

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Síntese Enzimática de Triacilgliceróis Estruturados de Gordura de Ucuúba

Waldomiro Filleti Júnior
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano
Orientador

Trabalho apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos, para
obtenção de título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

F481s Filleti Júnior, Waldomiro
Síntese enzimática de triacilgliceróis estruturados de gordura de Ucuúba / Waldomiro Filleti Júnior. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Daniel Barrera-Arellano
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ucuúba (*Viola surinamensis*). 2.lípase.
3Interesterificação. 4.Superfície de resposta - Metodologia
5.Óleo de canola. I.Barrera-Arellano, Daniel. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

cars-fea

Palavras-chave em inglês (Keywords): Ucuhuba (*Viola surinamensis*), Lípase, Interesterification,
Response surface - Methodology , Canola oil

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Daniel Barrera-Arellano

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Renato Grimaldi

Jane Mara Block

Jane Gonçalves Menegaldo Snow

Thais Maria Ferreira de Souza Vieira

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)
(FEA/UNICAMP)

Profa. Dr. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(FEA/UNICAMP)

Dr. Renato Grimaldi
(FEA/UNICAMP)

Profa. Dra. Jane Mara Block
(CCA/UFSC)

Dra. Jane G. Menegaldo Snow
(CIAL/ITAL)

Dra. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira
(CTAA/EMBRAPA)

Agradecimentos

A Deus e a Jesus Cristo e aos meus mentores espirituais pela inspiração e força para prosseguir.

Aos meus pais amados pelo apoio constante em todos os sentidos, viabilizando a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera pela orientação precisa e segura, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e apoio.

Ao Prof Dr. Casimir C. Akoh, da Universidade da Geórgia – EUA, pela orientação e por disponibilizar seu laboratório para a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Lireny que sempre me incentivou, em vários momentos da minha vida acadêmica. E também pelas suas valiosas sugestões para a realização deste trabalho.

Ao amigo Dr. Subramani Sellappan, da Universidade da Geórgia – EUA, pelo apoio técnico, pela orientação e pelas palavras de incentivo e amizade.

Ao amigo Evandro Carlos Remedi, pelo incentivo e pelo apoio que me deu.

Ao amigo Dr. Renato Grimaldi, pelas muitas vezes em que me ajudou, pelas sugestões e pelo incentivo.

A todos os amigos do Laboratório de Óleos e Gorduras pela colaboração direta ou indireta.

A Fábrica Santa Maria de Óleos, pelo fornecimento da gordura de Ucuúba.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Índice Geral

| | |
|---|------------|
| <i>ÍNDICE DE TABELAS</i> | <i>iii</i> |
| <i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> | <i>v</i> |
| <i>RESUMO</i> | <i>x</i> |
| <i>SUMMARY</i> | <i>xi</i> |
| <i>INTRODUÇÃO</i> | <i>1</i> |
| <i>JUSTIFICATIVA</i> | <i>3</i> |
| <i>OBJETIVOS</i> | <i>4</i> |
| Objetivo Geral | <i>4</i> |
| Objetivos Específicos | <i>4</i> |
| <i>1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i> | <i>5</i> |
| 1.1 - Gordura de ucuúba | <i>5</i> |
| 1.2 - Óleo de Canola | <i>10</i> |
| 1.2.1 - Características Físico-Químicas do Óleo de Canola. | <i>10</i> |
| 1.3 - Óleos Poliinsaturados | <i>15</i> |
| 1.4 - Lipídios Estruturados | <i>20</i> |
| 1.4.1 - Considerações Nutricionais | <i>22</i> |
| 1.4.2 – Síntese Enzimática de LEs..... | <i>26</i> |
| 1.4.3 - Efeito das Condições de Reação | <i>30</i> |
| 1.4.4 - Efeito da atividade de água | <i>32</i> |
| 1.4.5 - Efeito do Bioreator | <i>33</i> |
| 1.4.6 – Purificação de LEs..... | <i>35</i> |
| <i>2 - Material e Métodos</i> | <i>38</i> |
| 2.1 - Matérias Primas e Insumos..... | <i>38</i> |
| 2.2 - Equipamentos e Instrumentos | <i>38</i> |
| 2.3 - Métodos Analíticos..... | <i>41</i> |

