



***Síntese enzimática de lípidos estruturados sucedâneos
de gordura de leite humano, enriquecidos em ácidos
gordos polinsaturados***

Tiago Filipe da Silva Simões

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Carla Sofia
Ramos Tecelão e co-orientação da Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias
Vicente

[2011]

Título: Síntese enzimática de lípidos estruturados sucedâneos de gordura de leite humano, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados

Copyright © Tiago Filipe da Silva Simões

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projecto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Professora Doutora Carla Tecelão pelo tempo, sabedoria, competência e amizade que generosamente dedicou a esta minha tese transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Acima de tudo, obrigado por me continuar a acompanhar nesta jornada pois sem ela nunca teria sequer começado.

À professora Doutora Suzana Ferreira Dias pela sua inteira disponibilidade de recursos e pela orientação sábia e saliente em pontos fulcrais na presente tese.

À professora Doutora Maria Manuel Sampaio pela sua inteira disponibilidade em prestar a sua ajuda neste trabalho.

À minha família, por me fazerem sentir orgulhoso, por se sentirem da mesma forma, e por me recordarem de quem sou, pois a distância por vezes faz-nos sentir algo incompletos.

À Ana, que me apoiou incondicionalmente, mesmo em alturas mais difíceis, sempre com a sua forma de estar radiante e contagiosa, e de bata vestida, quando necessário. É muito mais fácil trabalhar e estar, contigo por perto.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e na concretização deste trabalho, e que me estimularam intelectual e emocionalmente.

Obrigado.

RESUMO

RESUMO

Na gordura de leite humano (HMF- “Human Milk Fat”), o ácido palmítico encontra-se esterificado principalmente na posição interna (*sn*-2) dos triacilgliceróis, enquanto os ácidos gordos insaturados ocupam as posições externas (*sn*-1,3).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA- “Polyunsaturated Fatty Acids”) de cadeia longa, como o ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) são considerados essenciais ao desenvolvimento do recém-nascido.

No presente trabalho pretendeu produzir-se sucedâneos de gordura de leite humano (HMFS- “Human Milk Fat Substitutes”) por reação de acidólise enzimática entre a banha e um concentrado de óleo de peixe rico em PUFA, em meio livre de solvente.

Testaram-se lipases comerciais imobilizadas de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IMTM), de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IMTM), de *Candida antártica* (Novozym 435TM), e a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AKTM) não imobilizada. Foram também testados biocatalisadores não comerciais, entre os quais a lipase/ aciltransferase de *Candida parapsilosis* imobilizada em Accurel[®] MP 1000, a lipase de *Carica papaya* autoimobilizada no látex da papaia e a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (*r*ROL) expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris* e imobilizada em Accurel[®] MP 1000.

Após 24h de reacção a 50°C obtiveram-se incorporações molares de PUFA de 17,48% para a “Novozym 435TM”, de 16,92% para a *r*ROL e de 16,75% para a “Lipozyme RM IMTM”. As restantes incorporações variaram entre 8,01% (*C. papaya*) e 4,37% (Amano AK). A *r*ROL foi o biocatalisador selecionado para ensaios de modelação e optimização das condições reacionais pela Metodologia das Superfícies de Resposta (RSM- “Response surface Methodology”) por se tratar de um biocatalisador não comercial, de baixo custo e sobre o qual existem poucos estudos publicados.

A lipase apresentou melhor atividade de acidólise para uma temperatura de 40°C e razão molar 1:3 (banha/PUFA). Quer o aumento da temperatura como da razão molar conduziram a menores incorporações de PUFA nos TAG.

Estudou-se a estabilidade operacional de *r*ROL em ensaios de reutilização sucessiva. Observou-se uma redução de cerca de 20% na actividade residual do biocatalisador, entre a primeira e a segunda reutilização e entre a terceira e a quarta.

A seleção do biocatalisador deve ser feita em função da sua actividade de interesterificação e da estabilidade operacional.

*r*ROL é um biocatalisador com elevada potencialidade para a síntese de HMFS.

Palavras-chave: ácidos gordos polinsaturados; banha; interesterificação; lipases; lípidos estruturados; sucedâneos de gordura de leite humano.

ABSTRACT

ABSTRACT

In human milk fat (HMF-"Human Milk Fat"), palmitic acid is mostly esterified at the internal position (*sn*-2) of triacylglycerols, while unsaturated fatty acids occupy the external positions (*sn*-1, 3).

Long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are considered essential for the development of the newborn.

This study aims at the production of HMF substitutes (HMFS) by enzymatic acidolysis reaction between lard and a fish oil rich in PUFA, in a solvent-free media.

Immobilized commercial lipases from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IMTM), from *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IMTM), from *Candida antarctica* (Novozym 435TM) and the non-immobilized commercial lipase from *Pseudomonas fluorescens* (Amano AKTM), were tested. Non-commercial biocatalysts were also tested including the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* immobilized in Accurel[®] MP 1000, the *Carica papaya* lipase self-immobilized in papaya latex and the heterologous *Rhizopus oryzae* lipase (*r*ROL) expressed in a recombinant *Pichia pastoris* strain and immobilized in Accurel[®] MP 1000.

After 24h reaction at 50°C, PUFA molar incorporations of 17.48% for "Novozym 435TM", 16.92% for *r*ROL and 16.75% for "Lipozyme RM IMTM" were attained. The remaining mean incorporations ranged from 8.01% (*C. papaya*) to 4.37% (Amano AK). Response surface methodology was used to model and optimize the reaction catalyzed by *r*ROL, which is a low cost non commercial biocatalyst that hasn't been extensively studied.

The highest acidolysis activity was achieved at 40°C using a molar ratio 1:3 (lard/PUFA). The incorporations levels of PUFA in TAG decreased with both temperature and molar ratio.

Operational stability studies for *r*ROL in consecutive reutilizations were performed. A decrease of about 20% on the activity of the biocatalyst was observed between the first and the second batch and between the third and the fourth batch.

The selection of the appropriate biocatalyst must be performed taking into account the catalytic activity and the operational activity.

*r*ROL is a suitable biocatalyst for the synthesis of HMFS.

Keywords: human milk fat substitutes; interesterification; lard; lipases; polyunsaturated fatty acids; Structured lipids

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	ix
ÍNDICE GERAL	Xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	Xxi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Enquadramento do Tema	3
1.2. Objetivos	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1. OS LÍPIDOS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS ...	9
2.1.1. Os Ácidos Gordos	9
2.1.2. Os Triacilgliceróis	11
2.2. A FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE HUMANO	13
2.3. LÍPIDOS ESTRUTURADOS	15
2.3.1. Definições e Aspetos Gerais	15
2.3.2. Sucedâneos do Leite Materno	16
2.3.3 Produção de Lípidos Estruturados	17
2.3.3.1. Interesterificação/ Acidólise Enzimática	17
2.3.3.2. Atividade Catalítica das Lipases	18
2.3.3.2.1. Especificidade e seletividade das lipases	19
2.3.3.2.2. Enzima Livre/ Imobilizada	20
2.3.3.3. Parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade enzimática	21

3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAIS	29
3.1.1. Biocatalisadores	29
3.1.2. Substratos	29
3.1.2.1. Fonte de Ácido Palmítico	29
3.1.2.2. Fonte de Ácidos Gordos Livres	30
3.1.3. Reagentes e Outros Materiais	31
3.1.4. Equipamentos e Utensílios	32
3.2. MÉTODOS	33
3.2.1. Preparação dos ácidos gordos polinsaturados	33
3.2.2. Imobilização da lipase heteróloga de <i>Rhizopus oryzae</i>	33
3.2.3. Interesterificação Enzimática	34
3.2.3.1. Atividade do Biocatalisador	35
3.2.3.2. Modelação e Otimização da Interesterificação	36
3.2.3.2.1. Metodologia das Superfícies de Resposta ...	36
3.2.3.2.2. Modo Operatório	39
3.2.3.3. Estabilidade Operacional	40
3.2.4. Métodos Analíticos	40
3.2.4.1. Análise dos Produtos de Reação	40
3.2.4.1.1. Cromatografia em Camada Fina	40
3.2.4.1.2. Derivatização/ Metilação	41
3.2.4.1.3. Análise por Cromatografia Gasosa Capilar ..	42
3.2.4.1.4. Incorporação e Rendimento	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Rendimento de imobilização de rROL em Accurel MP 1000	47
4.2. Seleção do biocatalisador	48
4.3. Modelação e otimização das condições reacionais para a lipase heteróloga <i>Rhizopus oryzae</i>	54
4.4. Estabilidade Operacional	59
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	61
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação Estrutural de um Ácido Gordo	9
Figura 2.2. Estrutura de alguns ácidos gordos insaturados comuns	11
Figura 2.3. Estrutura representativa de um triacilglicerol. A – estrutura sn, B – estrutura ótica	12
Figura 2.4. Representação da estrutura dos principais triacilgliceróis da gordura do leite materno	13
Figura 2.5. Diferentes reações catalisadas pelas lipases em sistemas aquosos e não aquosos	18
Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases 1,3-específicas e por lipases não específicas	20
Figura 3.1. Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm ³) sob agitação magnética	34
Figura 3.2. “Central Composite Rotatable Design” (CCRD) para dois fatores X1 e X2.....	37
Figura 3.3. Esquema representativo do processo de metilação dos triacilgliceróis ..	42
Figura 4.1. Recta de calibração obtida para o padrão BSA	47
Figura 4.2. Incorporações molares médias para os biocatalisadores testados com comparação entre banha comercial e banha em rama (fontes de ácido palmítico). EPAX 1050 como fonte de AGL	49
Figura 4.3. Incorporação molar para os biocatalisadores não comerciais testados, usando como substratos banha em rama e EPAX 4020 EE	52
Figura 4.4. Rendimento total de incorporação para o biocatalisador Novozym 435, usando como substratos banha em rama e tripalmitina	53
Figura 4.5. Superfície de resposta (a) e respectiva projeção (b), relativa à incorporação molar de PUFA nos TAG de banha, tendo como variáveis a temperatura e razão molar	56
Figura 4.6. Relação linear entre os resultados preditos pelo modelo e os observados experimentalmente	57
Figura 4.7. Estudo de estabilidade operacional, em ensaios de reutilização em descontínuo, realizados com a lipase rROL. Atividade residual (%) ao fim de cada reutilização de 24 h	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Nomes e designações de alguns ácidos gordos comuns	10
Tabela 3.1. Composição em ácidos gordos dos substratos utilizados como fontes de ácido palmítico na posição <i>sn</i> -2 e composição em ácidos gordos do leite materno	30
Tabela 3.2. Composição em ácidos gordos dos substratos utilizados como fontes de ácidos gordos livres	30
Tabela 3.3. Enzimas e parâmetros reacionais testados na fase de “screening” inicial	35
Tabela 3.4. Matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”) codificada para duas variáveis, X_1 e X_2 (temperatura e razão molar)	37
Tabela 3.5. Matriz Central Compósita Rotativa codificada e decodificada dos ensaios de interesterificação de banha em rama com ácidos gordos PUFA	39
Tabela 3.6. Massas moleculares e massas dos respectivos ésteres metílicos de ácidos gordos específicos	44
Tabela 4.1. Absorvância e concentração de enzima em solução, ao longo do processo de imobilização	47
Tabela 4.2. Incorporações molares (mol%) de ácidos gordos essenciais, catalisadas por todos os biocatalisadores testados, com EPAX 1050 ...	51
Tabela 4.3. Composição em ácidos gordos (mol%) percentual dos TAG após as reacções de acidólise com a lipase Novozym 435, usando banha em rama e tripalmitina como substratos	54
Tabela 4.4. Valores de incorporação e rendimento molares médios obtidos após 24h de reacção catalisada pela lipase rROL em cada ensaio da Matriz Central Compósita Rotativa	55
Tabela 4.5. Resultados dos efeitos, linear (L) e quadrático (Q), e respetivos valores de <i>p</i> , das variáveis (Temperatura e Razão Molar) testadas na incorporação de PUFA nos TAG de banha	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Algumas das abreviaturas ao longo deste trabalho correspondem à língua inglesa, por serem utilizadas na literatura da especialidade.

AA – “Arachidonic Acid” – Ácido Araquidónico

AG – Ácidos Gordos

AGL – Ácidos Gordos Livres

AAL – “alpha-linolenic acid” – Ácido alfa-linolénico

AL – “Linoleic acid” – Ácido linoleico

a_w – Atividade da água

CCRD – “Central Composite Rotatable Design” – Matriz Central Compósita Rotativa

DAG – “Diacylglycerols” – Diacilgliceróis

DHA – “Docosahexaenoic Acid” – Ácido Docosahexaenóico

EPA – “Eicosapentaenoic Acid” – Ácido Eicosapentaenóico

GLA – “gamma-linolenic acid” – Ácido gamma-Linolénico

HMF – “Human Milk Fat” – Gordura do Leite Humano

HMFA – “Human Milk Fatty Acids” - Ácidos Gordos do Leite Humano

HMFS – “Human Milk Fat Substitutes” – Substitutos da Gordura do Leite Humano

LCFA – “Long chain fatty acids” – Ácidos Gordos de Cadeia Longa

LC-PUFA – “Long Chain Poliunsaturated Fatty Acids” – Ácidos Gordos Polinsaturados de Cadeia Longa

MAG – “Monoacylglycerols” – Monoacilgliceróis

MUFA – “Monounsaturated Fatty Acid” – Ácidos Gordos Monoinsaturados

PUFA – “Polysaturated Fatty Acids” – Ácidos Gordos Polinsaturados

R² - Coeficiente de Determinação/ Coeficiente de Correlação Quadrático

R²_{aju} – R² ajustado

RSM – “Response Surface Methodology” – Metodologia das Superfícies de Resposta

ROS - “Reactive oxygen species” – Espécies Reativas de Oxigénio

SL – “Structured Lipids” – Lípidos Estruturados

TAG – “Triacylglycerols” – Triacilgliceróis

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Enquadramento do Tema

O leite humano é considerado o melhor alimento natural e funcional para o recém-nascido do ponto de vista nutricional, imunológico e de segurança alimentar (Maduko *et al*, 2007). O leite materno fornece a maior fração de energia necessária ao lactente, bem como nutrientes e outros componentes essenciais. Contém 4 a 5% de gordura, sendo que cerca de 98% desta são triacilgliceróis (TAG), responsáveis pelo fornecimento de 50% da energia (Srivastava *et al*, 2006). A gordura de leite humano possui, maioritariamente, ácidos gordos (AG) de cadeia longa como o ácido oleico (30-35%), o ácido palmítico (20-30%) e menores quantidades de ácido linoleico e ácido esteárico (Silva e Gioielli, 2009). A estrutura do TAG do leite humano é única na natureza, uma vez que 60-70% do ácido palmítico (o ácido gordo saturado em maiores proporções) encontra-se na posição *sn*-2 do esqueleto de glicerol e os AG insaturados, como o ácido oleico, o ácido esteárico e o ácido linoleico, ocupam preferencialmente as posições *sn*-1 e *sn*-3 (Nielsen *et al*, 2006). A regiodistribuição dos AG no TAG é de grande importância uma vez que condiciona os produtos formados pela lipase pancreática na absorção no intestino delgado (Yang *et al*, 2003). Esta lipase *sn*-1,3 selectiva hidrolisa os AG das posições externas do TAG, originando AG livres e 2-monoacilgliceróis (MAG).

Uma série de fatores socioeconómicos têm condicionado a prevalência do período de aleitamento materno nos primeiros meses de vida do bebé. Neste contexto, as fórmulas para lactentes surgem como uma necessidade de assegurar as necessidades alimentares do recém-nascido privado de amamentação.

As fórmulas de leite infantil devem adequar-se, o mais possível, aos requisitos nutricionais do lactente (Maduko *et al*, 2007), aliando a importância da regiodistribuição dos AG no TAG, anteriormente referida, à baixa produção de sais biliares e à reduzida área de superfície intestinal do lactente (Graham e Sackman, 1983).

Os TAG sucedâneos de gordura de leite humano devem assegurar a presença de um AG saturado, como o ácido palmítico, na posição *sn*-2, e a presença de AG insaturados como o ácido oleico e os ácidos gordos polinsaturados (PUFA - "Polyunsaturated Fatty Acids") como o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5), o ácido

docosahexaenóico (DHA, C22:6) e o ácido araquidónico (ARA, C20:4) nas posições *sn*-1,3 dos TAG.

Diversos estudos têm sido reportados utilizando diferentes substratos para a síntese de TAG estruturados (Esteban *et al*, 2011; Srivastava *et al*, 2006; Sahin *et al*, 2005; Yang *et al*, 2003).

Existem diversas formas, algumas patenteadas para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano (HMFS-“Human Milk Fat Substitutes”).

A maior parte das fórmulas de leite infantil é produzida a partir de óleos de origem vegetal e/ou de leite de ruminantes que são similares à gordura de leite humano no que respeita à composição em ácidos gordos. No entanto, como são diferentes quanto à distribuição estereoespecífica, surgem problemas nos recém-nascidos que se alimentam de fórmulas artificiais.

1.2. Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho consistiu na produção de lípidos estruturados sucedâneos de gordura de leite humano, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados. Para o efeito utilizaram-se lipases imobilizadas *sn*-1,3 selectivas comerciais e não comerciais, como biocatalisadores na reacção de interesterificação da banha ou tripalmitina com um concentrado de ácidos gordos polinsaturados.

As reacções processaram-se em meio livre de solvente e a temperaturas reduzidas, com o intuito de implementação de um sistema reaccional economicamente competitivo e de baixo impacto ambiental. Estes aspectos são de extrema importância na produção a nível industrial.

A banha de porco, utilizada como fonte de ácido palmítico, apresenta-se como um substrato de custo reduzido e de fácil aquisição. A sua temperatura de fusão (37°C) permite implementar o sistema reaccional a temperaturas reduzidas o que oferece diversas vantagens, nomeadamente, na redução do dispêndio energético, na menor probabilidade de oxidação dos ácidos gordos (principalmente polinsaturados) bem como na maior estabilidade operacional do biocatalisador (Xu *et al*, 2000). Uma menor temperatura reaccional pode ainda considerar-se vantajosa por provocar uma menor

migração de grupos acilo na estrutura do triacilglicerol, desfavorecendo a formação de subprodutos (“by-products”) indesejados (Vikbjerg *et al*, 2006; Xu *et al*, 1998). A banha pode ainda considerar-se um bom substrato na produção de HMFS pela regiodistribuição dos AG nos TAG. Estes apresentam a tripalmitina na posição interior (*sn*-2) do triacilglicerol, e o ácido oleico nas posições exteriores (*sn*-1 e *sn*-3), estrutura característica do leite humano (Huilong Mu, 2010). A única desvantagem na utilização de banha de porco em rama prende-se com questões étnicas, dada a sua origem animal.

O biocatalisador mais adequado foi seleccionado em termos da maior incorporação molar de PUFA no TAG. Modelou-se e optimizou-se as condições operacionais pelo método das superfícies de resposta (RSM-“Response Surface Methodology”), em função dos parâmetros reacionais temperatura e razão molar.

