as lipases apresentam, em geral, maior atividade na esterificação e na interesterificação dos lípidos em meios de a_w entre 0,2 e 0,5 ou mesmo em meios quase isentos de água (a_w de 0,064 a 0,11), dependendo do biocatalisador utilizado e das condições da reação (Bloomer *et al.*, 1992; Parvaresh *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 1992; Ferreira-Dias e da Fonseca, 1995; Osório *et al.*, 2001; Adlercreutz *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Petersson *et al.*, 2007).

Contudo, diferentes enzimas apresentam exigências diferentes em relação à a_w que necessitam para manter um nível apreciável de atividade catalítica e, por essa razão, alguns estudos provaram que existem lipases cuja atividade máxima de esterificação ou interesterificação se verifica para valores de a_w superiores a 0,5 e, em alguns casos, a valores de a_w próximos de 1, onde seria de esperar que ocorresse apenas a reação de hidrólise (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Petersson *et al.*, 2007; Pires-Cabral *et al.*, 2007). É o caso da lipase comercial imobilizada de *Thermomyces lanuginosa* cuja atividade tende a aumentar com o aumento da atividade da água (Pérignon *et al.*, 2013). Também a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* exibiu, a a_w 0,97 e em meio livre de solvente, uma atividade de interesterificação similar à de lipases imobilizadas comerciais (Osório *et al.*, 2009).

Dados obtidos em trabalhos anteriores com a rROL, enzima em estudo, mostram que esta enzima se comporta do mesmo modo que as anteriores, no que diz respeito à influência da

atividade da água na sua atividade catalítica. Em estudos de estabilidade operacional, a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 mostrou uma maior atividade de interesterificação quando re-hidratada entre ensaios consecutivos, tanto na produção de TAG estruturados do tipo MLM (Nunes *et al.*, 2012) como na produção de sucedâneos de gordura do leite materno (Tecalão *et al.*, 2012a), o que mostra a sua preferência por meios com presença de água.

4.3. “Time-course” da reação de acidólise catalisada pela rROL

Tal como foi referido em 4.1., a atividade das enzimas utilizadas nas reações de acidólise foi avaliada em termos da percentagem de incorporação molar de ácidos gordos nos triacilgliceróis da tripalmitina. No entanto, efetuar um ensaio ao longo do tempo pode mostrar-se igualmente vantajoso, pois fornece informação adicional sobre as características dos biocatalisadores, nomeadamente sobre a velocidade inicial da reação e sobre quando se atinge o equilíbrio cinético.

Como é sabido pelo estudo da cinética enzimática, a atividade de uma enzima não é constante ao longo do tempo, apresentando tendência para seguir uma curva (e não uma reta afim) até se atingir um patamar ou uma situação de *quasi-equilíbrio*, altura em que não compensa prolongar a reação, pois não haverá maior extensão da reação ou formação adicional de produto.

O tempo que decorre até se atingir este estado estacionário depende dos substratos usados, das condições do meio reacional e, claro, do biocatalisador em causa. Assim, para cada reação, o conhecimento do tempo que decorre até se atingir a situação de *quasi-equilíbrio* é bastante importante, pois permite otimizar a duração da reação. No caso do presente trabalho, visto que os ensaios anteriores foram sempre realizados com a duração de 24 horas, recorreu-se ao acompanhamento da reação ao longo do tempo para perceber se deve manter-se esta duração em ensaios futuros, se é vantajoso aumentá-la ou, se pelo contrário, deve optar-se por uma diminuição do tempo de reação em ensaios futuros, o que facilitaria grandemente o trabalho laboratorial e funcionaria simultaneamente como uma mais-valia para o uso da interesterificação enzimática a nível industrial, em sistemas contínuos.

Assim, realizou-se uma reação de acidólise entre a tripalmitina e os AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, mantendo as condições usadas anteriormente – temperatura de 60°C, pressão atmosférica, meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de tripalmitina - retirando-se amostras ao fim dos seguintes tempos: 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 24h e 48h.

Com as amostras obtidas, calculou-se a incorporação molar dos AGL do óleo de camelina nos triacilgliceróis da tripalmitina (mol-%), tal como sucedeu nos ensaios anteriores. Decidiu-se quantificar também o consumo tripalmitina (% m/m), de acordo com o referido em 3.2.7. Os resultados obtidos, para as diferentes horas, encontram-se apresentados na figura 21.

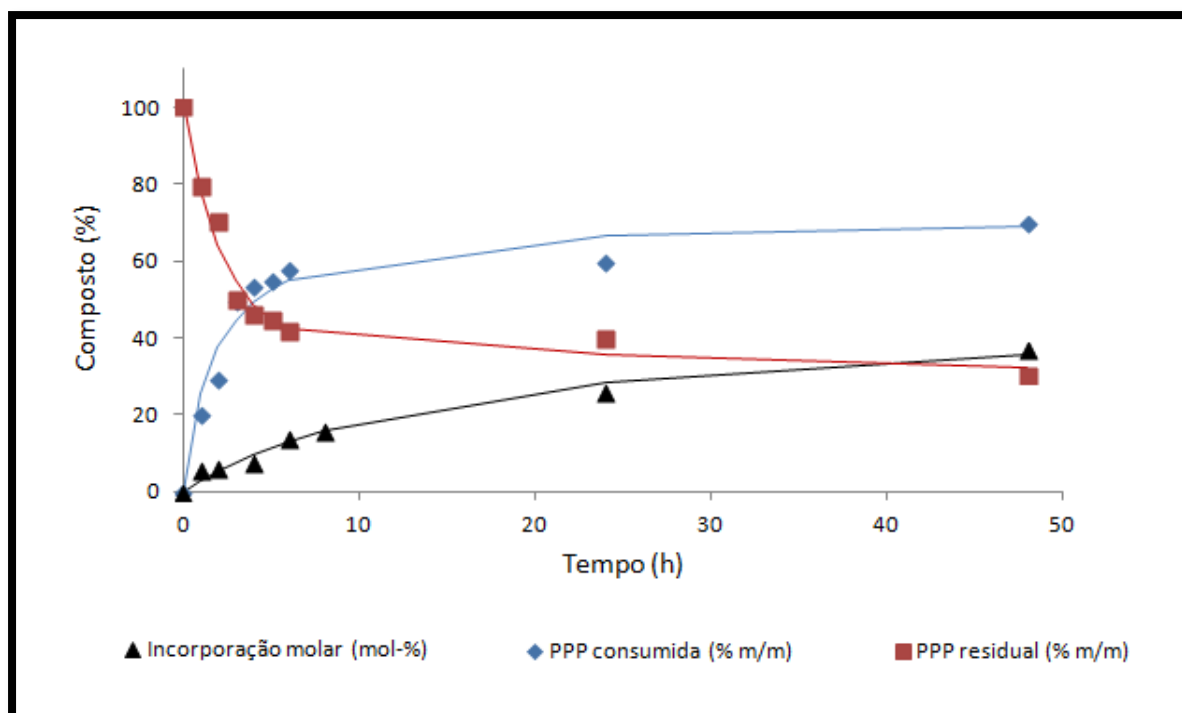


Figura 21 – Incorporação molar dos AGL do óleo de camelina na tripalmitina (PPP) (Δ), consumo de PPP (◇) e PPP residual (◻), ao longo de 48 horas de acidólise catalisada pela rROL em Lewatit, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2 e carga de enzima de 5% em relação à massa de PPP.

Na figura 21, encontram-se representadas três curvas, que dizem respeito à incorporação molar dos AGL nos TAG de tripalmitina, ao consumo de tripalmitina e à quantidade de tripalmitina residual.

Quanto à incorporação molar, esta foi calculada de acordo com o referido em 3.2.6. Uma vez que o biocatalisador em causa é uma enzima *sn*-1,3 seletiva, o valor de incorporação molar (mol-%) deve ser, no máximo, igual a 66 %, o que corresponde ao corte de todas as ligações *sn*-1 e *sn*-3 dos TAG de tripalmitina e posterior re-esterificação, com formação de novos TAG, pela incorporação dos AGL do óleo de camelina (oleico, linoleico, linolénico, etc) nessas posições, com manutenção do ácido palmítico na posição interna dos TAG. Esta situação seria a ideal, uma vez que se pretendem produzir sucedâneos de gordura do leite materno. O valor de incorporação molar pode ser superior a 66 %, caso ocorram migrações dos grupos acilos das posições *sn*-1,3 para a posição interna dos TAG pois, apesar da seletividade e da regioespecificidade das lipases, estas nunca são absolutas, e portanto as lipases podem igualmente cortar algumas posições *sn*-2. Este fenómeno pode ser favorecido por alguns fatores como atividade da água, temperatura, carga de enzima e tempo de reação. Estas reações secundárias não são desejáveis, no caso da produção de HMFS, pois originam TAG com outro ácido gordo a ocupar a posição *sn*-2 que não o ácido palmítico.

O valor máximo de incorporação molar obtido foi de 37 mol-%, às 48 horas, o que é bastante inferior à incorporação teórica máxima de 66 mol-%. Às 24 horas, o valor registado foi de 26,4 mol-%, o que é bastante inferior ao obtido no ensaio de seleção do biocatalisador no qual, nas mesmas condições e também com a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, se atingiu uma incorporação molar de $43,3 \pm 4,31$ mol-%. Assumiu-se que esta variação se deveu ao facto dos lotes de enzima utilizados terem sido diferentes e da imobilização ter sido feita em duas alturas distintas (pode ter ocorrido algum problema na segunda imobilização que se traduziu num decréscimo da atividade da lipase aquando os ensaios do “time-course”).