| | |
|--|-----------|
| 2.4 - Procedimento Experimental | 43 |
| 2.4.1 – Caracterização dos Óleos..... | 43 |
| 2.4.2 - Purificação da Gordura de Ucuúba | 43 |
| 2.4.3 - Produção de Ésteres Etílicos a partir de Óleos de Canola e Algas..... | 44 |
| 2.4.4 – Reação de Síntese de Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba..... | 45 |
| 2.4.5 - Purificação dos Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba: | 46 |
| 2.4.6 - Otimização da Reação e Desenho Experimental..... | 46 |
| 2.4.7 - Produção e Purificação de LEs em Escala Piloto..... | 50 |
| <i>3 - Resultados</i> | <i>52</i> |
| 3.1 - Caracterização dos substratos..... | 52 |
| 3.2 - Síntese de Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba..... | 63 |
| 3.2.1 - Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba e Ésteres Etílicos de Óleo de Canola..... | 63 |
| 3.2.2 - Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba e Ésteres Etílicos de Óleo de Algas (DHASCO®)..... | 73 |
| 3.3 - Ensaio em Escala Piloto..... | 82 |
| Curvas de Cristalização e fusão dos LEs | 87 |
| <i>CONCLUSÕES</i> | <i>91</i> |
| <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> | <i>92</i> |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabela 1: Composição centesimal da semente de ucuúba.</i> | <i>6</i> |
| <i>Tabela 2: Constantes físico-químicas da gordura de ucuúba.</i> | <i>7</i> |
| <i>Tabela 3: Composição em ácidos graxos da gordura de ucuúba</i> | <i>7</i> |
| <i>Tabela 4: Triacilgliceróis principais da gordura de ucuúba.</i> | <i>8</i> |
| <i>Tabela 5: Constituintes dos Óleos de Canola, Colza e Soja.</i> | <i>11</i> |
| <i>Tabela 6: Propriedades físicas do óleo de canola</i> | <i>14</i> |
| <i>Tabela 7: Famílias de ácidos graxos insaturados e suas fontes mais comuns.</i> | <i>16</i> |
| <i>Tabela 8: Síntese catalisada por lipase e produção de lipídios estruturados específicos em reatores de batelada.</i> | <i>34</i> |
| <i>Tabela 9: Síntese e produção de lipídios estruturados específicos catalisadas por lipases em reatores de leito empacotado.</i> | <i>35</i> |
| <i>Tabela 10: Variáveis do processo de transesterificação enzimática de ucuúba com éster etílico de óleo de canola :</i> | <i>47</i> |
| <i>Tabela 11: Variáveis do processo de transesterificação enzimática de ucuúba com éster etílico de óleo de algas.</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabela 12: Composição em ácidos graxos da gordura purificada de ucuúba:</i> | <i>53</i> |
| <i>Tabela 13: Composição triacilglicéridica da gordura purificada da ucuúba.</i> | <i>54</i> |
| <i>Tabela 14: Índice de peróxido, acidez e índice de iodo na gordura de ucuúba bruta e purificada.</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabela 15: Composição em ácidos graxos do éster etílico de óleo de canola.</i> | <i>60</i> |
| <i>Tabela 16: Composição em ácidos graxos do éster etílico de óleo de algas (DHASCO®).</i> | <i>61</i> |

Tabela 17: Desenho experimental e porcentagem molar do ácido oléico incorporado no lipídio resultante da transesterificação enzimática da gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de canola. 64

Tabela 18: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola..... 68

Tabela 19: Desenho experimental e porcentagem molar do ácido docosahexaenóico (DHA) incorporado no lipídio resultante da transesterificação enzimática de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®). 74

Tabela 20: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®). 78

Tabela 21: Análises dos lipídios estruturados produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola e algas..... 83

Tabela 22: Composição em ácidos graxos dos lipídios estruturados produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola e algas..... 84