Numa ótica da implementação industrial, as enzimas devem manter a sua atividade catalítica pelo maior período de tempo possível, quer em reator contínuo como em reutilizações sucessivas em reatores descontínuos. Neste sentido, foram planeados ensaios de estabilidade operacional para o biocatalisador com melhor rendimento catalítico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. OS LÍPIDOS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS

“Lípidos são ácidos gordos e seus derivados, e substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a estes compostos.” - William Christie (1994)

Num sentido lato podem definir-se lípidos como um grupo de compostos, que têm em comum uma pronta solubilidade em solventes orgânicos como clorofórmio, éter e álcool. Esta família de compostos é muito vasta e engloba os esteróides, os carotenóides, os terpenos, os ácidos gordos e seus derivados (incluindo tri-, di- e monoacilgliceróis) e os fosfolípidos.

Os lípidos exercem funções como sinalização intracelular e regulação hormonal local, sendo utilizados como biomarcadores no estudo de diversas espécies de organismos. Estes compostos são essenciais na dieta alimentar também pelo facto de serem veículos de formação de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), nutrientes essenciais armazenados no fígado e tecidos gordos. Embora o termo possa ainda por vezes ser utilizado como sinónimo de gordura, as gorduras são um subgrupo de lípidos designados de triacilgliceróis.

2.1.1. Os Ácidos Gordos

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia de hidrocarbonetos. O carbono mais próximo do terminal carboxilo é denominado alfa (α), o segundo é denominado beta (β) e assim sucessivamente. O terminal metil é denominado ómega (ω). A figura 2.1 ilustra a estrutura de um ácido gordo saturado, com o comprimento de n átomos de carbono.

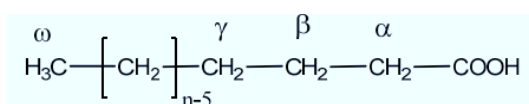


Figura 2.1. Representação estrutural de um ácido gordo.

A maioria dos ácidos gordos encontrados na natureza é composta por um número par de átomos de carbono, com cadeias de tamanho variável (4 a 26 átomos de carbono). Atendendo à presença ou ausência de ligações duplas na cadeia carbonada, os ácidos

gordos classificam-se em ácidos gordos saturados, se não possuem ligações duplas, em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA “monounsaturated fatty acid”), caso possuam apenas uma ligação dupla, e em ácidos gordos polinsaturados (PUFA-“polyunsaturated fatty acids”) se forem compostos por duas ou mais ligações duplas.

Os ácidos gordos saturados podem ser encontrados em alimentos como a manteiga, o óleo de coco e o óleo de palma. O MUFA mais comum na natureza é o ácido oleico (C18:1) e encontra-se em concentrações particularmente elevadas no azeite, óleo de girassol e na gordura animal. Os PUFA podem ser encontrados em alguns óleos vegetais e essencialmente em óleos de peixe.

Os ácidos gordos podem ser designados de acordo com a nomenclatura atribuída pela IUPAC, ou descritos pela forma abreviada X:Y onde X representa o número de átomos de carbono da cadeia e Y o número de ligações duplas. A posição das ligações duplas nos ácidos gordos insaturados representa-se pela forma (*n*-Z), onde *n* indica o número de ligações duplas na cadeia carbonada e Z representa a posição da primeira ligação dupla a contar do terminal- ω . Na tabela 2.1 estão representadas as designações de alguns dos ácidos gordos mais comuns.

Tabela 2.1. Nomes e designações de alguns ácidos gordos comuns.

Designação IUPAC	Nome Comum	Abreviações
Etanoico	Acético	2:0
Butanóico	Butírico	4:0
Hexanóico	Caproico	6:0
Octanoico	Caprílico	8:0
Decanoico	Capríco	10:0
Dodecanoico	Laurico	12:0
Tetradecanoico	Mirístico	14:0
Hexadecanoico	Palmitico	16:0
Octadecanoico	Esteárico	18:0
9 – Octadecanoico	Oleico	18:1 <i>n</i> -9/7
9,12 – octadecadienoico	Linoleico	18:2 <i>n</i> -6
9,12, 15 - octadecatrienoico	α - Linolénico	18:3 <i>n</i> -3
5, 8, 11, 14 – eicosatetraenoico	Araquidónico	20:4 <i>n</i> -6
5, 8, 11, 14, 17 – eicosapentaenoico	EPA	20:5 <i>n</i> -3
4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosahexaenoico	DHA	22:6 <i>n</i> -3

Apesar de os ácidos gordos poderem ter diversas conformações, devido à sua rotação livre em torno das ligações C-C, a sua forma mais estendida é a mais favorável energeticamente. Isto permite um maior empacotamento em cristais, causando uma maior solidez dos ácidos gordos à medida que aumenta o seu grau de saturação. Pelo contrário, à medida que a insaturação das cadeias aumenta, diminui a temperatura de fusão.

Inerente ao aumento da insaturação das cadeias dos ácidos gordos está também a sua crescente suscetibilidade à oxidação. Assim sendo, os ácidos gordos insaturados e polinsaturados oxidam mais facilmente que os saturados. Na figura 2.2 estão representadas as estruturas de alguns ácidos gordos insaturados comuns.

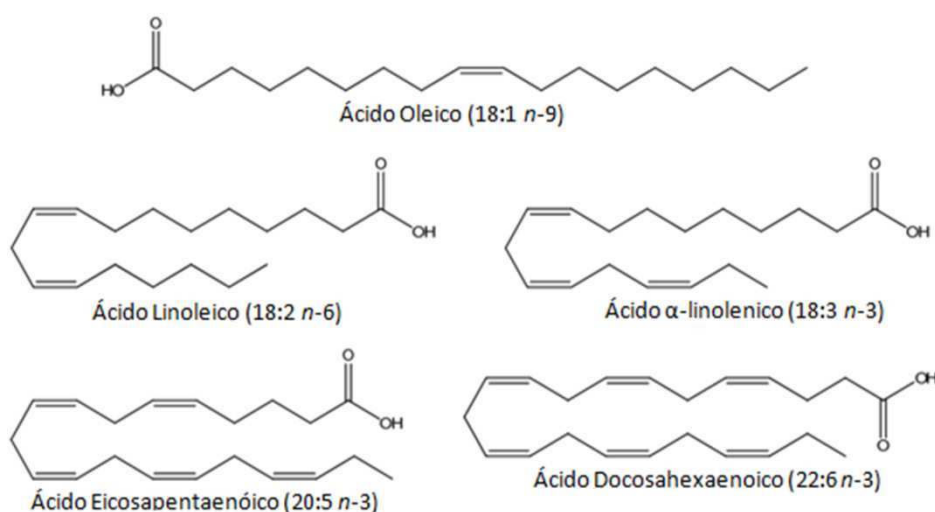


Figura 2.2. Estrutura de alguns ácidos gordos insaturados comuns.

Os ácidos linoleico e linolénico são ácidos gordos essenciais pois não podem ser sintetizados pelo organismo, sendo fornecidos através da alimentação. Eles são os precursores dos ácidos gordos essenciais araquidónico (ARA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os quais são constituintes dos lípidos membranares.

2.1.2. Os Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis (TAG) são formados pela esterificação de uma molécula de glicerol com três moléculas de AG (Figura 2.3).

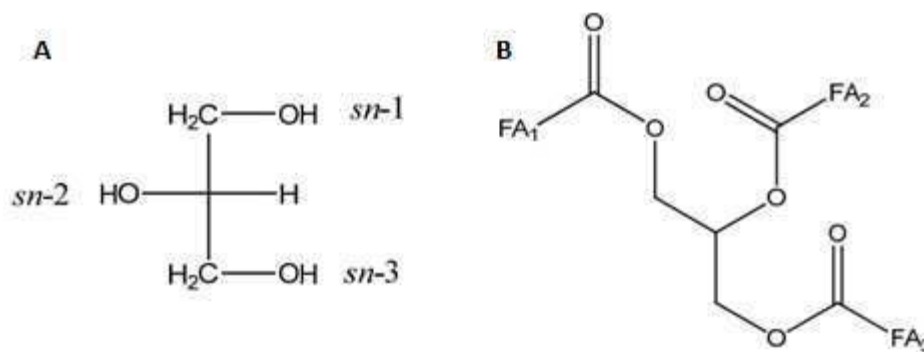


Figura 2.3. Estrutura representativa de um triacilglicerol. A – estrutura *sn*, B – estrutura ótica.

Todos os organismos eucarióticos, e alguns procarióticos, possuem a capacidade de sintetizar TAG. Nos animais, apesar de o fígado e os intestinos metabolizarem estes compostos, a sua maioria encontra-se armazenada no tecido adiposo como reserva energética, ou em outros tecidos na forma de aglomerados (“lipid droplets”).

Estes lípidos compõem a maioria da gordura encontrada em óleos vegetais como óleos de girassol e de palma, azeite, em gorduras animais e em margarinas. A gordura de leite humano é composta por cerca de 98% de TAG (c.f. 1.1).

Os TAG podem ser hidrolisados, resultando da reação ácidos gordos e glicerol. Se esta hidrólise ocorrer em meio alcalino, formam-se sais de ácidos gordos, os sabões, e o processo designa-se por saponificação.

Os diacilgliceróis (dois ácidos gordos por glicerol) e monoacilgliceróis (um ácido gordo por glicerol) encontram-se habitualmente em quantidades vestigiais, tanto em tecidos animais como vegetais.

As características físicas e a reatividade química são determinadas por fatores como a natureza, a proporção, e a localização dos AG na molécula de TAG. Com efeito, TAG que contenham qualitativamente e quantitativamente os mesmos ácidos gordos na sua composição vão manifestar propriedades físicas, químicas e fisiológicas diferentes, se os ácidos gordos estiverem distribuídos de forma distinta no esqueleto de glicerol. As propriedades fisiológicas e o metabolismo dos ácidos gordos nos TAG dependem do comprimento da cadeia carbonada, posição e grau de insaturação (Osborn e Akoh, 2002).

2.2. A FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE HUMANO

O leite humano é um alimento rico em gordura, sais minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas que protegem o lactente contra possíveis doenças. Apesar do leite materno ser composto por 87% de água, os restantes 13% são uma poderosa combinação de elementos, fundamentais para o desenvolvimento e crescimento da criança. A gordura de leite humano fornece entre 40-55 g/100g da energia total necessária ao lactente, consistindo principalmente em ácido oleico (26-35 g/100g), ácido palmítico (18-26 g/100g), ácido linoleico (10-16 g/100g) e ácido esteárico (4-9 g/100g) na sua composição (Yüksel e Yesilçubuk, 2011). A composição da secreção láctea não é uniforme ao longo do período de amamentação. Assim, o leite inicial é mais fino e aquoso, com a função de suprir a sede e as necessidades líquidas do lactente. O leite final (após o décimo quinto dia de lactação - leite maduro) tem quatro vezes mais gordura na sua composição do que o leite inicial, e tem a principal função de fornecer calorías ao lactente (Silva e Goielli, 2009; Pons *et al*, 2000). Embora a gordura de leite humano contenha, pelo menos, cento e setenta estruturas diferentes de triacilgliceróis, apenas trinta delas constituem setenta por cento da gordura total. Os triacilgliceróis obedecem a um padrão característico no que respeita à distribuição dos ácidos gordos no esqueleto de glicerol, apresentando um predomínio de ácidos gordos de cadeia média e ácidos gordos insaturados nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e ácidos gordos saturados na posição *sn*-2 (Figura 2.4).

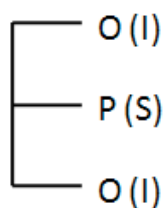


Figura 2.4. Representação da estrutura dos principais triacilgliceróis da gordura de leite humano. **O**-ácido oleico e **P**-ácido palmítico. **I**-insaturado e **S**-saturado.

O ácido palmítico (C 16:0) é o ácido gordo saturado predominante, constituindo 20-25% dos ácidos gordos do leite maduro, sendo que, 70-80 % se encontra esterificado na posição *sn*-2 dos TAG.

Em contrapartida, o ácido palmítico presente nos óleos vegetais, largamente utilizados na produção de fórmulas de leite infantil, encontra-se esterificado

preferencialmente nas posições *sn*-1 e *sn*-3, sendo a posição central ocupada por ácidos gordos insaturados (Jiménez *et al*, 2010; Um e Hoy, 2004).

A combinação de ácidos gordos que formam os triacilgliceróis do leite humano mantém o ponto de fusão abaixo dos 38 °C, ao passo que o ponto de fusão do ácido palmítico na forma livre é de 61-65 °C, sendo muito superior ao da temperatura corporal e explicando sua baixa absorção na forma livre.

O leite humano fornece PUFA, incluindo os ácidos linoleico (AL, C18:2, *n*-6) e ácido α -linolénico (AAL, C18:3, *n*-3). O ácido linoleico, por exemplo, é um componente estrutural essencial de algumas ceramidas dérmicas, controlando a permeabilidade na epiderme. Embora o organismo não os consiga sintetizar *de novo*, os ácidos gordos AL e AAL são ainda os componentes estruturais maioritários dos fosfolípidos membranares, estando envolvidos na fluidez da membrana e no transporte iónico ao longo da membrana celular (Sharma *et al*, 2009) e são precursores dos PUFA de cadeia longa. O AAL é precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, *n*-3) e do ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6, *n*-3) e o AL é precursor do ácido araquidónico (ARA, C20:4, *n*-6) (Gorjão *et al*, 2009). Alguns autores consideram que as fórmulas de leite infantil deveriam conter AL e AAL em proporções específicas, dado que estes competem um com o outro pela mesma enzima durante a síntese dos ácidos gordos de cadeia mais longa. Recentemente ficou comprovado que os lactentes são capazes de metabolizar os ácidos gordos ómega-6 e ómega-3. Através da administração de AAL marcado foi detetado DHA marcado no plasma dos lactentes sujeitos a ensaio, o que demonstra a sua capacidade para converter AAL em DHA (Sijben *et al*, 2011).

O leite humano contém também na sua composição EPA, DHA e ARA. Estes PUFA são benéficos para a saúde nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares, inflamação, cancro, resposta imunitária, diabetes, hipertensão, distúrbios renais, entre outros (Lopez-Huertas, 2010; William Harris, 2010; Hamam e Shahidi, 2006; Horrocks e Young, 1999) e sobre os quais se tem prestado especial atenção nos últimos tempos (Muggli, 2008; Hin *et al*, 2006).

Os ácidos gordos polinsaturados são importantes componentes estruturais das membranas celulares, reduzindo a sua rigidez, com efeito especialmente acentuado em tecidos como a retina e tecidos cerebrais nos humanos (Koletzko *et al*, 2001). Os lactentes necessitam de elevadas quantidades destes compostos na sua dieta, durante o

seu desenvolvimento inicial que se caracteriza por ser muito acentuado. O seu metabolismo não consegue sintetizá-los ao mesmo ritmo que são consumidos numa fase inicial de desenvolvimento e crescimento (Emmet e Rogers, 1997). Mais especificamente, o EPA assume essencialmente funções no sistema imunitário. O DHA apresenta um papel importante no desenvolvimento visual e neuronal em recém-nascidos e crianças (Yüksel, 2011; Valente et al, 2009).

2.3. LÍPIDOS ESTRUTURADOS

2.3.1. Definições e aspetos Gerais

Os lípidos estruturados (SL-“Structured Lipids”) são frequentemente designados como a nova geração de gorduras que possuem propriedades nutracêuticas: alimentos, ou partes destes, que fornecem benefícios de saúde/médicos, incluindo o potencial para tratamento e/ou prevenção de doenças (Vu *et al*, 2008; Srivastava *et al*, 2006).

Definem-se lípidos estruturados como sendo TAG que foram modificados através da incorporação de novos AG ou pela alteração da posição dos AG no esqueleto de glicerol (Sahin *et al*, 2005; Iwasaki e Yamane, 2000). A estrutura molecular dos TAG influencia o seu destino metabólico nos organismos (digestão e absorção), bem como as suas características físicas, nomeadamente, o ponto de fusão. Como consequência, quando se formulam SL com estruturas químicas específicas é possível controlar o comportamento dos TAG, melhorando as suas propriedades funcionais.

A síntese de lípidos estruturados é, geralmente, levada a cabo por enzimas *sn* 1,3 selectivas. Na indústria alimentar estes lípidos possuem uma vasta aplicação desde a formulação de margarinas (Lumor *et al*, 2007) à produção de substitutos de manteiga de cacau e óleos de fritar (Osborn e Akoh, 2002). Dado o elevado potencial destes lípidos, as suas aplicações ainda se estendem ao seu uso na medicina, nutrição enteral e parental. O seu uso a nível nutricional ainda é possível como nutracêutico na produção de fórmulas infantis (Osborn e Akoh, 2002).

2.3.2 Sucedâneos da gordura de leite materno

As fórmulas de leite infantil procuram mimetizar a estrutura e composição da gordura de leite humano. Todavia, a maioria não respeita a regiodistribuição dos ácidos gordos na molécula de glicerol característica da gordura de leite humano, de acordo com a estrutura ISI, isto é, AG insaturados nas posições externas do TAG e AG saturados na posição *sn*-2.

Dados apresentados pela revista *Wellness Foods Europe* em 2009, revelam que a fórmula infantil produzida pela *Lipid Nutrition-Betapol*TM apresenta-se como o produto comercial que melhor se correlaciona com a gordura de leite materno, principalmente pela introdução maioritária de ácido palmítico na posição *sn*-2 do triacilglicerol e ácido oleico nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Encontra-se também comercializado um HMFS designado InFatTM, produzido pela fusão de duas empresas do setor, a sueca AAK e a empresa israelita *Enzymotec*. Estas empresas compõem as suas fórmulas infantis consoante os requisitos do cliente e os formuladores alegam que os produtos são de origem 100% vegetal e controlada.

As formulações comerciais obedecem à diretiva 2006/141/EC publicada por *Official Journal of the European Union*, e segundo classificação “GRAS-Generally Recognized as Safe” (Estados Unidos).

A introdução de AG essenciais em sucedâneos de gordura de leite humano pode beneficiar o desenvolvimento do lactente. Todavia, desconhecem-se os efeitos secundários que um consumo elevado destes AG possa ter no organismo.

Um estudo recente revelou que um consumo diário de DHA de, pelo menos, 4 a 6 g pode ser considerado seguro na dieta do recém-nascido (Lien, 2009). Relativamente ao consumo de PUFA para a mulher em período de amamentação, algumas instituições mundiais referenciadas, como a *World Association of Perinatal Medicine*, a *Early Nutrition Academy* e a *Child Health Foundation* recomendam o consumo mínimo diário de DHA de 200 mg (Kris-Etherton *et al*, 2009).

Com efeito, um estudo comparativo sobre a composição em AG do leite de mulheres originárias de nove países (Austrália, Canadá, Chile, China, Japão, México, Filipinas, Reino Unido e Estado Unidos), onde foram analisadas 440 amostras, revelou

que a maior diferença se centrou na composição em DHA (entre 0,17% e 0,99%). Segundo os autores, a *Child Health Foundation* recomenda a adição de, pelo menos, 0,5% de DHA, relativamente à gordura total, na composição de fórmulas de leite infantil, embora se reconheça ser necessário um estudo mais aprofundado para determinar um valor ótimo de consumo deste AG (Yuhas *et al*, 2006). Um outro estudo onde são comparadas as composições lipídicas entre leite humano, sucedâneos do leite materno e alguns óleos revelam existir algumas semelhanças a nível composicional, mas fraca correlação a nível estrutural (Wang *et al*, 2010).