As outras duas curvas presentes na figura são complementares, na medida em que ambas fornecem a mesma informação, mas de pontos de vista diferentes. O consumo de tripalmitina corresponde à quantidade que foi consumida durante a reação e, obviamente, a tripalmitina residual é a diferença entre 100 % e esse valor, para cada hora, representando a quantidade de tripalmitina que não reagiu ou que não originou outros compostos.

Ao contrário da incorporação molar, no caso do consumo de tripalmitina pretende-se um valor o mais elevado possível, de preferência 100 %. Ou seja, queremos que toda a tripalmitina que se encontra presente no tempo zero reaja e origine novas espécies químicas, de preferência novos TAG. No entanto, durante a interesterificação, existe uma primeira etapa de hidrólise com libertação de grupos acilo, seguida de uma etapa de esterificação, onde se formam outros acilgliceróis para além de TAG (ou seja, MAG e DAG de diferentes composições). Assim, para um determinado tempo de reação, o valor obtido para o consumo de tripalmitina é sempre bastante superior ao valor de incorporação molar.

Tal como no caso da incorporação molar, também o valor máximo obtido para o consumo de tripalmitina foi bastante inferior ao desejado 100 %. No final da reação, havia-se consumido 69,9 % (m/m) da tripalmitina inicial, sendo que às 24 horas o valor registado foi de 60,2 % (m/m). Ou seja, existe uma quantidade bastante considerável de tripalmitina que, ao fim de 48 horas de reação, continua sem ser consumida e sem originar novos TAG ou outras espécies químicas.

Perante os valores de incorporação molar e de tripalmitina consumida, pode-se afirmar que a duração ideal dos ensaios deve ser de 24 horas, tal como os realizados anteriormente. Isto porque o acréscimo de incorporação conseguido das 24 às 48 horas não parece suficientemente elevado para compensar esse acréscimo de tempo.

Com os dados obtidos, parece que não se atinge nenhuma situação de *quasi-equilíbrio* até às 48 horas, pois nem a curva do consumo de tripalmitina nem a da incorporação molar apresentam um patamar ou uma zona completamente estacionária. Ambas continuam a crescer continuamente até as 48 horas, no entanto com um declive bastante menos acentuado ao longo do tempo. Estes resultados contrastam bastante com os obtidos por Tecelão *et al.* (2012a), onde se atingiu uma situação de *quasi-equilíbrio* ao fim de 6 horas, na produção de HMFS através da reação de acidólise entre a tripalmitina e o ácido oleico, em meio livre de solvente com a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, e ao fim de 12 horas, nas mesmas condições, mas com a

rROL imobilizada em Accurel MP 1000. Tal pode ser explicado por diferenças de afinidade da rROL em Lewatit para os AGL. Nos ensaios descritos por Tecelão *et al.* (2012a), utilizou-se apenas ácido oleico, enquanto no presente estudo se utilizou uma grande variedade de AGL, nomeadamente PUFA. No quadro 6, está patente uma maior afinidade da rROL para os MUFA (como o ácido oleico) do que para os PUFA.

4.4. Modelação e otimização das condições reacionais para a rROL

Perante os resultados obtidos nos ensaios anteriores, realizou-se um ensaio de modelação e otimização da reação de acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit, mantendo constantes a maioria das condições do primeiro ensaio (a_w 0,946, pressão atmosférica, meio livre de solvente e carga de enzima de 5% em relação à massa de tripalmitina), sendo o tempo de reação igualmente de 24 h, pelo justificado na secção 4.3.

Fez-se variar a razão molar e a temperatura, relativamente às usadas nos ensaios anteriores (nos quais se fixou a temperatura de 60° C e a razão molar Tripalmitina:AGL de 1:2), uma vez que se pretendeu investigar se estas variáveis teriam efeitos significativos na cinética da reação de acidólise entre a tripalmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina.

Os resultados obtidos nos ensaios de modelação e otimização das condições reacionais para a rROL em Lewatit, segundo uma CCRD (*c.f.* 3.2.4.3.) foram analisados através do programa *Statistica TM*, da Stasoft, versão 5, USA, e encontram-se apresentados no quadro 9, assim como as condições operacionais para cada ensaio.

Quadro 9 – Matriz central compósita rotativa (CCRD) utilizada na modelação da acidólise e na otimização das condições reacionais e valores de tripalmitina consumida (% m/m) para cada ensaio, após 24h de reação, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit (Temperatura - T; Razão Molar – RM; PPP - tripalmitina).

Ensaio	T (°C)	RM PPP:AGL	PPP consumida (% m/m)
1	60	1:2	63,8
2	60	1:6	39,1
3	70	1:2	12,7
4	70	1:6	31,4
5	57,93	1:4	18,6
6	72,07	1:4	21,4
7	65	1:1,2	62,7

8	65	1:6,8	34,9
9	65	1:4	46,6
10	65	1:4	13,8
11	65	1:4	41,4

A partir da matriz apresentada (Quadro 9) foi possível ajustar um modelo aos dados experimentais. A segunda repetição do ponto central da matriz não foi considerada no modelo em causa, por apresentar uma discrepância acentuada relativamente aos valores das outras duas repetições. Isto poderá dever-se ao facto de o sistema reacional não ter permanecido termoestabilizado durante um período de tempo indeterminado.

No Quadro 10 estão representados os valores dos efeitos e respetivos valores de p para todas as variáveis testadas, após 24 horas de acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit.

Quadro 10 – Resultados dos efeitos e respetivos valores de p para as variáveis testadas na cinética da reação de acidólise entre a tripalmitina e AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit. (L-efeito linear; Q-efeito quadrático; T-temperatura; RM-razão molar; TxRM-interação entre T e RM).

Fator	Efeito	Valor de p
T (° C) (L)	-13,67	0,20
T (° C) (Q)	-22,72	0,13
RM (m/m) (L)	-11,32	0,28
RM (m/m) (Q)	6,03	0,65
T x RM	21,68	0,17

Apesar de nenhum dos fatores estudados (razão molar e temperatura) apresentar efeitos significativos na reação de acidólise, avaliada pelo consumo de tripalmitina (pois todos apresentam um valor de p superior a 0,05), para o ajuste do modelo da superfície de resposta apenas foi desprezado o termo quadrático do fator razão molar, por apresentar um valor de p extremamente elevado, de aproximadamente 0,65.

Apesar do fraco efeito que as variáveis em estudo parecem ter no consumo de tripalmitina, por análise dos resultados obtidos verificou-se que um aumento quer da temperatura quer da razão molar se traduz numa redução na resposta, isto é, num decréscimo da quantidade de tripalmitina consumida (% m/m), uma vez que tanto a temperatura e como a razão molar

apresentaram efeitos lineares negativos. Verifica-se também que a temperatura é a variável mais determinante no sistema reacional em estudo.

Na figura 22, encontram-se representadas a superfície de resposta relativa à quantidade de tripalmitina consumida, em função da temperatura e da razão molar, e a sua respectiva projeção. Tal como seria de esperar, a superfície obtida é convexa, uma vez que o único termo quadrático considerado no modelo, a temperatura, apresenta um efeito negativo.

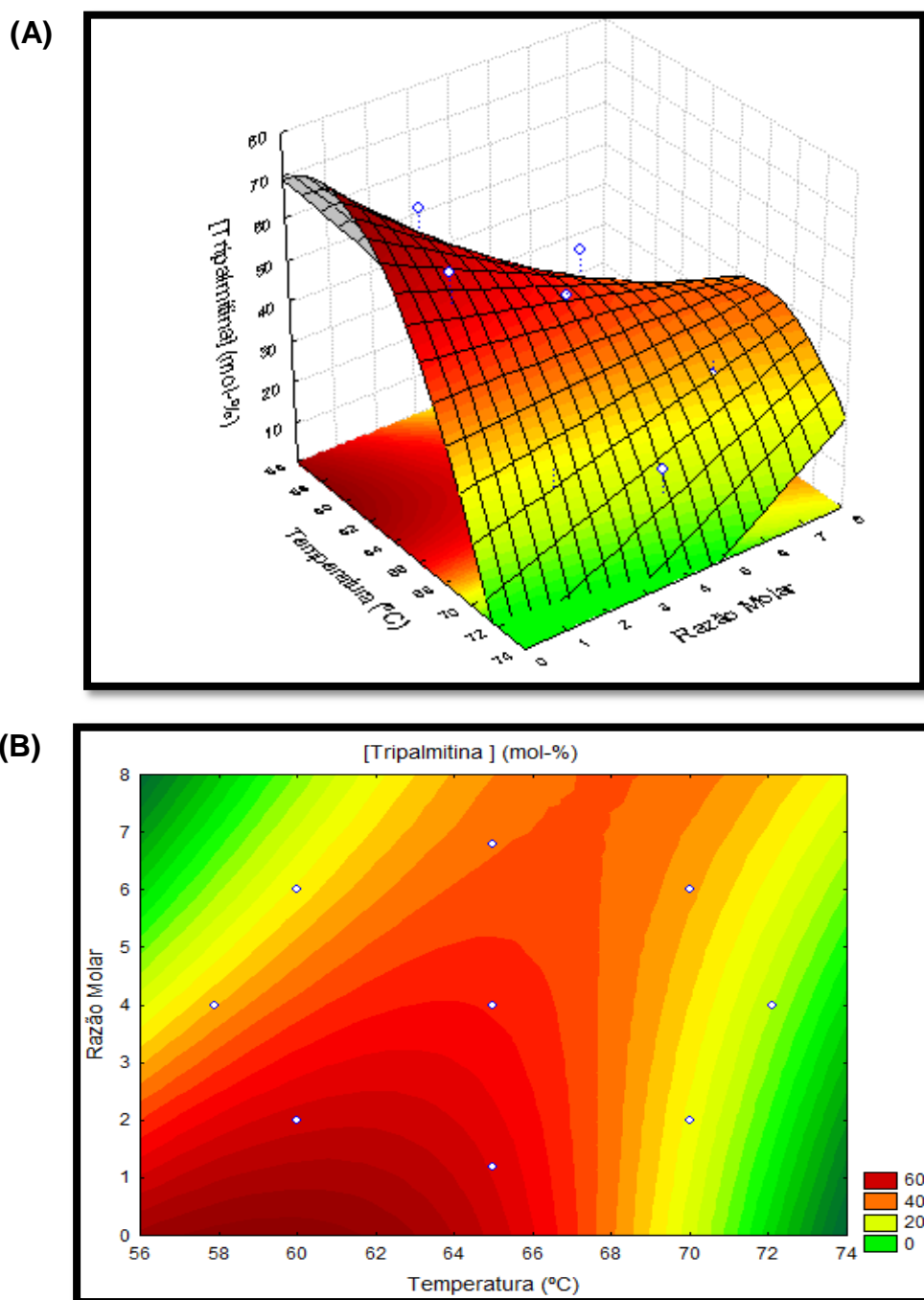


Figura 22 – (A) Superfície de resposta ajustada à quantidade de tripalmitina consumida por acidólise com AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL em Lewatit, em função da temperatura do meio reacional (° C) e da razão molar PPP:AGL (m/m) e (B) respetiva projeção.

