

Bioacessibilidade de ácidos gordos n-3 PUFA em produtos da pesca e aquacultura com diferentes teores de gordura

Sara Vanessa Botelho Martins

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora auxiliar no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.

Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Júri:

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

Vogais: Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora auxiliar no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.

Doutora Helena Maria Gomes Lourenço, Investigadora auxiliar no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com apoios e incentivos essenciais, sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais agradeço desde já.

Agradeço ao IPMA pelo acolhimento e pela oportunidade concedida, permitindo um contato direto com a área de investigação.

À Dr.^a. Narcisa Maria Mestre Bandarra, minha orientadora, por ter-me possibilitado a realização deste projeto, pela forma como tão bem me recebeu e pela preocupação de desenvolver o trabalho com tempo e qualidade. Obrigada pela confiança, incentivo e paciência.

À Professora Dr.^a. Luísa Louro Martins, pela sua orientação, por todo o acompanhamento ao longo do meu percurso académico, pela disponibilidade e sobretudo por ter sido uma força motriz para esta etapa final.

Ao Dr. Carlos Cardoso e à Dr.^a. Cláudia Afonso, investigadores do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pela sua disponibilidade, ajuda e simpatia. Obrigada por tudo, nomeadamente pelo acompanhamento e orientação, principalmente na parte prática desta tese.

Aos meus Pais, o meu profundo agradecimento por todo o amor, carinho, apoio e conselhos que me deram. Por terem sempre acreditado nas minhas capacidades e terem sempre uma palavra amiga e encorajadora. Por me terem permitido crescer numa família unida e estruturada que me fez ser quem eu sou.

A todos aqueles que fizeram parte do meu percurso no ISA, mas em especial aos que levo comigo, o meu muito obrigada. Como sempre ouvi dizer “O que o ISA constrói, nada destrói”.

Glossário de Abreviaturas

De seguida listam-se as abreviaturas utilizadas ao longo desta dissertação, por ordem alfabética, seguidas do seu significado e da respetiva tradução. Optou-se por mantê-las na forma como são internacionalmente reconhecidas.

CH – *Cholesterol* (colesterol)

DAG – *Diacylglycerol* (diacilglicerol)

DHA – *Docosahexaenoic acid* (ácido docosahexaenóico), 22:6 ω 3

EPA – *Eicosapentaenoic acid* (ácido eicosapentaenóico), 20:5 ω 3

FAME – *Fatty acid methyl esters* (Ésteres Metílicos dos Ácidos Gordos)

FFA – *Free Fatty Acids* (Ácidos gordos livres)

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

MAG – *Monoacylglycerol* (monoacilglicerol)

MUFA – *Monounsaturated Fatty Acids* (Ácidos Gordos Monoinsaturados)

NP – Norma Portuguesa

PL - *Phospholipids* (Fosfolípidos)

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos Gordos Polinsaturados)

SFA – *Saturated Fatty Acids* (Ácidos Gordos Saturados)

TAG – *Triacylglycerol* (Triacilglicerol)

TLC - *Thin Layer Chromatography* (Cromatografia de camada fina)

Resumo

A composição química e nutricional de um alimento não nos garante que todos os seus compostos e nutrientes sejam totalmente absorvidos pelo organismo humano, uma vez que, ao longo do processo digestivo, os nutrientes vão sofrendo alterações na sua matriz.

Esta dissertação teve como principal objetivo o estudo da bioacessibilidade dos ácidos gordos em pescado com diferentes teores de gordura, devido à importância que a composição lipídica apresenta neste tipo de alimentos. Assim, foram submetidos a um modelo digestivo *in vitro* três amostras de sardinha (*Sardina pilchardus*) e uma amostra de salmão de aquacultura (*Salmonidae*).

Verificou-se que quanto maior a percentagem de gordura a amostra estudada tiver, maior também a percentagem de TAG, considerados lípidos de reserva, e que são mais facilmente digeridos. Por outro lado, os ácidos gordos presentes na classe dos PL são menos acessíveis, uma vez que são essencialmente lípidos estruturais, localizados mais internamente no músculo do peixe.

Relativamente à bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega-3, concluiu-se que nem todos os ácidos gordos que constituíam a matriz inicial ficam bioacessíveis.

Contudo, na amostra de sardinha com menor teor de gordura, a taxa de bioacessibilidade do EPA foi de 126 % e do DHA foi de 118 %, o que demonstra que este modelo necessita de uma otimização para matrizes com baixos teores de gordura.

Nas restantes amostras verificou-se uma taxa de bioacessibilidade do EPA entre 67% e 88 % e do DHA entre 51% e 75 %.

Palavras-chave: bioacessibilidade, pescado, ácidos gordos ómega-3, EPA, DHA.

Abstract

The chemical and nutritional composition of a food does not guarantee that all its compounds and nutrients are fully absorbed by the human organism, since, throughout the digestive process, the nutrients undergo changes in their matrix.

This dissertation had as main objective the study of the bioaccessibility of fatty acids in fish with different levels of fat, due to the importance that the lipid composition presents in this type of food. Thus, three samples of sardines (*Sardina pilchardus*) and one sample of aquaculture salmon (*Salmonidae*) were submitted to an *in vitro* digestive model.

It was found that the higher the percentage of fat the sample studied has, the higher the percentage of TAG, considered reserve lipids, and which are more easily digested. On the other hand, the fatty acids present in the PL class are less accessible, since they are essentially structural lipids, located more internally in the fish muscle.

Regarding the bioaccessibility of omega-3 fatty acids, it was concluded that not all fatty acids that constituted the initial matrix are bioaccessible.

However, in the sample of sardines with lower fat content, the bioaccessibility rate of EPA was 126% and DHA was 118%, which demonstrates that this model needs optimization for matrices with low fat content.

The remaining samples showed a bioaccessibility rate of EPA between 67% and 88% and DHA between 51% and 75%.

Keywords: bioaccessibility, fish, omega-3 fatty acids, EPA, DHA.

Índice	
Agradecimentos	i
Glossário de Abreviaturas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
1. Introdução	9
1.1. Composição Química do Pescado	10
1.1.1. Água.....	10
1.1.2. Proteínas.....	11
1.1.3. Lípidos.....	12
1.1.3.1. Ácidos Gordos.....	13
1.1.3.2. Benefícios para a saúde.....	15
1.2. Digestão Humana	16
1.3. Digestão <i>in vitro</i>	21
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	22
3.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários	22
3.2 Composição Química	24
3.2.1 Humidade.....	24
3.2.2 Cinza Total	24
3.2.3 Proteína Bruta	25
3.2.4 Gordura / Teor de lípidos Totais	26
3.3 Bioacessibilidade – Método de digestão <i>in vitro</i>	26
3.4 Extração da gordura do bioacessível	28
3.5 Determinação das classes de lípidos por cromatografia em camada fina (thin layer chromatography – TLC)	29
3.6 Determinação dos Ácidos Gordos	30
3.7. Tratamento Estatístico	31
4. Discussão de Resultados	32
4.1. Composição Química	32
4.2. Ensaio de bioacessibilidade	35
4.2.1. Identificação das classes lipídicas	35

4.2.2. Perfil de ácidos gordos	37
5. CONCLUSÕES.....	43

Índice de Figuras

Figura 1 - Consumo de produtos da pesca e da aquicultura em 2010	9
Figura 2 - Estrutura de um Triacilglicerol (TAG)	13
Figura 3 - Representação esquemática da biossíntese dos ácidos gordos das famílias $\omega 6$ e $\omega 3$	14
Figura 4 - Digestão, Secreção e Absorção no aparelho digestivo	18
Figura 5 - Digestão de triacilgliceróis	19
Figura 6 - Processo do Transporte de Lípidos	20
Figura 7 - TLC analítica inicial das amostras de sardinha e de salmão	36
Figura 8 - TLC analítica do bioacessível das amostras de sardinha e de salmão	36
Figura 9 - Percentagem relativa das classes lipídicas das amostras estudadas.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos	27
Tabela 2 - Composição química aproximada de humidade, proteína, lípidos e cinza (g/100 g peso fresco) das amostras de atum cru, cozido e grelhado.....	33
Tabela 3 - Composição química aproximada de humidade, proteína, lípidos e cinza (g/100 g peso fresco) das amostras de sardinha e salmão.	34
Tabela 4 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 1 (mg/100 g)	38
Tabela 5 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 2 (mg/100 g)	39
Tabela 6 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 3 (mg/100 g)	40
Tabela 7 - Perfil de ácidos gordos do salmão (mg/100 g).....	41
Tabela 8 - Percentagem de bioacessível dos principais ácidos gordos.....	42

1. Introdução

A designação “produto de pesca” de acordo com o DL. nº 375/98 de 24 de novembro, compreende “todos os animais ou partes de animais marinhos ou de água doce, incluindo as suas ovas e leitugas, com exclusão dos mamíferos aquáticos, das rãs e dos outros animais aquáticos abrangidos por regulamentação comunitária específica”.

De acordo com o mesmo decreto, entende-se por produtos de aquicultura “todos os produtos da pesca cujos nascimento e crescimento são controlados pelo homem até à sua colocação no mercado como género alimentício, sendo os peixes ou crustáceos de água do mar ou de água doce capturados quando juvenis ou no seu meio natural e mantidos em cativeiro até atingirem o tamanho comercial pretendido para consumo humano considerados produtos de aquicultura. Os peixes e crustáceos de tamanho comercial capturados no seu meio natural e mantidos vivos para serem vendidos posteriormente não são considerados produtos de aquicultura se a sua permanência nos viveiros tiver como único objetivo mantê-los vivos, e não fazê-los aumentar de tamanho ou de peso”.

Dada a localização geográfica de Portugal junto ao oceano Atlântico, com uma linha de costa de 2830 km, o consumo de pescado, fresco ou em diversas formas de conservação, sempre teve um papel proeminente na alimentação da população portuguesa e na preparação de muitas refeições familiares. Existem ao longo da costa muitas comunidades que têm na pesca a sua principal actividade (DGPA, 2015; ASAE, 2012; Nunes et al. 2008)

A média de peixe ou marisco consumidos, por pessoa e por ano, mundialmente é de cerca de 19 kg, um valor inferior ao observado na União Europeia, que ronda os 24,9 kg (CE, 2014; CE, 2016).

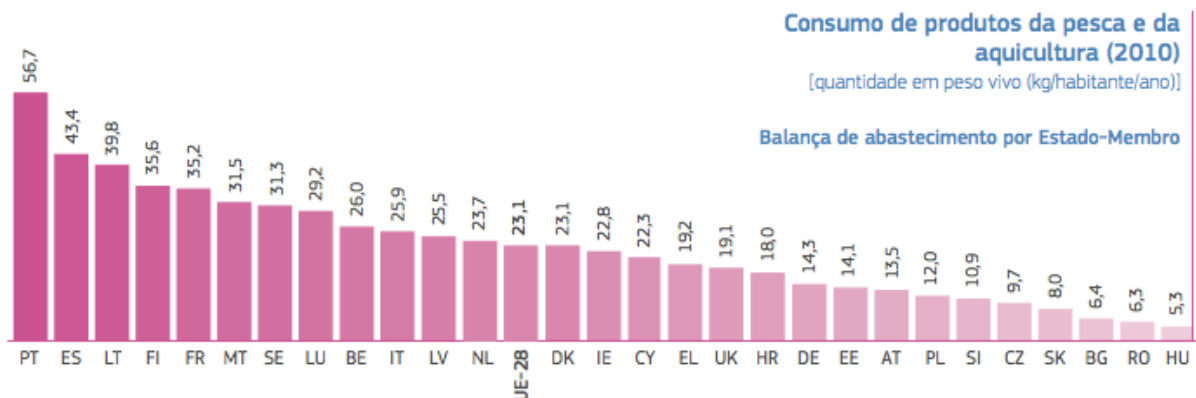


Figura 1 - Consumo de produtos da pesca e da aquicultura em 2010 (CE, 2014)

Como é possível observar na figura 1, Portugal é o país da União Europeia com o consumo *per capita* de pescado mais elevado, cerca de 57 kg/ano, seguido da vizinha Espanha, com mais de 10 % de diferença. Este consumo coloca Portugal no 3º lugar a nível mundial, depois do Japão e da Islândia (CE, 2014; DGPA, 2015).

Por outro lado, a produção nacional de pescado é idêntica à média comunitária, ou seja, permite satisfazer uma procura per capita na ordem dos 23 kg/ano. Este valor é, como observado anteriormente, insuficiente face ao elevado consumo nacional registado (DGPA, 2015).