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1: Comparação do grau de insaturação de algumas gorduras alimentícias</i> | 12 |
| <i>Figura 2: Composição de Triacilgliceróis em Óleos canola. Abreviações: Ln - Linolênico; L - Linoléico; O - Oléico; P - Palmítico; S - Esteárico; LLCanola – Canola de Baixo Linolênico; HOCanola - Canola de Alto Oléico.....</i> | 13 |
| <i>Figura 3: Estrutura geral dos Triacilgliceróis Estruturados Específicos (LEE). S, M e L são ácidos graxos de cadeia curta, média e longa respectivamente. As posições de S, M e L são intercambiáveis.....</i> | 21 |
| <i>Figura 4: Diferença entre uma mistura física de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e longa (TCL) e os lipídios estruturados contendo aleatoriamente ácidos graxos de cadeia média e longa na mesma molécula.....</i> | 22 |
| <i>Figura 5: Absorção e metabolismo de triacilgliceróis de cadeias médias e longas. (AGCM = ácido graxo de cadeia média; AGCL = ácido graxo de cadeia longa; TCM = triacilglicerol de cadeia média; MG – monoglicerídio; TCL = triacilglicerol de cadeia longa).....</i> | 24 |
| <i>Figura 6 A e B: Síntese enzimática de LE do tipo MLM. A) Interesterificação entre TCL e TCM. B) Acidólise de TCL com AGCM ou interesterificação entre TCL e EtAGCM (éster etílico de AGCM). Os triacilgliceróis estão representados esquematicamente. “M” e “L” indicam resíduos de AGCM e AGCL, respectivamente. Os subprodutos possíveis (e impurezas) são mostrados em tamanho menor no esquema.....</i> | 26 |
| <i>Figura 7: Relação entre a razão molar do substrato e a composição das espécies de triacilgliceróis no equilíbrio durante reações catalisadas por lipases específicas sn-1,3. (Inc é o equilíbrio de incorporação dos doadores de acila).....</i> | 28 |
| <i>Figura 8: Mecanismo de reação da migração acila.....</i> | 30 |
| <i>Figura 9: Etapas do processo simplificado para a aplicação na purificação de LEE.....</i> | 37 |
| <i>Figura 10 : Reator utilizado nos testes de escala piloto.....</i> | 39 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Figura 11: Destilador “Short Path” utilizado na purificação dos lipídios estruturados. Legenda: 1: Reservatório da amostra; 2: Agitador de superfície raspada; 3: Evaporador encamisado; 4: Coletor do destilado; 5: Coletor do resíduo; 6: Bomba de vácuo; 7: Trap; 8: Banho de resfriamento; 9 Banho de aquecimento.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Figura 12: Cromatograma da gordura purificada de ucuúba.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Figura 13: Cromatograma da gordura purificada de ucuúba. C= ácido cáprico; L= láurico; M= mirístico; P= palmítico; S= esteárico; O= oléico; LI = linoléico.</i> | <i>54</i> |
| <i>Figura 14: Estabilidade oxidativa da gordura purificada de ucuúba (110°C).....</i> | <i>55</i> |
| <i>Figura 15: Termogramas de Fusão 5°C/min. (a) e Cristalização 10°C/min. (b) da gordura de ucuúba.</i> | <i>57</i> |
| <i>Figura 16: Curva de sólidos da gordura de ucuúba, obtido a partir do termograma de fusão (Figura 13a).....</i> | <i>59</i> |
| <i>Figura 17: Cromatograma da Composição dos ésteres etílicos obtidos a partir de óleo de canola.....</i> | <i>60</i> |
| <i>Figura 18: Cromatograma da Composição dos ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).....</i> | <i>61</i> |
| <i>Figura 19: Valores de R^2 e Q^2 mostrando o ajuste do modelo estatístico na incorporação de ácido oléico no triacilglicerídio transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.....</i> | <i>65</i> |
| <i>Figura 20: Gráfico ANOVA da Falta de Ajuste do modelo para incorporação de ácido oléico no triacilglicerídio transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.</i> | <i>66</i> |
| <i>Figura 21: Curva de probabilidade normal dos resíduos para incorporação de ácido oléico no triacilglicerídio transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.</i> | <i>67</i> |
| <i>Figura 22: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.....</i> | <i>68</i> |