Verifica-se que a quantidade de tripalmitina consumida após 24 horas de reação de interesterificação entre esta e os AGL do óleo de camelina, catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, em função da temperatura do meio reacional e da composição dos substratos, pode ser representada por uma superfície convexa descrita pelo seguinte polinômio de 2º grau:

$$\text{Tripalmitina consumida (\% m/m)} = - 1702,68 - 59,9 T - 0,5 T^2 - 73,29 RM + 1,08 (T \times RM)$$

(Eq. 4)

em que T representa a temperatura e RM a razão molar PPP:AGL. Os valores obtidos para R^2 e R^2_{ajustado} foram de apenas 0,742 e 0,536, respetivamente. Estes valores traduzem-se num ajuste mediano do modelo, ou seja, cerca de 74 % dos resultados experimentais são explicados pelo modelo. A figura 23 demonstra a relação existente entre os valores de tripalmitina consumida preditos pelo modelo e os observados experimentalmente.

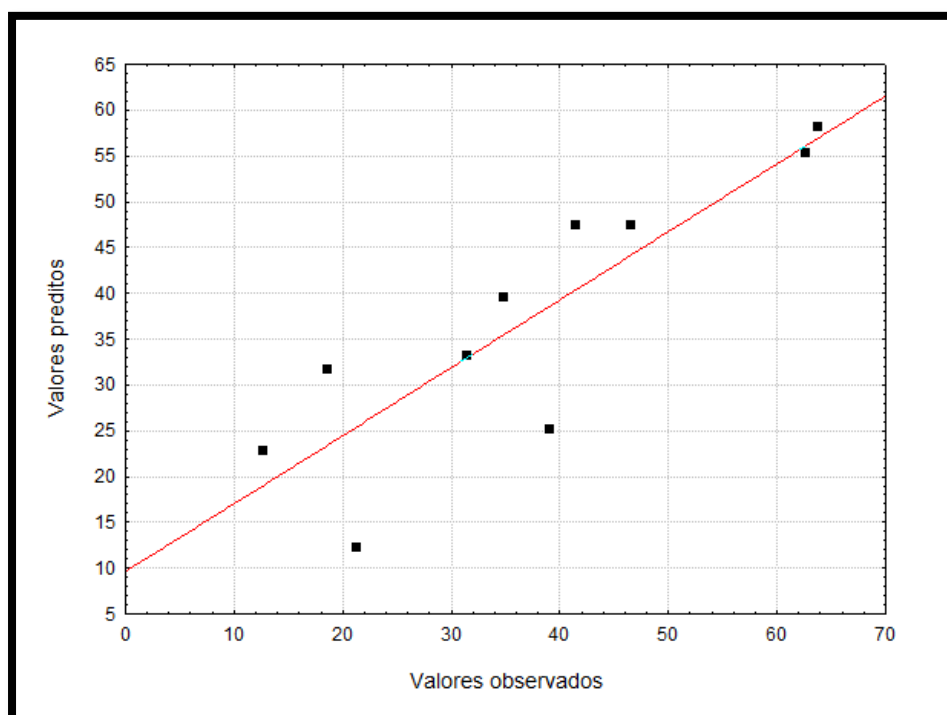


Figura 23 – Relação entre os valores de tripalmitina consumida preditos pelo modelo (% m/m) e os observados experimentalmente (% m/m).

Pela observação do quadro 9 e da figura 22, pode-se verificar que os maiores consumos de tripalmitina foram obtidos nos ensaios realizados com os valores mais baixos de temperatura e de razão molar testados, uma vez que estes dois fatores se apresentam inversamente relacionados com o consumo de tripalmitina (quadro 10). Assim, foi no ensaio 1 da CCRD, com

temperatura de 60° C e razão molar PPP:AGL de 1:2, que se obteve o valor mais elevado de tripalmitina consumida. Esta conclusão é bastante positiva, pois significa que todos os ensaios da presente tese realizados anteriormente foram executados de acordo com a temperatura e razão molar ótimas para a rROL. Como seria de esperar, o valor de tripalmitina consumida obtido no ensaio 1 da CCRD é bastante semelhante ao obtido para as 24 horas no ensaio time course (c.f. 4.3.).

Efeito da Temperatura

Regra geral, em reações catalisadas por enzimas, um aumento da temperatura traduz-se num aumento da conversão de substratos em produtos, o que contrasta com os resultados obtidos. Um aumento da temperatura provoca uma maior solubilidade do substrato, diminuindo a viscosidade do meio reacional e favorecendo uma maior transferência de massa, o que favorece a extensão da reação (Matsumoto e Ohashi, 2003). Além disso, segundo a lei de Arrhenius, um aumento da temperatura reacional resulta num efeito de aceleração das reações catalisadas por enzimas.

Não obstante, sabe-se que o aumento da temperatura provoca dois efeitos simultâneos mas contraditórios na reação (c.f. 2.3.2.2.4. Temperatura): provoca colisões entre os reagentes e a enzima, resultando num aumento da velocidade da reação e num maior consumo dos reagentes, ao mesmo tempo que pode igualmente acelerar a inativação enzimática (Malcata *et al.*, 1990).

Fixando a razão molar PPP:AGL de 1:2, a subida de temperatura de 60 para 70° C faz descer bruscamente a quantidade consumida de tripalmitina, de 63,8 para 12,7 % (m/m), valores mais alto e mais baixo de todos os 11 ensaios realizados, respetivamente. No caso da razão molar de 1:6, a mesma subida de temperatura provoca um decréscimo no consumo de tripalmitina, no entanto não tão pronunciado. Quando se fixa a razão molar de 1:4 e se aumenta a temperatura de 58° C para 65° C e depois para 72° C, a quantidade de tripalmitina consumida sofre primeiro um aumento e depois um decréscimo. Por estes resultados, podemos então supor que, até cerca de 65° C, o aumento da temperatura provoca um acréscimo da velocidade da reação que se sobrepõe ao acréscimo da taxa de desnaturação proteica, resultando num efeito conjugado positivo, ou seja, num aumento do consumo de tripalmitina. A partir de 65° C aproximadamente, o consecutivo aumento de temperatura parece provocar um acréscimo da velocidade da reação que já não é suficiente para se sobrepor ao acréscimo da taxa de desnaturação proteica, resultando num efeito conjugado negativo, ou seja, num decréscimo do consumo de tripalmitina por inativação da lipase.

Vários estudos realizados com a rROL demonstraram que melhores resultados se atingem com o decréscimo da temperatura. É o caso de Simões *et al.* (2013), cuja reação de acidólise enzimática entre a banha e um concentrado de óleo de peixe rico em PUFA, em meio livre de solvente, apresentou o maior valor de incorporação molar de PUFA (24 mol-%) para a

temperatura mínima testada (40° C). Nunes e colaboradores (2011) testaram o efeito de diferentes temperaturas na reação de acidólise entre azeite e ácido cáprico, catalisada por esta enzima, e o maior valor de incorporação molar de C10 foi novamente obtido a 40° C. Em 2007, Ghamgui e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre o biocatalisador rROL na sua forma livre e imobilizada em CaCO₃. Os resultados revelaram uma temperatura reacional ótima de 37° C em ambos os casos. Num estudo semelhante (Kharrat *et al.*, 2011) foi delineada a mesma matriz de teste, mas fazendo variar o suporte e utilizando solvente no meio reacional. Este estudo revelou também uma temperatura reacional ótima de 37° C. No caso do sistema em causa, não é possível empregar temperaturas do meio reacional tão baixas, por não permitirem a fusão da tripalmitina.

Efeito da Razão Molar

Tal como sucedeu no caso da temperatura, seria de esperar que um aumento da razão molar em AGL se traduzisse num maior consumo de tripalmitina, uma vez que o aumento da quantidade de um dos substratos tende a deslocar o equilíbrio reacional no sentido da formação de produtos (Yang *et al.*, 2003). No entanto, a tendência observada experimentalmente foi precisamente a inversa: para as temperaturas de 60°C e de 65°C, verifica-se um decréscimo acentuado da quantidade de tripalmitina consumida à medida que aumenta a razão molar utilizada. Simões *et al.* (2013) relataram a mesma tendência quando realizaram ensaios com valores de temperatura e de razão molar idênticos aos usados no presente trabalho e usando igualmente a rROL mas imobilizada em Accurel MP 1000. Tal poderá estar relacionado com uma inibição enzima-substrato ou perda de atividade por parte da lipase. Níveis elevados de AGL produzem níveis elevados de ácidos carboxílicos, o que pode acidificar o meio e a fase micro-aquosa que envolve a lipase, ou causar adsorções de água da interfase onde atua a lipase, o que limita a sua atividade (Simões *et al.*, 2013). Também já foi demonstrado que um elevado teor em AGL poderá ter um efeito inibitório na enzima, com conseqüente aumento do tempo de reação até se atingir o equilíbrio (Xu *et al.*, 2000).