1.1. Composição Química do Pescado

Um regime alimentar que inclua a maioria dos nutrientes é fundamental ao bem-estar e bom funcionamento do organismo humano. A composição química dos alimentos, nomeadamente a composição da gordura, as características das proteínas e a presença de algumas substâncias minerais têm sido amplamente estudadas. Por outro lado, o papel de alguns destes constituintes na prevenção de muitas doenças, nomeadamente as cardiovasculares e cancro, tem sido também objeto de um elevado número de estudos, revelando muitos deles provas consistentes dos benefícios do consumo de pescado. (Nunes et al. 2008).

A composição química do pescado varia consideravelmente de espécie para espécie e, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, regista diferenças que decorrem do grau de maturação sexual, idade, sexo, zona geográfica, época do ano e disponibilidade alimentar. (Nunes et al. 2008; Huss, 1995).

No pescado de aquicultura a composição química depende, essencialmente, das condições de produção, podendo a dieta ser formulada e os fatores de produção controlados.

1.1.1. Água

O principal constituinte do músculo do pescado é a água, e o seu teor e o tipo de interação entre este constituinte e as proteínas, hidratos de carbono, lípidos e minerais determinam de modo significativo a textura. No músculo dos peixes o teor de água varia, em regra, entre 60 a 80 % (Huss, 1995; Belitz *et al.* 2009).

Nos peixes os teores em água e gordura variam inversamente e a sua soma ronda os 80 %. Logo, um teor de humidade de 60 % indica um peixe com um teor lipídico elevado, ao passo que um teor de humidade de 80 % revela um peixe com menor teor lipídico (Belitz *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2008).

1.1.2. Proteínas

Na parte muscular dos produtos de pesca podemos encontrar compostos azotados que são, essencialmente, constituídos por proteínas, entre 80 e 90 %, e por substâncias azotadas não proteicas. (Bandarra *et al.* 2003; Nunes *et al.* 2008)

As proteínas são macromoléculas constituídas essencialmente por carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto, embora possam também conter enxofre e fósforo e em menor percentagem, ferro, cobre e magnésio, cujas unidades básicas são os aminoácidos. Quando comparado com os teores em lípidos e em água, o teor proteico é mais estável. (Bandarra *et al.* 2004; Nunes *et al.* 2008).

A maioria das espécies de pescado apresenta um teor proteico, no músculo, que se situa entre 16 e 21 %. No entanto, o teor de proteína total pode variar entre valores inferiores a 8 % e superiores a 25 % (Belitz *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2008). Numa mesma espécie, durante o seu ciclo de vida, não existem diferenças substanciais no teor de proteína, porém, nalgumas espécies tem-se observado que a maturação das gónadas, ou longos períodos de privação de alimento, originaram uma diminuição do teor proteico (Nunes *et al.* 2008).

A proteína é o principal componente funcional e estrutural de todas as células do corpo, exercendo um papel essencial no crescimento e manutenção das funções vitais do organismo e estando envolvida noutros importantes processos fisiológicos (IOM, 2005; Nunes *et al.* 2008).

As proteínas dos produtos da pesca possuem um elevado valor biológico, pois têm na sua constituição todos os aminoácidos essenciais, com teores semelhantes à proteína do ovo. São também reconhecidas pela grande digestibilidade, ou seja, pela curta duração de digestão estomacal. Logo, um fornecimento adequado de proteína é essencial para manter a integridade e função celular e para a saúde (IOM, 2005; Nunes *et al.* 2008).

No que respeita aos compostos que constituem o azoto não proteico, esta fração representa entre 9 a 18 % do azoto total do pescado. Estes compostos influenciam as características

sensoriais e apresentam um papel significativo na deterioração do pescado (Bandarra et al. 2003; Nunes et al. 2008).

1.1.3. Lípidos

Os lípidos compõem um dos maiores grupos de biomoléculas encontradas nos sistemas vivos e, embora evidenciem uma grande variedade estrutural, todos têm em comum o facto de serem hidrofóbicos. Este grande grupo pode ser dividido em dois subgrupos: lípidos polares e lípidos não polares. A classe dominante dos lípidos polares são os fosfolípidos (PL), enquanto que os lípidos não polares são maioritariamente constituídos por triacilgliceróis (TAG) (Tocher, 2003).

Os PL são moléculas constituídas por uma cabeça hidrofílica, composta pelo grupo fosfato, e uma cauda hidrofóbica, formada pelas cadeias de ácidos gordos. É esta característica que lhes permite desempenhar a função de constituinte da membrana celular, pois consegue estabelecer uma interface entre os meios extra e intracelular. Estes lípidos têm especial relevo nas espécies magras, uma vez que as gorduras que as constituem são essencialmente estruturais. (Tocher, 2003; Campos, 2009)

Os TAG são constituídos por três cadeias de ácidos gordos esterificadas a um glicerol. São compostos não polares, pois as regiões polares dos grupos acilo estão ligadas aos grupos álcool do glicerol. São, por isso, moléculas muito hidrofóbicas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como éter e clorofórmio. As posições onde se encontram os ácidos gordos na molécula de TAG são designadas por sn-1, sn-2 e sn-3 como demonstrado na figura 2. Nos peixes, os ácidos gordos saturados e monoinsaturados encontram-se preferencialmente nas posições sn-1 e sn-3, enquanto que os polinsaturados se localizam principalmente na posição sn2 (Tocher, 2003).

Os lípidos desempenham importantes funções biológicas, destacando-se as seguintes (Nunes et al. 2008):

- reservas energéticas de elevado valor calórico (por exemplo, TAG);
- constituição de membranas celulares e conservação da sua integridade estrutural e funcional (por exemplo, PL, esteróis);
- sinalizadores intra e intercelulares;
- isoladores térmicos (tecido adiposo subcutâneo) e elétricos.



Figura 2 - Estrutura de um Triacilglicerol (TAG)
http://schoolbag.info/chemistry/mcat_biochemistry/30.html

Dependendo da espécie a que diz respeito, e mesmo dentro da mesma espécie, existem grandes variações quanto ao teor lipídico. Um exemplo desta variação é a sardinha, cujo teor de gordura pode variar entre um mínimo de 1,2 % em Março/Abril e um máximo superior a 18 % nos meses de Setembro/Outubro (Bandarra et al. 2001).

Esta variação é resultante de diversos fatores, entre os quais as condições ambientais em que se encontram, o tipo de dieta que consomem, a disponibilidade de alimento, a época do ano e a própria maturidade do animal (Tocher, 2003; Nunes et al. 2011).

Assim sendo, os peixes tendem a ser classificados como (Nunes et al. 2008):

- Espécies gordas (> 5 %) – salmão, sardinha, cavala, cherne, dourada, enguia;
- Espécies semi-gordas (2 a 5 %) – atum, besugo, carapau, espadarte, goraz, peixe-espada-branco, peixe-espada-preto, robalo, safio;
- Espécies magras (< 2 %) – pescada, bacalhau, corvina, linguado, pargo, tamboril.

1.1.3.1. Ácidos Gordos

As unidades básicas de qualquer composto lipídico são os ácidos gordos, que são compostos orgânicos simples, constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio. Cada molécula de ácido

gordo tem, no extremo da cadeia, um grupo carboxílico que lhe confere um carácter ácido e no extremo oposto apresenta um grupo metilo não funcional (Nunes et al. 2008).

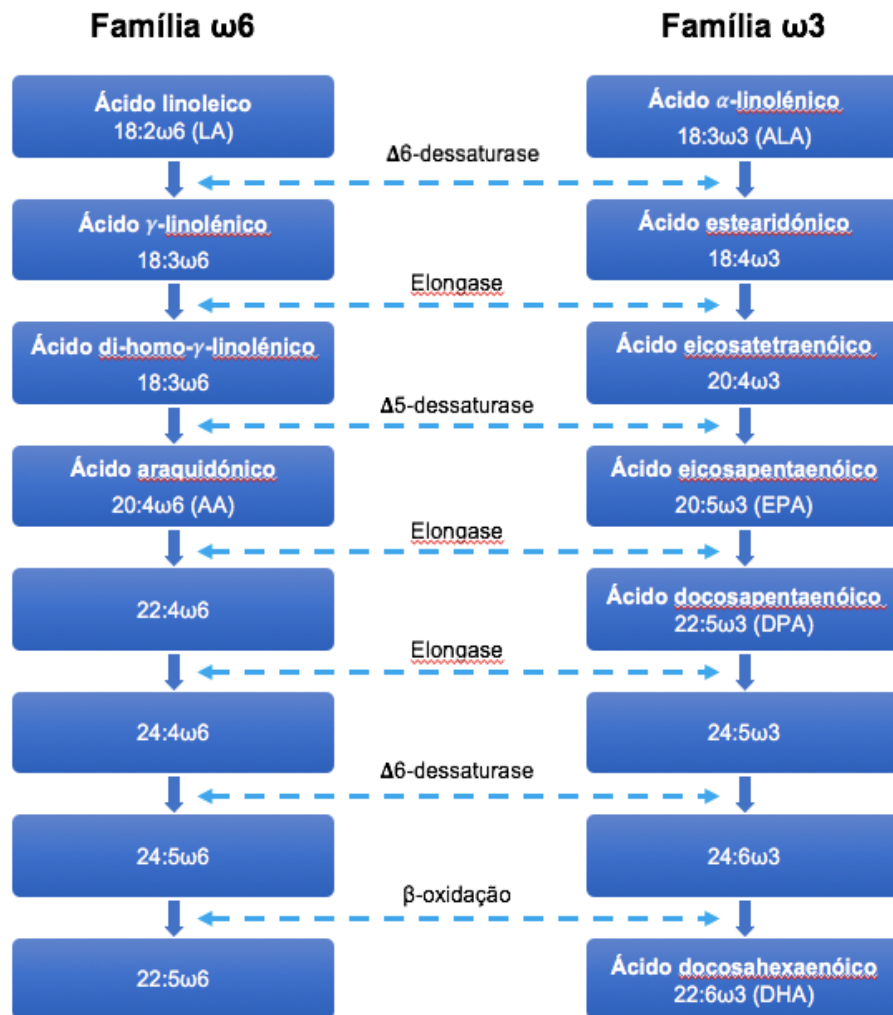


Figura 3 - Representação esquemática da biossíntese dos ácidos gordos das famílias ω6 e ω3 – Fonte: Adaptado de Williams, 2000.

Estes podem ser classificados consoante o tamanho da cadeia e a presença ou ausência de duplas ligações (insaturações). Deste modo, existe uma grande variedade de ácidos gordos, desde ácidos gordos de cadeia curta (2 a 10 átomos de carbono), média (12 a 16 átomos de carbono) e longa (18 a 24 átomos de carbono). Os ácidos gordos podem também ser saturados (SFA), se não apresentarem nenhuma dupla ligação, monoinsaturados (MUFA), se houver uma dupla ligação e polinsaturados (PUFA) se apresentarem duas ou mais duplas ligações (Nunes et al. 2008; Tocher, 2003).

Os SFA mais abundantes nos lípidos do pescado são o mirístico (14:0), o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0), enquanto que os MUFA mais abundantes são, habitualmente, o ácido palmitoleico (16:1 ω 7) e o ácido oleico (18:1 ω 9). Quanto aos PUFA, os mais importantes presentes no pescado são o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω 3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω 3), constituindo cerca de 90 % do total destes compostos (Bandarra et al. 2004).

Os ácidos linoleico (18:2 ω 6) e α -linolénico (18:3 ω 3) são chamados ácidos gordos essenciais para o Homem, pois apenas algas e alguns fungos são capazes de os sintetizar (He, 2009). O nosso organismo pode converter estes dois compostos noutros importantes ácidos gordos, nomeadamente em EPA (20:5 ω 3) e DHA (22:6 ω 3), através de um conjunto de reações (Bandarra et al. 2004).

Nestas reações participam enzimas que promovem a incorporação de insaturações e o alongamento da cadeia carbonada. Ainda que o nosso organismo consiga sintetizar estes ácidos gordos, esta conversão é limitada e insuficiente quando comparada com a nossa necessidade, podendo ser inibida pela produção do ácido araquidónico (20:4 ω 6), pois ambos competem pelas mesmas enzimas como é possível observar na figura 3. (Williams, 2000; He, 2009).