| | |
|---|----|
| <i>Figura 23: Superfície de contorno da incorporação de ácido oléico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).</i> | 69 |
| <i>Figura 24: Superfície de resposta da incorporação de ácido oléico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).</i> | 70 |
| <i>Figura 25: Superfície de contorno da incorporação do ácido oléico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).</i> | 71 |
| <i>Figura 26: Superfície de resposta da incorporação do ácido oléico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).</i> | 71 |
| <i>Figura 27: Valores de R^2 e Q^2 mostrando o ajuste do modelo estatístico na incorporação de ácido docosahexaenóico no triacilglicerídeo transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 75 |
| <i>Figura 28: Gráfico ANOVA da Falta de Ajuste do modelo para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 76 |
| <i>Figura 29: Curva de probabilidade normal dos resíduos para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 76 |
| <i>Figura 30: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 77 |

| | |
|--|----|
| <i>Figura 31: Superfície de contorno da incorporação de ácido docosahexaenóico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).</i> | 79 |
| <i>Figura 32: Superfície de resposta da incorporação de ácido docosahexaenóico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).</i> | 79 |
| <i>Figura 33: Superfície de contorno da incorporação do ácido docosahexaenóico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).</i> | 80 |
| <i>Figura 34: Superfície de resposta da incorporação do ácido docosahexaenóico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).</i> | 81 |
| <i>Figura 35: Lipídios estruturados (a) e resíduos (b) após destilação no “Short Path Distilator”.</i> | 83 |
| <i>Figura 36: Cromatograma da composição em ácidos graxos do lipídio estruturado produzido a partir de gordura de ucuúba e éteres etílicos de óleo de canola.</i> | 85 |
| <i>Figura 37: Cromatograma da composição em ácidos graxos do lipídio estruturado resultante da transesterificação a partir de gordura de ucuúba e éteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 85 |
| <i>Figura 38: Termograma de fusão do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola.</i> | 87 |
| <i>Figura 39: Termograma de cristalização do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola.</i> | 88 |
| <i>Figura 40: Termograma de fusão do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).</i> | 89 |

Figura 41: Termograma de Cristalização LE obtido a partir de gordura de ucuíba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®). 89

RESUMO

Nos últimos anos houve um crescente interesse por alimentos mais saudáveis e também por produtos com baixo teor de gordura, um segmento novo na indústria de alimentos, impulsionado, principalmente, por uma nova consciência do consumidor que deseja melhor qualidade de vida, consumir produtos naturais e mais saudáveis. A tendência será a de se encontrar métodos mais “naturais” de processar óleos e gorduras. Os lipídios estruturados podem apresentar a solução para a obtenção de uma gordura “saudável”, desvinculada da associação com obesidade e doenças coronárias. Assim, a hidrogenação e a interesterificação, que são processos químicos largamente utilizados atualmente na indústria de óleos (tidos como artificiais ou não naturais) poderiam ser substituídos por processos enzimáticos, que são considerados “naturais”. Os lipídios estruturados também mostram sua importância no campo da medicina e nutrição, como em fórmulas para bebês prematuros (similar ao leite materno) e em produtos para nutrição enteral e parenteral (para pacientes com necessidades especiais de nutrição). Também podem ser utilizados em alimentos voltados para esportistas, que necessitam de uma fonte de energia rápida e ao mesmo tempo usufruir os benefícios à saúde dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. Neste trabalho foi realizada a otimização, por metodologia de superfície de resposta, da síntese de lipídios estruturados a partir da gordura de ucuúba (*Virola sebifera*) rica em ácido mirístico e ésteres etílicos de óleo de canola (com alto teor de ácido oléico) e de óleo de algas (com alto teor de ácido docosahexaenóico – DHA), utilizando-se as lipases sn-1,3-específica do *Rhizomucor miehei* (IM 60) e a não específica SP435 (*Candida antarctica*). As faixas ótimas das condições das reações enzimáticas com IM60, foram de 50 a 61°C, 12 a 33 h de tempo de reação, % enzima/substrato 5 a 7% e razão molar gordura:éster etílico 1:6 e 1:8 para uma incorporação de 51% de ácido oléico no lipídio estruturado. Para as reações com SP435, para uma incorporação de cerca de 27% de DHA, a faixa de temperatura ótima foi de 45 a 54°C, tempo de reação >22h, % enzima/substrato 6,5% e razão molar gordura:éster etílico 1:7.