Além disso, é importante notar que a presença excessiva de AGL, dos quais grande parte não irá reagir, não é desejável em termos de pureza do produto final obtido e do custo do processo de purificação (Ferreira-Dias, 2009), pois existe uma grande quantidade de AGL misturados com os TAG finais que se pretendem recuperar. O aumento da razão molar implica também um acréscimo no custo com substratos, o que encarece e inviabiliza o processo enzimático.

É importante referir que, nos ensaios realizados à temperatura de 70°C, o aumento da razão molar de 1:2 para 1:6 traduziu-se num aumento do consumo de tripalmitina. Pensa-se que tal terá acontecido porque a presença de maior quantidade de AGL no meio reacional (correspondente à razão molar de 1:6) é capaz de conseguir compensar, de certo modo, a perda de atividade causada pela temperatura elevada. De qualquer forma, não compensa na

totalidade, pois o valor de tripalmitina consumida obtido no ensaio realizado a 70°C e razão molar de 1:6 foi de apenas 31,42 % (m/m).

4.5. Influência da carga de enzima na cinética da reação de acidólise catalisada pela rROL

Pretendeu-se estudar o efeito da carga de lipase na cinética da reação de acidólise entre a tripalmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600. Para tal, realizou-se a referida reação empregando uma carga de enzima equivalente a 5 %, 8 % e 10 % em relação à massa de tripalmitina (que se manteve fixa, de acordo com o referido em 3.2.4.). As reações foram realizadas em duplicado, com uma duração de 24 horas e mantendo as condições reacionais usadas nos ensaios anteriores - temperatura de 60°C, pressão atmosférica, meio livre de solvente e razão molar PPP: AGL de 1:2.

É importante lembrar que todos os ensaios executados anteriormente foram realizados usando uma carga de enzima equivalente a 5 % em relação à massa de tripalmitina. Assim, em vez de se realizarem novamente as reações usando 5 % de rROL, aproveitaram-se os resultados referentes à amostra das 24 horas do “time course” (c.f. 4.3.) e os obtidos no ensaio 1 da CCRD (c.f. 4.4.), ambos realizados nas condições reacionais desejadas, procurando diminuir os gastos de enzima e de substratos, assim como o tempo despendido.

Para cada carga de enzima, determinou-se o consumo de tripalmitina (% m/m). Os resultados obtidos são apresentados no quadro 11.

Quadro 11 – Valores relativos ao consumo de tripalmitina (PPP) (% m/m) para cada carga de lipase usada, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2.

Carga de rROL (%)	Consumo de PPP (% m/m)
5%	62,00 ± 2,55
8%	87,9 ± 0,63
10%	88,4 ± 2,88

Tal como se pode observar pelo quadro 11, a quantidade de tripalmitina consumida aumentou bastante quando se substituiu a carga de 5 % usada anteriormente nas reações de acidólise por 8 % de rROL, passando de aproximadamente 62 % (m/m) para 87,9 % (m/m). Já o aumento da carga de lipase de 8 % para 10 % traduziu-se num aumento do consumo de tripalmitina insignificante, inferior a 1%.

Perante estes resultados, concluir-se-ia que a carga de lipase ideal, para o sistema reacional em causa, seria de 8 % em relação à quantidade de tripalmitina usada, pois origina um consumo de tripalmitina bastante elevado e promissor, de quase 100 %. O uso de 10 % de lipase não é compensatório, pois não se traduz numa melhoria significativa do consumo de substrato, em relação ao observado para a carga de 8 %.

No entanto, o aumento do consumo de tripalmitina provocado pelo aumento da carga de lipase pode traduzir-se ou não num acréscimo da formação de novos TAG (objetivo do presente trabalho), uma vez que a reação de acidólise em causa é complexa, originando-se outros produtos para além de TAG. Assim sendo, calculou-se a massa referente aos novos TAG formados como resultado da reação de acidólise, de acordo com o referido em 3.2.7 e os resultados encontram-se no quadro 12. Tal como referido neste mesmo tópico, a percentagem mássica de novos TAG em relação à quantidade de tripalmitina inicial pode ser denominada como grau de conversão da tripalmitina em novos TAG e, dada a sua importância para o presente estudo, os valores obtidos para as três cargas de lipase estudadas encontram-se na figura 24.

Quadro 12 – Valores relativos à formação de novos TAG para cada carga de lipase utilizada, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2.

Carga de rROL (%)	Massa de novos TAG (g) *	Percentagem mássica (%)	
		Em relação à PPP inicial	Em relação à massa total de amostra
5%	$1,9 \times 10^{-7} \pm 1,86 \times 10^{-8}$	$42,6 \pm 4,11$	$21,9 \pm 3,09$
8%	$2,8 \times 10^{-7} \pm 5,21 \times 10^{-8}$	$52,2 \pm 1,89$	$26,6 \pm 3,66$
10% **	$3,2 \times 10^{-7}$	69,24	32,99

* as massas apresentadas correspondem às massas detetadas na quantidade de amostra injetada no cromatógrafo gasoso (1 μ L).

** não foi possível calcular o desvio padrão para os dados referentes à carga de 10% de lipase pois desprezou-se o duplicado, por apresentar resultados discrepantes em relação às restantes amostras.

Pela observação dos dados do quadro 12, pode-se concluir-se que o aumento do consumo de tripalmitina, provocado pelo aumento da carga de rROL, é acompanhado por um aumento da formação de novos TAG como resultado da reação de acidólise, no sistema em estudo. De facto, com a carga de 5 % habitualmente usada nos ensaios deste estudo, apenas 42% da tripalmitina inicial originou novos TAG, enquanto nas reações usando 10 % de rROL se registou um grau de conversão da tripalmitina em novos TAG de aproximadamente 70 %. Isto

corresponde a um aumento da massa de novos TAG de $1,9 \times 10^{-7}$ para $3,2 \times 10^{-7}$ g, na quantidade de amostra analisada ($1 \mu\text{L}$).

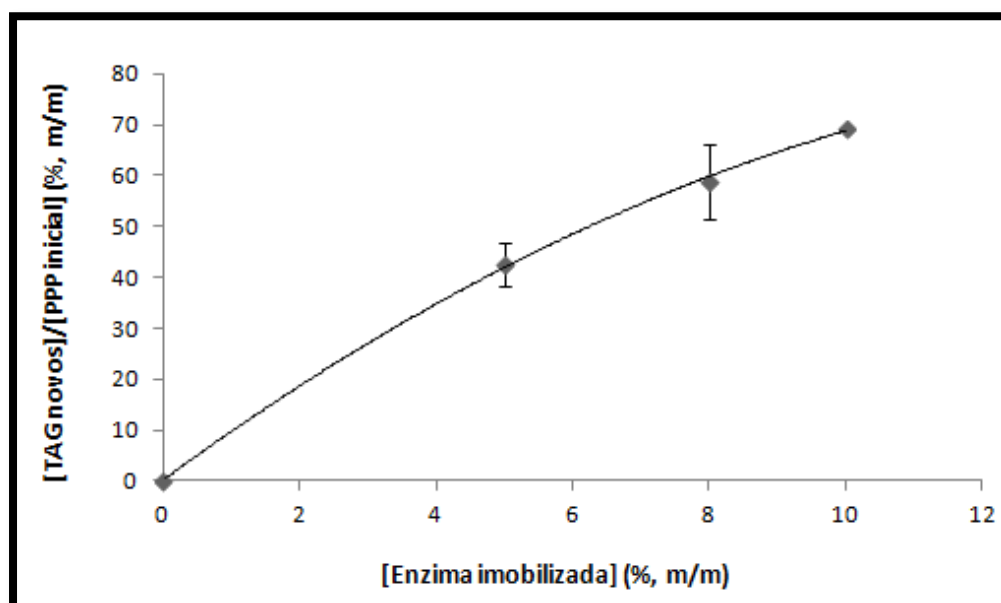


Figura 24 – Valores obtidos para o grau de conversão da tripalmitina em novos TAG para cada carga de lipase estudada, após 24 h de reação, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2.

No entanto, quando se observam os resultados obtidos referentes à percentagem mássica de novos TAG em relação à massa total de amostra (quadro 12), verificam-se valores bastante baixos. Para a carga de lipase de 5 %, a massa relativa aos TAG formados representa apenas cerca de 22 % da totalidade da amostra ao fim de 24 horas de reação. Quando se utilizou uma carga de lipase de 10 %, esta percentagem mássica sofreu um ligeiro aumento, para aproximadamente 33 %. Isto mostra que, para além do produto pretendido (os TAG), também se formam outros produtos como resultado da reação de acidólise, que no seu conjunto representam uma grande fatia da amostra total. São eles: MAG, DAG, ácido palmítico livre, tripalmitina residual e AGL (todos os AGL presentes na amostra, à exceção do ácido palmítico).

No sentido de aprofundar um pouco mais o estudo da influência da carga de lipase na cinética da reação, estudou-se a constituição do meio reacional no tempo zero e após 24 horas de reação, para cada carga de lipase. Os objetivos foram: (i) perceber a variação que os grupos de compostos supracitados sofrem durante a reação de acidólise em causa, (ii) a importância, em termos de massa, de cada um desses grupos de compostos no meio reacional final e (iii) a influência da carga de lipase nestes aspetos cinéticos. Os resultados foram obtidos de acordo com o referido em 3.2.7. e são apresentados no quadro 13.