2.3.3. Produção de Lípidos Estruturados

2.3.3.1 Interesterificação/acidólise enzimática

Na área dos óleos e gorduras, a pesquisa de lipases que catalisam reações destinadas à produção de lípidos estruturados com propriedades funcionais específicas aumentou significativamente.

Os lípidos estruturados podem ser sintetizados por via química (inorgânica) ou por via enzimática (orgânica).

A catálise química pode ser considerada uma forma não muito dispendiosa para a produção de SL, e também de fácil “scale up”. No entanto, estas reações são pouco específicas, pelo que não oferecem um controlo na distribuição posicional dos ácidos gordos no produto final (Saifuddin *et al*, 2008). Inicialmente ocorre hidrólise nos TAG, com posterior reesterificação. Os produtos finais vão ter uma composição e estrutura aleatórias (Osborn e Akoh, 2002; Xu, 2000).

O recurso à catálise enzimática oferece várias vantagens face à síntese química. A utilização de lipases *sn*-1,3 selectivas permite incorporar grupos acilo desejados em posição específicas do TAG, enquanto a reação química não o possibilita (Akoh e Lee, 1998). As reacções enzimáticas processam-se à pressão atmosférica, a temperaturas reduzidas o que se traduz numa redução do custo do processo comparativamente à síntese química. Os produtos resultantes da via enzimática podem ser considerados naturais.

2.3.3.2 Atividade Catalítica das Lipases

O setor da biotecnologia industrial sofreu um impulso significativo a partir do momento que se compreendeu que as enzimas podiam ser exploradas comercialmente.

Atualmente existe uma enorme variedade de enzimas que são extraídas, produzidas, expressas e vendidas para variadas aplicações. As lipases representam um dos grupos mais importantes pela capacidade que possuem de catalisar diversas reações. Podem ser isoladas de plantas, animais e microrganismos como bactérias, leveduras e fungos.

As lipases encontram-se divididas em dois grupos principais: as esterases e as originalmente designadas “verdadeiras lipases”. A diferença fundamental reside no facto de as esterases atuarem em triacilgliceróis de cadeia curta, que são solúveis em água.

As lipases (acilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3.) catalisam a hidrólise de ésteres em meio aquoso. No entanto, em meio orgânico com baixa actividade de água, são eficientes catalisadores em reacções de síntese (esterificação, transesterificação, acidólise, aminólise e hidrólise) (Figura 2.5).

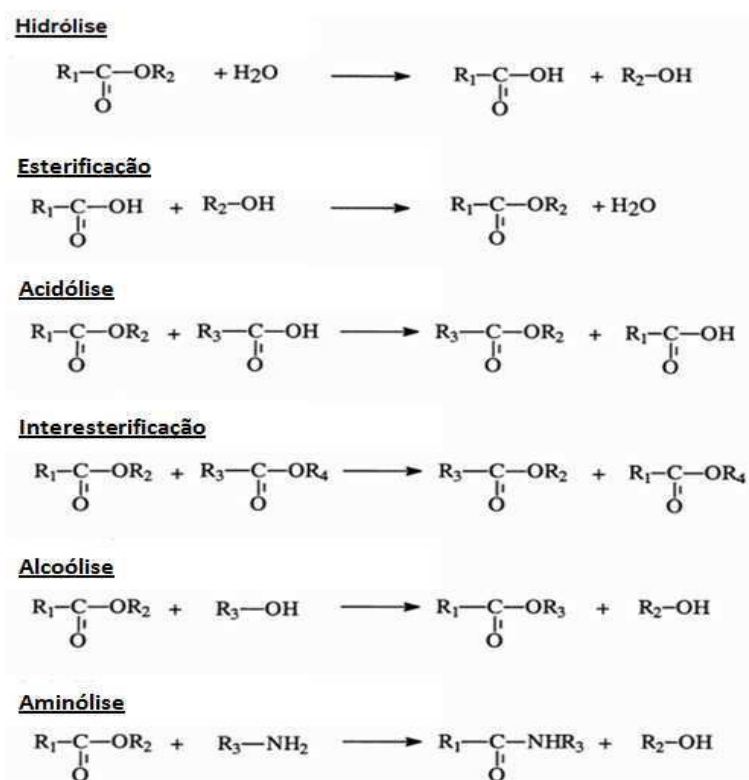


Figura 2.5. Diferentes reações catalisadas por lipases em sistemas aquosos e não aquosos.

As lipases sofrem activação na presença de interfases hidrofóbicas. Esta característica foi primeiro reportada por Sarada e Desnuelle (1958). Na ausência de interfases, as lipases são compostas por estruturas secundárias móveis, designadas “lids” ou “flaps”, que cobrem o centro ativo e as tornam inacessíveis ao substrato. Contudo, na presença de interfases hidrofóbicas estas enzimas sofrem alterações conformacionais, exibindo o seu centro ativo. Estas alterações resultam na exposição das superfícies hidrofóbicas aptas a interagir com a interfase hidrofóbica, o que confere funcionalidade à enzima (Petkar *et al*, 2006; Fernandez-Lafuente *et al*, 1998).

Muitas aplicações das lipases tiram proveito das suas características de regio- e estereo-seletividade e especificidade, nomeadamente, ao nível da indústria alimentar, farmacêutica, de detergentes, têxtil, cosmética, biodiesel, e na síntese de compostos poliméricos (Dutta and Ray, 2009, Villeneuve et al, 2000).

2.3.3.2.1. Especificidade e seletividade das lipases

A especificidade das lipases é influenciada pelo comprimento da cadeia carbonada do AG e pelo número e posição das ligações duplas na sua molécula. Na sua maioria, as lipases apresentam maior especificidade para AG de cadeia curta e média, do que para os AG de cadeia longa (LC-PUFA – “Long Chain Poliunsaturated Fatty Acids”). As lipases de *Rhizomucor miehei* “Lipozyme RM IMTM” e de *Candida antárctica* “Novozyme 435TM” apresentam uma elevada especificidade para LC-PUFA (Tecelão *et al*, 2010; Hamam e Shahidi, 2006; Shimada *et al*, 2001). As lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* apresentam preferência por AG de cadeia média-curta (Kahveci *et al*, 2010), comparativamente a AG de cadeia C20 ou superior (Kahveci *et al*, 2010).

Muitas lipases são menos reativas com ácidos gordos que tenham as ligações duplas perto do grupo carboxilo. Lipases como as de *C. rugosa*, *G. candidum*, *Rhizopus oryzae*, *R. miehei* reagem de forma mais eficiente com o ácido α -linolénico, com a ligação dupla em $n-9$, mas menos com o ácido γ -linolénico (GLA-“gamma linolenic acid”; 18:3 $n-6$), com a ligação dupla em $n-6$ (Hou e Shimada, 2002). As lipases de *R. oryzae* e de *R. miehei* também reagem com o ácido docosapentaenóico (DPA-“Docosapentaenoic acid”; 22:5 $n-6$), com a ligação dupla em $n-4$, de forma menos eficiente do que em DPA (22:5 $n-3$), com a ligação dupla em $n-7$ (Hou e Shimada, 2002). Adicionalmente, muitas lipases possuem menor afinidade para o DHA com a dupla ligação em $n-4$ do que para o EPA com a dupla ligação em $n-5$ (Kojima *et al*, 2006). Por outro lado, as lipases de

Pseudomonas sp. (Lipase AKTM) e de *Alcaligenes* sp. não seguem esta regra e são mais reativas com o EPA do que com o DHA (Shimada et al, 2001;).

As enzimas podem ser classificadas em dois grupos distintos quanto à sua selectividade, isto é, à sua preferência posicional para as ligações éster na molécula do TAG. Por um lado, existem as enzimas selectivas *sn*-1,3 que reconhecem as ligações éster nas posições 1,3 do TAG (reconhecem os ésteres com grupos OH primários). Por outro lado, existem as enzimas designadas não selectivas que reconhecem todas as ligações éster na estrutura do triacilglicerol (reconhecem grupos-OH primários e secundários nos esteres) (Bourlieu *et al*, 2009) (Figura 2.6).

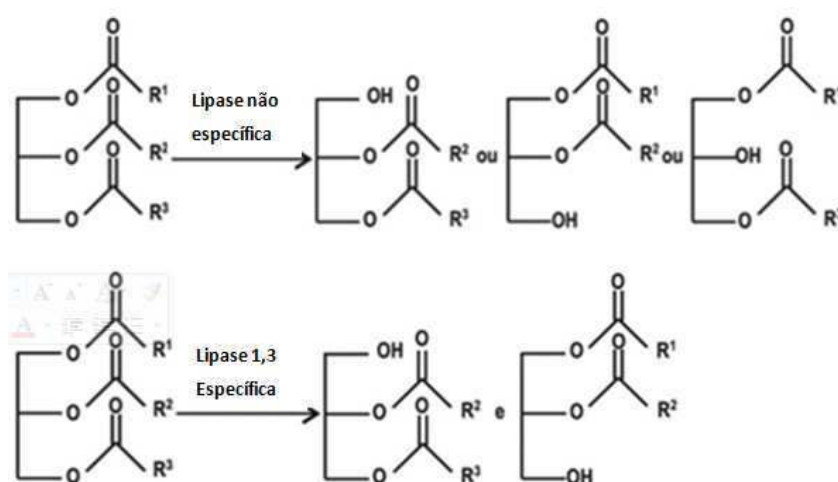


Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases *sn*-1,3 seletivas e por lipases não seletivas (adaptado de Paques e Macedo, 2006).

2.3.3.2.2. Enzima Livre/Imobilizada

A aplicação industrial das lipases é condicionada pela sua sensibilidade à desnaturação ou inativação influenciada por fatores operacionais como o pH, a temperatura e a presença de solventes orgânicos. Além disso, a recuperação de enzimas do meio reacional para posterior reutilização é geralmente difícil de executar e economicamente desfavorável, o que limita o seu uso de forma continuada. Uma forma de contornar estas limitações consiste na imobilização das lipases em suportes sólidos. Apesar da imobilização não se traduzir, necessariamente, num aumento da atividade enzimática (Knežević *et al*, 2004), existem diversos estudos que referem não só um aumento da estabilidade operacional do biocatalisador após imobilização (Matsumoto e

Ohashi, 2003; Ghamgui *et al*, 2007), como uma maior facilidade na sua recuperação do meio reacional (Michaux *et al*, 2010).

Atualmente, e dado o potencial deste processo, existem já elaborados e a decorrer diversos métodos de imobilização enzimática, tais como a adsorção física ou química a uma superfície sólida, ligações covalentes ou “cross linking” a uma matriz, aprisionamento em membrana, microencapsulação em polímeros de microsferas e hidrogéis ou encapsulação em microemulsões ou organelos (Knežević *et al*, 2004). Deverá ser referido que algumas lipases, como o caso da lipase de *Carica papaya*, se apresentam como casos únicos. Isto porque esta enzima se autoimobiliza no processo de extração por se ligar covalentemente à matéria seca do látex da planta (Dominguez de Maria *et al*, 2006). O método de imobilização por adsorção é ainda o mais comum. Este apresenta baixo custo e poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima (Villeneuve *et al*, 2000). As imobilizações por adsorção são usualmente realizadas pela incubação do suporte e da enzima em tampão ou pela precipitação da lipase com solventes sobre a superfície do suporte. Ao contrário do que acontece com outras proteínas, a adsorção de lipases é favorecida em meios com baixa força iónica. As resinas poliméricas, compostas por polipropileno, e materiais contendo grupos hidrofóbicos de ligações como octil-agarose são exemplos de suportes que se têm vindo a destacar como sendo apropriados à imobilização de lipases, conferindo um bom sistema difusional e boa ativação do centro ativo, descrito em 2.4.3.2. (Petkar *et al*, 2006; Villeneuve *et al*, 2000). O método e o suporte de imobilização são factores preponderantes na actividade e estabilidade operacional de lipases, pelo que é importante o estudo de suportes diferentes que mantenham a estabilidade da lipase e, se possível, aumentem a atividade catalítica, como proposto em alguns trabalhos publicados (Mateo *et al*, 2007).

2.3.3.3. Parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade enzimática

No decorrer dos últimos anos, as lipases têm vindo a ser alvo de grande interesse em aplicações biotecnológicas. Mas quando se trabalha com este tipo de enzimas devem ter-se em conta diversos fatores implicativos na sua atividade e estabilidade operacional. Um estudo publicado por Holm e Cowan (2008), indica que a estabilidade de uma enzima a atuar em meio aquoso é influenciada, sobretudo, pela temperatura, pH, e pela presença do substrato, em certa medida. Em meios não aquosos a estabilidade enzimática manifesta-se de forma diferente. Embora se saiba que as lipases são mais termostáveis

em meios não aquosos, muitos destes estudos foram elaborados por curtos períodos de tempo, não envolvendo operações em sistemas contínuos. Alguns dos principais fatores que influenciam a atividade e estabilidade operacional das enzimas são: temperatura, produtos de oxidação dos lípidos, atividade da água e ácidos gordos livres. Em baixo encontra-se uma breve descrição de como estes fatores se tornam condicionantes no meio reacional.

A temperatura é um parâmetro que se deve ter em consideração no decorrer de uma reação enzimática. A maioria das enzimas imobilizadas são termoestáveis, operando a maiores amplitudes de temperatura sem apresentar diferenças acentuadas de atividade. A maioria das enzimas livres apresenta no entanto temperaturas ótimas para atuar, perdendo atividade fora desses parâmetros ótimos. Nas reações enzimáticas, verifica-se que a velocidade de reação aumenta com a temperatura até a um valor ótimo, a partir da qual decresce, podendo mesmo inativar a enzima por processos de desnaturação. À medida que se aumenta a temperatura, aumenta-se a energia atômica que confere maior agitação e mobilidade nos átomos que pode ser suficiente para quebrar as fracas ligações que mantêm a estrutura proteica. Desta forma dá-se a desnaturação da enzima e inativação da mesma. Na maioria dos casos, as enzimas sofrem processos de imobilização para não perderem a sua atividade tão rápido e suportarem temperaturas mais elevadas, favoráveis a maiores taxas de conversão, maior solubilidade no substrato e menor viscosidade no meio reacional, favorecendo a transferência de massa (Person *et al*, 2002; Karra-Châabouni *et al*, 2008). A nível industrial, pretendem-se catalisadores que mantenham a sua atividade por um período o mais extenso possível, a uma taxa de incorporação estável, num processo que implique os menores custos possíveis. Neste sentido têm sido sugeridos sistemas com enzimas capazes de operar a temperaturas inferiores, evitando oxidações, principalmente em sistemas que envolvam ácidos gordos insaturados de cadeia longa (Karra-Châabouni *et al*, 2008; Shakeri e Kawakami, 2009).

A oxidação dos lípidos entende-se como um fenómeno complexo, induzido pelo oxigénio, e na presença de catalisadores como o calor, radicais livres, luz, pigmentos fotossensíveis ou iões metálicos. Esta oxidação pode ocorrer por três vias diferentes: (i) oxidação não-enzimática em cadeia, mediada pelos radicais livres, (ii) oxidação espontânea induzida pela luz, e (iii) oxidação enzimática (Laguerre *et al*, 2007). A lipólise e a oxidação dos lípidos nos alimentos origina “off-flavours” desagradáveis, que resultam da formação de hidroperóxidos (produtos iniciais da oxidação) que reagem facilmente

com os ácidos gordos e originam produtos secundários da oxidação, essencialmente aldeídos e cetonas (Serra *et al*, 2008), provocando um decréscimo na atividade e estabilidade das lipases.

As gorduras insaturadas são mais suscetíveis à oxidação, quando comparadas com gorduras saturadas, oxidação que aumenta consoante o seu grau de insaturação (Osório *et al* 2001; Leyton *et al*, 1987) e a sua posição na estrutura do TAG. Assim, os ácidos gordos polinsaturados inseridos nas posições *sn*-1 e *sn*-3 estão sujeitos a um maior grau de oxidação do que se estiverem, comparativamente, inseridos na posição central do TAG (*sn*-2) (Andrews *et al*, 2008). Alguns autores apresentam inclusive resultados onde comprovam capacidades antioxidantes para estes ácidos gordos (Richard *et al*, 2008). Em reações de acidólise ou de interesterificação, a oxidação dos PUFA resulta também da conjugação das condições reacionais (Osório *et al*, 2001). Esta oxidação também pode levar a uma diminuição da atividade e estabilidade operacional das lipases, quando utilizadas em reatores contínuos (Osário *et al*, 2008), originando um menor rendimento no produto final. A tentativa de evitar ou retardar a oxidação de produtos lipídicos formulados em laboratório ou à escala industrial, representa uma das maiores preocupações quando se trabalha com estes compostos, pelo que se aplicam algumas técnicas para retardar ou prevenir a oxidação lipídica. Estas vias incluem a quelação de metais de transição, a destoxificação enzimática das espécies reativas de oxigénio (“Reactive oxygen species” - ROS), filtração U.V., inibição de enzimas pró-oxidantes, cofactores enzimáticos antioxidantes (Laguerre *et al*, 2007), apenas para referir técnicas mais usuais.

A atividade da água (a_w) é uma medida da água disponível de um sistema, e corresponde à relação entre a pressão de vapor de água desse sistema (P) e a pressão de vapor de água pura no ar saturado à mesma temperatura (P_o) (Parker e Birch, 1983). Estudos anteriores puderam inclusive comprovar que o conteúdo de água no sistema reacional pode ser melhor quantificado em termos de atividade da água (Halling, 1994). Na síntese dos mais variados compostos e derivados lipídicos estruturados, as lipases podem ser utilizadas em três tipos de sistemas principais. Os sistemas aquosos, sistemas com solventes orgânicos ou os sistemas livres de solventes, sobre os quais se tem prestado mais atenção nos últimos tempos. Este sistema consiste na mistura simples dos reactantes e apresenta maiores vantagens, no que respeita a condições de operação, a alta especificidade para o substrato, a simplificação considerável no processo de “downstream” e as reduzidas implicações ambientais.

Outras vantagens adicionais para os sistemas livres de solventes passam eventualmente pela redução de custos no design do reator para o processo em larga escala e na redução nos custos de separação, visto não ser necessário recuperar os solventes utilizados (Xin *et al*, 2010).

As lipases são caracterizadas por um fenómeno designado de “ativação interfacial” e assim sendo, a atividade enzimática aumenta consideravelmente quando o substrato se encontra na interface água-substrato, um fenómeno que é devido às características estruturais únicas desta classe de enzimas e que se justifica pela sua maior flexibilidade molecular. A a_w de um sistema determina a hidratação da enzima e, assim, a sua atividade catalítica. Além disso, este parâmetro determina 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. A água pode encontrar-se no sistema em quantidades vestigiais, geralmente adsorvida nas moléculas de biocatalisador (Foresti *et al*, 2007). Verifica-se assim uma a_w muito baixa, que vai favorecer as reações de esterificação e de interesterificação. Uma hidratação excessiva do biocatalisador (fase separada da fase orgânica) vai promover reações essencialmente extensas de hidrólise, originando maioritariamente, diacilgliceróis, monogliceróis e ácidos gordos livres como produtos finais (Zhao *et al*, 2007). Quanto menor a a_w no sistema, mais será beneficiada a reação global no sentido da formação de triacilgliceróis pelo processo de interesterificação (Ma *et al*, 2003; Yang *et al*, 2003).