SUMMARY

There has been a growing interest in healthier foods and also in products with low fat content recently. It's a new segment, in the industry of foods, impelled, mainly, by a new conscience of the consumers, that they want a better life quality, and to consume natural and healthier products. The trend will be the one of finding "more natural" methods of processing oils and fats. The structured lipids can be the way to find "healthy" fats and to disentail their association with obesity and coronary illnesses. Thus the hydrogenation and the interesterification, that are chemical processes broadly used now in the industry of oils (considered as artificial or not natural) could be substituted by enzymatic processes, that are considered "natural". The structured lipids also show their importance in the field of the medicine and nutrition, as in formulas for premature babies (trying to imitate the maternal milk) and in products for enteral and parenteral nutrition (for patients with special needs of nutrition). They can also be used in foods directed to sportsmen, which need a fast source of energy and at the same time to enjoy the benefits to the health of the long chain polyunsaturated fatty acids. In this work the synthesis of structured lipids were accomplished starting from the ucuúba oil (*Virola sebifera*) rich in miristic acid, canola oil (high in oleic acid) and algae oil (high in Docosahexaenoic - DHA fatty acid), using the lipases sn-1,3-specific of *Rhizomucor miehei* (IM 60) and the non-specific SP435 (*Candida antarctica*). The optimum ranges of the enzymatic reaction parameters with IM60 were 50 to 61°C, 12 to 33h o reaction time, % enzyme / substrate from 5 to 7% and molar ratio of 1:6 and 1:8 to incorporate 51% of oleic acid in the structured lipid. For the reactions with SP435, for an incorporation of 27% DHA, the optimum range of temperature was from 45 to 54°C, reaction time >22h, % enzyme/substrate 6.5% and molar ratio 1:7.

INTRODUÇÃO

Com a consciência crescente dos consumidores dos efeitos negativos à saúde associados com o consumo excessivo de óleos e gorduras, é dada muita atenção à pesquisa em lipídios para o desenvolvimento de uma geração nova de óleos e gorduras saudáveis conhecidos como Lipídios Estruturados (LEs) (Willis citado por Akoh, 2001).

Nos últimos 10 anos tem havido muito interesse em lipídios estruturados, com dezenas de artigos e publicações relatando as aplicações nutricionais e tecnologias de sua produção, especialmente as que utilizam lipases região-específicas (Xu, 2000a).

Os LEs, ou “gorduras do futuro”, são lipídios funcionais que podem ser considerados como nutracêuticos, isto é, lipídios com potencial para o tratamento e/ou prevenção de doenças (Kennedy, 1991, Holmes, 1999 citados por Akoh, 2001). Os LEs são triacilgliceróis que contêm misturas de ácidos graxos de cadeia curta ou média, ou ambos, e ácidos graxos de cadeia longa, preferencialmente na mesma molécula de triacilglicerol (Akoh, 1995). Para que o LE seja benéfico, um mínimo de ácido graxo de cadeia longa é necessário para satisfazer as exigências de ácidos graxos essenciais.

A descoberta do potencial benefício à saúde dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA) criou um mercado para a nova geração de óleos e gorduras ricos em PUFA como peixe, soja, e canola. Mais adiante, avanços realizados no campo da interesterificação criaram possibilidades novas para a indústria agregar valor aos óleos e gorduras existentes (Opstvedt, 1990).