No tempo zero, o meio reacional é praticamente composto por tripalmitina e ácidos gordos livres, em percentagens de aproximadamente 50 % e 47 % (5 % de ácido palmítico e 42 % dos restantes AGL) em relação à massa total de amostra, respetivamente. Foram detetados

ainda alguns MAG e DAG, numa percentagem de cerca de 2,2 % em relação à massa total de amostra. Estes compostos são possivelmente impurezas presentes na tripalmitina, uma vez que esta apresenta um grau de pureza igual ou superior a 85 % (c.f. 3.1.3.). De entre os vários picos correspondentes a MAG e a DAG, apenas foi possível identificar o pico relativo à monopalmitina, uma vez que apenas dispúnhamos de padrão para este composto.

Decorridas 24 horas de reação, observou-se obviamente um decréscimo na massa de tripalmitina presente no meio reacional, devido à quebra das ligações *sn*-1 e *sn*-3 por ação da rROL. Assim, a percentagem de 50 % de tripalmitina presente no meio reacional no tempo zero decresce para aproximadamente 22 %, 10 % e 4 % em relação à massa total de amostra, respetivamente para as cargas de rROL de 5 %, 8 % e 10 %. Estes valores encontram-se de acordo com o que se havia concluído aquando a observação do quadro 11, ou seja, maior quantidade de rROL origina um maior consumo de tripalmitina.

Consequentemente, a massa de ácido palmítico livre detetada no final da reação é superior à detetada no tempo zero. No tempo zero, o ácido palmítico presente é proveniente somente do óleo de camelina, uma vez que a rROL ainda não atuou. No final da reação, para além desse ácido palmítico, existe também todo o ácido palmítico que foi libertado devido à quebra das ligações *sn*-1 e *sn*-3 da tripalmitina e que não foi posteriormente re-esterificado. A massa de ácido palmítico livre será maior para a carga de 10 % de rROL, uma vez que o consumo de tripalmitina é superior. Assim, enquanto no tempo zero o ácido palmítico livre representa apenas 5 % de todo o meio reacional, às 24 horas representa aproximadamente 9 %, 28 % e 32 % em relação à massa total de amostra, respetivamente para as cargas de rROL de 5 %, 8 % e 10 %.

Tal como havia sido concluído pela observação do quadro 12 e da figura 25, o aumento do consumo de tripalmitina provocado pela utilização de maior massa de rROL provocou igualmente um aumento no grau de conversão de tripalmitina em novos TAG. Para a formação de novos TAG foram necessários os AGL provenientes do óleo de camelina que foram incorporados nas posições da tripalmitina onde anteriormente existia ácido palmítico. Por essa razão, a massa de AGL (à exceção do ácido palmítico) detetada ao fim de 24 horas de reação é inferior à detetada no tempo zero, sendo menor quando se utilizou maiores cargas de lipase, devido à formação de uma maior massa de novos TAG. Na verdade, a percentagem mássica de AGL é de 22,45 % (no final da reação com 10 % de rROL) e de 42 % (no final da reação com 5 % de rROL).

Por fim, observou-se que, paralelamente à formação de novos TAG, existiu também a formação de outros MAG e DAG que não se encontravam presentes no tempo zero, assim como um aumento da massa de monopalmitina, já detetada no início da reação. Tal como acontece com os TAG, também a formação de MAG e DAG parece ser favorecida pela presença de uma maior massa de rROL. Enquanto no tempo zero a massa destes compostos corresponde a

apenas 2 % da massa total de amostra, após 24 horas representa quase 10 % do meio reacional, quando se usa 8 % e 10 % de rROL.

Assim, com base nos dados disponíveis, concluiu-se que as cargas de lipase de 8 e 10 % originam resultados bastante melhores no âmbito da presente tese que a carga de 5 % de rROL. No entanto, dado o preço atual das lipases, talvez se deva optar pela carga de 8%, pois o aumento da massa de novos TAG conseguido pela mudança de 8 % para 10 % de lipase pode não compensar o aumento dos custos relacionados com a lipase e o respetivo suporte. Em qualquer um dos casos, os custos relativos à purificação dos TAG, ou seja, à sua separação relativamente ao resto da mistura, serão sempre elevados, uma vez que se formam muitos produtos intermédios de reação.

Quadro 13 – Composição do meio reacional (% m/m) no tempo zero e após 24 horas de reação de acidólise entre a tripalmitina e AGL do óleo de camelina, para cada carga de lipase estudada, a 60°C e pressão atmosférica, em meio livre de solvente, com razão molar PPP: AGL de 1:2.
(AP – ácido palmítico; PPP – tripalmitina)

		Novos TAG		AP livre		AGL*		MAG+DAG		PPP residual	
		Massa (g) **	% mássica	Massa (g) **	% mássica	Massa (g) **	% mássica	Massa (g) **	% mássica	Massa (g) **	% mássica
Tempo zero		---	---	$4,4 \times 10^{-7} \pm 1,17 \times 10^{-7}$	50,4 ± 2,79	$2,0 \times 10^{-8} \pm 3,92 \times 10^{-9}$	2,2 ± 0,15	$4,3 \times 10^{-8} \pm 7,24 \times 10^{-9}$	5,0 ± 0,32	$3,6 \times 10^{-7} \pm 5,68 \times 10^{-8}$	42,3 ± 2,40
Após 24 horas de acidólise	5% rROL	$1,9 \times 10^{-7} \pm 1,86 \times 10^{-8}$	21,9 ± 3,09	$1,7 \times 10^{-7} \pm 1,16 \times 10^{-8}$	24,3 ± 3,42	$1,7 \times 10^{-8} \pm 6,10 \times 10^{-10}$	3,3 ± 0,57	$7,4 \times 10^{-8} \pm 7,62 \times 10^{-8}$	8,5 ± 2,84	$3,3 \times 10^{-7} \pm 6,63 \times 10^{-8}$	42,0 ± 0,76
	8% rROL	$2,8 \times 10^{-7} \pm 5,21 \times 10^{-8}$	26,6 ± 3,66	$1,1 \times 10^{-7} \pm 5,55 \times 10^{-8}$	10,4 ± 5,73	$9,3 \times 10^{-8} \pm 1,01 \times 10^{-8}$	8,8 ± 0,53	$3,0 \times 10^{-7} \pm 2,82 \times 10^{-8}$	28,2 ± 1,33	$2,8 \times 10^{-7} \pm 1,53 \times 10^{-8}$	26,1 ± 0,21
	10% rROL ***	$2,86 \times 10^{-7}$	32,99	$3,13 \times 10^{-8}$	3,46	$8,85 \times 10^{-8}$	9,78	$2,92 \times 10^{-7}$	32,32	$2,56 \times 10^{-7}$	22,45

* diz respeito a todos os AGL à exceção do ácido palmítico.

** as massas apresentadas correspondem às massas detetadas na quantidade de amostra injetada no cromatógrafo gasoso (1 µL).

*** não foi possível calcular o desvio padrão para os dados referentes à carga de 10% de lipase pois desprezou-se o duplicado, por apresentar resultados discrepantes em relação às restantes amostra.

5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões gerais

O presente trabalho incidiu no estudo da reação de acidólise entre TAG da tripalmitina (utilizada como fonte de ácido palmítico) e um concentrado de AGL (obtido por saponificação do óleo de camelina), num meio livre de solvente e em reator descontínuo, com o objetivo de produzir lípidos estruturados adequados como substitutos de gordura de leite materno, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados ômega-3.

Como catalisadores, testou-se a preparação lipásica comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RM IM") e a uma enzima não comercial, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL), expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris* e imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Relizyme OD403/S. Ambas as lipases são termoestáveis e *sn*-1,3 seletivas.

A atividade catalítica das enzimas foi avaliada em termos do grau de incorporação de ácidos gordos do óleo de camelina nos TAG da tripalmitina. Os resultados obtidos para a incorporação molar total e para a percentagem de PUFA incorporados, de entre a totalidade de AGL incorporados, foram de 50,3 mol-% (40 % PUFA), 43,3 mol-% (27 % PUFA) e 19,5 mol-% (51 % PUFA) para a "Lipozyme™ RM IM", rROL imobilizada em Lewatit e rROL imobilizada em Relizyme, respetivamente.

Perante estes resultados, a rROL imobilizada em Relizyme parece ser a lipase com maior afinidade para a incorporação de PUFA, no entanto com resultados pouco promissores ao nível da incorporação molar total de AG. "Lipozyme™ RMIM" apresentou bons resultados mas, por ser uma lipase comercial de elevado custo, optou-se pela rROL imobilizada em Lewatit para ser empregue como biocatalisador para os ensaios da presente tese. Além de não comercial, esta lipase é relativamente nova e existem ainda poucos estudos sobre o seu uso na produção de HMFS.

Avaliou-se a influência da atividade da água inicial da rROL imobilizada em Lewatit na sua atividade catalítica. Ao realizar a reação de acidólise entre a tripalmitina e os AGL a quatro valores distintos de a_w - 0,56, 0,75, 0,81 e 0,92 - obtiveram-se incorporações molares de 17,5 mol-%, 21,1 mol-%, 35,5 mol-% e 51,4 mol-%, respetivamente.

Quanto à incorporação molar de PUFA, pode concluir-se que esta acompanhou o aumento da incorporação molar total provocado pelo aumento da a_w , correspondendo a 72-74 % relativamente ao valor de incorporação molar obtido para cada valor de a_w testado.

Concluiu-se que a atividade da água favorece a incorporação molar e, por essa razão, os restantes ensaios foram realizados com a a_w apresentada pela lipase imobilizada em Lewatit VP OC 1600: 0,946 (a temperatura de 30° C).