Atendendo a que o mecanismo de interesterificação envolve uma primeira fase de hidrólise dos grupos éster, com posterior reesterificação, o rendimento do produto final depende diretamente deste balanço entre hidrólise e esterificação reacionais. Diversos estudos referem que a adição de água no meio reacional pode favorecer a acidólise, mas em proporções severamente controladas, e que variam consoante o catalisador (Foresti *et al*, 2007; Ma *et al*, 2006; Nielsen *et al*, 2006; Huang e Akoh, 1994).

A síntese de lípidos estruturados, e de triacilgliceróis, mais especificamente, envolve sucessivas reações de hidrólise e posterior reesterificação na molécula de glicerol. Contudo neste processo estão envolvidos alguns produtos intermédios como ácidos gordos livres, glicerol e glicéridos parciais (mono e diacilgliceróis). Tanto recorrendo a meios químicos como enzimáticos, o processo de interesterificação não se traduz em incorporações totais, resultando no aparecimento destes produtos intermédios no meio que misturam nos produtos finais.

O aparecimento de ácidos gordos livres no meio reacional provoca um decréscimo do pH do mesmo. Existem estudos que referem a inativação/inibição das lipases na presença de elevados teores de ácidos gordos livres, precisamente pela sua sensibilidade ao pH do meio. Nas reações de acidólise, este aspeto limita a utilização de concentrações elevadas de ácidos gordos livres como substrato (Pesaresi *et al*, 2009). Por outro lado é sugerido por alguns autores que, com a formação de ácidos gordos livres no meio, estes possam competir com os ácidos gordos livres específicos, que são utilizados como substrato de incorporação no TAG, causando uma diminuição ou inibição na taxa de incorporação de determinados ácidos gordos no produto de interesse final.

Embora seja também sugerido que a elevada concentração de AGL no meio possa por em causa a estabilidade operacional do biocatalisador, Holm e Cowan (2008) demonstraram não haver interferência negativa sobre o processo de acidólise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Biocatalisadores

Utilizaram-se como biocatalisadores as preparações comerciais de lipases termoestáveis, imobilizadas em matrizes poliméricas, gentilmente cedidas por Novozymes™, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca: as lipases 1,3 seletivas de *Rhizomucor miehei* (“Lipozyme™ RM IM”-imobilizada em Lewatit™), de *Thermomyces lanuginosa* (“Lipozyme™ TL IM”-imobilizada em sílica) e a lipase de *Candida antarctica* (“Novozym™ 435”-imobilizada em matriz tipo poliacrilato). A lipase Amano AK de *Pseudomonas fluorescens*, da Sigma-Aldrich, foi utilizada na sua forma livre.

Testaram-se ainda diversas enzimas não comerciais. A lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL), expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris*, foi produzida pelo grupo do Prof. Francisco Valero, da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha. A lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, imobilizada em Accurel MP 1000, foi produzida pelo grupo do Prof. Eric Dubreucq, de Montpellier SupAgro, França. A lipase de *Carica papaya* auto-imobilizada no látex, foi extraída de agro-resíduos de plantações de papaia. Este biocatalisador foi preparado pelo grupo da Profª Georgina Sandoval, CIATEJ, Guadalajara, México.

3.1.2. Substratos

3.1.2.1. Fonte de ácido palmítico

Utilizaram-se como fonte de ácido palmítico: tripalmitina ($C_{51}H_{98}O_6$; MM 807,35 g mol⁻¹) com um grau de pureza em ácido palmítico (C 16:0) de aproximadamente 95%, da Fluka, banha de porco comercial (Tricar®), adquirida num mercado local e banha de porco em rama (sem adição de sal e antioxidantes), cedida por um talho local. A tabela 3.1 descreve a composição em ácidos gordos dos TAG, determinada por cromatografia gasosa, para as diferentes fontes de ácido palmítico utilizadas.

Tabela 3.1. Composição em ácidos gordos dos substratos utilizados como fonte de ácido palmítico.

Ácidos Gordos	Banha em Rama (%)	Banha Comercial (%)	Tripalmitina (%)
C 14:0	2,12	1,57	
C 16:0	34,72	41,35	~ 95%
C 16:2	1,29	0,95	
C 18:0	3,13	20,14	
C 18:1 <i>n</i> -9	56,85	14,25	
C 18:2 <i>n</i> -6	1,38	17,28	
C 18:3 <i>n</i> -3	0,4	1,15	
C 20:1 <i>n</i> -9	0,63	1,83	

3.1.2.2. Fonte de Ácidos Gordos Livres

Como fonte de ácidos gordos livres utilizaram-se concentrados de triacilgliceróis enriquecidos em ómega-3 PUFA, “EPAX 1050TG” e “EPAX 4020 EE”, gentilmente cedidos por EPAX AS, Lysaker, Noruega. O concentrado “EPAX 1050” contém cerca de 60% de ómega-3 PUFA. Destes, 10% são EPA e 50% são DHA. O concentrado “EPAX 4020” contém cerca de 60% de ésteres etílicos ómega-3 PUFA, onde 40% são EPA e 20% DHA. A composição percentual em ácidos gordos destes óleos concentrados encontra-se discriminada na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Composição em ácidos gordos dos substratos utilizados como fonte de ácidos gordos livres.

Ácidos Gordos	EPAX 1050TG (%)	EPAX4020TG (%)
C 16:0	5,4	1,93
C 16:1	1,66	0,4
C 16:2	-	0,37
C 16:3	-	0,32
C 18:0	0,81	1,48
C 18:1	5,35	7,28

C 18:2	0,59	0,92
C 18:3	4,57	0,87
C 18:4	4,35	3,11
C 20:1	0,13	0,9
C 20:4	3,33	0,31
C 20:5	16,45	50,14
C 22:5	1,03	2,23
C 22:6	56,29	29,78

3.1.3. Reagentes e outros materiais

- Accurel[®] MP 1000, da Membrana, GmbH (Oberburg, Germany)
- Acetona p.a, da Fisher Scientific;
- Ácido acético glacial, da Panreac Química S.A.;
- Ácido clorídrico 36-38% (m/m), MM: 36,46 g mol⁻¹ e massa volúmica de 1,19 kg/dm³, da Fisher Scientific;
- Ácido sulfúrico concentrado, da Sigma-Aldrich;
- Clorofórmio, da Fisher Scientific;
- 2',7'- diclorofluoresceína, da Fluka;
- Etanol 96% (v/v), da Merck;
- Éter de petróleo p.a, da Panreac Química S.A.;
- Éter etílico, da Merck;
- Glutaraldeído, solução aquosa a 50%, da Acros Organics;
- Hidróxido de potássio, da Merck;
- Hidróxido de sódio em palhetas (98%), da Panreac;
- Meristato de metilo standard (>99%), da Fluka;
- Metanol Anidro, da Fisher Scientific;
- *n*-Hexano 95% (v/v), da Merck;
- Padrões certificados PUFA-3, Menhaden Oil da Supelco Analytical;
- Sulfato de sódio anidro, da Panreac.

Os solventes utilizados, *n*-hexano, éter etílico, éter de petróleo e ácido acético, foram de grau de pureza p.a. e obtidos de diferentes fontes.

3.1.4. Equipamentos e utensílios

- Ampolas de decantação, da Normax
- Balança de precisão BL 120S, da Sartorius;
- Balões periformes 10 mL, da Normax;
- Banho-Maria;
- Condensador Liebig;
- Cromatógrafo Gasoso Capilar, Finnigan TRACE GC Ultra, equipado com injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation e munido de uma coluna Trace TR-FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme;
- Erlenmeyer esmerilado de 100 mL;
- Estufa de secagem, WTB Binder 7200, T_{máx}=300°C;
- Evaporador Rotativo de Vácuo Laborota 4000, da Heidolph;
- Lâmpada visível nos UV (254 nm), da CAMAG;
- Manta de aquecimento, da Selecta;
- Material de vidro diverso;
- Micropipetas de 20 µL, de 200 µL e de 1 mL, da VWR;
- Papel de filtro n°1 da Whatman;
- Placas de agitação magnética e aquecimento, da VELP® Científica;
- Placas (TLC) de sílica gel 60 (0,25 mm de espessura, 20x20 cm), da Merck;
- Placas de 96 poços;
- Reatores de vidro de parede dupla, com cerca de 25 cm³ de volume;
- Tina cromatográfica de vidro, 22x20x10 cm;
- Ultrasons, da VWR;
- Leitor de Placas Multiskan EX, da Labsystems;
- “Vials” com “micro insert” de 300 µL, da Thermo Scientific.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos ácidos gordos polinsaturados

O procedimento para obtenção dos AG polinsaturados livres a partir de “EPAX 1050 TG” foi baseado no método descrito por Sahin *et al* (2005). Vinte e cinco gramas de “EPAX 1050 TG” foram saponificados usando uma mistura de hidróxido de potássio (5,75 g), água destilada (11 mL) e uma solução aquosa de etanol (95% v/v) (66 mL), por refluxo em condensador a 100 °C, durante uma hora. À mistura saponificada foi adicionada água destilada (50 mL), e a fase sobrenadante (orgânica) foi extraída por lavagem com *n*-hexano (2×100 mL) e, posteriormente, rejeitada. A fase aquosa contendo a matéria saponificada foi acidificada (pH 1,0) com HCl 3N. Os ácidos gordos livres libertados foram então extraídos com hexano (50 mL). A fase orgânica (*n*-hexano) foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido por evaporação a vácuo, a 40 °C, em evaporador rotativo.

Os ácidos gordos obtidos foram guardados em frasco de vidro escuro. Foi borbulhado azoto gasoso no “headspace” do frasco e este foi posteriormente conservado a -18°C até à sua utilização.

3.2.2. Imobilização da lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

Todos os biocatalisadores não comerciais testados foram fornecidos na forma imobilizada com excepção da lipase de *rROL*. A imobilização da lipase foi efectuada segundo o método utilizado por Osório *et al* (2009).

O protocolo de imobilização iniciou-se com a dissolução de 0,25g de enzima em 50mL de tampão fosfato (0,1M; pH 7). Posteriormente, adicionou-se 1g de Accurel[®] MP 1000 como suporte de imobilização. O Accurel[®] MP 1000 sofreu um tratamento prévio com etanol, dada a sua elevada hidrofobicidade. Para o efeito, adicionou-se 7mL de etanol a 1g de suporte deixando em contacto durante cerca de 10 minutos. Retirou-se o etanol em excesso e adicionou-se o suporte à enzima, deixando a mistura em agitação moderada durante 18 horas. Seguidamente a mistura foi filtrada a vácuo, deixando o imobilizado retido no filtro. Adicionou-se 25 mL de solução de glutaraldeído a 2,5%, deixando novamente em agitação magnética durante 2 horas. A solução foi novamente filtrada a vácuo e o imobilizado, retido no filtro, foi lavado com 50 mL de tampão fosfato.

Repetiu-se a operação de lavagem e deixou-se o imobilizado retido no filtro a secar a vácuo durante 5 minutos.

O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando como padrão BSA (*Bovine Serum Albumine*). O rendimento de imobilização (η) foi calculado por quantificação do teor de proteína presente na solução inicial, antes da adição do suporte de imobilização (P_0) e a quantidade de proteína residual presente no sobrenadante e nas soluções de lavagem após a imobilização (P_1), de acordo com a equação 1.

$$\eta = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.3. Interesterificação Enzimática

As reações de interesterificação processaram-se em descontínuo, à pressão atmosférica, em reator de vidro de geometria cilíndrica com parede dupla (Figura 3.1), em meio livre de solvente, com agitação de 300 rpm, a temperaturas compreendidas entre os 40 e os 55 °C.

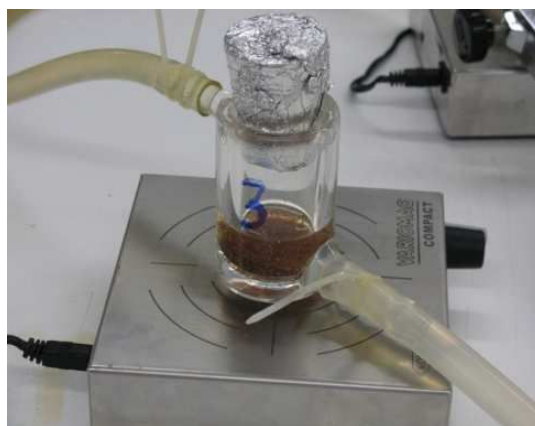


Figura 3.1. Reator cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm³) sob agitação magnética.

Estudaram-se sistemas reacionais com composição distinta no que respeita ao substrato utilizado como fonte de ácido palmítico, ao substrato utilizado como fonte de ácidos gordos, à razão molar dos substratos e à natureza e carga do biocatalisador. A temperatura manteve-se constante ao longo da reacção (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Enzimas e parâmetros reacionais testados na fase de “screening” inicial. **S** significa **SIM** e **N** significa **NÃO**. **Substrato 1** representa a fonte de ácido palmítico e **Substrato 2** representa a fonte de ácidos gordos livres.

Biocatalisadores	Parâmetros reacionais						
	T. (°C)	Razão Molar (m/m)	Carga de Enzima (m/m)	Substrato 1		Substrato 2	
				Banha Comercial	Banha em Rama	EPAX 1050	EPAX 4020
Amano AK	45/50	1:2	8,75	S	S	S	S
Novozym 435	50	1:2	8,75	S	S	S	N
Lipozyme RM IM	50	1:2	8,75	S	S	S	N
Lipozyme TL IM	50	1:2	8,75	S	S	S	N
<i>C. parapsilosis</i>	40/45/50	1:2	8,75	S	S	S	S
<i>Carica papaya</i>	45/50/55	1:2	8,75	S	S	S	S
rROL	50	1:2	8,75	N	S	S	S

Antes da adição da lipase os substratos foram colocados a termostatar no reator. A banha em rama e a tripalmitina encontravam-se no estado sólido, à temperatura ambiente, pelo que foram fundidas em microondas, a 300 Watt durante um minuto.

Seguidamente, adicionou-se 8,75% (m/m) de lipase, relativamente à massa total dos substratos, e registou-se o tempo inicial. Os reatores foram vedados com rolhas de borracha revestidas com folha de alumínio, a fim de minimizar reações de oxidação durante o processo. Após 24h de reação, o meio foi recolhido e filtrado em papel de filtro, à temperatura ambiente, para a remoção do biocatalisador. O meio filtrado foi armazenado a (-20°C), em tubos *falcon* (15 mL), devidamente identificados para subseqüentes análises. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.2.3.1. Atividade do Biocatalisador

Os ensaios de interesterificação por acidólise enzimática foram realizados com todas as enzimas a testar, durante 24h e nas condições previamente descritas (c.f. 3.2.3).

3.2.3.2. Modelação e Otimização da Interesterificação

3.2.3.2.1. Metodologia das Superfícies de Resposta

Da fase de “screening” inicial foi selecionada apenas uma enzima, de acordo com os parâmetros: boa taxa de incorporação molar, preferencialmente uma enzima não comercial e pouco abordada na bibliografia.

A metodologia das superfícies de resposta (“Response Surface Methodology”-RSM) baseia-se numa coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que se conjugam na análise e modelação de um determinado problema real. Consideram-se previamente as variáveis determinantes e analisa-se a sua influência, isto é, o seu efeito positivo ou negativo no problema em estudo. Estes efeitos podem ser ainda avaliados de forma individual ou combinada, na resolução de uma resposta ótima. A otimização pode originar um modelo matemático entre respostas e fatores, podendo ser avaliado o principal efeito de cada fator na resposta (Dellino *et al*, 2010; Xu, 2003).

A RSM tem-se revelado extremamente útil na otimização de reações de produção de lípidos estruturados (Araújo *et al*, 2011; Yüksel e Yeşilçubuk, 2011; Öztürk *et al*, 2010). O principal motivo prende-se pelo facto de não existirem modelos teóricos capazes de prever inteiramente, para um sistema complexo, os efeitos das características da enzima em questão, transferências de massa e calor, termodinâmica da água, etc, ou o facto de estes parâmetros terem um efeito conjugado e simultâneo, o que influencia uma resposta desejada (Dellino *et al*, 2010). A compreensão e modelagem dos efeitos individuais e interativos são essenciais na medida em que permitem a cada parâmetro da reação ser otimizado em coerência com os outros para alcançar a rentabilidade máxima dos produtos (Soo *et al*, 2004), com uma redução significativa de testes experimentais, economizando tempo e custos.

Geralmente inicia-se a análise da relação entre o conjunto de variáveis e o problema com uma função polinomial de primeira ordem, resultante de uma resposta linear das variáveis. Deve sempre procurar-se uma relação real e funcional. Se o sistema originar uma curvatura na resposta devem ser considerados modelos não-lineares, que se traduzem numa função de polinomial de segunda ordem, ou superior (Montgomery, 1997). Uma das matrizes mais utilizadas em RSM é a matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”, CCRD) (Montgomery, 1997).

No presente estudo, os testes de modelação e otimização da atividade catalítica foram realizados de acordo com uma CCRD de dois fatores (2^k), segundo o modelo da tabela 3.4.

Tabela 3.4. Matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”) codificada para duas variáveis, X_1 e X_2 (temperatura e razão molar).

Ensaio	X_1	X_2	
1	-1	-1	Matriz Fatorial
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	
5	$-\alpha$	0	Pontos Estrela $\alpha=\sqrt{2}$
6	α	0	
7	0	$-\alpha$	
8	0	α	
9	0	0	Repetições do Ponto Central
10	0	0	
11	0	0	
12	0	0	

A CCRD consiste em três conjuntos de ensaios experimentais: (i) uma matriz fatorial das variáveis em estudo, cada uma com dois níveis (mínimo e máximo). A matriz fatorial 2^k (k representa o número de variáveis) é representativa dos pontos extremos, correspondentes ao vértice de um cubo cujo centro é a origem (0,0), e os extremos inferior e superior são (-1,1) (Figura 3.2).

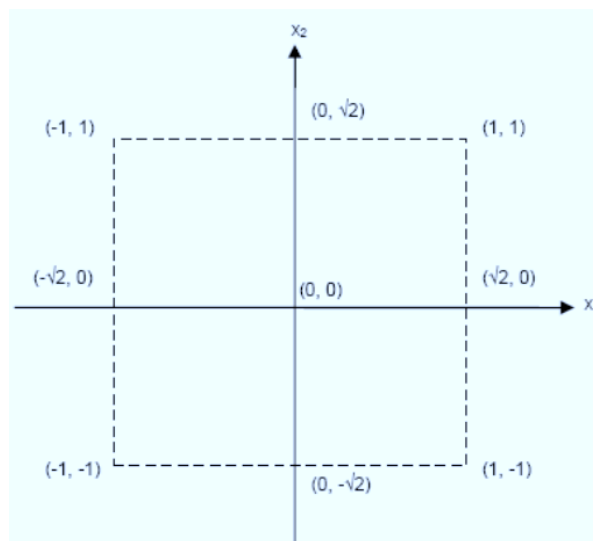


Figura 3.2. “Central Composite Rotatable Design” (CCRD) para dois fatores X_1 e X_2 .