1.1.3.2. Benefícios para a saúde

Pelos motivos anteriormente apresentados, é importante garantir o consumo específico de alimentos que contenham alguns ácidos gordos, nomeadamente o EPA e DHA (Arterburn, 2006). Uma vez que os produtores primários destes compostos são microrganismos marinhos, como as algas e o fitoplâncton, os peixes obtêm estes ácidos gordos através da cadeia alimentar (Turan, 2007; Lavie et al. 2009).

São vários os estudos científicos que dão conta das vantagens do consumo de pescado rico em ómega-3 e que indicam os diversos benefícios para a saúde cardiovascular. Estes ácidos gordos aparentam também desempenhar um papel vital no desenvolvimento e função do sistema nervoso (cérebro), do sistema visual e do sistema reprodutivo. Por outro lado, a carência destes ácidos gordos pode conduzir à perda de memória, fadiga, pele seca, problemas cardíacos e depressão (Sidhu, 2003; Nunes et al. 2008; ISSFAL, 2004).

Mas os benefícios destes ácidos gordos não se limitam aos adultos, contribuindo particularmente no desenvolvimento neurológico em fetos e crianças quando consumidos pela progenitora antes e durante a gravidez. (Williams, 2000; FAO/WHO, 2011).

Em geral, as recomendações nutricionais aconselham o consumo semanal de uma a duas porções de peixes gordos. (EFSA, 2015; ISSFAL, 2004).

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) recomenda que sejam ingeridas, para adultos e para crianças com idades entre os 2 e dos 18 anos, 250 mg/dia de EPA+DHA com base nas considerações de saúde cardiovascular, enquanto que a *American Heart Association* recomenda que a dose diária ingerida seja de 500 mg/dia (Kris-Etherton et al. 2002; EFSA, 2015).

A EFSA aconselha ainda que 100 mg/dia de DHA sejam ingeridas por crianças com idades entre os 6 e os 24 meses, e que 100 a 200 mg/dia de DHA sejam adicionados aos 250mg/dia anteriormente referidos para mulheres durante o período de gestação ou de lactação (EFSA, 2015).

É importante perceber que o pescado é de facto essencial na nossa alimentação, no entanto é necessário referir que os peixes têm diferentes concentrações de contaminantes químicos, nomeadamente algumas espécies têm elevados níveis de mercúrio. Assim, aqueles que não consomem peixe suficiente, nomeadamente as mulheres grávidas que têm bastantes restrições alimentares, devem considerar tomar suplementos de óleo de peixe. (Domingo, 2007; He, 2009)

1.2. Digestão Humana

Quando o alimento é ingerido, é posteriormente fragmentado no trato gastrointestinal num processo designado por digestão. A digestão divide-se em digestão mecânica, que envolve a mastigação e a mistura dos alimentos, e em digestão química, realizada pelas enzimas digestivas segregadas ao longo do tubo digestivo (Seeley et al. 2003).

O aparelho digestivo tem algumas funções essenciais, das quais se destacam a digestão, a absorção, e a eliminação, sendo também uma barreira física e imunológica (Seeley et al. 2003; Mahan, 2008):

- A digestão consiste na fragmentação de grandes moléculas orgânicas em moléculas mais pequenas, biologicamente ativas, para que possam ser absorvidas pelo tubo digestivo: glúcidos em monossacáridos, proteínas em aminoácidos e TAG em ácidos gordos e glicerol. As vitaminas, minerais e a água não são fragmentados nos seus componentes antes de serem absorvidos, pois esta transformação da sua estrutura determina a perda da sua função.
- A absorção é o movimento de moléculas do tubo digestivo para a circulação sanguínea ou linfática e mecanismo de absorção depende do tipo de moléculas envolvidas. Maior parte do alimento ingerido é digerido e absorvido nos primeiros 100 cm de intestino delgado.
- A eliminação é o processo através do qual os resíduos da digestão (catabolitos) são removidos do organismo. Durante este processo, que ocorre principalmente no intestino grosso, a água e os sais são absorvidos, tornando semissólidos o material liquefeito do tubo digestivo. Estes resíduos semissólidos, as fezes, são então eliminados pela defecação.
- O aparelho digestivo serve também como barreira física e imunológica contra microrganismos, material estranho e potenciais antigénios consumidos com alimentos ou formados durante a passagem de alimentos pelo trato.

Dependendo da natureza da dieta consumida, cerca de 90 % a 97 % dos alimentos são digeridos e absorvidos e a maior parte do material não absorvido é de origem vegetal (Mahan, 2008).

O intestino delgado está dividido em três porções: o duodeno, o jejuno e o íleo, medindo aproximadamente 6 m (varia entre 4,6-9 m). O duodeno mede aproximadamente 25 cm de comprimento, o jejuno representa cerca de 2/5 do comprimento total do intestino delgado, com aproximadamente 2,5 m de comprimento.

O íleo representa 3/5 do intestino delgado, cerca de 3,5 m. As duas glândulas anexas principais, o fígado e o pâncreas, estão ligadas ao duodeno (Seeley et al. 2003).

É no intestino delgado que ocorre a maior parte da digestão e absorção (Seeley et al. 2003; Mahan, 2008). Alguns compostos químicos podem ser absorvidos através da fina mucosa sublingual e algumas moléculas de pequenas dimensões podem difundir-se através do epitélio do estômago para a circulação. Contudo, a maior parte da absorção dá-se no duodeno e no jejuno, embora também ocorra em menor grau no íleo, como se observa na figura 4 (Seeley et al. 2003).

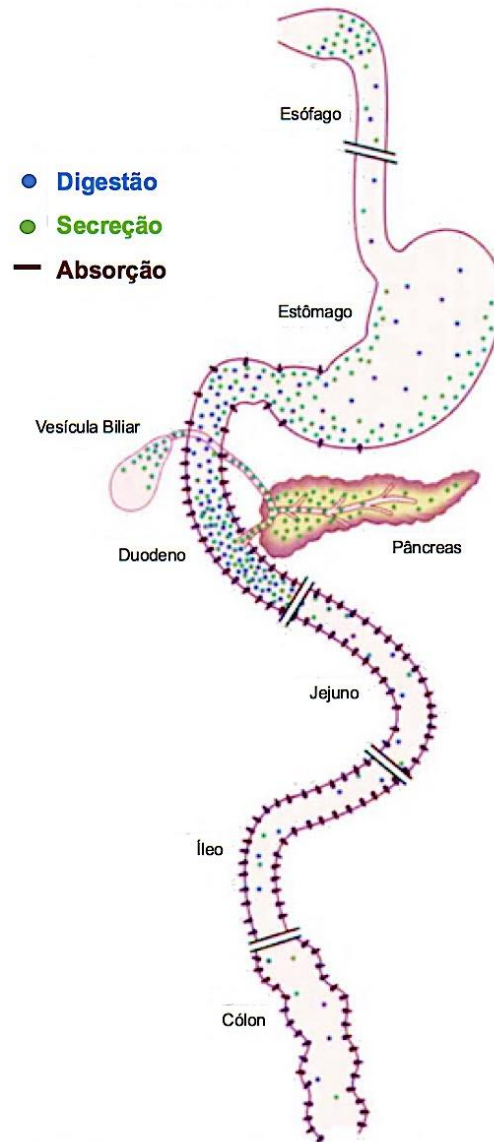


Figura 4 - Digestão, Secreção e Absorção no aparelho digestivo - Fonte: Mahan, 2008

Cada dia, em média, o intestino delgado absorve 150 a 300 g de monossacáridos, 60 a 100 g de ácidos gordos, 60 a 120 g de aminoácidos e péptidos e 50 a 100 g de íões (Mahan, 2008). Cerca de 97 % dos lípidos ingeridos são na forma de TAG, os restantes são na forma de PL e colesterol (CH).

A presença de alimentos no intestino delgado estimula a libertação de hormonas, que por sua vez, estimulam a produção e libertação de poderosas enzimas do pâncreas, do intestino delgado, do fígado e da vesícula biliar (Mahan, 2008).

A gordura ingerida sofre lipólise por lipases no trato gastrointestinal antes da absorção, permitindo que haja emulsificação, ou seja, que haja transformação de grandes gotículas de

lípidos em gotículas menores. A hidrólise do triacilglicerol é conseguida através da acção da lipase pancreática, que requer a colipase, segregada pelo pâncreas, para a actividade.

Existe uma pequena quantidade de lipase lingual segregada na boca, que é deglutida com os alimentos e digere uma pequena porção (<10 %) dos lípidos no estômago, no entanto, é no intestino que a maioria da absorção ocorre. Os principais produtos deste processo digestivo são ácidos gordos livres (FFA) e glicerol. Contudo, a separação pode não ser completa, podendo os TAG degradar-se em monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG). O CH e os PL também fazem parte dos produtos de digestão dos lípidos. (IOM,2005; Seeley et al. 2003; Mahan, 2008)

As enzimas que intervêm na digestão dos lípidos são hidrossolúveis e atuam apenas à superfície das gotículas. A emulsificação, ao diminuir o tamanho das gotículas lipídicas, aumenta a área exposta à ação enzimática, favorecendo a sua digestão. Este processo é realizado pela intervenção dos sais biliares, segregados pelo fígado e armazenados na vesícula biliar. Desta, cerca de 1 litro de bÍlis é segregada diariamente em resposta ao estímulo de alimentos no estômago e duodeno (Mahan, 2008).

A lipase pancreática tem uma especificidade elevada para as posições sn-1 e sn-3 dos TAG, resultando, como demonstrado na figura 5, na libertação de FFA das posições sn-1 e sn-3 e 2-monoacilglicerol (IOM, 2005; Mahan, 2008).

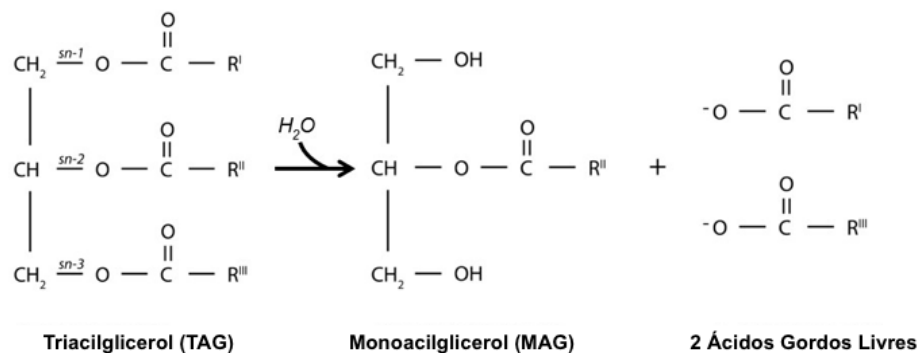


Figura 5 - Digestão de triacilgliceróis - <http://www.1life63.com/en/omega-in-your-body-digestion-of-lipids/digestion-of-lipids>

Após a digestão dos lípidos no intestino, os sais biliares agregam-se à volta das pequenas gotículas para formar micelas (isto é, complexos de FFA, MAG e sais biliares) (Mahan, 2008).

As extremidades hidrofóbicas dos sais biliares ficam orientadas para os FFA, CH e triglicéridos no centro da micela; as extremidades hidrofílicas ficam orientadas para o meio aquoso no lúmen do intestino. Quando a micela entra em contacto com as células epiteliais do epitélio do intestino delgado, o seu conteúdo passa, por difusão simples, através da membrana plasmática das células epiteliais, como é possível observar na figura 6 (Seeley et al. 2003). Os lípidos separam-se das micelas e os restos das micelas regressam ao lúmen para posterior transporte (Mahan, 2008). A maioria dos sais biliares é reabsorvida ativamente no íleo terminal e retorna ao fígado para reentrar no intestino nas secreções biliares (Mahan, 2008).