Os óleos de peixe, soja e canola, com os seus altos conteúdos de PUFA têm um potencial para desenvolver odores e sabores indesejáveis durante o armazenamento. Os produtos de oxidação primários e secundários dos PUFA são a causa principal dos sabores desagradáveis em óleos armazenados (Vinter, 1995 citado por Akoh, 2001). Devido as principais descobertas sobre os possíveis efeitos benéficos à saúde dos PUFA, como 20:5n-3 (EPA), 22:6n-3 (DHA) em óleo de peixe e algas e 18:3n-3 (α -linolênico) em canola e soja, estes óleos estão sendo usados em uma variedade de produtos para consumo humano, alimentos animais, cosmética, e outras aplicações para fornecer ácidos graxos ω -3 (Chapman, et al., 1996; Kolanowski et al., 1999). Os lipídios estruturados que contêm

PUFA nas posições sn-2 e ácido caprílico nas posições sn-1,3 devem prover energia rápida para os indivíduos com disfunções na absorção de lipídios e aumento da absorção dos PUFA n-3. Absorção eficiente, estabilidade, e funcionalidade em produtos alimentícios são características desejáveis dos LEs (Lee, 1999; Christensen, 1995 citados por Akoh, 2001).

JUSTIFICATIVA

A ucuúba é a designação popular para muitas espécies do gênero *Virola*, . árvores encontradas na região amazônica. Atualmente, o principal produto fornecido pela ucuúba é a madeira que tem provocado uma redução dos estoques naturais deste recurso. Além da madeira, do fruto da ucuúba pode ser extraído, de maneira simples (prensa contínua) uma gordura de composição e características únicas na natureza .

A gordura de ucuúba possui um teor de ácido mirístico superior a 60%, portanto trata-se de uma matéria prima com altíssimo teor de ácidos graxos saturados, consistência muito dura, sendo excelente para aplicações não alimentares (fabricação de sabonetes), mas de baixo valor agregado.

Hoje há um grande interesse global por óleos vegetais, particularmente aqueles com propriedades especiais ou que possam ser produzidos sem degradar o meio ambiente, assim a exploração da gordura de ucuúba poderia ser incentivada, pois atualmente trata-se de uma atividade puramente extrativista.

Devido a suas características e composição a gordura de ucuúba precisa ser modificada para aplicações no setor alimentício, dentro das quais poder-se-ia incluir sua utilização como matéria prima, para a síntese de novos triacilgliceróis chamados de lipídios estruturados, aproveitando seu alto teor de ácido mirístico.

Os lipídios estruturados, atualmente têm inúmeras aplicações , tais como regimes especiais de nutrição (parenteral, para atletas de alta performance, etc.), como ingredientes de alimentos de baixo teor calórico, como substituto de manteiga cacau, etc.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Modificação enzimática da gordura de ucuúba para produção de lipídios estruturados com ésteres etílicos de óleos de canola (ricos em ácidos oléico e linolênico) e de algas (ricos em ácido docohexaenócio), utilizando-se as lipases IM 60 sn-1,3-específica (*Rhizomucor miehei*) e SP 435 não específica (*Cândida antarctica*), respectivamente.

Objetivos Específicos

Adaptação da metodologia para a purificação da gordura de ucuúba

Desenvolvimento e otimização do processo de produção por via enzimática de lipídios estruturados a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola e algas.

Confirmação das condições ótimas e teste dos modelos matemático em escala piloto para a produção de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de ucuuba e ésteres etílicos de óleos de canola e algas.

Caracterização da gordura de ucuúba, dos ésteres etílicos de canola e algas e dos lipídios estruturados.

1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - Gordura de ucuúba

Ucuúba é a designação popular a muitas espécies do gênero *Virola*. Existem duas variedades principais de ucuúba: a branca (*V. surinamensis*) e a vermelha (*V. sebifera*), idênticas, seja na forma da árvore, como nos frutos que produzem e se reconhecem pela seiva que corre das feridas que se fazem na casca da árvore, seiva que é branca ou vermelha, conforme a variedade. O nome indígena ucuúba é proveniente de ucu (graxa) e yba (árvore), mas também é conhecido como ucuúba da várzea, bicuíba ou virola (Rodrigues, 1972).