(ii) Um conjunto de pontos estrela, representados por α e $-\alpha$. Estes pontos resultam das medianas dos pontos fatoriais e permitem testar a precisão do modelo, sendo por isso efetuadas réplicas (Montgomery, 1997). (iii) O ponto central (0,0), situado na origem dos eixos, permite estimar a variância do erro experimental, que se considera constante ao longo da totalidade do domínio experimental. Deverão ser efetuadas várias repetições deste ponto central (Montgomery, 1997).

As equações polinomiais que se obtêm através deste método traduzem a resposta, Y , em função das variáveis, X_i , dando origem a uma superfície de resposta com dimensão $k+1$, onde k representa o número de variáveis X_i (Ximénez e Martín, 2000).

O polinómio de resposta não linear para duas variáveis, é dado pela função:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

Y – variável dependente;

x_1x_2 – variáveis independentes;

β_1, β_2 – coeficientes lineares;

β_{11}, β_{22} – coeficientes quadráticos;

β_{12} – coeficiente linear de interação X_1X_2 ;

O ponto ótimo da resposta resulta do cálculo dos extremos da função polinomial, (máximo ou mínimo, consoante a curvatura da superfície). Para o cálculo destes valores, máximos ou mínimos, das variáveis X_1 e X_2 , calculam-se as suas respetivas derivadas parciais.

O ajuste do modelo aos resultados experimentais é traduzido pelo coeficiente de determinação R^2 , sendo R o coeficiente de correlação entre as variáveis independentes.

O coeficiente de determinação ajustado, R^2 ajust., é determinado a partir do valor de R^2 , pela equação (Wiesberg, 1985):

$$R_{aju}^2 = 1 - [(n - 1)/(n - k)] \times (1 - R^2) \quad (\text{Eq. 3})$$

O R^2 e o R^2 ajustado variam entre 0 e 1 e, quanto mais próximo estiver da unidade, mais o modelo se ajusta à realidade.

3.2.3.2.2. Modo Operatório

O biocatalisador que apresentou melhores taxas de incorporação de ácidos gordos livres (AGL), de acordo com as condições impostas inicialmente (não comercial, 1,3-seletiva, pouco estudada em bibliografia), na fase de “screening” inicial, foi submetido a ensaios de modelação e optimização da interesterificação. De acordo com a CCRD formulada, fez-se variar a temperatura entre os 40°C e 66°C, e a razão molar banha/ ω 3 (expressa em moles de Oleico-Palmitico-Oleico para a banha e moles de DHA para os AGL) entre 1:1,2 e 1:6,8. A quantidade de biocatalisador utilizada manteve-se constante e igual a 8,75% (m/m), relativamente à quantidade de banha utilizada (3,9 g), assumindo que os PUFA têm uma densidade aproximada à dos ácidos docosahexaenóico (C22:6) e eicosapentaenóico (C20:5), igual a 0,943. Foram realizados um total de 12 ensaios, mediante as condições apresentadas na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Matriz Central Compósita Rotativa codificada e decodificada dos ensaios de interesterificação de banha em rama com ácidos gordos PUFA.

Ensaio	Matriz Codificada		Matriz Descodificada		
	T (°C)	Razão Molar	T (°C)	Razão Molar (Banha:PUFA)	
1	-1	-1	44	1:2	Matriz Fatorial 2k
2	-1	1	44	1:6	
3	1	-1	62	1:2	
4	1	1	62	1:6	
5	$-\alpha$	0	40	1:4	Pontos Estrela $\alpha=\sqrt{2}$
6	α	0	66	1:4	
7	0	$-\alpha$	53	1:1,2	
8	0	α	53	1:6,8	
9 (C)	0	0	53	1:4	Repetições do Ponto Central
10 (C)	0	0	53	1:4	
11 (C)	0	0	53	1:4	
12 (C)	0	0	53	1:4	

As incorporações molares médias do biocatalisador selecionado, nas condições selecionadas de acordo com a CCRD, foram determinadas conforme descrito em c.f. 3.2.4.1.

3.2.3.3. Estabilidade Operacional

Os ensaios de estabilidade operacional consistiram em ensaios consecutivos de 24 h de duração cada, nas condições descritas em 3.2.3.

A lipase selecionada para este estudo foi a mesma testada na metodologia das superfícies de resposta, mediante os resultados obtidos na fase de “screening” (*rROL*) para a atividade de acidólise.

Depois de cada ensaio, o biocatalisador foi removido do meio reacional por filtração em papel de filtro, em estufa a 70°C. De seguida foi reidratado com tampão fosfato (pH=7) e reutilizado em novo ensaio com meio fresco e mantendo as mesmas condições reacionais. A atividade do biocatalisador corresponde à taxa de incorporação molar de PUFA na banha, observada no fim de cada ensaio, *n*. O primeiro ensaio serviu como referência (100% de atividade) para os ensaios posteriores. A atividade residual (*a_n*, %) do biocatalisador no final de cada ensaio, *n* (*n*=1, ..., *n*=7), foi estimada a partir dos modelos ajustados aos ensaios de estabilidade operacional, segundo a expressão equacional:

$$a_n = \left(\frac{\text{Incorporação}_{\text{ensaio}_n}}{\text{Incorporação}_{\text{ensaio}_1}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Posteriormente foi determinado o tempo de meia vida operacional para o biocatalisador (*t*_{1/2}), que consiste no tempo operacional que o mesmo leva a perder metade da sua atividade catalítica inicial.

3.2.4. Métodos Analíticos

3.2.4.1. Análise dos produtos de reação

3.2.4.1.1. Cromatografia em Camada Fina (“Thin Layer Chromatography”, TLC)

Pesou-se 0,150 g do meio reacional recuperado (e armazenado no frio) e dissolveu-se em 25 mL de clorofórmio. Desta solução foram aplicados 200 µL em banda contínua numa placa revestida com sílica gel, que constituiu a fase estacionária. A placa foi

inserida numa câmara de vidro e o eluente composto por *n*-hexano, éter etílico e ácido acético na proporção de 70:30:1,5 (v/v/v) ascendeu, por capilaridade, na fase estacionária, processo que demorou cerca de 1 hora. As bandas separadas foram reveladas após pulverização com uma solução de 0,2% (m/v) de 2,7-diclorofluoresceína em etanol 95% (v/v) e visualizadas sob luz ultravioleta.

Foram identificados os vários grupos lipídicos (triacilgliceróis, ácidos gordos livres, diacilgliceróis e monoacilgliceróis), recuperando apenas a banda dos triacilgliceróis, excepto em ensaios específicos, onde se recolheram os ácidos livres para análise.

3.2.4.1.2. Derivatização/Metilação

A preparação de ácidos gordos sob a forma de esteres metílicos deverá ser, claramente, a reação química mais comum levada a cabo pelos analistas (Figura 3.3). Os dois principais métodos de derivatização de ácidos gordos são as catálises ácida e básica, embora alguns casos especiais possam requerer algumas modificações. Na catálise ácida, os ácidos gordos livres podem ser esterificados, e os lípidos *O*-Acilo, como os triacilgliceróis podem ser transesterificados por aquecimento em presença de metanol anidro em excesso e um reagente ácido como catalisador (ácido clorídrico metanólico ou ácido sulfúrico). A catálise básica apresenta-se como um método paralelo ao anterior, embora seja mais eficaz e direcionada para amostras ricas em ácidos gordos de cadeia curta (Christie, 1989). Os lípidos *O*-Acilo são transesterificados muito rapidamente em metanol anidro, na presença de um catalisador básico, geralmente metóxido ou hidróxido de sódio. Trata-se de um método rápido mas que exige extremo cuidado para impedir a presença de água no meio, que promove a formação de ácidos gordos livres, que normalmente não são esterificados pela catálise básica.

O procedimento de metilação (ácida) para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME, "Fatty Acid Methyl Esters") para posterior análise por cromatografia gasosa foi efetuado de acordo com o método descrito no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* de, N°L 248/47, (1991), com algumas alterações ao mesmo, nomeadamente no tempo e temperatura do banho-maria, que foi mantido a 80°C pelo período de 1 hora. Também o processo de evaporação do solvente foi adaptado, tendo sido efetuado em vácuo com evaporador rotativo.

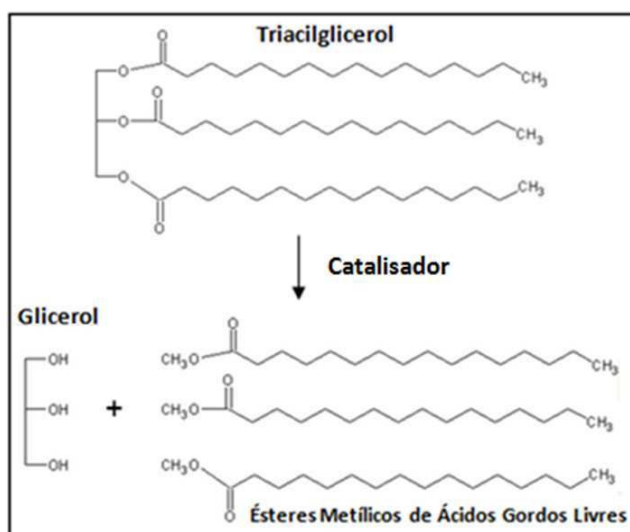


Figura 3.3. Esquema representativo do processo de metilação dos triacilgliceróis. O catalisador é composto por um conjunto de reagentes (metanol anidro/*n*-hexano/ácido sulfúrico concentrado; 75/25/1 (v/v/v)).

A mistura esteve em ebulição sob refluxo durante 60 minutos, em banho-maria a sensivelmente 80°C. Posteriormente adicionou-se à mistura 10 mL de água destilada pelo orifício superior do condensador de refluxo para arrastar possíveis vestígios de compostos das paredes do mesmo. Adicionou-se 10 mL éter de petróleo e transferiu-se para uma ampola de decantação. Agitou-se vigorosamente o conteúdo para permitir a separação de fases na decantação. A fase superior (orgânica) foi recuperada e lavada duas vezes com água destilada (2 x 10 mL), com nova recuperação. A fase orgânica foi filtrada numa coluna de sulfato de sódio anidro e finalmente recuperada para um balão cônico de 10 mL. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40°C.

3.2.4.1.3. Análise por Cromatografia Gasosa Capilar

O resíduo seco obtido pela evaporação do solvente em evaporador rotativo, foi dissolvido em 100 µL de uma solução de 0,1% (v/v) de meristato de metilo (padrão interno, C15:0) em *n*-hexano, e 0,1 µL desta solução foi injetada e analisada no Cromatógrafo Gasoso.

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), um injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation (a operar em modo *splitless*) e um detetor de ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se nos 250°C e 260°C, respetivamente. Utilizou-se o hélio como gás de arraste, a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 350 mL/min e 35mL/min, respetivamente.

Para a análise das amostras o programa de temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 60°C durante 1 min; aumento da temperatura até 150°C a 15°C/min (rampa 1); manutenção a 150°C por 1 min; aumento para 220°C a uma taxa de 5°C/min (rampa 2); patamar final a 220°C durante 10 min.

3.2.4.1.4. Incorporação e Rendimento

A incorporação mássica (%) e molar (% mol) de AGL PUFA nos TAG, catalisada pelas lipases testadas foram calculados conforme descrito:

Da análise de todas as amostras obtiveram-se os respetivos cromatogramas e “peak lists” com os tempos de retenção dos compostos presentes nas amostras, bem como as áreas dos picos correspondentes (Anexos 2 e 3).

Pelas áreas dos picos (%) calculou-se a percentagem molar (%mol) e percentagem mássica de incorporação de AGL-PUFA. Primeiramente normalizaram-se as áreas a partir da área do padrão interno (meristato de metilo), através da seguinte expressão:

$$\text{Áreas Normalizadas (\%)} = \frac{\text{Área Pico (\%)}}{\text{Área Padrão Interno (\%)}} \quad (\text{Eq. 5})$$

A partir da área normalizada foi possível calcular a percentagem mássica para cada um dos ácidos gordos de cada amostra.

À soma das áreas normalizadas dos picos considerados foram descontadas as áreas normalizadas dos ácidos gordos presentes na amostra inicial, t=0 (AG_{t=0}). Desta forma foi possível calcular a incorporação mássica por parte dos biocatalisadores, da seguinte forma:

$$Inc. mássica (\%) = \frac{PUFA \times 0,97}{Total} \times 100 \quad (Eq. 6)$$

PUFA representa todos os ácidos gordos polinsaturados incorporados no TAG, excepto aqueles que, em termos percentuais, já estão inseridos na composição da banha e que representam 3% da composição total. Isto justifica a inserção do factor 0,97 na equação.

Obtendo a percentagem mássica e o peso molecular do éster metílico correspondente a cada um dos ácidos gordos (Tabela 3.6) obteve-se a percentagem molar para cada ácido gordo (%molar).

Tabela 3.6. Massas moleculares e massas dos respectivos ésteres metílicos de ácidos gordos específicos.

Ácidos Gordos	Massa Molar (gmol ⁻¹)	Massa Ester Metílico (gmol ⁻¹)
C 16:0	256,416	270,46
C 16:1	254,4	268,26
C 18:0	284,47	298,3
C 18:1	282,272	296,29
C 18:2	280,436	294,27
C 20:1	310,51	324,3
C 20:4	304,47	318,21
C 20:5	302,451	316,48
C 22:5	330,5	344,1
C 22:6	328,488	342,51

A incorporação molar para cada enzima testada foi então calculada seguindo a mesma ordem de cálculo efectuada para a incorporação mássica.

O rendimento de incorporação (mássico e molar) foi calculado assumindo que os biocatalisadores testados são 1,3-específicos. Assim sendo, um rendimento de 100% corresponde a uma substituição total dos ácidos gordos inseridos nas posições *sn1* e *sn3* dos TAG, sendo substituídos pelos ácidos gordos ómega-3. Isto corresponde a um grau de substituição de 66,6%, segundo Villeneuve *et al* (2007). Assim sendo, a fórmula para a determinação do rendimento da reação, molar e mássico, traduz-se da seguinte forma:

$$Rendimento (\%) = \frac{Incorporação (\%)}{0,66} \quad (Eq. 7)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento de Imobilização de rROL em Accurel[®] MP 1000

O rendimento de imobilização de rROL em Accurel[®] MP 1000 foi determinado de acordo com a equação 1 (c.f. 3.2.2).

A concentração de proteína antes e após imobilização foi estimada com base na recta de calibração de absorvância vs concentração do padrão BSA (figura 4.1). A recta pode ser descrita pela equação 8, para a qual se obteve um valor de $R^2 = 0,995$. O rendimento calculado de imobilização efetiva no suporte Accurel MP 1000 foi de 66,43%.

$$Y = 1,175x + 0,546 \quad (\text{Eq. 8})$$

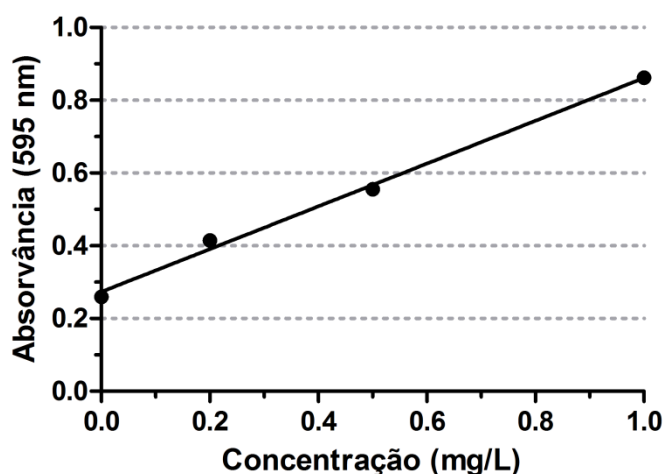


Figura 4.1. Recta de calibração obtida para o padrão BSA.

Os valores obtidos para a absorvância e concentração de proteína na solução tampão inicial, antes de adição do suporte de imobilização, e nas soluções de lavagem após imobilização, estão discriminados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores médios de absorvância e concentração de enzima em solução, ao longo do processo de imobilização.

	Absorvância	Concentração Média (mg/mL)
rROL+Tampão	1,4208	0,4877
Filtração 1	0,784	0,1509
Filtração 2	0,625	0,01279
Filtração 3	0,599	0,01225
Filtração 4	0,601	0,01231

O Accurel[®] MP 1000 é um suporte hidrofóbico pelo que a imobilização estabeleceu-se por adsorção física entre as superfícies hidrofóbicas em torno do centro ativo da enzima e os grupos hidrofóbicos da matriz, com uma consequente estabilização da forma aberta da lipase. Este suporte é mais barato do que a maioria dos materiais utilizados para imobilização enzimática para além de o procedimento de imobilização ser bastante simples de executar, com reagentes de baixo custo (Tufvesson *et al*, 2011).

O glutaraldeído foi adicionado após a imobilização para promover ligações cruzadas estáveis entre a lipase e a matriz. Na realidade, este agente de reticulação tem uma aplicação generalizada, devido à sua disponibilidade comercial, baixo custo e alta reatividade com os grupos amina da enzima em pH neutro (Migneault *et al*, 2004).

4.2. Seleção do biocatalisador

Testaram-se diferentes lipases como biocatalisadores na reacção de acidólise entre a banha, adquirida num mercado local, e um concentrado de ácidos gordos polinsaturados, rico em ácido docosahexaenóico (EPAX 1050), após 24h de reacção.

Os níveis mais elevados de incorporação molar de PUFA em TAG de banha comercial registaram-se para as lipases comerciais “Novozym 435TM” (11.72 mol% ± 1.67), “Lipozyme RM IMTM” (10.86 mol% ± 0.98). A lipase “Amano AKTM” foi utilizada na sua forma livre e apresentou valores de incorporação molar de 6,86 mol% ± 3,31. As lipases não comerciais de *C.papaya* e *C. parapsilosis* conduziram a valores de incorporação molar consideravelmente inferiores, de 3.73mol% ± 1.10 e 2.16mol% ± 0.56, respetivamente (Figura 4.2).