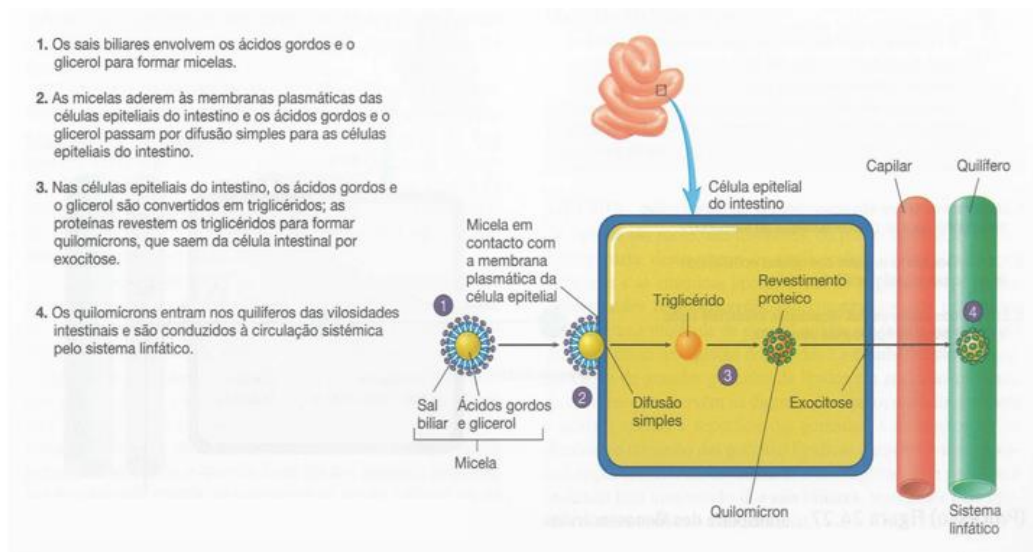


Figura 6 - Processo do Transporte de Lípidos - Fonte: Seeley et al. 2003

Nas células mucosas, os ácidos gordos e monoacilgliceróis são reagrupados em novos triacilgliceróis. Alguns são ainda digeridos em FFA e glicerol e, em seguida, reorganizadas para formar TAG. Como os lípidos são insolúveis ou pouco solúveis em água são transportados, no sangue, combinados com proteínas hidrossolúveis. A combinação de lípidos com proteínas origina lipoproteínas. Os quilomícra são um tipo de lipoproteínas (Seeley et al. 2003).

Os glóbulos de lipoproteína passam para o sistema linfático, são transportados para o ducto torácico e libertos na circulação. Os quilomícra são então levados através da corrente sanguínea para vários tecidos, incluindo fígado, tecido adiposo e músculo. No fígado, os triglicéridos dos quilomícrons são envolvidos em lipoproteínas de muito baixa densidade e

transportados principalmente para o tecido adiposo para metabolismo e armazenamento (Seeley et al. 2003).

1.3. Digestão *in vitro*

A técnica *in vitro* é preferida relativamente aos estudos *in vivo*, pois estes muitas vezes envolvem questões éticas, devido ao uso de animais para testes, exigem tempo e requerem muitos recursos para um controlo experimental adequado (Hur et al. 2011). Além disso, nas experiências *in vivo*, o tempo de digestão pode variar consideravelmente, dependendo das características de cada indivíduo, como por exemplo, idade, sexo, estado de saúde e estado mental, e das propriedades dos alimentos ingeridos, como a quantidade total ingerida e a composição química (McClements et al. 2009). No entanto, sempre que possível, devem ser utilizados estudos *in vivo* para a validação de modelos *in vitro* (Cardoso et al. 2015).

Uma maneira de ultrapassar as dificuldades apresentadas, é recorrer aos estudos *in vitro* (Hur et al. 2011). Este tipo de metodologia, que simula processos de digestão, é muito utilizado para estudar o comportamento gastrointestinal quando ingerimos alimentos ou fármacos e apresenta como principais vantagens ser mais rápido, menos dispendioso, menos trabalhoso e não tem restrições éticas (Minekus et al. 2014).

Os métodos de digestão *in vitro* incluem tipicamente as fases oral, gástrica e do intestino delgado, e ocasionalmente, do intestinal grosso (Minekus et al. 2014). Este último muitas vezes não é levado em conta, uma vez que, a digestão de alimentos e a absorção de compostos *in vivo* ocorre principalmente no intestino delgado (Versantvoort, 2005). Estes métodos tentam imitar as condições fisiológicas *in vivo*, levando em conta a presença de enzimas digestivas e as suas concentrações, os valores de pH e o tempo de digestão em cada fase (Minekus et al. 2014 ; Versantvoort, 2005).

O impacto que estes parâmetros podem ter na libertação ou digestibilidade de alguns alimentos vai variar tendo em conta o tipo de matriz (Minekus et al. 2014).

Neste contexto, é importante clarificar os conceitos de bioaccessibilidade e biodisponibilidade.

A bioaccessibilidade é definida como a fração de um composto que é libertado da sua matriz no trato gastrointestinal e assim fica disponível para absorção intestinal (Fernández-García, 2009; Versantvoort, 2004).

A quantidade total de um composto ingerido nem sempre reflete a quantidade disponível para o corpo, dado que apenas uma certa quantidade estará biodisponível. A biodisponibilidade de um determinado composto pode ser considerada como consequência de três processos

(Versantvoort, 2004).:

1. A libertação do composto da sua matriz por ação do suco digestivo no trato gastrointestinal (bioacessibilidade);
2. O transporte através do epitélio intestinal para a *veia Portae* (transporte intestinal);
3. A degradação do composto no fígado e intestino (metabolismo).

Resumindo, podemos encarar a biodisponibilidade como a consequência da bioacessibilidade, absorção e metabolismo (Oomen, 2005).

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo o estudo da bioacessibilidade de ácidos gordos ómega-3 em peixe. Inicialmente foram estudadas amostras de atum albacora (*Thunnus albacares*), mas posteriormente foram consideradas outras espécies, como a sardinha (*Sardina pilchardus*) e o salmão de aquacultura (*Salmonidae*).

Considerando que, ao longo do processo digestivo, os lípidos vão sofrendo alterações de naturezas distintas, este estudo permitirá ainda avaliar outras questões que se pretende possam ser respondidas, designadamente:

- Que alterações sofre o perfil de ácidos gordos no final do processo digestivo, em pescado com diferentes teores de gordura;
- Qual a eficácia do modelo digestivo *in vitro* em pescado com diferentes teores de gordura;
- Qual a bioacessibilidade dos diferentes ácidos gordos, quais as diferenças entre saturados, monoinsaturados e polinsaturados em pescado de diferentes teores de gordura;

3. Materiais e métodos

3.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários

Inicialmente foram estudadas amostras de atum albacora (*Thunnus albacares*). O atum foi obtido durante o mês de fevereiro em cinco superfícies comerciais distintas, de modo a garantir uma amostra mais representativa e procurando que fossem todas de lotes distintos.

Adquiriram-se duas fatias de cada amostra, em cada superfície, com cerca de 300 g cada, com origem de captura no Pacífico (Zona FAO 77).

Para a preparação das amostras de atum, removeu-se a pele e espinhas, conservando apenas o músculo e procedendo-se a nova pesagem. Antes de efetuar o tratamento culinário, as postas foram lavadas e nas postas para cozer e grelhar, foi adicionado sal para temperar, numa proporção de 1,5 g de sal por cada 100 g de posta de atum. As amostras foram pesadas antes e após os tratamentos térmicos.

Posteriormente foram consideradas outras espécies, como a sardinha (*Sardina pilchardus*) e o salmão de aquacultura (*Salmonidae*). As amostras de salmão foram adquiridas numa superfície comercial e a respetiva caracterização química foi posteriormente efetuada no laboratório.

As amostras e a composição química de sardinha foram fornecidos pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), sendo que as amostras já estavam preparadas e armazenadas na câmara de -80 °C.

No caso das amostras de salmão e de sardinha, as mesmas não foram submetidas a tratamento térmico, pois não havia amostra suficiente de sardinha para tal, optando-se por prosseguir as análises com a matéria-prima crua.

As amostras de todos os atuns foram grelhadas num grelhador doméstico (Flama Sketch 230v, 50Hz, 2000W) durante cerca de 20 minutos (10 minutos de cada lado da posta).

Na cozedura, as amostras foram cozidas numa panela de inox (previamente lavada e seca entre utilizações) garantindo sempre uma proporção de 1 de peixe para 2 de água. As porções foram cozidas numa panela durante 10 minutos, a cerca de 100 °C.

Após os tratamentos culinários as amostras foram homogeneizadas num moinho granulador de laboratório (Retsh, GM 200) e posteriormente colocadas em sacos devidamente identificados.

Uma porção de cada amostra foi ainda liofilizadas durante 48 horas, a -45 °C e cerca de 10^{-1} atm e novamente homogeneizada, com a finalidade de analisar o perfil de ácidos gordos

Todas as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas na câmara de -80 °C até à sua utilização, de maneira a evitar a oxidação dos lípidos.

3.2 Composição Química

3.2.1 Humidade

O teor de humidade foi determinado com base no método descrito na Norma Portuguesa (NP) 2282 (2009) e no procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura, Valorização e Bioprospeção (DivAV) do IPMA.

Pesou-se em balança analítica (Mettler Toledo, AG 204) cerca de 5 g da amostra de músculo homogeneizado, com um rigor de ± 0.001 g, para um cadinho previamente tarado e colocou-se o cadinho na estufa (Memmert, ULE 500) a 105 ± 2 °C. No dia seguinte, retirou-se o cadinho da estufa para um exsiccador, deixou-se arrefecer pelo menos 30 minutos e pesou-se. Esta última operação foi repetida até se atingir peso constante, ou seja, até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 1 mg.

A humidade do produto, expressa em grama por 100 g de amostra, é dada pela seguinte fórmula:

$$100 - \left[\frac{m_3 - m_1}{m_2} \right] \times 100$$

Sendo que:

m_1 – massa do cadinho (g);

m_2 – massa da amostra (g);

m_3 – massa do conjunto do cristalizador e da amostra, após secagem (g).

3.2.2 Cinza Total

O teor de cinza total foi determinado com base no método descrito na NP 2032 (2009) e no procedimento técnico em uso na DivAV do IPMA.

Pesou-se cerca de 5 g de amostra homogeneizada, com rigor de $\pm 0,001$ g, para o cadinho previamente tarado. Colocou-se o cadinho na estufa, para secagem da amostra durante a noite, a pelo menos 100 °C. No dia seguinte transferiu-se o cadinho para a mufla (Heraeus, MR 170 E), elevando a temperatura, muito lentamente, até atingir uma temperatura de aproximadamente 500 ± 25 °C, permanecendo a esta temperatura cerca de 16 horas (uma noite) para incineração.

Transferiu-se o cadinho da mufla para um exsiccador, deixou-se arrefecer durante meia hora,

e de seguida pesou-se o cadinho. As operações de incineração, durante 30 minutos, arrefecimento e pesagem foram repetidas até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 1 mg.

Calculou-se o teor de cinza total, expresso em grama por 100 g de amostra, usando a seguinte equação:

$$\left[\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right] \times 100$$

Sendo que:

m_1 – massa do cadinho vazio (g);

m_2 – massa do cadinho com a amostra (g);

m_3 – massa do cadinho com o resíduo (g).

3.2.3 Proteína Bruta

O teor de proteína bruta foi quantificado com base no descrito por Saint-Denis e Goupy (2004) (Método de Combustão de Dumas), utilizando um aparelho analisador de azoto (LECO, FP-528). A quantificação do teor de proteína baseia-se na determinação indireta do teor de proteína total da amostra, por combustão, a partir da quantidade de azoto presente. Foi utilizado um fator de conversão de azoto em proteína de 6,25, que é o normalmente utilizado para o caso do pescado.

Pesou-se para a cápsula cerca de 0,3 g de amostra homogeneizada e depositou-se a amostra no carregador do analisador automático de azoto/proteína e de acordo com as instruções do equipamento efectuou-se a leitura. A calibração foi realizada de forma automática, contudo efectuou-se a comprovação da mesma, utilizando uma amostra padrão de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA).

No analisador automático de azoto/proteína FP-528, a amostra encapsulada sofreu uma combustão total em forno, seguida de arrastamento por um fluxo de oxigénio até ao depósito de homogeneização. Retirou-se uma aliquota após homogeneização sendo esta transportada por uma corrente de hélio para uma célula. O teor de azoto é medido por termocondutividade diferencial.

O teor de proteína em percentagem foi dado pelo equipamento, sendo o resultado expresso em g por 100 g de peso fresco.

3.2.4 Gordura / Teor de lípidos Totais

Para a determinação do teor de lípidos totais nas amostras do músculo do atum, recorreu-se ao método descrito por Folch et al. em 1957.

Para a realização desta análise procedeu-se à pesagem, numa balança analítica (Mettler Toledo, AG 204) com uma precisão de 0,001 g, de cerca de 200 mg de amostra liofilizada, para tubos de 15 ml devidamente pesados e identificados.

De seguida, adicionou-se aos tubos, 3 ml da solução de extração clorofórmio (CHCl₃) e metanol (MeOH) numa proporção de 2:1), previamente preparada, para a extração da gordura. Agitou-se ligeiramente num vórtex (*Heidolph*) e colocou-se os tubos num banho de agitação, durante cerca de 10 minutos.