Realizou-se um ensaio cinético para o sistema reacional em causa, retirando-se amostras ao longo de 48 horas de reação. Para cada tempo, calculou-se a incorporação molar total e o consumo de tripalmitina, cujos valores máximos obtidos (correspondentes às 48 horas) foram 37 mol-% e 69,9 % (m/m), respetivamente. Às 24 horas, os valores registados foram de 26,4 mol-% e 60,2 % (m/m). Perante estes resultados, concluiu-se que os acréscimos conseguidos nas segundas 24 horas não compensavam o prolongamento da reação. Assim, assumiu-se que 24 horas seria a duração aconselhável para o sistema em causa.

Por ser uma lipase não comercial e sobre a qual existem ainda poucos estudos, realizou-se um ensaio de modelação e otimização da reação de acidólise catalisada pela rROL imobilizada em Lewatit, fazendo-se variar a razão molar PPP:AGL de 1:1,2 a 1:6,8 e a temperatura de 58° C a 72° C, com o objetivo de investigar se estas variáveis teriam efeitos significativos na cinética da reação de acidólise em causa.

A otimização das condições operacionais pela Metodologia das Superfícies de Resposta estabeleceu, como condições ótimas para a rROL no sistema em estudo, a temperatura de 60°C e razão molar PPP:AGL de 1:2, para as quais se atingiu o valor máximo de consumo de tripalmitina, correspondente a 63,8 % (m/m). Concluiu-se igualmente que tanto a razão molar como a temperatura têm um efeito negativo no consumo de tripalmitina, sendo o último, o fator mais significativo.

Testou-se a influência da carga de lipase na cinética da reação em estudo. Para tal, utilizou-se 5 %, 8 % e 10 % de rROL imobilizada em Lewatit em relação à massa de tripalmitina presente no meio reacional. Constatou-se que o aumento da carga de lipase de 5 % para 8 % favorecia bastante o consumo de tripalmitina, que aumentou de 62 % (m/m) para quase 88 % (m/m). No entanto, o aumento da carga de lipase de 8 % para 10 % traduziu-se num aumento de tripalmitina consumida inferior a 1 %.

O aumento da carga de lipase traduziu-se não só num maior consumo de tripalmitina mas também numa maior formação de novos TAG, produto de reação desejável no âmbito do presente trabalho. Para a carga de 5 % de rROL, apenas 43 % da tripalmitina inicial foi usada para a formação de novos TAG, enquanto no caso da carga de 10 % de rROL o grau de conversão da tripalmitina em novos TAG foi de aproximadamente 70 %.

Assim, concluiu-se que a melhor carga de lipase a usar no sistema reacional em estudo será de 10 %. No entanto, dado o preço atual das lipases, talvez se deva optar pela

carga de 8 %, pois o aumento da massa de novos TAG conseguido pelo uso de 10 % de rROL pode não compensar o aumento dos custos relacionados com a lipase e o respectivo suporte.

Por fim, constatou-se que, para além da formação de novos TAG, também ocorre formação de novos MAG e DAG, sendo esta igualmente favorecida pelo aumento da carga de rROL. Assim, no final da reação de acidólise em causa, para além dos TAG formados, existe uma mistura composta por MAG, DAG, tripalmitina residual e uma grande percentagem dos AGL iniciais que não foram incorporados, bem como uma grande percentagem de ácido palmítico libertado devido ao consumo de tripalmitina. Esta mistura representa uma grande fatia da massa total de meio reacional ao fim das 24 horas de reação, para qualquer uma das cargas de lipase estudadas. Tal não é benéfico, pois pressupõe elevados custos para a purificação do produto final.

Os resultados obtidos na presente tese mostraram que a atividade catalítica e a cinética da reação de acidólise considerada variam bastante consoante o biocatalisador usado, a duração da reação e as condições do meio reacional.

As características dos produtos obtidos neste estudo, relativamente à composição em ácidos gordos, parecem ser adequadas para a sua utilização em fórmulas para lactentes. Assim, os resultados sugerem que a rROL, imobilizada em Lewatit VP OC 1600, poderá ser um catalisador adequado à produção de HMFS a partir de tripalmitina e de ácidos gordos provenientes do óleo de camelina.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

O estudo desenvolvido no âmbito da presente tese coloca a possibilidade de se perspetivarem trabalhos futuros, no sentido de complementar o trabalho realizado, que poderão basear-se nas seguintes sugestões:

- Realizar testes de estabilidade operacional com a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, para complementar os resultados obtidos na presente tese, visto que o biocatalisador não deve ser escolhido tendo em conta apenas a sua atividade de interesterificação. Seria igualmente interessante e pertinente avaliar a regiodistribuição dos AG no esqueleto de glicerol, determinando os ácidos gordos incorporados na posição *sn*-2 dos TAG da tripalmitina, através da reação com a lipase pancreática, no sentido de confirmar a seletividade *sn*-1,3 da rROL no sistema reacional estudado.
- Implementar o sistema em descontínuo, otimizado nesta tese para a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, em reatores contínuos, uma vez que a

migração de grupos acilo se pode tornar problemática quando se trabalha com reatores em “batch” sucessivos, com conseqüente formação de produtos indesejados. O processo contínuo permite ainda a reutilização de lipases imobilizadas, sem necessidade de as separar do meio reacional, o que se traduz numa redução de custo e tempo.

- Repetir as reações de acidólise entre a tripalmitina e os AGL provenientes do óleo de camelina, catalisadas pela rROL imobilizada em Relizyme OD403/S, alterando as condições reacionais em relação às testadas no presente trabalho, procurando aumentar a sua atividade catalítica. Realizar igualmente testes de estabilidade operacional com a enzima imobilizada neste suporte.
- Testar a possibilidade de imobilização da rROL noutros suportes, para além de Lewatit VP OC 1600 e Relizyme OD403/S, estudando diferentes razões carga de lipase/suporte e repetindo posteriormente os ensaios realizados na presente tese.
- Para o sistema reacional estudado, testar outras preparações lipásicas imobilizadas, no sentido de encontrar preparações com elevada atividade de interesterificação e elevada estabilidade operacional, a menor custo que as preparações comerciais.
- Testar novas misturas reacionais, a submeter a interesterificação, usando por exemplo a banha, o óleo de palma ou as suas frações (como fontes de ácido palmítico mais económicas que a tripalmitina), com outros óleos vegetais (e.g. óleo de girassol, óleo de bolota, óleo de bagaço de azeitona, óleo de amendoim e azeite) ou concentrados de TAG ricos em ómega-3 PUFA comerciais, usando como catalisador a rROL ou outras preparações enzimáticas imobilizadas não comerciais.
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* dos HMFS produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, S., Okumura, K., Ota, V., Mankura, M., (1993), Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides, *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 259–264.
- Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E., (2002), Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction, *Biotechnol. Bioeng.*, 78: 403-411.
- Agostini, C., (2003), Compliance of present recommendations of fatty acids in formulas for term infants with the actual human milk fatty acid composition in different populations, *Acta Paediatr.*, 92: 785-789.
- Ahern, T. J., Klibanov, M., (1985), The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C, *Science*, 228: 1280-1284.
- Akimoto, K., Yamaguchi, T., Fujikawa, S., (1999), *European Patent* 0965 578 A1.
- Akoh, C. C., (1998), Structured lipids. In: *Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology* (Akoh, C. C. and Min, D. B., Eds.), Dekker, New York (EUA), 699-727.
- Akoh, C. C., (2002), Structured lipids, In: *Food Lipids*, (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Dekker, New York (EUA), 877-908.
- Akoh, C. C., Lee, K-T., Fomuso, L. B., (1998), Synthesis of positional isomers of structured lipids with lipases as biocatalysts, *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, AOCS Press, 46-72.
- Akoh, C. C., Xu, X., (2002), Enzymatic production of Betapol and other specialty fats, In: *Lipid Biotechnology*, (Kuo, T. M., Gardner, H.W., Eds.), Dekker, New York (EUA), 461-478.
- Arnau, C., Ramón, R., Casas, C., Valero, F., (2010), Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess, *Enzyme Microb. Technol.*, 46: 494-500.

- Bailey, J. E., Ollis, D. F., (1986), Applied enzyme catalysis. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*, (Verma, K., Martin, C. C.), McGraw-Hill International Editions., 157-227.
- Basu, H., Pernecky, S., Sengupta, A., Liepa, G. U., (2006), Coronary heart disease: how do the benefits of w-3 fatty acids compare with those of aspirin, alcohol/red wine, and statin drugs?, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 83: 985-997.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1991), Triglyceride interesterification by lipases, *Biocatalysis*, 5: 145-162
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Kiylogram-scale ester synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterification, *JAOCS*, 69 (10): 966-973.
- Bryhn, M. D., (2006), Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition, *Copyright Epax AS*, 1-8.
- Cambou, B., Klibanov, A. M., (1984), Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media, *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 2687-2692.
- Campos, P. R. B., (2010), Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilgliceróis estruturados funcionais, Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, Brasil.
- Carlson, S. E., (1996), Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids, *J. Nutr.*, 126: 1092S–1098S.
- Carvalho, N. B., (2011), Produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas, Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia De Processos, Universidade Tiradentes, Aracajú, Brasil.
- Chambon, M., (1996), Milk Fat - Sources of the main fats and relevant monographs, cap.3, In: *Oils and fats manual: a comprehensive treatise*, vol. 1, (Karleskind, A. Eds.), Intercept Ltd., Hampshire (UK), 277-286.