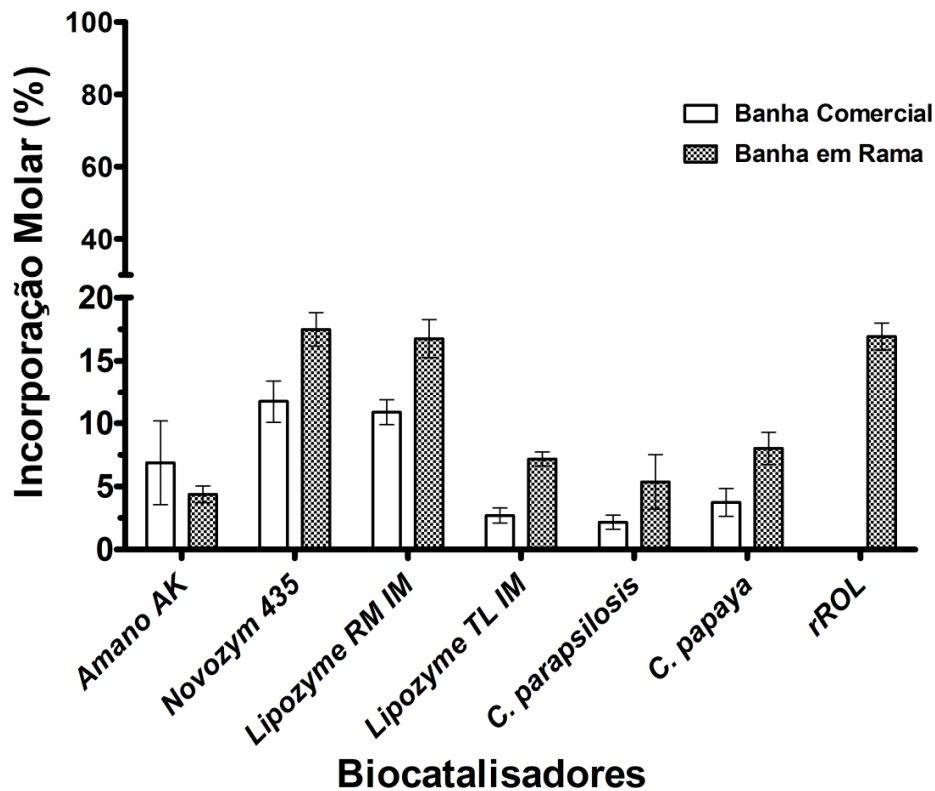


Figura 4.2. Incorporações molares médias para os biocatalisadores testados, comparando banha comercial e banha em rama (fontes de ácido palmítico). EPAX 1050 como fonte de AGL.

A banha, utilizada como fonte de ácido palmítico, continha antioxidantes e sal na sua composição, que podem ter conduzido à inibição da enzima no meio reaccional. Esta hipótese é sustentada por Sharma (2009) que revelou existir uma inibição acentuada na actividade dos biocatalisadores aquando da adição de iões metálicos (Na^+ , K^+) sob a forma de sais (NaCl , KCl). O estudo sugere que as lipases possuem um centro ativo característico, onde o substrato se liga e é convertido a produto e, qualquer modificação ou distorção no centro activo resulta na perda de actividade catalítica por parte do biocatalisador. Estes iões metálicos, por serem de proporções reduzidas, podem efetivamente ligar-se ao catalisador e provocar alteração nas suas propriedades conformacionais, distorcendo o centro activo e inibindo o biocatalisador.

Xu *et al* (2005) avaliou o efeito de antioxidantes na reacção de acidólise entre óleo de peixe e ácido caprílico, catalisada pela lipase “Lipozyme RM IMTM”, na produção de lípidos estruturados. A adição destes compostos não revelou um efeito significativo na actividade catalítica da lipase.

Com o intuito de aumentar a incorporação de PUFA no TAG, substituiu-se a banha comercial por banha em rama. A banha em rama não sofre qualquer tratamento após a sua extração, podendo ser considerada uma matéria-prima em bruto ("raw material"). A aquisição da banha em rama coincidiu com a introdução da lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) como biocatalisador no presente estudo. Assim, esta lipase foi testada na reacção de acidólise entre a banha em rama e PUFA, tal como todas as enzimas comerciais e não comerciais já referidas.

A lipase comercial "Novozym 435TM" foi o biocatalisador que apresentou o valor mais elevado de incorporação molar ($17,48 \pm 1,33\%$), seguida das lipases rROL ($16,92 \pm 1,07\%$) e "Lipozyme RM IMTM" ($16,75 \pm 1,50\%$). A lipase de *Carica papaya* apresentou incorporações molares de $8,01 \pm 1,28\%$ e a lipase TL IM $7,16 \pm 0,57\%$. A lipase/acil-transferase de *Candida parapsilosis* conduziu a um valor de incorporação molar de PUFA de $5,35 \pm 2,49\%$ e a lipase Amano AK de $4,37 \pm 0,66\%$. O menor valor de incorporação molar obtido para a lipase "Amano AKTM", comparativamente às restantes lipases comerciais testadas, pode justificar-se pelo facto de a enzima ter sido utilizada na sua forma livre e, conseqüentemente, sofrer mais facilmente inactivação no meio reacional. Com efeito, os suportes de imobilização podem conferir uma maior estabilidade operacional ao biocatalisador e aumentar a sua actividade catalítica (Knežević et al, 2004). Estes valores de incorporação podem ser também justificados pela afinidade reduzida da lipase para PUFA, demonstrada por Kojima et al (2006), juntamente com outras lipases de *Pseudomonas fluorescens*. Alguns autores referem ainda que se trata de uma lipase que catalisa, preferencialmente, reacções de hidrólise (Pawongratet al, 2007; Shimada et al, 2001).

A tabela 4.2 apresenta os valores de incorporação molar obtidos na reacção de acidólise entre a banha em rama e os PUFA, para os diferentes biocatalisadores testados, discriminando os diferentes PUFA incorporados no TAG, em função dos biocatalisadores testados, usando como substratos a banha em rama e EPAX 1050. Apenas estão representados os valores obtidos para os ácidos gordos polinsaturados considerados mais preponderantes no metabolismo humano.

Tabela 4.2. Incorporações molares (mol%) de ácidos gordos essenciais, catalisadas por todos os biocatalisadores testados, com EPAX 1050.

Ácidos Gordos	Biocatalisadores						
	Amano AK (mol%)	Novozym 435 (mol%)	RM IM (mol%)	TL IM (mol%)	C. <i>parapsilosis</i> (mol%)	C. <i>papaya</i> (mol%)	rROL (mol%)
AAL C 18:3 <i>n</i> -3	1,04	--	0,66	1,75	--	--	0,74
ARA C 20:4 <i>n</i> -6	--	0,47	0,91	--	0,85	--	1,76
EPA C 20:5 <i>n</i> -3	1,04	3,90	5,14	2,26	2,22	2,75	6,41
DHA C 22:6 <i>n</i> -3	1,48	9,50	6,88	1,63	--	2,90	7,60

Apesar de a lipase “Novozym 435TM” ter apresentado os melhores resultados de incorporação molar total e a maior percentagem de incorporação de DHA (9,50%) apresentou menores taxas de incorporação para outros ácidos gordos essenciais, como o ácido araquidónico (ARA, C20:4, *n*-3) e o ácido α -linolénico (AAL, C18:3, *n*-3), comparativamente aos biocatalisadores “Lipozyme RM IMTM” e rROL. A “Novozym 435TM” é uma lipase comercializada e largamente estudada na formulação de lípidos estruturados, o que lhe confere menor interesse de estudo no presente trabalho. Além disso, alguns autores referem que a selectividade da lipase “Novozym 435TM” depende da reacção que catalisa (Jimenez *et al*, 2010; Seriburi e Akoh, 1998). Assim, para avaliar a selectividade desta lipase na reacção em estudo ter-se-ia de pesquisar a regiodistribuição dos AG no esqueleto de glicerol através da reacção com a lipase pancreática *sn*-1,3 selectiva.

A lipase “Lipozyme TL IMTM” apresentou valores de incorporação molar de PUFA bastante reduzidos comparativamente às restantes lipases comerciais testadas. Isto poderá dever-se ao facto de este biocatalisador possuir maior afinidade para ácidos gordos de cadeia mais curta. Tecelão e colaboradores (2010) obtiveram incorporações molares reduzidas quando esta lipase foi utilizada como biocatalisador na reacção de acidólise entre a tripalmitina e um concentrado de PUFA. O mesmo estudo revelou que a substituição dos PUFA por ácido oleico (C18:1) conduziu a incorporações molares consideravelmente superiores, o que parece demonstrar uma maior afinidade da lipase de “Lipozyme TL IMTM” por AG de cadeia mais curta e com menor grau de insaturação. Zhao *et al* (2007) estudaram a incorporação de ácido cáprico (C10:0) em triacilgliceróis de banha, e os resultados demonstraram incorporações muito superiores para o biocatalisador “Lipozyme TL IMTM”, dados estes que podem comprovar a maior especificidade do biocatalisador para ácidos gordos de cadeia média/curta. Outro factor que poderá justificar o baixo rendimento obtido para este biocatalisador consiste na sua

estabilidade operacional, que se revelou pouco consistente em estudos efectuados por Nunes e colaboradores (2011).

A lipase de *C. papaya* apresentou também valores de incorporação molar reduzidos, o que poderá justificar-se pela comprovada especificidade da lipase para ácidos gordos de cadeia curta (Dominguez de Maria, 2006; Villeneuve, 1994).

Relativamente à lipase/acil-transferase de *C. parapsilosis*, os resultados obtidos estão em concordância com os reportados por Tecelão *et al* (2010), que demonstraram uma reduzida incorporação quer de PUFA como de ácido oleico em tripalmitina.

Estudou-se também a reacção de interesterificação entre a banha em rama e um concentrado de ésteres etílicos de cadeia longa (EPAX 4020), catalisada pelas lipases não comerciais de *C. parapsilosis*, *C.papaya* e rROL. A lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis* apresentou a maior especificidade para os ésteres etílicos de cadeia longa, apresentando incorporações molares consideravelmente superiores ($14.98 \pm 1.48\%$) quando comparado com rROL ($2.91 \pm 0.52\%$) e *C.papaya* ($0.57 \pm 0.12\%$) (Figura 4.3). A lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis* é um biocatalisador com propriedades catalíticas peculiares pois em meio aquoso/orgânico catalisa preferencialmente a alcoolise face à hidrólise. Esta lipase demonstra especificidade para ésteres de ácidos gordos de cadeia longa e particularmente, para AG insaturados com configuração *cis*-9 (Riaublanc *et al*, 1993).

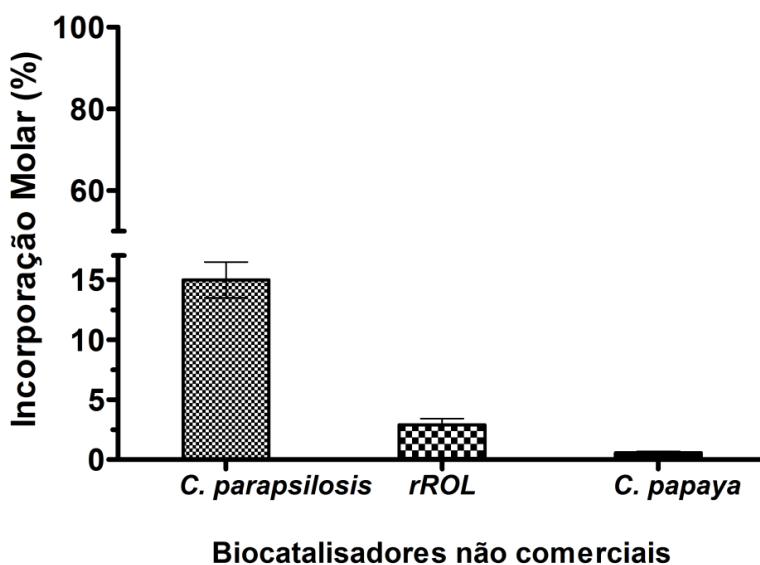


Figura 4.3. Incorporação molar para os biocatalisadores não comerciais testados, usando como substratos banha em rama e EPAX 4020 EE.

Testou-se ainda a tripalmitina como fonte de ácido palmítico em alternativa à banha. A tripalmitina é um substrato vulgarmente utilizado em reações de interesterificação para a síntese de HMFS. Todavia, apresenta algumas limitações comparativamente à banha, em particular, o seu custo elevado e a imposição de operar a reação a temperaturas de, pelo menos, 60°C (temperatura de fusão da tripalmitina) (Silva *et al*, 2009). Selecionou-se a lipase “Novozym 435™” como biocatalisador na reacção de acidólise entre a tripalmitina e um concentrado de PUFA (EPAX 1050) pelos elevados rendimentos de incorporação que demonstrou em diferentes estudos (Tufvesson *et al*, 2011; Jimenez *et al*, 2010; Hamam e Shahidi, 2006; Seriburi e Akoh, 1998). Estabeleceu-se a comparação, em termos de incorporação molar de PUFA, com um sistema reacional similar no qual a tripalmitina foi substituída por banha em rama (Figura 4.4).

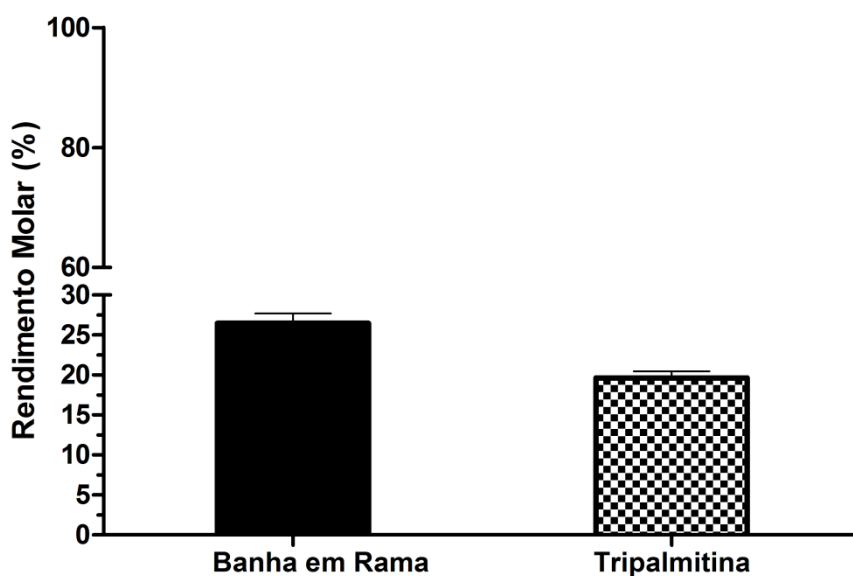


Figura 4.4. Rendimento molar total de incorporação para o biocatalisador Novozym 435, usando como substratos banha em rama e tripalmitina.

Os valores de incorporação molar de PUFA foram inferiores quando a tripalmitina foi utilizada como fonte de ácido palmítico (19,62 ± 0,87%), comparativamente à banha em rama (26,48% ± 1,21), em reações catalisadas pela lipase “Novozym 435™”. Salienta-se que o rendimento total de incorporação molar para a tripalmitina não contabiliza a incorporação de ácido oleico (C18:1), visto não se tratar de um ácido gordo PUFA. Este ácido gordo representou 48,3% do total da incorporação de AG para este substrato. No caso da banha em rama deve salientar-se que, segundo os dados obtidos, esta possui na sua composição antes da reação de acidólise, cerca de 60% de ácido oleico. As

composições percentuais dos ácidos gordos presentes nos TAG após as reacções de acidólise com os dois substratos distintos estão descritas na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Composição em ácidos gordos (mol %) percentual dos TAG após as reacções de acidólise com a lipase Novozym 435, usando banha em rama e tripalmitina como substratos.

Ácidos Gordos	Banha em Rama (mol%)	Tripalmitina (mol%)
C 16:0	32,49	68,61
C 16:1 <i>n</i> -7	1,46	0,86
C 18:1 <i>n</i> -9/7	49,37	15,32
C 18:2 <i>n</i> -6	2,01	0,68
C 20:1 <i>n</i> -9	0,79	0,27
C 20:4 <i>n</i> -3	0,47	--
C 20:5 <i>n</i> -3	3,90	3,78
C 22:6 <i>n</i> -3	9,50	10,94

As lipases de “Lipozyme RM IMTM” e de *r*ROL conduziram aos valores mais elevados de incorporação de AG essenciais PUFA em banha em rama (Figura 4.2, Tabela 4.2).

A *r*ROL foi o biocatalisador selecionado para estudos de otimização das condições reacionais, pela Metodologia das Superfícies de Resposta (RSM), e de estabilidade operacional da lipase em reutilizações sucessivas. A selecção teve em consideração o facto de *r*ROL ser um biocatalisador não comercial, de mais baixo custo e menos estudado na síntese de lípidos estruturados do que a “Lipozyme RM IMTM”.

4.3. Modelação e otimização das condições reacionais para a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

Pretendeu investigar-se se as variáveis em estudo, temperatura e razão molar teriam efeito significativo na incorporação molar de PUFA em banha, na reacção catalisada por *r*ROL. Na tabela 4.4 apresentam-se as condições operacionais para cada ensaio realizado, bem como a incorporação molar média e o rendimento molar médio de PUFA obtido em cada ensaio. Deve ser referido que a quarta repetição do ponto central da matriz não foi considerada nos cálculos porque apresentou uma discrepância acentuada relativamente aos valores das restantes repetições. Isto poderá dever-se ao facto de o sistema reacional não ter permanecido termoestabilizado durante um período de tempo indeterminado.

Tabela 4.4. Valores de incorporação e rendimento molares médios obtidos após 24h de reação catalisada pela lipase rROL (com carga em suporte de 1:4 g/g), em cada ensaio da Matriz Central Compósita Rotativa.

Ensaio	Matriz Codificada		Matriz Descodificada		Incorporação Molar Média (mol%)	Rendimento Molar Médio (mol%)
	T (°C)	Razão Molar	T (°C)	Razão Molar (Banha:PUFA)		
1	-1	-1	44	1:2	16,92	25,64
2	-1	1	44	1:6	18,80	28,47
3	1	-1	62	1:2	6,70	10,15
4	1	1	62	1:6	4,89	7,4
5	- α	0	40	1:4	24,00	36,36
6	α	0	66	1:4	3,80	5,78
7	0	- α	53	1:1,2	12,13	18,37
8	0	α	53	1:6,8	12,70	19,23
9 (C)	0	0	53	1:4	20,10	30,87
10 (C)	0	0	53	1:4	20,45	30,99
11 (C)	0	0	53	1:4	19,50	29,54
12 (C)	0	0	53	1:4	10,17	15,41

Na tabela 4.5 estão representados os valores dos efeitos das variáveis testadas (Temperatura - T; Razão Molar - RM), após 24 horas de reação, para o biocatalisador rROL. Por análise destes resultados verifica-se que um aumento quer da temperatura como da razão molar se traduz numa redução na resposta, isto é, num decréscimo na incorporação molar de PUFA (mol %). Verifica-se também que a temperatura é a variável mais determinante no sistema reacional em estudo ($p=0,000002$). Apenas foi desprezado o termo linear do fator razão molar ($p=0,791$). O termo de interação temperatura X razão molar, apesar de apresentar um valor de $p>0,05$ ($p=0,155$) foi mantido por ser importante no ajuste elevado do modelo (equação 8). Os efeitos foram calculados para um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.5. Resultados dos efeitos, linear (L) e quadrático (Q), e respetivos valores de p , das variáveis (Temperatura e Razão Molar) testadas na incorporação de PUFA nos TAG de banha em rama.

Fator	Efeito	Valor de p
Temperatura (°C) (L)	-13,17	0,000002
Temperatura (°C) (Q)	-6,74	0,00022
Razão Molar (m/m) (Q)	-5,91	0,000069

Na figura 4.5 representa-se a superfície de resposta (Figura 4.5a.) relativa à incorporação molar de PUFA na banha em rama, em função da temperatura (°C) e da razão molar, e a sua respectiva projeção (Figura 4.5b.).