Após a agitação retiraram-se os tubos e adicionaram-se, com recurso a uma micropipeta, 3 mL de HCl 0,1 M e 300 µl de MgCl 0,5 %, de forma a promover a precipitação das proteínas. Seguidamente, voltou-se a agitar ligeiramente os tubos no vórtex e foram centrifugados numa centrífuga (*Sigma*, 2k 15) a 2000 g durante 5 minutos. Deste modo, ocorreu a separação de fases (fase aquosa e fase orgânica), e recolheu-se, com uma pipeta de Pasteur, a fase orgânica (parte inferior) para outro tubo de 15 ml previamente pesado. Note-se que este tubo é apenas para recolha da fase orgânica obtida.

Adicionaram-se, mais uma vez, aos primeiros tubos, 3 ml da solução de extração CHCl₃ + MeOH (2:1), colocou-se no banho de agitação, durante 5 minutos, e repetiu-se o processo de centrifugação e de recolha da fase orgânica. Esta foi adicionada aos tubos que já continham a fase orgânica obtida na primeira extração.

Por fim, procedeu-se à evaporação do solvente com fluxo de azoto e após esta evaporação os tubos foram novamente pesados e através uma subtração determinou-se a quantidade de gordura presente na amostra ($m_{\text{amostra+tubo}} - \text{massa}_{\text{tubo}}$).

3.3 Bioacessibilidade – Método de digestão *in vitro*

A bioacessibilidade foi determinada com recurso ao modelo de digestão *in vitro* descrito por Versantvoort et al. (2004) e modificado por Afonso et al. (2015).

Os sucos digestivos têm um papel importante no processo digestivo do Homem e foram preparados em laboratório de forma a cumprirem os valores de pH adequados e adicionados

a 37 °C, para simular o melhor possível as condições humanas. Na tabela 1 estão as soluções e enzimas utilizadas na preparação destes.

Tabela 1 – Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos

		Saliva (100 mL)	Suco Gástrico (200 mL)	Suco Duodenal (200 mL)	Suco Biliar (100 mL)
Soluções Inorgânicas	KCl (89,6 g/L)	2 mL	3,64 mL	2,52 mL	0,84 mL
	KSCN (20 g/L)	2 mL	-	-	-
	NaH ₂ PO ₄ (88,8 g/L)	2 mL	1,2 mL	-	-
	NaSO ₄ (57 g/L)	2 mL	-	-	-
	NaCl (175,3 g/L)	0,34 mL	6,28 mL	16 mL	6 mL
	NaHCO ₃ (84,7 g/L)	4 mL	-	16 mL	12,76 mL
	CaCl ₂ • 2H ₂ O (22,2 g/L)	-	7,2 mL	3,6 mL	2 mL
	NH ₄ Cl (30,6 g/L)	-	4 mL	-	-
	KH ₂ PO ₄ (5 g/L)	-	-	4 mL	-
	MgCl ₂ (5 g/L)	-	-	4 mL	-
	HCl 37 % (g/g)	-	2,6 mL	72 µL	30 µL
Soluções orgânicas	Ureia (25 g/L)	1,6 mL	1,36 mL	1,6 mL	2 mL
	Ácido glucorónico (2 g/L)	-	4 mL	-	-
	Glucose (65 g/L)	-	4 mL	-	-
	Hidrocloreto de glucosamina (33 g/L)	-	4 mL	-	-
Enzimas	α-amilase	58 mg	-	-	-
	Ácido úrico	3 mg	-	-	-
	Mucina	5 mg	1,2 g	-	-
	BSA	-	0,4 g	0,4 g	0,36 g
	Pepsina	-	1,32 g	-	-
	Pancreatina	-	-	3,6 g	-
	Lipase	-	-	0,6 g	-
	Bílis	-	-	-	6 g
	Tripsina	-	-	0,032 g	-
α-quimotripsina	-	-	0,348 g	-	

Pesou-se 1,5 g da amostra húmida em balança analítica (Mettler Toledo, AG 204 com uma precisão 0,001 g), para os tubos de ensaio e adicionou-se 4 mL de saliva. De seguida, juntou-se 8 mL da solução de suco gástrico, procedeu-se à medição e acerto do pH ($2,0 \pm 0,1$) (HANNA Instruments, HI 221) e deixou-se os tubos na estufa a 37 °C, em rotação, durante 2

horas, simulando a digestão no estômago.

Para concluir a digestão foram adicionados 8 mL de suco duodenal e 4 mL de suco biliar, executou-se uma nova medição e acerto do pH ($6,5 \pm 0,5$) e os tubos foram deixados 2 horas na mesma condição que no passo anterior, a fim de simular o processo no trato intestinal.

No final da digestão *in vitro* deixou-se arrefecer os tubos a temperatura ambiente e pesou-se. Posteriormente foram a centrifugar (*Sigma*, 2k 15) durante 5 minutos, a $2750 \times g$ e separou-se a fase aquosa da fase orgânica. A fase aquosa é absorvida pelo intestino, ou seja, trata-se da fração bioacessível, posteriormente reservada em tubos para proceder a análises, e o *pellet* é sólido e, portanto, não é absorvido pelo epitélio intestinal. A fração bioacessível foi separada do *pellet* através do uso de algodão, que absorveu a gordura presente e foi colocado num tudo devidamente identificado.

3.4 Extração da gordura do bioacessível

Na extração de gordura do bioacessível seguiu-se um método adaptado, baseado no descrito por Bligh & Dyer, 1959.

A cada tubo de bioacessível, que continha algodão com gordura, adicionou-se 2 ml de clorofórmio, levou-se ao vórtex e verteu-se o líquido para um tudo devidamente identificado. O processo foi repetido três vezes, de forma a garantir que toda a gordura era extraída do algodão.

Posteriormente foram adicionadas três espátulas (aproximadamente 1g/espátula) rasas de NaCl, homogeneizou-se os tubos no vórtex, durante um minuto e centrifugou-se a 2000 g, durante 10 minutos, a 4 °C. Recolheu-se, com uma pipeta de *Pasteur*, a fase inferior para um balão de pêra previamente tarado, filtrando por uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro. Adicionou-se 3 ml de clorofórmio ao tubo da fase orgânica, homogeneizou-se novamente a mistura no vórtex e centrifugou-se sob as condições já referidas, durante 6 minutos. Repetiu-se a separação de fases e a fase inferior foi novamente filtrada por uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro para o balão de pêra anteriormente referido. Este processo foi repetido duas vezes.

Evaporou-se o clorofórmio dos balões de pêra em evaporador rotativo, com banho a 40 °C e bomba de vácuo a 434 mbar. Após terminar a evaporação do solvente, passou-se o balão-pêra por corrente de azoto para eliminar qualquer vestígio e pesou-se novamente para calcular a massa de gordura obtida.

Parte da gordura foi submetida a catálise ácida, posteriormente descrita no capítulo 2.6, para libertar os ácidos gordos presentes e injetar no cromatógrafo de fase gasosa, obtendo-se o perfil lipídico de ácidos gordos bioacessível das amostras estudadas, neste caso, das sardinhas com 1 %, 5 % e 10 % de gordura e do salmão com 16 % de gordura. Outra parte foi utilizada para fazer cromatografia em camada fina (thin layer chromatography – TLC), com o intuito de separar as várias frações lipídicas, que são também sujeitas a catálise ácida, para posterior injeção no cromatógrafo de fase gasosa.

3.5 Determinação das classes de lípidos por cromatografia em camada fina (thin layer chromatography – TLC)

Após extração dos lípidos totais e da fração bioacessível, foi necessário avaliar que classes lipídicas estavam presentes em cada uma das amostras. Para tal, utilizou-se cromatografia em camada fina (TLC), descrita por Bandarra et al. 2001.

Este procedimento consiste essencialmente na aplicação das amostras em placas de sílica e na comparação dos resultados com os padrões.

Existem dois tipos de TLC: analítica, que permite identificar e quantificar de forma relativa as diferentes frações lipídicas, e preparativa, que permite conhecer o perfil de ácidos gordos em cada fração de lípidos.

Realizaram-se TLC analíticas para conhecer a proporção de cada fração de lípidos nas diferentes amostras iniciais de sardinhas e salmão, bem como dos respetivos bioacessíveis. Para a realização desta análise, as amostras de gordura são preparadas a uma concentração de 10 mg/mL, em clorofórmio.

Para ativar a sílica e eliminar quaisquer vestígios de humidade, a placa foi à estufa a 110 °C durante 1 hora, e posteriormente foi posta num exsiccador, à temperatura ambiente, para arrefecer.

Enquanto a placa se encontrava no exsiccador, fez-se a mistura de eluição na câmara de eluição, constituída por n-hexano, éter dietílico e ácido acético, na proporção 50:50:2, durante 30 minutos, para saturar o ambiente.

Após o arrefecimento da placa de sílica, colocou-se a mesma no suporte fez-se um risco com o lápis metálico a alguns centímetros da parte superior de modo a evitar que a eluição atinja o topo. Com o auxílio da régua de TLC e de uma micropipeta de exclusão total, aplicaram-se

10 µL de cada amostra.

Terminada a aplicação das amostras, a placa foi posta dentro da tina de eluição, deixando os solventes eluir até ao risco superior. Após o risco ser atingido, retirou-se a placa da tina e deixou-se a mistura evaporar na *hotte*. Pulverizou-se a placa com o corante ácido fosfomobilídico hidratado a 10 % em etanol e a placa foi então colocada na estufa, durante 1 hora, a 120 °C, para revelação das frações lipídicas.

Findo este processo, é possível observar as manchas e com o auxílio do programa informático *Quantity One*, da PDI, calcularam-se as proporções relativas de cada fração.

3.6 Determinação dos Ácidos Gordos

O perfil de ácidos gordos é determinado de acordo com o método descrito por Lepage e Roy (1986), modificado por Cohen et al. (1988) e respeitando o procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura, Valorização e Bioprospeção DivAV.

Este método consiste na transesterificação, em meio ácido, dos ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME – Fatty Acid Methyl Esters).

As amostras foram depois injetadas num GC *Varian Star 3 800* equipado com um auto sampler e um detetor de ionização de chama.

Com as amostras corretamente preparadas (liofilizadas) procedeu-se à pesagem na balança analítica. Pesou-se para tubos de 15 ml aproximadamente 200 mg de pescado.

Seguiu-se a elaboração da solução de Cloreto de acetilo: Metanol (1:19), procedendo-se à medição, com uma proveta graduada, de metanol para um copo de vidro. É importante realçar que o copo estava numa tina cheia de gelo, uma vez que a junção destes dois compostos promove uma reação exotérmica, na qual se liberta calor. Pelo mesmo motivo, a adição do Cloreto de acetilo, com uma pipeta descartável de Pasteur, teve que ser cuidadosa – colocou-se a pipeta junto à parede do copo de vidro e adicionou-se, gota a gota, o cloreto de acetilo, rodando sempre o mesmo.

Adicionou-se a cada tubo contendo a amostra, 5 ml da solução. Seguidamente, agitou-se a amostra, num vortex, durante 30 segundos. De seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 80 °C, durante 1 hora. Após concluído esse tempo, foram retirados e deixados a arrefecer. Caso durante o banho se tenha verificado evaporação total do solvente, adicionou-

se ao respetivo tubo 5 ml de metanol.

Posteriormente, colocou-se 1 ml de água Mili-Q, 2 ml de n-Heptano e agitou-se novamente os tubos, num vortex, durante aproximadamente 30 segundos. Procedeu-se de seguida à separação da fase orgânica e da fase aquosa através de uma centrifugação, durante 5 minutos a 2000 g. Após esta etapa, recolheu-se a fase orgânica (parte superior que contém os ésteres metílicos) e passou-se por uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro, previamente preparada, de modo a garantir que nenhuma fração da fase aquosa fosse transferida para o vial.

De seguida, todas as amostras que necessitavam ser concentradas foram sujeitas a um fluxo contínuo de azoto, de modo a promover a sua evaporação, seguida da adição do volume pretendido de n-Heptano.

Posteriormente, procedeu-se à análise dos FAME através da injeção de 2 µL num cromatógrafo em fase gasosa, com detetor de ionização de chama (FID), a 250 °C. A separação foi efetuada numa coluna capilar e tinha como gás de arraste o hélio. A leitura no cromatograma durou de cerca de 40 minutos por cada injeção.