- Chapus, C., Semériva, M., Bovier-Lapierre, C., Desnuelle, P., (1976), Mechanism of pancreatic lipase action, cap.1, Interfacial activation of pancreatic lipase, *Biochemistry*, 15: 4980-4987.
- Christensen, M. W., Andersen, L., Husum, T. L., Kirk, O., (2003), Industrial lipase immobilization, *Eur J Lipid Sci Technol.*, 105(6): 318-321.
- Christensen, T. C., Holmer, G., (1993), Lipase catalyzed acyl-exchange reactions of butter oil. Synthesis of a human milk fat substitute for infant formulas, *Milchwissenschaft*, 48: 543–547.
- Christie, W. W., (1995), In: *Advanced dairy chemistry-2: Lipids*, (P. F. Fox Eds.), Chapman & Hall, London (UK).
- Comparini, A., Passos, G., Graziadei, H., Louzada, F., Metodologia de Superfície de Resposta: uma introdução nos softwares R e Statística, ICMC – USP – CP668 – CEP 13.566-590, São Carlos – SP – Brasil.
- Connor, W. E., Neuringer, M., Reisbeck, S., (1992), Essential FA: the importance of n-3 FA in the retina and brain, *Nutr. Rev.*, 50: 21.
- Correia, A. C., Ferreira-Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (A. Ballesteros, F.J. Plou, Iborra, J.L., P. Halling, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 71-76.
- Da Silva, R. C., Escobedo, J. P., Gioielli, L. A., (2007), Centesimal composition of milk and physico-chemical properties of its fat, *Quim. Nova*, 30 (7): 1535-1538.
- Da Silva, R. C., Gioielli, L. A., (2009), Structured lipids: alternatives for the production of human milk fat substitutes, *Quim. Nova*, 32 (5).
- DeMan, J. M., (1999), *Principles of Food Chemistry*, chapter 2, A.S.P.E.N Publications, 3rd Ed., pp.80.
- Doran, P. M., (1995), *Bioprocess Engineering Principles*, 1^a ed., London: Academic Press.

- Dünhaupt, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E., (1992), *Biological Reaction Engineering*, 56-59.
- Erickson, M. D., (1995), Interesterification. In: *Practical handbook of soybean processing and utilization*, (Erickson D. R., Eds.), AOCS Press and United Soybean Board, 277-296.
- Faber, K., (2004), *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5^a ed., Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Ferreira-Dias, S., (2004), Potencialidades de Utilização das Lipases na Produção de Lípidos para a Indústria Alimentar, Sumário da Lição de Síntese, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 3-12.
- Ferreira-Dias, S., (2009), Enzymatic Production of Functional Fats, In: *Food Biotechnology*, (A. Pandey, C. Larroche, C. R. Soccol, E. Gnansounou, P Nigam, Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Deli (India).
- Ferreira-Dias, S., Correia, A.C., da Fonseca, M.M.R., (2003), Response surface modeling of glycerolysis catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in diferente polyurethane foams for the production of partial glycerides, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21: 71-80.
- Ferreira-Dias, S., da Fonseca, M. M. R., (1995), Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: Effect of the water activity, *Bioprocess Eng.*, 12: 327–337.
- Forsyth, J. S., (1998), Lipids and infant formulas, *Nutr. Res. Rev.*, 11:255–278.
- Frankel, E. N., (1995), Natural and biological antioxidants in foods and biological systems, Their mechanism of action, applications and implications, *Lipid Technology*, 77–80.
- Gamboa, O. W. D., Gioielli, L. A. (2006), Comportamento de cristalização de lípidios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe, *Quím.Nova*, 29 (4): 646-653
- Ghazali, H. M., Hamidah, S., Che Man, Y. B., (1995), Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72: 633- 639.

- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., (2006), Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251.
- Haumann, B. F., (1994), Tools: hydrogenation, interesterification, *INFORM*, 5 (6): 668-678.
- Helland, I. B, Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O. D., Drevon, C. A., (2003), Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age, *Pediatrics*, 111: e39-e99.
- Holm, H. C., Cowan, D., (2008), The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, 110: 679-691.
- Howlett, J., (2008), Functional Foods: From Science to Health and Claims, ILSI Europe publications, pp.36.
- Huang, K., Akoh, C. C., (1994), Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 1277–1280.
- Hustedt, H. H., (1976), Interesterification of edible oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53: 390–392.
- Innis, S. M., (2008), Dietary omega-3 fatty acids and the developing brain, *Brain Research*, 1237: 35-43.
- Innis, S. M., Dyer, R., Quinlan, P., Diersen-Schade, D., (1995), Palmitic acid is absorbed as *sn*-2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride *sn*-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets, *J. Nutr.*, 125: 73-81.
- Innis, S.M., Vaghri, Z., King, D.J., (2004), n-6 Docosapentaenoic acid is not a predictor of low docosahexaenoic acid status in Canadian preschool children, *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 768–773.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T., (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends Biotechnol*, 16: 396–403.

- Jensen, R. G., (1989), Lipids in human milk—Composition and fatsoluble vitamins, In: *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*, 2nded, (Lebenthal, E., ed.), Raven Press, New York (United States of America), 157–208.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., and Lammi-Keefe, C. J., (1992), Lipids in Human Milk and Infant Formulas, *Annual Review of Nutrition*, 12: 417-441.
- Kellens, M., (2000), Interesterification: process conditions, *SCI Lecture Papers Series*, 114, pp.3.
- Kennedy, K., Fewtrell, M. S., Morley, R., Abott, R., Quinlan, P. T., Wells, J. C. K., Bindels, J. G., Lucas, A., (1999), Double-blind, randomized trial of a synthetic triacylglycerol in formula-fed term infants: Effects on stool biochemistry, stool characteristics and bone mineralization, *Am. J. Clin. Nutr.*, 70: 920–927.
- Kidd, D., Liu, Y., Cravatt, B. F., (2001), Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes, *Biochemistry*, 40: 4005-4015.
- Kim, B. H., Akoh, C. C., (2005), Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8033-8037.
- Kim, B. H., Akoh, C. C., (2006), Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5132-5141.
- Klibanov, A. M., (1986), Enzymatic reaction in organic media, In: *Protein Engineering Application in Science, Medicine and Industry*, (Inouye M., Sarma R., Eds.), Academic Press, 341-349.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., Mojović, L. V., (2004), Immobilized lipases as practical catalysts, *APTEFF*, 35: 151-164.
- Kremer, J. M., Lawrence, D. A., Jubiz, W., DiGiacomo, R., Rynes, R., Bartholomew, L. E., Sherman, M., (1990), Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheu.*, 33: 810-820.
- Lee, K. T., Akoh, C. C., (1998), Structured lipids: synthesis and applications, *Food Rev Int.*, 14(1): 17-34.

- Linfield, W. M., (1988), Enzymatic Fat Splitting, In: *Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry*, (Apple White, T. H., Eds.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Il., USA, 131-133.
- Lopez-Hernandez, A., Otero, C., Hernández-Martín, E., Garcia, H. S., Hill Jr., C. G., (2007), Interesterification in batch and continuous flow processes of sesame oil and fully hydrogenated fat catalyzed by immobilized lipase, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 1147-1159.
- Luna, P., Juárez, M., De la Fuente, M. A., (2007), Fatty acid and conjugated linoleic acid isomer profiles in human milk fat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 1160-1166.
- Macrae, A. R., (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60: 291-294.
- Maduko, C. O., Akoh, C. C., Park, Y. W., (2007), Enzymatic interesterification of tripalmitin with vegetable oil blends for formulation of caprine milk infant formula analogs, *J. Dairy Sci.*, 90: 594–601.
- Maeiro, M. I. S., (2008), Interesterificação de gorduras ricas em ácidos gordos ómega-3, catalisada pela lipase de *Aspergillus Niger* imobilizada em diferentes suportes, Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Vegetais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 1-8.
- Makrides, M., Neumann, M. A., Gibson, R. A., (1996), Is dietary docosahexaenoic acid essential for term infants, *Lipids*, 31: 115–119.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Amundson, H., (1990), Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review, *JAOCS*, 67 (12): 890-910.
- Marangoni, A. G., Rousseau, D., (1995), Engineering of Triacylglycerols: The role of interesterification, *Trends in Food Science & Technology*, 6 (10): 329-335.
- Martinek, K., Semenov, A. N., Berezin, I. V. (1981). Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 658: 76:89.

- Megraud, F., Boudara, G., Bessand, K., Bensid, S., Dabis, F., Soltana, R., Touhahmi, M., (1990), Incidence of bacterial infection in infants in Western Algeria and the possible protective role of breastfeeding, *J. Epidemiol. Infect.*, 105: 73–78.
- Messias, J. M., Costa, B. Z., Lima, V. M. G., Giese, E. C., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., (2011), Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications, *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, 32 (2): 213-234.
- Moraes, F., Colla, L., (2006), Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios para a saúde, *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3 (2): 109-122.
- Moreno, P. A., Medina, A. R., Rubio, F. C., Páez, B. C., Grima, E. M., (2004), Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes, *Biotechnol. Prog.*, 20: 1044-1052.
- Mu, H., (2010), Production and nutritional aspects of human milk fat substitutes, *Lipid Technology*, 22: 126-129.
- Mukherjee, K. D., Kiewitt, I., (1998), Structured triacylglycerols resembling human milk fat by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex, *Biotechnol. Lett.*, 20: 613-616.
- Nagachinta, S., Akoh, C. C., (2013), Production and Characterization of DHA and GLA-Enriched Structured Lipid from Palm Olein for Infant Formula Use, *J Am Oil Chem Soc*, 90: 1141–1149.
- Nascimento, A. C., Tecelão, C. S. R., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S., (2004), Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing n-3 fatty acids monitored by their Solid Fat Content, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 106: 599-612.
- Nawar, W. W., (1996), Lipids. In: *Food chemistry*, 3.^a Ed, (FENNEMA O. R. Eds.), Dekker, New York (EUA), 225-319.
- Neidleman, S. L., (1991), Enzymes in the food industry: a backward glance, *Food Technology*, 45: 88-91.