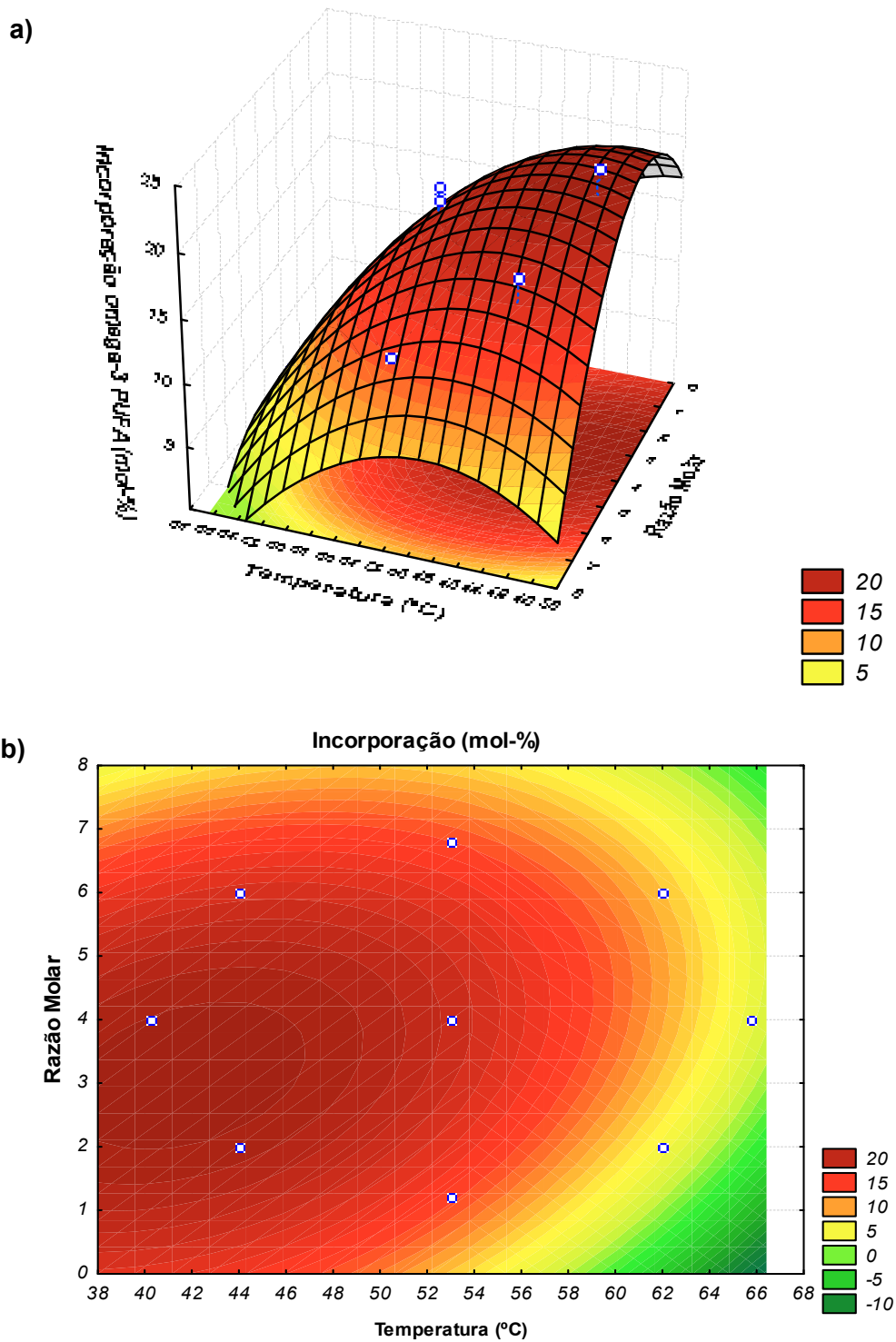


Figura 4.5. Superfície de resposta (a) e respetiva projeção (b), relativa à incorporação molar de PUFA nos TAG de banha, tendo como variáveis a temperatura e razão molar.

Os valores mais elevados de incorporação molar de PUFA foram obtidos com os valores de temperatura mais baixos testados. O modelo prevê também melhores incorporações com razões molares mais baixas (Banha: AGL-PUFA), com uma razão molar ótima de 1:3.

Deve ainda ser mencionado que um sinal negativo ou positivo nos termos quadráticos dá indicação sobre a curvatura da superfície, convexa ou côncava, respetivamente. Neste caso, como os sinais são negativos para os termos quadráticos dos dois efeitos obtém-se uma superfície convexa, como demonstra a figura 4.5a.

Verifica-se que a incorporação de PUFA em TAG de banha em rama, catalisada pela lipase rROL, em função da temperatura reacional e de razão molar dos substratos, pode ser representada por uma superfície convexa descrita pelo polinómio de segundo grau:

$$Inc. (mol\%) = -34,4 + 2,74T - 0,037T^2 - 0,70RM^2 + 0,105 T \times RM \quad (Eq. 8)$$

Em que T representa a temperatura e RM a razão molar de substratos. Os valores obtidos para R^2 e $R^2_{ajustado}$ foram de 0.987 e de 0.979, respectivamente. Estes valores revelam um bom ajuste do modelo. Este ajuste pode ser confirmado pela boa relação linear que se observa entre os valores preditos pelo modelo e os observados experimentalmente (Figura 4.6), quando o valor discrepante obtido para a última repetição do ponto central (10,17 mol%) foi desprezado (tabela 4.4).

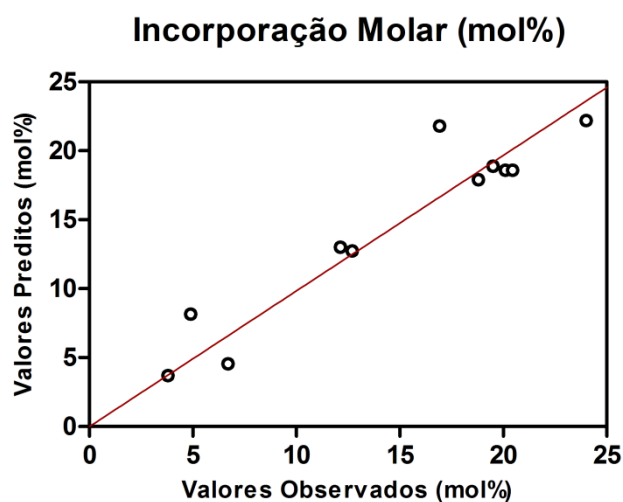


Figura 4.6. Relação linear entre os resultados preditos pelo modelo e os observados experimentalmente.

Regra geral, um aumento da temperatura e da razão molar traduzem-se num aumento da conversão de substratos em reações catalisadas por enzimas, 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 (Matsumoto e Ohashi, 2003). Por outro lado, e segundo a lei de Arrhenius, um aumento da temperatura reacional resulta num efeito de aceleração das reações catalisadas por enzimas. No presente trabalho, o maior valor de incorporação molar de PUFA (24 mol %) foi obtido para a temperatura mínima testada (40°C). Nunes e colaboradores (2011) testaram diferentes gamas de temperatura na reação de acidólise entre azeite e ácido cáprico catalisada por *rROL*. O maior valor de incorporação molar de c10:0 foi também obtido a 40°C. Em 2007, Ghamgui e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre o biocatalisador (*rROL*) na sua forma livre e imobilizado. Os resultados revelaram uma temperatura reacional ótima de 37°C para ambos, embora o biocatalisador na sua forma livre tenha apresentado elevada instabilidade operacional. Num estudo semelhante (Kharrat *et al*, 2011) foi delineada a mesma matriz de teste fazendo variar o suporte e usando solvente no meio reacional. Este estudo revelou também uma temperatura reacional ótima reduzida, 37°C.

Relativamente à razão molar, esta não apresentou um efeito muito significativo na atividade de acidólise de *rROL* no sistema em estudo. Seria de esperar que um aumento da razão molar em AGL se traduzisse numa maior incorporação de PUFA nos TAG. Estudos anteriores demonstraram que razões molares elevadas deslocam o equilíbrio reacional no sentido da formação de produtos e, conseqüentemente, num aumento da incorporação de grupos acilo nos TAG (Yang *et al*, 2003). A tendência observada experimentalmente foi precisamente a inversa. Assim, o aumento da razão molar de ácidos gordos livres traduziu-se numa diminuição da incorporação de PUFA nos TAG da banha, o que poderá estar relacionado com uma inibição enzima-substrato ou perda de actividade por parte da lipase. Níveis elevados de ácidos gordos livres 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 actua a lipase limitando a sua atividade.

O valor de incorporação molar total de 24 mol % obtido para a lipase *rROL* durante a otimização e modelação das condições reacionais revela os efeitos positivos do teste, dado que na fase de “screening” inicial se tinham obtido valores de incorporação total de 16.92% ± 1,07 (mol %) para esta lipase.

4.4. Estabilidade Operacional

Considerando os resultados obtidos na modelação e optimização das condições operacionais da reacção de acidólise entre a banha em rama e um concentrado de PUFA, optou-se por implementar os ensaios de estabilidade operacional à temperatura de 40°C e à razão molar banha/PUFA de 1:3. Estes parâmetros revelaram estar na gama do ótimo na superfície de resposta Fig (4.5). Após 24h de reacção a lipase era recuperada do meio reacional por filtração e reidratada com tampão fosfato (0,1M; pH=7). Posteriormente, era reutilizada em novo ensaio nas mesmas condições operacionais. Foram realizados 7 batches sucessivos com a lipase rROL, perfazendo um total de 168 horas de operação. Os resultados obtidos estão representados na figura 4.7.

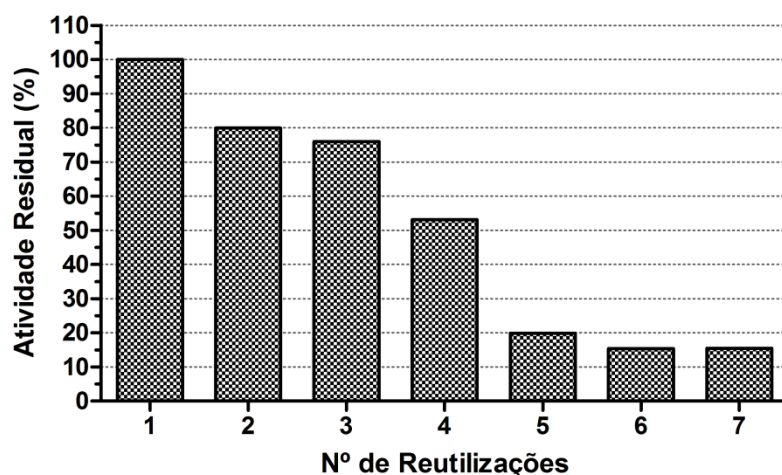


Figura 4.7. Estudo de estabilidade operacional, em ensaios de reutilização em descontínuo, na reacção de acidólise entre a banha em rama e PUFA, catalisada por rROL. Atividade residual (%) ao fim de cada reutilização de 24 h.

Observou-se uma diminuição de cerca de 20% na actividade residual biocatalisador, entre a primeira e a segunda reutilização e entre a terceira e a quarta. Isto poderá estar relacionado com o processo de reidratação da enzima entre reutilizações, durante o qual poderá ter ocorrido o desprendimento de biocatalisador do suporte e o seu arraste com o tampão.

Pode observar-se que a actividade residual da lipase parece estabilizar a partir da quinta reutilização.

Os resultados obtidos parecem estar em concordância com os apresentados por Kharrat e colaboradores (2011). Nesse estudo, uma estirpe foi isolada e identificada como sendo *R. oryzae*, e a lipase classificada como sendo rROL, embora não se possa afirmar tratar-se do mesmo biocatalisador testado na presente tese. Os investigadores imobilizaram a lipase por adsorção a um suporte e esta foi colocada a operar em meio com solvente (hexano), com sucessivas hidratações entre reutilizações. Os autores descrevem que o biocatalisador se manteve estável durante 12 ciclos consecutivos de 8 horas cada, perfazendo um total de 96 horas de operação. Num outro trabalho realizado por Esteban e colaboradores (2011), utilizou-se uma lipase extraída de *R. oryzae*, adquirida pelos autores e que os mesmos denominaram de lipase DF de *Rhizopus oryzae*. Esta lipase, adquirida na sua forma livre, foi imobilizada no mesmo suporte utilizado neste estudo (Accurel[®] MP 1000) e revelou uma estabilidade operacional de 190 horas, em “batch” sucessivos de 19 horas. Os ensaios descritos no trabalho destes investigadores retratam um meio composto por TAG com o ácido palmítico esterificado na posição *sn*-2 e essencialmente ácidos gordos livres de ácido oleio. Tratando-se de um meio reacional bastante simples, tal poderá justificar uma estabilidade operacional mais prolongada, relativamente ao presente trabalho, onde se incorporaram nos TAG essencialmente PUFA, num meio reacional bastante diversificado em ácidos gordos livres.

Pode acrescentar-se ainda que um aumento do tamanho da cadeia carbonada do ácido gordo, utilizado como dador de grupo acilo, poderá estar associado a uma redução da estabilidade operacional do biocatalisador (Nunes *et al.*, 2011). Estes autores investigaram a estabilidade operacional de rROL na reação de acidólise entre o azeite e o ácido caprílico (C 8:0) ou ácido cáprico (C 10:0), em batches sucessivos de 24h cada. rROL revelou ter maior estabilidade operacional quando o ácido caprílico, de cadeia mais curta, foi utilizado no sistema reacional, registando-se um tempo de meia vida para o biocatalisador (isto é, o tempo requerido para reduzir em 50% a sua actividade inicial) de 159 horas, contrastando com as 136 horas obtidas com o ácido cáprico.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente trabalho estudou-se, essencialmente, a reacção de acidólise entre TAG da banha (utilizada como fonte de ácido palmítico) e um concentrado de PUFA, num meio livre de solvente. A banha, para além de ser uma gordura natural, de baixo custo, apresenta elevada semelhança composicional e estrutural com a gordura de leite humano. Salienta-se ainda a sua reduzida temperatura de fusão o que possibilita diminuir os custos energéticos associados ao processo.

Testaram-se diferentes lipases comerciais e não comerciais como biocatalisadores na reacção de acidólise e a lipase comercial (“Novozym 435”) e a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* expressa numa estirpe mutante de *Pichia pastoris* e imobilizada em Accurel MP 1000 conduziram aos valores mais elevados de incorporação total de PUFA nos TAG, nomeadamente $17,48 \pm 1,33\%$ e $16,92 \pm 1,07\%$.

Por ser uma lipase não comercial, sobre a qual existem poucos estudos, *rROL* foi seleccionada para ensaios de modelação e optimização das condições operacionais bem como para estudos de estabilidade operacional em batches sucessivos.

A optimização das condições operacionais pela Metodologia das Superfícies de Resposta estabeleceu as condições ótimas *rROL*, no sistema em estudo, a uma temperatura de 40°C e razão molar 1:3 (banha/PUFA).

Foram realizados 7 batches sucessivos com a lipase *rROL*, perfazendo um total de 168 horas de operação. Observou-se uma diminuição de cerca de 20% na actividade residual biocatalisador, entre a primeira e a segunda reutilização e entre a terceira e a quarta. Esta perda de actividade pode estar relacionado com o processo de reidratação da enzima entre reutilizações, durante o qual poderá ter ocorrido o desprendimento de biocatalisador do suporte e o seu arraste com o tampão.

Como trabalho futuro sugere-se a implementação do sistema reacional em reator contínuo 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.

Seria igualmente interessante avaliar a influência da atividade da água no sistema reacional em estudo, dado que a monocamada de água residual presente na superfície do biocatalisador é necessária para manter a sua estrutura tridimensional, e que cada lipase sofre influência de forma diferente pela a_w presente no meio.

Poder-se-ia investigar a imobilização de *r*ROL em outros suportes e estudar razões carga de lipase/suporte.

Outro estudo interessante a desenvolver seria a avaliar a regiodistribuição dos AG no esqueleto de glicerol. Para o efeito determinar-se-iam os ácidos gordos na posição *sn*-2 através da reação com a lipase pancreática (*sn*-1,3 selectiva), no sentido de confirmar a selectividade *sn*-1,3 da lipase de *r*ROL no sistema reacional estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akoh, C.C., Lee, K.-T. (1998) Solvent-Free Enzymatic Synthesis of Structured Lipids from Peanut Oil and Caprylic Acid in a Stirred Tank Batch Reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 75, no. 11
- Andrews, P. C., Fraser, B. H., Junk, P. C., Massi, M., Perlmutter, P., Thienthong, N., Wijesundera, C. (2008). Large-scale synthesis of both symmetrical and unsymmetrical triacylglycerols containing docosahexaenoic acid. *Tetrahedron*, 64 (39), 9197-9202.
- Araújo, M. E. M. B., Campos, P. R. B., Noso, T. M., Alberici, R. M., da Silva Cunha, I. B., Simas, R. C., Eberlin, M. N. (2011). Response surface modelling of the production of structured lipids from soybean oil using *Rhizomucor miehei* lipase. *Food Chemistry*, 127 (1), 28-33.
- Box, G. E. P., Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (com discussão). *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 13(1):1-45.
- Briand, D., Dubreucq, E., Grimaud, J. e Galzy, P. (1995). Substrate Specificity of the Lipase from *Candida parapsilosis*. *Lipids*, 30 (8). 747-754,
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., Dubreucq, E. (2004), High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.*, 111: 41-50.
- Christie, W., Barnes, P. J. (1989). Gas chromatography and lipids: A practical guide: *Phytochemistry*. Vol. 28, pp. 3251-3252.
- Dellino, G., Kleijnen, J. P. C., Meloni, C. (2010). Robust optimization in simulation: Taguchi and Response Surface Methodology. *International Journal of Production Economics*, 125(1), 52-59.
- Domínguez de María, P., Sinisterra, J. V., Tsai, S.-W., Alcántara, A. R. (2006). *Carica papaya* lipase (CPL): an emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology advances*, 24(5), 493-9.
- Dutta, S., Ray, L. (2009). Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(1), 142-54.
- Emmett, P. M., Rogers, I. S. (1997). Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early human development*, 49 Suppl(97), S7-28.
- Esteban, L., Jiménez, M. J., Hita, E., González, P. a, Martín, L., Robles, A. (2011). Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 54(1), 62-69. Elsevier B.V.
- Esteban, L., Robles, A., Hita, E., Gonza, P. A., Molina, E. (2010). Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at position 2 as intermediates for the synthesis of human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Process Biochemistry*, 45, 407-414.
- F. D. C., Paulo, U. D. S. (2009). Bioquímico-farmacêutica, D. D. T., Farmacêuticas, Revisão. *Production*, 32 (5), 1253-1261.
- F., Pina, M., Lago, R. (2007). Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. *Food Chemistry*, 100: 1443-1452.

- Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, 93(1-2), 185-97.
- Foresti, M., Pedernera, M., Bucala, V., Ferreira, M. (2007). Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2), 62-70.
- Ghamgui, H., Miled, N., Karrachaabouni, M., Gargouri, Y. (2007). Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 34-41.
- Gorjão, R., Azevedo-Martins, A. K., Rodrigues, H. G., Abdulkader, F., Arcisio-Miranda, M., Procopio, J., Curi, R. (2009). Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology & therapeutics*, 122(1), 56-64.
- Graham, D. Y., Sackma. (2002). Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 1024-1029.
- Graham, D. Y., Sackman, J. W. (1983). Solubility of calcium soaps of long-chain fatty acids in simulated intestinal environment. *Digestive diseases and sciences*, 28(8), 733-6.
- H. Mu, C.E. Hoy (2004). The digestion of dietary triacylglycerols: review. *Prog. Lipid Res.* 43, 105–133.
- Halling PJ (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microbial Technology*; 16:178–206.
- Hamam, F., Shahidi, F., (2008), Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin, *Food Chemistry*, 106: 33-39.
- Hamam, F., Shahidi, F. (2006). Synthesis of structured lipids containing medium-chain and omega-3 fatty acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12), 4390-6.
- Holm, H.C., Cowan, D., (2008). The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. *European Journal Lipid Science Technology*, 110: 679-691
- Hou, C., Shimada, Y. (2002). Industrial Uses of Lipases. *Lipid Biotechnology*. 18, 432-442.
- Howlett, J. (2008). Functional Foods: From Science to Health and Claims. P. Aggett (eds.), *ILSI Europe publications*, pp.36
- Huang, K.-hsiang, Akoh, Casimir C. (1994). Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1277-1280.
- Human milk in Germany 13. (1988). *Nutrition Research*, 954-959.
- Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand, Karen C. Waldron (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, Vol. 37, No. 5. pp. 790–802
- Iwasaki, Y., Yamane, T. (2004). Enzymatic synthesis of structured lipids. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 90, 151-71.

- Jiménez, M. J., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., González, P. a, Muñío, M. M., Molina, E. (2010). Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 51(3), 172-179.
- Kahveci, D., Falkeborg, M., Gregersen, S., Xu, Xuebing. (2010). Upgrading of Farmed Salmon Oil Through Lipase-Catalyzed Hydrolysis. *Biotechnology*, 47-55.
- Karra-Châabouni, M., Bouaziz, I., Boufi, S., Botelho do Rego, A. M., Gargouri, Y. (2008). Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 66(2), 168-77.
- Knezevic, Z., Siler-Marinkovic, S., Mojovic, L. (2004). Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta periodica technologica*, 280 (35), 151-164.
- Kojima, Y., Sakuradani, E., Shimizu, S. (2006). Acidolysis and glyceride synthesis reactions using fatty acids with two *Pseudomonas* lipases having different substrate specificities. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(3), 179-183.
- Kojima, Y., Sakuradani, E., Shimizu, S. (2006). Different specificity of two types of *Pseudomonas* lipases for C20 fatty acids with a Delta5 unsaturated double bond and their application for selective concentration of fatty acids. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(6), 496-500.
- Koletzko, B., Agostoni, C., Bergmann, R., Ritzenthaler, K., Shamir, R. (2011). Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 100(11), 1405-1415.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J., Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 81(2-3), 99-104.
- Kuo, S. J., Parkin, K. L. (1993). Substrate Preferences for Lipase-Mediated Acyl-Exchange Reactions with Butteroil Are Concentration-Dependent. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 70(4), 393-399.
- Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, 93(1-2), 185-97.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-82.
- Leyton, J., Drury, P. J., Crawford, M. a. (1987). Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *The British journal of nutrition*, 57(3), 383-93.
- Lien, E. L. (2009). Toxicology and safety of DHA. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 81(2-3), 125-32.
- Liu, K.-J., Chang, H.-M., Liu, K.-M. (2007). Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. *Food Chemistry*, 100(4), 1303-1311.
- Lo, S.-K., Arifin, N., Cheong, L.-Z., Tan, C.-P., Long, K., Yusoff, M. S. A., Lai, O.-M. (2009). Response surface modeling of 1-stearoyl-3(2)-oleoyl glycerol production in a pilot packed-bed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), 136-144.

- Macsai, M. S. (2008). The role of omega-3 dietary supplementation in blepharitis and meibomian gland dysfunction (an AOS thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 106, 336-56.
- 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. *Journal of dairy science*, 90(2), 594-601.
- Maduko, C. O., Akoh, C C, Park, Y. W. (2007). Enzymatic production of infant milk fat analogs containing palmitic acid: optimization of reactions by response surface methodology. *Journal of dairy science*, 90(5), 2147-54.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
- Matsumoto, M., Ohashi, K. (2003). Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 75-77.
- Michaux, F., Zoumpantioti, M., Papamentzelopoulou, M., Stébé, M. J., Blin, J. L., Xenakis, A. (2010). Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. *Process Biochemistry*, 45(1), 39-46.
- M.M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*. 72 248-254
- Montgomery, D. C., (1997). Design and Analysis of Experiments, 5th edition. Wiley: New York, pp 392-430.
- Myers, R.H., D.C. Montgomery (2002). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 1st Edition. *John Wiley and Sons, New York*, ISBN: 0471412554.
- Mu, H. (2010). Production and nutritional aspects of human milk fat substitutes. *Lipid Technology*, 22(6), 126-129.
- Mu, H., Xu, X., Høy, C. (1998). Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Interesterification in a Laboratory-Scale Continuous Reactor 1. *Lipids*, 75(9), 1187-1193.
- Nielsen, N., Yang, T., Xu, X, Jacobsen, C. (2006). Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chemistry*, 94(1), 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., Luna, D., Ferreira-Dias, S. (2010). Production of MLM-Type Structured Lipids Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(4), 473-480.
- Osborn, H. T., Akoh, C.C. (2002). Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 110-120.
- 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. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 120-134.

- Osório, N. M., Ribeiro, M.H., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S. (2008). Interesterification of fat blends rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids catalysed by immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase under high pressure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52-53, 58-66
- Osório, N. M., Ferreira-Dias, S., Gusmão, J. H., Fonseca, M. M. R. (2001). Response surface modelling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 677-686.
- Oztürk, T., Ustun, G., Aksoy, H. A. (2010). Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: optimization by response surface methodology. *Bioresource technology*, 101(19), 7456-61.
- Paques, F. W. and Macedo, G. A., (2006). Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review. *Química Nova*, 29, No. 1, 93.
- Pawongrat, R., Xu, Xuebing, H-Kittikun, A. (2007). Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chemistry*, 104(1), 251-258.
- Persson, M. (2002). Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7), 916-923.
- Pesaresi, L., Brown, D. R., Lee, a F., Montero, J. M., Williams, H., Wilson, K. (2009). Cs-doped H4SiW12O40 catalysts for biodiesel applications. *Applied Catalysis A: General*, 360(1), 50-58.
- Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M. (2006). Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4), 83-90.
- Pons, S. M., Bargalló, A. C., Folgoso, C., Sabater, M. C. L. (2000). *European Journal of Clinical Nutrition*. 54, 878.
- Riaublanc, A., Ratomahenina, R., Galzy, P., Nicolas, M. (1993). Peculiar Properties of Lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice. *JAOCS*, 70(5), 497-500.
- Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F. (2008). Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 57(6), 451-5.
- Sadana, A. (1980). A desactivation model for immobilized and soluble enzymes. *Biotechnol Letters*, 2: 279-284.
- Sahin, N., Akoh, Casimir C, Karaali, A. (2005). Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5779-83.
- Saifuddin, N., Raziah, A. Z., Unit, C., Nasional, U. T. (2008). Enhancement of Lipase Enzyme Activity in Non-Aqueous Media through a Rapid Three Phase Partitioning and Microwave Irradiation. *October*, 5(4), 864-871.
- Sangeetha. R, Arulpandi. I, Geetha. A (2011). *Bacterial Lipases as Potencial Industrial Biocatalysts: An Overview*. *Research Journal of Microbiology* 6 (1); 1-24.
- Seriburi, V., Akoh, Casimir C. (1998). Enzymatic Interesterification of Lard and High-Oleic Sunflower Oil with *Candida antarctica* Lipase to Produce Plastic Fats. *October*, 75(10).

- Serra, M., Trujillo, a, Pereda, J., Guamis, B., Ferragut, V. (2008). Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 99-104.
- Shakeri, M., Kawakami, K. (2009). Enhancement of *Rhizopus oryzae* lipase activity immobilized on alkyl-functionalized spherical mesocellular foam: Influence of alkyl chain length. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 115-120.
- Shimada, Y., Sugihara, a, Tominaga, Y. (2001). Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(6), 529-38.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, a, Baba, T., Ooguri, T., Moriyama, S., Terai, T., et al. (2001). Ethyl esterification of docosahexaenoic acid in an organic solvent-free system with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(1), 19-23.
- Sijben, J. W., Goedhart, A . C., Kamphuis, P. J., Calder, P. C., Gottrand, F., Koletzko, B. (2011). Is it prudent to add n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids to paediatric enteral tube feeding. *Clinical Nutrition*, 30(3). 273 a 281.
- Silva, J (2009). Produção de Sucedâneos de Gordura de Leite Materno Enriquecidos em Ácidos Gordos Polinsaturados ómega-3, Catalisada por Enzimas Termoestáveis Imobilizadas. *Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar, No Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.*
- Silva, R. C., Cotting, L. N., Poltronieri, T. P., Balcão, V. M., de Almeida, D. B., Goncalves, L. a G., Grimaldi, R., (2009). The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1275-1282.
- Soo, E. L., Salleh, a B., Basri, M., Rahman, R. N. Z., Kamaruddin, K. (2004). Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry*, 39(11), 1511-1518.
- Srivastava, A., Akoh, C.C., Chang, S.-W., Lee, G.-C, Shaw, J.-F. (2006). *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5175-5181.
- Stillwell, W. (2008). Docosahexaenoic acid: a most unusual fatty acid. *Chemistry and physics of lipids*, 153(1), 1-2.
- Sharma, P. (2009). Effect of Na + and K + on Lipase Catalyzed Hydrolysis of Ester. *Tese de Mestrado na Universidade de Química e Bioquímica de Thapar, Índia.*
- Taib, Mariam (1999). The Effects of Water Activity and Enzyme Modification on Lipase Activity During Esterification. *Tese de Mestrado na Faculdade de Ciências e Estudos Ambientais de Putra, Malásia.*
- Tecelão, C., Silva, J., Dubreucq, E., Ribeiro, Maria H., Ferreira-Dias, Suzana. (2010). Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1-4), 122-127.
- The Mendeley Support Team. (2011). Getting Started with Mendeley. Mendeley Desktop. *London: Mendeley Ltd.*

- Tufvesson, P., Törnvall, U., Carvalho, J., Karlsson, A. J., Hatti-kaul, R. (2011). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 68(2), 200-205.
- Valente, T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramirez, B., Anglés, N., Reguant, J., Morelló, J. R., (2009). A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 18(4), 849-65.
- Vikbjerg, A. F., Mu, H., Xu, Xuebing. (2006). Elucidation of Acyl Migration During Lipase-Catalyzed Production of Structured Phospholipids. *JAOC*, 83(7), 609-14.
- Villeneuve, P., Barouh, N., Barea, B., Piombo, G., Lago, R., Figueroa-Espinoza, M.C.F. Turon, Pina, M. (2007). Chemoenzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols with Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Central Position. *Food Chemistry*. 100: 1443-1452
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., e Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9(4-6), 113-148.
- Villeneuve, P., Pina, M., Skarbek, A., Graille, J., Foglia, T. A. (1997). Specificity of Carica papaya latex in lipase-catalysed interesterification reactions. *Biotechnology Techniques*, 58(2), 91-94.
- Villeneuve, P, Pina, M., Montet, D., Graille, J. (1995). Carica papaya Latex Lipase: sn-3 Stereoselectivity or Short-Chain Selectivity? Model Chiral Triglycerides Are Removing the Ambiguity. *JAOC*, 72(6).
- Wang, Y.-H., Mai, Q.-Y., Qin, X.-L., Yang, B., Wang, Z.-L., Chen, H.-T. (2010). Establishment of an evaluation model for human milk fat substitutes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 642-9.
- Weisberg S., (1985). Applied Linear Regression. *John Wiley & Sons*, 216-219.
- Willis, W. M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G. (1998). Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 639-674.
-
- Ximénez, M. C., Martín, S. (2000). Application of response surface methodology to the study of person-organization fit. *Psicothema*, 12, 151-158.
-
- Xin, J.-ying, Chen, L.-lin, Zhang, Y.-xin, Zhang, S., Xia, C.-gu. (2010). Lipase-catalyzed transesterification of ethyl ferulate with triolein in solvent-free medium. *Food and Bioproducts Processing*, 4-9.
- Xu, Xuebing, Timm-Heinrich, M., Nielsen, N. S., Porsgaard, T., Jacobsen, Charlotte. (2005). Effects of antioxidants on the lipase-catalyzed acidolysis during production of structured lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(7-8), 464-468.
- 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). Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(1), 3-10.

- Xu, Xuebing, Fomuso, L. B., Akoh, Casimir C. (2000). Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: Optimization by response surface design in a packed bed reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(2), 171-176.
- Xu, X, Balchen, S., Høy, C., Adler-nissen, J. (1998). Pilot Batch Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification: Preliminary Study on Incorporation and Acyl Migration. *Lipids*, 75(2).
- Yang, T. (2003). Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chemistry*, 80(4), 473-481.
- Yuhas, R., Pramuk, K., Lien, E. L. (2006). Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. *Lipids*, 41(9), 851-8.
- Yüksel, A., Şahin Yeşilçubuk, N. (2011). Enzymatic production of human milk fat analogues containing stearidonic acid and optimization of reactions by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. Disponível online a 15-10-2011.
- Zhao, H., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Liu, Z. (2007). Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 41-46.

Anexos

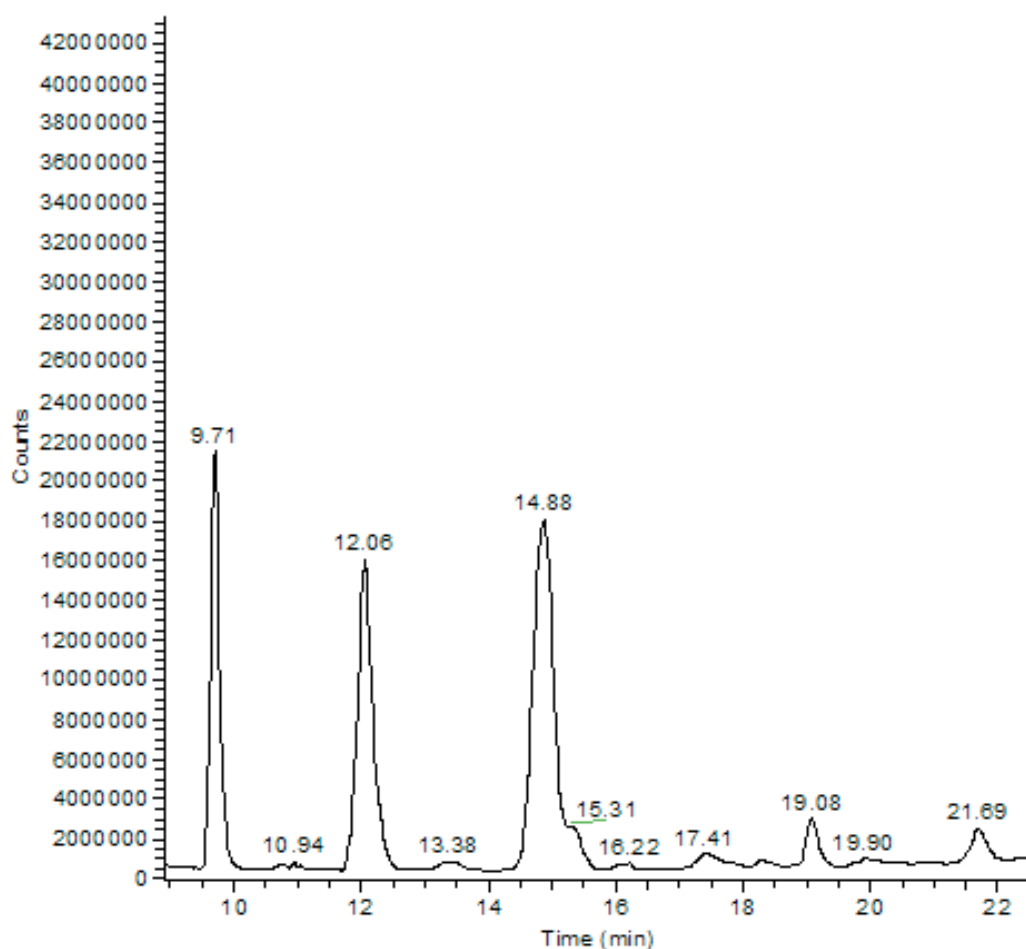
1. Incorporações e rendimentos mássicos e molares para os biocatalisadores testados na fase de “screening” inicial, usando banha em rama e EPAX 1050 como substratos.
2. Exemplo de um cromatograma obtido da amostra da primeira reutilização no ensaio de estabilidade operacional, para a lipase *rROL*.
3. Peak list com os cálculos efectuados em Microsoft Office Excel (áreas normalizadas, incorporação mássica e molar e, rendimento mássico e molar) do resultado do cromatograma da amostra da primeira reutilização no ensaio de estabilidade operacional, para a *rROL*.

Anexo 1

Biocatalisador	Incorporação				Rendimento			
	Mássica (%)	δ	Molar (mol%)	δ	Mássico (%)	δ	Molar (mol%)	δ
Novozym 435	18,1	1,52	17,48	1,33	27,42	2,29	26,48	2,04
Lipozyme RM IM	17,45	1,83	16,75	1,50	26,43	2,74	25,48	2,45
Lipozyme TL IM	7,56	0,70	7,16	0,57	11,45	0,89	10,84	0,79
Amano AK	4,56	0,89	4,37	0,66	6,91	1,3	6,62	1,16
<i>C. parapsilosis</i>	5,62	2,19	5,35	2,49	8,53	2,41	8,10	2,15
<i>Carica papaya</i>	8,33	1,56	8,01	1,28	12,62	1,93	12,14	1,69
rROL	17,79	1,30	16,92	1,07	26,96	2,07	25,64	1,70

Anexo 2

RT: 8.90 - 22.57



Anexo 3

		PEAK LIST						
		Estabilidade Operacional1.raw						
		RT: 0.00 - 31.99						
		Number of detected peaks: 9						
		Apex RT	Start RT	End RT	Area	%Area	Height	%Height
	Padrão Interno	9,71	9,09	10,18	2,21E+08	33,14	16582956,71	48,65
	C 16:0	12,06	11,51	13,04	1,85E+08	27,72	5955770,718	17,47
	C 16:1 <i>n</i> -7	13,38	13,36	14,4	56760917	8,51	1735216,882	5,09
	C 18:0/C18:1 <i>n</i> -7	14,88	14,52	15,24	1,02E+08	15,34	5291596,947	15,52
	C 18:2 <i>n</i> -6	15,31	15,29	15,93	12022411	1,8	618364,846	1,81
	C 18:3 <i>n</i> -3	17,41	16,57	17,29	18539992	2,78	798438,731	2,34
	C 20:4 <i>n</i> -6	18,26	17,96	18,84	15634693	2,34	642577,074	1,89
	C 20:5 <i>n</i> -3	19,08	18,97	19,59	22514781	3,38	1248159,097	3,66
	C 22:6 <i>n</i> -3	21,69	21,24	22,18	33200579	4,98	1214245,668	3,56
							Inc. Molar	23,67
							Inc. Mássica	26,58
							Rend. Molar	35,86
							Rend. Mássico	40,27