No final da leitura obteve-se um cromatograma que tem que ser analisado e os ácidos gordos presentes na amostra são identificados através da comparação entre o tempo de retenção obtido para cada um deles e o do obtido nos mesmos ácidos gordos existentes no padrão da Sigma-Aldrich (PUFA-3 óleo de savelha da Supelco Analytical).

Por fim, seguiu-se a etapa de quantificação dos diferentes ácidos gordos em função da sua área do pico, da massa da amostra pesada e da área total dos ácidos gordos da amostra (área total - área do padrão interno). Após a conversão da área em percentagem relativa procedeu-se ao cálculo das médias e respetivos desvio padrão, para que se procedesse à construção dos gráficos.

3.7. Tratamento Estatístico

A análise estatística dos dados foi feita usando o software estatístico STATISTICA 7,0 © (Statsoft, Tulsa, EUA). Para comparar os teores de ácidos gordos analisados entre as amostras recorreu-se à análise de variâncias “One-way” ANOVA e ao teste de “Tukey” quando o n era igual, e o teste “Unequal” quando o n era diferente.

Para tal, foram previamente testados os pressupostos desta análise, i.e, normalidade (teste

de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene F-test). Sempre que não se verificaram os pressupostos foram utilizados testes de análise de variância não paramétricos “Kruskal-Wallis”, seguido de testes de comparações múltiplas. Para comparar se existia diferenças significativas nos teores dos ácidos gordos analisados entre a amostra inicial e bioacessíveis, utilizou-se testes paramétricos “T-test” e testes não paramétricos “Mann-Witney U-test”. Para todas as comparações foi utilizado um nível de significância (α) de $p < 0,05$, ou seja, uma confiança de 95 %.

4. Discussão de Resultados

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos nas diferentes fases deste trabalho, nomeadamente os resultados da composição química de 5 amostras de atum e os resultados do ensaio de Bioacessibilidade onde foram utilizadas amostras de sardinha e salmão.

4.1. Composição Química

Os produtos alimentares que fazem parte da dieta humana são, na sua maioria, submetidos a diferentes tratamentos culinários antes de serem consumidos. Para conhecer as modificações que ocorrem na sua composição química após diferentes tratamentos culinários foram determinados os teores de humidade, proteína, lípidos totais e cinza nas cinco amostras de atum, cada uma analisada crua, cozida e grelhada. Os resultados obtidos estão indicados na tabela 2.

Analisando a tabela 2 é possível observar existe uma redução do teor humidade com o tratamento culinário, sendo esta redução mais significativa quando o peixe é grelhado. Como consequência, os outros constituintes ficam mais concentrados e, assim sendo, as suas percentagens aumentam.

Relativamente ao teor de cinza, este aumentou no peixe grelhado. Segundo Bandarra et al. (2009), este aumento de cinza deve-se não só à perda de água, como também à adição de sal durante os tratamentos culinários, nomeadamente no peixe grelhado. Contudo, apesar da variação ser expectável, os valores de cinza são mais elevados que o esperado, inclusive no atum cru.

Quanto ao teor lipídico das amostras, este também varia conforme o esperado uma vez que

aumentam quando sujeitos aos tratamentos térmicos. No entanto os atuns estudados apresentaram baixos valores de gordura, uma vez que o valor médio do mesmo é segundo tabela de composição dos alimentos, INSA, cerca de 4,9 % para o atum cru, e de 5,8 % para o atum grelhado.

Tabela 2 - Composição química aproximada de humidade, proteína, lípidos e cinza (g/100 g peso fresco) das amostras de atum cru, cozido e grelhado

		Humidade (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cinza (%)
Atum 1	Cru	76,3 ± 0,1	19,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	3,8 ± 0,0
	Cozido	71,4 ± 0,1	26,2 ± 0,3	0,9 ± 0,0	2,7 ± 0,0
	Grelhado	68,5 ± 0,0	28,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	4,2 ± 0,0
Atum 2	Cru	76,3 ± 0,8	19,9 ± 0,8	0,7 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	Cozido	71,6 ± 0,1	25,3 ± 0,6	0,8 ± 0,1	2,6 ± 0,0
	Grelhado	68,3 ± 0,2	26,8 ± 0,2	0,7 ± 0,0	4,8 ± 0,0
Atum 3	Cru	78,1 ± 0,1	18,9 ± 0,3	0,4 ± 0,0	2,7 ± 0,0
	Cozido	71,7 ± 0,0	26,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,0
	Grelhado	69,1 ± 0,2	27,1 ± 0,7	0,5 ± 0,0	4,3 ± 0,0
Atum 4	Cru	74,9 ± 1,9	18,7 ± 0,3	0,6 ± 0,0	3,2 ± 0,1
	Cozido	74,5 ± 0,1	22,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1	2,8 ± 0,0
	Grelhado	69,1 ± 0,2	26,7 ± 0,2	0,7 ± 0,0	5,3 ± 0,0
Atum 5	Cru	74,0 ± 0,1	20,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,0
	Cozido	71,3 ± 0,1	25,1 ± 0,2	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,0
	Grelhado	66,4 ± 0,1	26,8 ± 0,2	2,5 ± 0,0	5,3 ± 0,0

Uma vez que os valores de gordura não foram os esperados e o ensaio tinha como foco os lípidos, nomeadamente os ómega-3, optámos por prosseguir os ensaios de Bioacessibilidade com amostras disponibilizadas pelo IPMA e com valores de gordura já conhecidos.

As amostras estudadas posteriormente foram a sardinha e o salmão, no entanto as amostras apenas foram estudadas cruas, pois não havia amostra suficiente de sardinha para ser sujeita a tratamentos térmicos.

Na tabela 3 são apresentados os dados relativos às composições químicas das amostras de sardinha e da amostra de salmão. Os dados das sardinhas foram fornecidos pelo IPMA e os dados referentes à amostra de salmão, foram obtidos no decorrer deste estudo. No caso do salmão apenas, foram determinados os teores de humidade e de lípidos totais.

Tabela 3 - Composição química aproximada de humidade, proteína, lípidos e cinza (g/100 g peso fresco) das amostras de sardinha e salmão.

	Humidade	Proteína	Lípidos	Cinza
Sardinha 1	75,3 ± 0,1	20,0 ± 0,2	2,2 ± 0,0	1,5 ± 0,0
Sardinha 2	71,1 ± 0,2	20,9 ± 0,1	5,4 ± 0,3	1,5 ± 0,0
Sardinha 3	66,3 ± 0,1	22,9 ± 0,7	10,2 ± 0,1	1,5 ± 0,0
Salmão	64,8 ± 0,0	-	16,6 ± 0,1	-

Analisando a tabela 3, verifica-se que as amostras de sardinha seleccionadas apresentam diferentes teores de gordura. Foi também utilizada uma amostra de salmão, com uma percentagem de lípidos superior às das amostras de sardinha, de modo a ilustrar uma gama muito mais elevada. Esta seleção foi feita com o intuito de observar de que forma a bioacessibilidade dos ácidos gordos é influenciada pela variação do teor lipídico.

Como referido anteriormente, o teor de gordura na sardinha tem uma variação sazonal, e por isso pode variar entre os 1,2 % e os 18,4 % (Bandarra *et al.* 2001), estando os valores das amostras estudadas apresentados neste intervalo.

Na tabela 3 verifica-se que a amostra de salmão, tem um teor de gordura inferior ao mencionado na tabela de composição dos alimentos, INSA, de 21,9 %. Assim, de forma

expectável, o teor de humidade é ligeiramente superior ao mencionado na mesma tabela, de 60,5 %.

4.2. Ensaio de bioacessibilidade

No ensaio de bioacessibilidade foram utilizadas as três amostras de sardinhas com diferentes teores lipídicos e a amostra de salmão.

4.2.1. Identificação das classes lipídicas

Para a identificação e quantificação das diferentes classes lipídicas presentes nas diferentes amostras após o processo digestivo, nos respetivos bioacessíveis, recorreu-se à análise das TLC analíticas, apresentadas na figura 7 e 8. Os resultados estão presentes na figura 9.

Na figura 7 é possível verificar que a sardinha 1 tem um maior nível de FFA e menor de TAG. Por outro lado, as sardinhas 2 e 3 aparentam ter níveis semelhantes entre si, com o maior valor a ser representado pelos TAG.

Em todas as amostras de sardinha a classe dos MAG é pouco expressiva.

Quanto à amostra de salmão, analisando a TLC analítica, esta apresentou na amostra inicial um valor de TAG elevado, tal como esperado. Esta amostra, conforme é possível verificar na análise da figura 7, não apresentava as classes MAG e FFA, o que denota uma qualidade elevada.

Quanto aos bioacessíveis, figura 8, é possível perceber que houve uma digestão aproximadamente total dos TAG, sendo a classe predominante a dos FFA. É também visível a presença, nos bioacessíveis das amostras de sardinha, da classe lipídica MAG, com um contraste bastante superior às amostras iniciais de sardinha.

Quanto ao bioacessível da amostra de salmão, verificamos que as duas classes lipídicas que não estavam presentes na amostra inicial, surgem após a digestão, os FFA e os MAG.

Após a utilização do software informático Quantity One, obteve-se as percentagens relativas de cada fração, apresentadas na figuras 9.

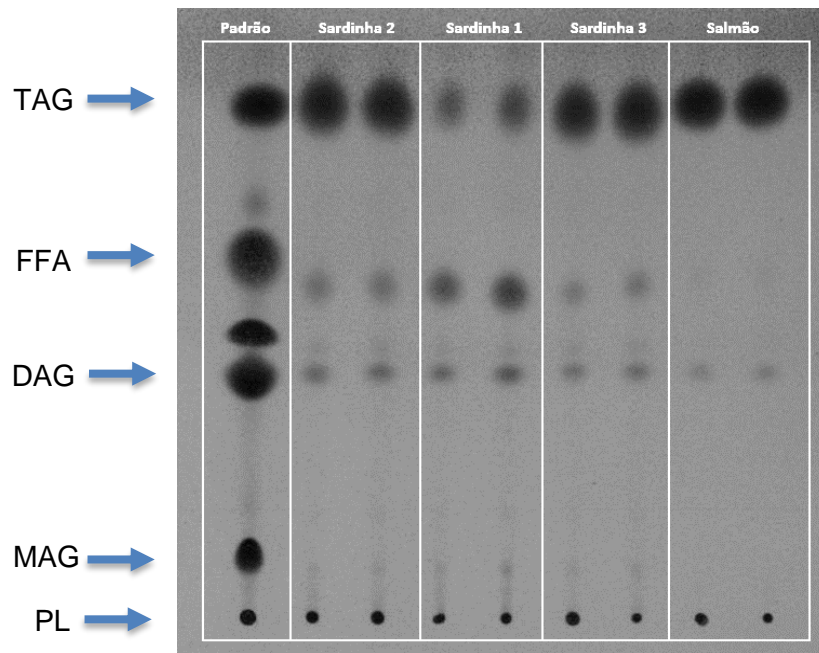


Figura 7 - TLC analítica inicial das amostras de sardinha e de salmão

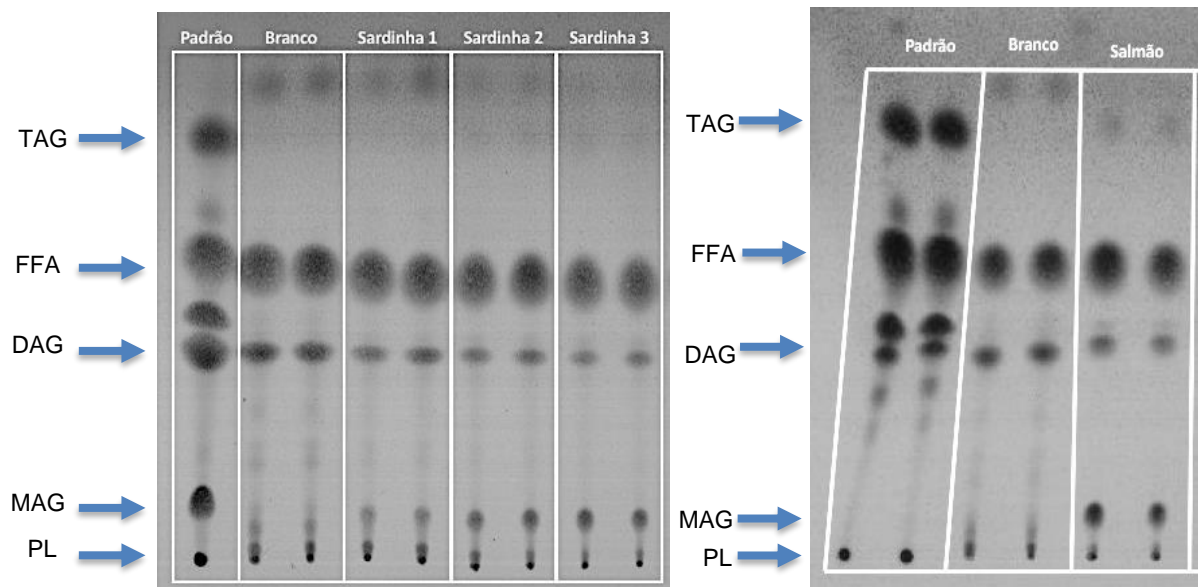


Figura 8 - TLC analítica do bioacessível das amostras de sardinha e de salmão

Analisando a figura 9 verificamos que não foi possível quantificar os MAG em nenhuma amostra inicial, devido ao baixo contraste que apresentavam.