- Nestel, P. J., (2000), Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function, *Am J Clin Nutr*, 71(Suppl): 228S-31S.
- 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 Chem.*, 94: 53-60.
- Nunes, P. A, Pires-Cabral, P., Ferreira-Dias, S., (2011), Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases, *Food Chemistry*, 127(3), 993-998.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Guillén, M., Valero, F., Ferreira-Dias, S., (2012), Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids, *Biochemical Engineering Journal*, 67: 265–268.
- O’Shea, M., Gerritsen, J., Mohede, I., (2005), Clinical benefits of a structured lipid (Betapol) in infant formula, *In: Handbook of Functional Lipids*, (Akoh, C. C., Ed.) CRC Taylor & Francis Group, New York (EUA), 261-278.
- 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*, 3: 93-103.
- Osório, N. M., da Fonseca, M. M., Ferreira-Dias, S., (2006), Operational Stability of *Thermomyces lanuginosa* Lipase during Fats Interesterification in Continuous-Packed-Bed Reactors, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 108: 545-553
- Osório, N. M., Dubreucq, E., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S., (2009), Lipase/acyltransferase-catalysed interesterification of fat blends containing n-3 polyunsaturated fatty acids, *Eur J Lipid Sci Technol.*, 111: 120–134.
- Osório, N. M., Ferreira-Dias, S., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., (2001), Response surface modelling of the production of w-3 polyunsaturated fatty acids enriched fats by a commercial immobilized lipase, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 677-686.
- 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, *J Am Oil Chem Soc*, 90: 1311–1318.

- Parker, K. J., Birch, G. G., (1983), Control of food quality and food analysis, *Elsevier Applied Science Publishers*, London & New York, 226-229.
- Pavaresh, F., Robert, H., Thomas, D., Legoy, M. D., (1992), Gas-phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, 39: 467-473.
- Pérignon, M., Lecomte, J., Pina, M., Renault, A., Villeneuve, P., (2013), Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B Lipases in Interesterification Reactions: Effect of the Aqueous Microenvironment, *J Am Oil Chem Soc*, 90: 1151–1156.
- Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (2007), A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, 97: 235-241.
- Pires-Cabral, P., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S., (2007), Modelling the Production of Ethyl Butyrate Catalysed by *Candida rugosa* Lipase Immobilised in Polyurethane Foams, *Biochemical Engineering Journal*, 33: 148-158.
- Posorske, L. H., LeFebvre, G. K., Miller, C. A., Hansen, T. T., Glenvig, B. L., (1988), Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 65: 922-926.
- Product information Lewatit VP OC 1600, (2013), Lennetech, Rotterdamseweg, Netherlands
- Product information Relizyme TM and Sepabeads EC, Resindion S.R.L., Rome, Italy
- Quinlan, P., (1993), Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats, *INFORM*, 4(5): 580-585.
- Quinlan, P., Moore, S., (1993), Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats, *INFORM*, 4: 580–585.

- Quinlan, P. T., Lockton, S., Irwin, J., Lucas, A. L., (1995), The relationship between stool hardness and stool composition in breast and formula-fed infants, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, 20: 81–90.
- Roche, H. M., Gibney, M. J., (2000), Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *Am J Clin Nutr*, 71(Suppl): 232S-7S.
- Rodrigues, J. M. M., (2011), Produção enzimática de lípidos estruturados, ricos em ácidos gordos polinsaturados ômega-3, em reator de alta pressão, Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 15-29.
- Rosevear, A., Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S., Hilger, A., (1987), Types of stability In: *Immobilised Enzymes and Cells*, Bristol and Philadelphia, 148-170.
- Rozenaal, A., (1992), Interesterification of oils and fats, *INFORM*, 3(11): 1232-1237.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., Millington, K. J., (2007), The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence, *J Hum Nutr Dietet*, 20:275-285.
- Sahín, N., Akoh, C. C., Karaali, A., (2005a), Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5779-5783.
- Sahín, N., Akoh, C. C., Karaali, A., (2005b), Enzymatic production of human milk fat substitutes, containing g-linolenic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 82: 549-557.
- Sahín, N., Akoh, C. C., Karaali, A. (2006), Human milk fat substitutes containing omega-3 fatty acids, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3717-3722.
- Sellapan, S., Akoh, C., (2001), Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalysed by Lipozyme IM60, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2071-2076.
- Semériva, M., Desnuelle, P., (1979), Pancreatic lipase and colipase, An example of heterogeneous biocatalysis, *Adv. Enzymol.*, 48: 319-370.

- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., (2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S., Tominaga, Y., (2000), Enzymatic Synthesis of Structured Lipid Containing Arachidonic and Palmitic Acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77: 89–93.
- Silva, F. A. M., Borges, M. F. M., Ferreira, M. A., (1999), Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, *Química Nova*, 22 (1): 94-103.
- Simões, T., Valero, F., Tecelão, C., Ferreira-Dias, S., (2013), Production of Human Milk Fat Substitutes Catalyzed by a Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase and Commercial Lipases, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Published online.
- Simopoulos, A. P., (1998), Overview of evolutionary aspects of w-3 fatty acids in the diets. In: *The Return of w-3 Fatty Acids into the Food Supply*, I, Land-based Animal Food Products and their Health Effects, (Simopoulos A. P, Eds.), *World Rev. Nutr. Diet*, Basel (Switzerland), 1-11.
- Sonntag, N. O. V., (1979), Structure and composition of fats and oils, In: *Bailey's industrial oil and fat products*, (SWERN, D., Eds), Wiley-Interscience, 4 ed, New York (EUA), v.1, 1-98.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Menge, U., Schmid, R. D., (1997), Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 427-433.
- Souza, P. H. M., Souza Neto, M. H., Maia, G. A., (2003), Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*, 37 (2):127-135.
- Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Lipase-catalysed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 986-991.
- 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., Valero, F., Sandoval, G., Ferreira-Dias, S., (2012b), Producción de sucedáneos de grasa de leche humana catalizados por lipasas, Obtención Enzimática de Compuestos Bioactivos a partir de Recursos Naturales Iberoamericanos, *Editorial CSIC*, Madrid, 4: 101-116.
- Tomarelli, R. M., Meyer, B. J., Weaber, J. R., Bernhart, W., (2013), Effect of Positional Distribution on the Absorption of the Fatty Acids of Human Milk and Infant Formulas, *The Journal Of Nutrition*, 95: 583-590.
- Torres, C. F., Lin, B., Moeljadi, M., Hill Jr., C. G., (2003), Lipase-catalyzed synthesis of designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, and/or stearic acids, *Eur. J. Lipid Sci.Technol*, 105: 614-623.
- Torres, C. F., Munir, F., Blanco, R. M., Otero, C., Jr, C. G. H., (2002), Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginose*, *J Am Oil Chem Soc.*, 79: 775–781.
- Turner, N. A; Duchateau, D. B., Vulfson, E. N., (1995), Effects of hydration on thermostability on serine esterases, *Biotech Letts*, 17: 371-376.
- Ucciani, E., Debal, A., (1996), Chemical properties of fats, In: *Oils and Fats Manual*, Vol.I, (A. Karlesking, ed.), Lavoisier Publishing, Paris (França), 1-65.
- Valenzuela B. A., (2009), Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper functioning of neuronal cells: their role in mood disorders, *Grasas y Aceites*, 60: 203-212.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D., Macrae, A. R., (1992), Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1122: 143-146.
- Vicente, M. S. L. F-D, (1994), Produção de monoacilgliceróis por glicerólise de azeite catalisada por lipases imobilizadas, Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 10-12.
- Wagner, C. L., Graham, E. M., (2004), HopeWW.Human breastmilk and lactation. EMedicin:(<http://www.emedicine.com/ped/topic2594.htm#section~bibliography>.)

- Wang, Y., Gordon, M. H., (1991), Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1693-1695.
- Ward, O. P., Singh, A., (2005), Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production, *Process Biochemistry*, 40: 3627-3652.
- Weber, P. C., Leaf, A., (1991), World Review of Nutrition and Dietetics In: *Health Effects of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, (A. P. Simopoulos, R. E. Martin, S. M. Barlow, Eds.), 66: 218-232.
- Willis, W. M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G., (1998), Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, 38: 1-36.
- Willis, W. M., Marangoni, A.G., (1999), Assessment of lipase – and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (4): 443-450.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W., (1990), Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, 343: 771-774.
- Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D., (1987), Enzymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, 29: 1081-1085.
- Xu, X., (2000), Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur J Lipid Sci Technol.*, 102: 287-303.
- Xu, X., (2003), Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105: 289-304.
- Xu, X., Fomuso, L. B., Akoh, C. C., (2000), Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a peacked bed reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77: 171-176.
- Xu, X., Porsgaard, T., Zang, H., Adler-Nisse, J., Hoy, C.-E., (2002), Production of structured lipids in a packed-bed reactor with *Thermomyces lanuginosa* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79: 561-565.

- Yamane, T., (1988), Importance of moisture contents control for enzymatic reactions in organic solvents, a novel concept of “microaqueous”, *Biocatalysis*, 2 (1): 1-8.
- Zaks, A., Klibanov, A. M., (1985), Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3192-3196.
- Zeijdner, E. E., Houwelingen, A. C., Kester, A. D. M., Hornstra, G., (1997), Essential fatty acid status in plasma phospholipids of mother and neonate after multiple pregnancy, *Prostaglandins, Leuk. Essent. Fatty Acids*, 56: 395-401.

Cibergrafia:

- <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/camelina-cameline-eng.php> (consultado em setembro de 2013)~
- www.lipidnutrition.com, ref:510-1-200610 (consultado em outubro de 2013)
- www.lipidnutrition.com, ref:540-2-200809 (consultado em outubro de 2013)
- <http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Grad/aula6.pdf> (consultado em novembro de 2013)
- <http://www.slideshare.net/catir/enzimas-302665> (consultado em novembro de 2013)
- <http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/effectspH.html> (consultado em novembro de 2013)
- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1461.pdf> (consultado em novembro de 2013).