Na amostra inicial de salmão é possível verificar que para além dos MAG, também não foi possível quantificar os FFA.

Comparando as quatro amostras iniciais, foi possível verificar que os PL, juntamente com os FFA e os DAG, apresentaram-se em menor quantidade quanto maior a percentagem de gordura na amostra. Quanto à classe dos TAG, sucedeu o inverso, tendo esta percentagem aumentado quanto maior o teor de gordura da amostra.

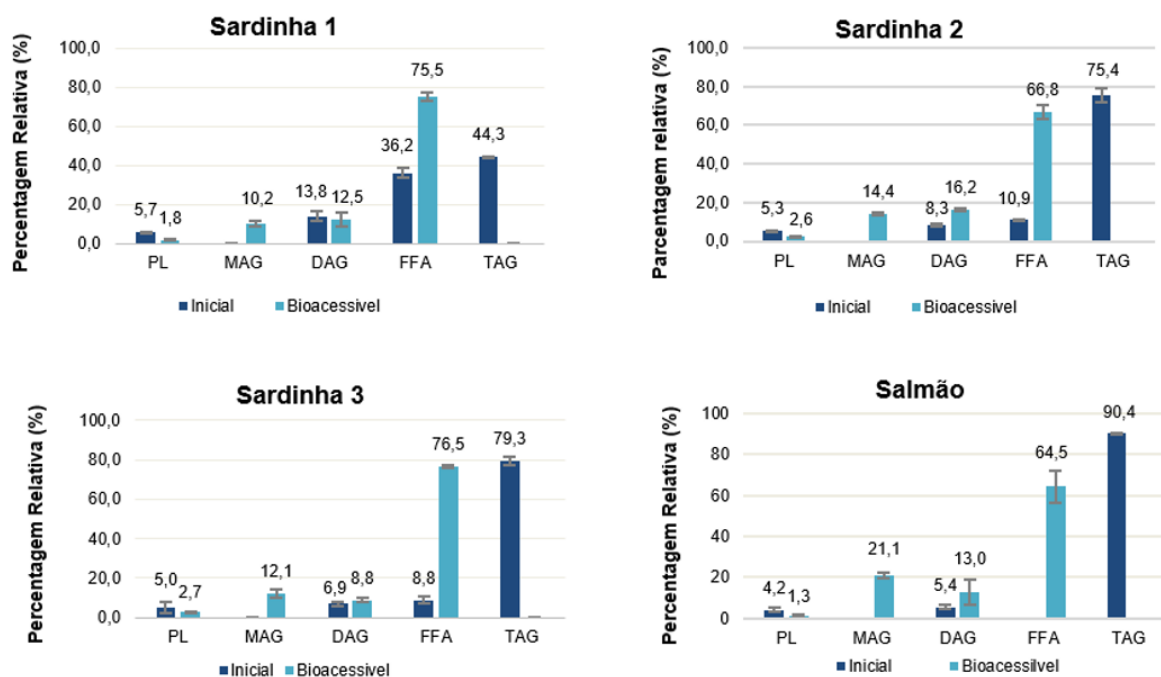


Figura 9 – Percentagem relativa das classes lipídicas das amostras estudadas

Quanto aos TAG, os mesmos são a classe que apresentam maior percentagem relativa em todas as amostras iniciais, sendo totalmente digeridos em todas as amostras após a digestão. Face à digestão completa desta classe lipídica, podemos concluir que a digestão foi eficaz.

4.2.2. Perfil de ácidos gordos

Após a catálise ácida da gordura extraída das amostras iniciais, bem como das frações bioacessíveis das sardinhas com diferentes digestões, foi possível obter o perfil de ácidos gordos para cada amostra, descritos nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

Na tabela 4 é possível observar o perfil de ácidos gordos da sardinha com menor teor de gordura, sardinha 1.

Tabela 4 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 1 (mg/100 g)

Ácido Gordido	Sardinha 1 inicial (mg/100 g de amostra)	Sardinha 1 bioacessível (mg/100 g de amostra)
14:0 (ácido mirístico)	179,2 ± 9,0 ^a	110,7 ± 1,0 ^a
16:0 (ácido palmítico)	592,2 ± 2,4 ^b	523,8 ± 32,1 ^b
18:0 (ácido esteárico)	104,9 ± 3,6 ^a	200,1 ± 23,2 ^a
SFA	929,4 ± 4,2^b	910,8 ± 32,1^b
16:1 ω 7 (ácido palmitoleico)	144,6 ± 0,5 ^b	105,2 ± 2,4 ^a
18:1 ω 9 (ácido oleico)	95,5 ± 0,5 ^b	72,2 ± 7,0 ^b
MUFA	347,5 ± 2,0^b	274,2 ± 10,6^a
18:2 ω 6 (ácido linoleico)	24,2 ± 0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
18:3 ω 3 (ácido α -linolénico)	9,1 ± 0,1 ^b	7,2 ± 0,2 ^a
20:5 ω 3 (EPA)	147,4 ± 3,0 ^a	186,2 ± 0,0 ^b
22:6 ω 3 (DHA)	251,8 ± 7,2 ^a	296,0 ± 0,0 ^b
PUFA	577,7 ± 0,5^a	612,2 ± 6,5^b
$\Sigma \omega$ 3	481,3 ± 3,4 ^a	570,4 ± 4,6 ^b
$\Sigma \omega$ 6	61,6 ± 0,9 ^b	20,2 ± 4,3 ^a
ω 3/ ω 6	7,8 ± 0,2 ^a	29,0 ± 6,5 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatísticas (p < 0,05).

Através da análise desta tabela é possível verificar que os SFA são os que estão em maior quantidade, principalmente devido à contribuição do ácido palmítico (16:0), que apresenta o valor mais alto da tabela.

No entanto, verifica-se que a quantidade de ácido esteárico (18:0) bioacessível é superior aquela presente na amostra inicial e que o mesmo acontece para os ácidos gordos EPA e DHA, sendo este último o ácido gordo em maior quantidade dentro do grupo dos ω 3.

À semelhança da tabela anterior, na tabela 5 constam dois perfis de ácidos gordos, o inicial e o bioacessível da sardinha 2.

É possível compreender, analisando a tabela 5, que os PUFA são os que estão em maior quantidade, com um importante contributo do EPA e do DHA, sendo este último o que apresenta maior valor na tabela.

Tabela 5 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 2 (mg/100 g)

Ácido Gordo	Sardinha 2 inicial (mg/100 g de amostra)	Sardinha 2 bioacessível (mg/100 g de amostra)
14:0 (ácido mirístico)	372,5 ± 21,5 ^a	335,0 ± 1,1 ^a
16:0 (ácido palmítico)	844,2 ± 8,7 ^a	793,6 ± 132,2 ^a
18:0 (ácido esteárico)	207,6 ± 2,8 ^a	143,4 ± 73,8 ^a
SFA	1602,9 ± 29,4^a	1420,1 ± 243,2^a
16:1 ω 7 (ácido palmitoleico)	277,1 ± 3,5 ^a	307,2 ± 20,2 ^a
18:1 ω 9 (ácido oleico)	271,7 ± 3,5 ^a	231,8 ± 7,5 ^a
MUFA	1107,3 ± 0,7^a	1122,4 ± 49,4^a
18:2 ω 6 (ácido linoleico)	67,6 ± 0,7 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
18:3 ω 3 (ácido α -linolénico)	34,0 ± 0,3 ^a	27,7 ± 3,4 ^a
20:5 ω 3 (EPA)	537,5 ± 8,0 ^b	360,1 ± 50,2 ^a
22:6 ω 3 (DHA)	873,1 ± 15,6 ^b	444,3 ± 36,3 ^a
PUFA	2025,6 ± 5,5^b	1214,4 ± 148,0^a
$\Sigma \omega$ 3	1741,0 ± 7,3 ^b	1057,1 ± 119,9 ^a
$\Sigma \omega$ 6	225,4 ± 2,4 ^b	66,6 ± 19,5 ^a
ω 3/ ω 6	7,7 ± 0,1 ^a	16,3 ± 3,0 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatísticas (p <0,05).

Quanto aos SFA, o que apresenta maior quantidade é o ácido palmítico (16:0), à semelhança do que se observa no perfil da sardinha 1.

Nesta amostra é possível verificar que o ácido palmitoleico (16:1 ω 7) tem um valor superior no bioacessível do que na amostra inicial.

A tabela 6, referente aos perfis de ácidos gordos da sardinha 3 inicial e bioacessível, demonstra que na amostra inicial o ácido palmítico (16:0) é o ácido gordo em maior quantidade, seguido do EPA e do DHA, respetivamente. Contudo, analisando os valores da amostra bioacessível, o ácido palmítico (16:0) e o EPA apresentam-se também com as

quantidades mais elevadas, porém seguidos do ácido palmitoleico (16:1 ω 7).

À semelhança do que acontece na sardinha 1 e 2, o ácido palmítico (16:0) é o ácido gordo saturado em maior quantidade.

Tabela 6 - Perfil de ácidos gordos da sardinha 3 (mg/100 g)

Ácido Gordo	Sardinha 3 inicial (mg/100 g de amostra)	Sardinha 3 bioacessível (mg/100 g de amostra)
14:0 (ácido mirístico)	631,8 \pm 143,2 ^a	651,3 \pm 4,8 ^a
16:0 (ácido palmítico)	1872,4 \pm 129,2 ^b	1400,4 \pm 82,8 ^a
18:0 (ácido esteárico)	386,7 \pm 11,3 ^b	132,5 \pm 60,0 ^a
SFA	3184,7 \pm 261,8^a	2371,7 \pm 162,2^a
16:1 ω 7 (ácido palmitoleico)	682,4 \pm 19,9 ^a	897,1 \pm 13,8 ^b
18:1 ω 9 (ácido oleico)	644,4 \pm 12,6 ^a	668,1 \pm 4,8 ^a
MUFA	2200,5 \pm 31,2^a	2465,5 \pm 2,8^b
18:2 ω 6 (ácido linoleico)	90,5 \pm 0,7 ^b	4,2 \pm 3,5 ^a
18:3 ω 3 (ácido α -linolénico)	56,7 \pm 0,7 ^a	54,4 \pm 1,4 ^a
20:5 ω 3 (EPA)	1435,1 \pm 188,2 ^a	1266,3 \pm 45,5 ^a
22:6 ω 3 (DHA)	1123,9 \pm 1,3 ^b	844,1 \pm 41,4 ^a
PUFA	3705,4 \pm 239,9^a	3204,1 \pm 138,7^a
$\sum \omega$ 3	3223,6 \pm 214,8 ^a	2759,1 \pm 116,6 ^a
$\sum \omega$ 6	277,9 \pm 21,9 ^b	136,9 \pm 14,5 ^a
ω 3/ ω 6	11,6 \pm 0,1 ^b	20,2 \pm 1,3 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatísticas (p <0,05).

Os PUFA são o grupo que está em maior quantidade, com um importante contributo do EPA e do DHA.

É também possível verificar que o ácido mirístico (14:0), o ácido palmitoleico (16:1 ω 7) e o ácido oleico (18:1 ω 9) têm um valor superior no bioacessível do que na amostra inicial.

Na tabela 7 observamos o perfil de ácidos gordos do salmão, onde constam dois perfis de ácidos gordos, o perfil inicial e o bioacessível.

Através da análise da tabela 7 é possível verificar que os MUFA são os que estão em maior quantidade, nomeadamente o ácido oleico (18:1 ω 9).

O ácido linoleico (18:2 ω 6) é o segundo em maior quantidade, seguido do ácido palmítico (16:0), que às semelhança das amostras de sardinha é o ácido gordo saturado em maior quantidade.

Tabela 7 - Perfil de ácidos gordos do salmão (mg/100 g)

Ácido Gordo	Salmão inicial (mg/100 g de amostra)	Salmão bioacessível (mg/100 g de amostra)
14:0 (ácido mirístico)	327,7 \pm 2,2 ^b	261,6 \pm 2,3 ^a
16:0 (ácido palmítico)	1401,2 \pm 6,6 ^b	1147,3 \pm 2,3 ^a
18:0 (ácido esteárico)	351,9 \pm 1,1 ^b	314,7 \pm 1,2 ^a
SFA	2342,9 \pm 1,1^b	1969,2 \pm 3,5^a
16:1 ω 7 (ácido palmitoleico)	391,7 \pm 2,2 ^b	342,5 \pm 0,0 ^a
18:1 ω 9 (ácido oleico)	6051,2 \pm 28,7 ^a	6501,4 \pm 15,3 ^b
MUFA	7468,9 \pm 32,0^a	8260,4 \pm 21,2^b
18:2 ω 6 (ácido linoleico)	2233,7 \pm 5,5 ^b	2109,0 \pm 0,0 ^a
18:3 ω 3 (ácido α -linolénico)	862,9 \pm 4,4 ^b	786,3 ^v \pm 1,2 ^a
20:5 ω 3 (EPA)	458,0 \pm 1,1 ^b	370,2 \pm 14,1 ^a
22:6 ω 3 (DHA)	887,9 \pm 6,6 ^b	572,5 \pm 1,2 ^a
PUFA	5436,4 \pm 4,4^b	4745,6 \pm 14,1^a
Σ ω 3	2842,3 \pm 3,3 ^b	2311,6 \pm 10,6 ^a
Σ ω 6	2514,6 \pm 1,1 ^b	2347,6 \pm 3,5 ^a
ω 3/ ω 6	1,1 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatísticas (p < 0,05).

A tabela 8 apresenta a percentagem de bioacessível dos principais ácidos gordos para cada uma das amostras.

Analisando a tabela, verificamos que há vários ácidos gordos com valores superiores a 100%. No caso da amostra da sardinha 1, os valores acima dos 100% para o EPA e DHA estão relacionados com o seu muito baixo teor lipídico. Quanto aos MUFA nas amostras com maior teor lipídico, esta situação poderá ter ocorrido devido à composição da matriz enzimática.

Os SFA apresentam uma complexidade estrutural inferior à apresentada pelos MUFA e PUFA. Assim, é espectável que a percentagem de bioacessível de ácidos gordos saturados, neste

caso do ácido palmítico, seja superior à percentagem de bioacessível do ácido oleico e do EPA e DHA.

Tabela 8 – Percentagem de bioacessível dos principais ácidos gordos

Ácido Gordo	Sardinha 1	Sardinha 2	Sardinha 3	Salmão
16:0 (ácido palmítico)	88%	94%	75%	82%
18:1 ω 9 (ácido oleico)	76%	85%	104%	107%
20:5 ω 3 (EPA)	126%	67%	88%	81%
22:6 ω 3 (DHA)	118%	51%	75%	64%

Assim, analisando a tabela 8, a amostra que apresenta os resultados mais convincentes é a amostra 2, com o ácido palmítico com uma percentagem de bioacessível de 94 %, face aos 85% do ácido oleico, 67% do EPA e 51% do DHA.

Face a estes resultados foi calculada a soma do EPA e DHA bioacessível em mg/ 100g para a sardinha 2.

Tendo em conta o valor nutricional da sardinha 2 e o valor de bioacessível do EPA+DHA, para ingerirmos 500 mg seria necessário consumir 62,2g de sardinha. Conforme verificamos na tabela 8, a bioacesibilidade média do destes dois ácidos ordos é 59%. Assim, tendo em conta essa informação, seria necessário ingerir 84,5 g de sardinha para atingir os 500 mg de EPA e DHA recomendados para a prevenção da doença cardiovascular (Kris-Etherton et al. 2002; EFSA, 2015).

5. CONCLUSÕES

A preocupação do consumidor com a sua saúde e bem-estar tem vindo a aumentar, bem como a preocupação em manter uma alimentação mais saudável e a procurar alimentos mais saudáveis.

Contudo, a composição química e nutricional de um alimento não nos garante que todos os seus compostos e nutrientes sejam totalmente absorvidos pelo organismo humano.

Este estudo teve como principal objetivo o estudo da bioacessibilidade dos ácidos gordos em pescado com diferentes teores de gordura, devido à importância que a composição lipídica apresenta neste tipo de alimentos.

O tratamento culinário promoveu um decréscimo na humidade do atum, mais acentuado nas amostras grelhadas do que cozidas. Este decréscimo da humidade proporciona, por consequência, um aumento na concentração dos restantes constituintes.

Foi possível concluir que quanto maior a percentagem de gordura a amostra estudada tiver, maior também a percentagem de TAG, considerados lípidos de reserva, que se situam numa região subcutânea do peixe e que são mais facilmente digeridos. Por outro lado, os ácidos gordos presentes na classe dos PL são menos acessíveis, uma vez que são essencialmente lípidos estruturais, localizados mais internamente no músculo do peixe.

Face aos resultados obtidos é possível concluir também que este modelo necessita de uma otimização, nomeadamente para matrizes com baixos teores de gordura.

O cálculo de % de bioacessibilidade dos principais ácidos gordos permitiu verificar que há vários fatores que influenciam a mesma, incluindo o teor lipídico do pescado, bem como a matriz enzimática, entre outros.

Foi ainda possível verificar que para atingir o consumo recomendado de 500 mg de EPA e DHA, temos que consumir uma maior quantidade de sardinha, uma vez que a bioacessibilidade destes ácidos gordos é inferior a 100 %. Assim, considera-se que estes modelos digestivos permitem um ajuste nas doses de ácidos gordos ómega-3 a ingerir devido a uma avaliação mais real.

No futuro, seria importante dar continuidade a este estudo, avaliando a bioacessibilidade de pescado com diferentes teores lipídicos em pescado cozinhado, que é a forma preferencial como os mesmos são consumidos.

Referências Bibliográficas

Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Bandarra, N. M., Batista, I., Coelho, I., Castanheira, I., Nunes, M. L., 2015. Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model. *Food Chemistry*, vol. 170, pp. 249-256.

Arterburn, L. M., Hall, E. B., Oken, H., 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol 83, pp. S1467–S1476.

ASAE, 2012. Riscos e Alimentos nº 4. DACR - Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar da ASAE. 37 p. Disponível em: [. Acesso em: 18/01/2017.](#)

Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., Empís, J. M., 2001 - Seasonal variation in the chemical composition of the horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). *Eur. Food Res. Technol.* ISSN: . Vol. 212, pp. 535-539.

Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., 2001. O óleo de sardinha e a saúde. IPIMAR Divulgação, Lisboa.

Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., 2009. Chemical composition and nutritional value of raw and cooked black scabbard fish (*Aphanopus carbo*). *Sci. Mar.* 73S2, pp. 105–113.

Bandarra, N.M., Calhau, M.A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M.G., Bártolo, H., Faria, M.R., Fonseca, M.C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M.L., 2004. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, Lisboa, Vol. 11, p. 103.

Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry*. 4a ed. Springer-Verlag, Berlin, p. 1070.

Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, pp. 911-917.

Campos, L. S. 2009. *Entender a Bioquímica*, 5ª Edição. Escolar Editora, 683 p.

Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., Nunes, M. L., 2015. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology*, Vol 40, pp. 5-23.

CE, 2014. Factos e números sobre a política comum das pescas — Dados estatísticos de base — Edição de 2014. Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia 2014. Disponível em: <http://www.infoeuropa.eu/ocid.pt/files/database/000061001-000062000/000061188.pdf>. Acesso em: 23/10/2016

CE, 2016. Factos e números sobre a política comum das pescas — Dados estatísticos de base — Edição de 2016. Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia 2016. Disponível em: https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/pcp_pt.pdf Acesso em: 18/01/2017.

Cohen, Z., Von Shak, A., Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.*, Vol. 24, pp. 328–332.

Decreto Lei no 375/98 de 24 de novembro do Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas. *Diário da República*: I série, No 272. Disponível em: <http://data.dre.pt/eli/dec-lei/375/1998/p/dre/pt/html>. Acesso em: 10/01/2017

DGPA, 2015. Programa Operacional Pesca 2007-2013. MADRP – Direção Geral das Pescas e Aquicultura. Disponível em: http://www.promar.gov.pt/Download/PROMAR/PO_janeiro2015.pdf. Acesso em: 18/01/2017.

Domingo, J. L., Bocio, A., Falcó, G., Llobet, J. M., 2007. Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*. Vol 230, pp. 219-226.

EFSA, 2015. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Scientific Committee. *EFSA Journal* 2015;13(1):3982. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3982>. Acesso em: 6/12/2016

FAO/WHO, 2011. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations; Geneva, World Health Organization. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/014/ba0136e/ba0136e00.pdf>. Acesso em: 6/12/2016

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A. 2009 - In vitro bioaccessibility

assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*. ISSN: 0271-5317. Nº 29, pp. 751-760.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), pp. 497-509.

He, K., 2009. Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease - Eat Fish or Take Fish Oil Supplement?. *Progress in Cardiovascular Diseases*. Vol 52, pp. 95-114.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J., 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. Vol 125, pp. 1-12.

Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes on fresh fish. *FAO Fisheries Technical paper - 348*. FAO, Rome. 203 pp. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/v7180e/V7180E00.htm>. Acesso em: 12/12/2016.

IOM, 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. *National Academic Press, Washington (DC)*, p. 1131.

ISSFAL, 2004. Recommendations for intake of Polyunsaturated fatty acids in healthy adults. *Brighton, UK*, p. 22.

Kris-Etherton, P., Harris, W., Appel, L., 2002. American Heart Association Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease.

Circulation, 2002;106:2747–2757. Disponível em:

<http://circ.ahajournals.org/content/106/21/2747>. Acesso em: 14/12/2016

Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R., Ventura, H. O., 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol 54, No 7, pp. 585-594.

Lepage, G., Roy, C.C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a onestep reaction. *J. Lipid Res*. Vol 27, pp. 114–119.

Mahan, L. K., Escott-Stump, S., 2008. *Krause's food & the nutrition therapy*. International Edition, 12th Edition. Elsevier/Saunders.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F.,

Boutrou, R., Corregid, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschiest, W., Brodkorb, A., 2014 - A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, pp. 1113–1124.

NP 2032, 2009. Determinação do teor de cinza total. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.

NP 2282, 2009. Determinação do teor de humidade. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.

Nunes, M.K., Bandarra, N.M., Batista, I. 2011. Health benefits associated with seafood consumption. In Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U. (EDS). *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, WILEY Blackwell, UK, pp. 369-379.

Nunes, M.I., Batista, I., Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O. 2008. *Produtos da Pesca: Valor Nutricional e Importância para a Saúde e Bem-Estar dos consumidores*. Publicações Avulsas do IPIMAR, ISSN 0872-914X, No18, Lisboa.

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Brandon, E.F.A., Kamp, E., Duits, M. R., CHM Versantvoort, C. H. M., JGM van Engelen, J. G. M., Sips, A. J. A. M., 2005 - Consumer Product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants from toys and application in risk assessment. RIVM report no. 320102004. Disponível em:
<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/7304/1/320102004.pdf>.
Acesso em: 3/05/2016.

Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de Novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. Disponível em:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:PT:PDF>.
Acesso em: 11/10/2016

Saint-denis, T., Goupy, J., 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Ana. Chim. Acta* 515, pp. 191–198.

Seeley, R., Stephens, T. D., Tate, P., 2003. *Anatomia e Fisiologia*. 6ª Edição. McGraw-Hill

Companies, Inc.

Sidhu, K. S., 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Vol 38, pp. 336-344.

Tocher, D. 2003. Metabolism and functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Fisheries Science*. Vol 11, pp. 107-184.

Turan, H., Sönmez, G., & Kaya, Y., 2007. Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata* L. 1975) from the Sinop coast in the Black Sea. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 1(2), pp. 97–103.

Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., van de kamp, E., Rompelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M., 2005 - Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, pp. 31-40.

Versantvoort, C. H. M., Van de kamp, E., Rompelberg, C. J. M., 2004 - Development of an in vitro digestion model to determine the bioaccessibility of contaminants from food. Report no 320102002, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Williams, C. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech*. Vol 49, pp. 165-180.