A ucuúba é uma árvore grande e atinge 30 m em altura e 1 m em DBH (Diâmetro à altura do peito), geralmente com um tronco cilíndrico, reto, sobre raízes de contraforte. A casca lisa é amarelo-marrom, com áreas cinzas ou brancas ocasionais. A coroa é pequena, com alguns galhos densamente folhados horizontalmente orientados. As folhas alternadamente espaçadas têm pecíolos pequenos, com textura dura e forma oblonga estreita, 10-20 cm de comprimento por 2-5 cm de largura. A inflorescência se ramifica abundantemente, com 5-20 flores agrupadas terminalmente, cada uma com 1,6-2,4 mm de comprimento (Rodrigues 1972).

A espécie *Virola surinamensis* ocorre, com certa frequência, nos igapós e várzeas dos Estados do Amazonas e Pará, onde é também conhecida por Ucuúba-da-Várzea. Ocorre, ainda, nas Guianas, América Central e Antilhas. A ucuúba-branca vem sendo intensamente explorada para a fabricação de compensados, não só na Amazônia, como principalmente nas Guianas. No comércio nacional, essa espécie é conhecida por Virola e Ucuúba-da-Várzea, e internacionalmente é conhecida por Dali, Virola, Banak e Baboen (Rodrigues, 1972).

A gordura de ucuúba era extremamente importante na Amazônia antes de Segunda Guerra Mundial, mas perdeu sua importância gradualmente porque a madeira está sendo explorada pesadamente como madeira para compensados e porque outras fontes de óleos ficaram disponíveis mais facilmente. Próximo a Manaus, as árvores de tamanho comercial para madeira são extremamente raras e em outras áreas médias e baixas da bacia Amazônica estão em um estado semelhante atualmente. Todavia, esta espécie tem grande potencial como uma espécie multiuso, com a colheita de sua semente oleaginosa antes da exploração da madeira (Sampaio, 1993).

Pinto (1951) relatou que as sementes pequenas têm 81-88% de endosperma que contém 60-73% de óleo de cor amarelo claro, localmente chamado de "sebo de ucuúba", composto principalmente do triacilglicerol trimiristina. Nas Tabelas 1 e 2 são mostradas a composição centesimal e as características físico-químicas da semente e do óleo de ucuúba. Baruffaldi et al. (1975) detalhou a estrutura de triacilgliceróis deste óleo (Tabelas 3 e 4). A menos que o óleo seja extraído fresco ou de sementes cuidadosamente armazenadas, terá uma cor marrom escura (Pesce, 1941). Logo após a Segunda Guerra Mundial, este óleo teve um mercado mundial importante para perfumaria e cosmética (Pinto, 1951).

Tabela 1: Composição centesimal da semente de ucuúba.

| | Peso Fresco | Peso Seco |
|------------------------|--------------------|------------------|
| Umidade | 9,3% | - |
| Gordura | 60,8% | 67,0% |
| Proteínas | 10,5% | 11,6% |
| Extrato sem N e fibras | 17,4% | 19,3% |
| Minerais | 2,0% | 2,1% |

Fonte: Pinto, 1951.

Tabela 2: Constantes físico-químicas da gordura de ucuúba.

| Determinação | 1 | 2 | 3 |
|---|-----------|----------|----------|
| Índice de Saponificação | 219-227 | 226,9 | 229 |
| Índice de Iodo (Hames) | 9,0-16,9 | 12,75 | 12,3 |
| Índice de Reichert-Meissl | 1,1-1,4 | 14 | |
| Insaponificáveis (%) | 2,5-3,2 | 3,0 | 1,0-3,0 |
| Ácidos Graxos Livres (Mirístico) (%) | 10,7-17,2 | 17,5 | 20,7 |
| Resinas (%) | 4,0 | | |
| Ponto de Fusão inicial | | 40° C | |
| Ponto de Fusão completo dos ácidos graxos | | 45° C | |
| Densidade relativa a 15° C (d_{15}^{100}) | | 0,9390 | |

Fontes :1. Pinto, 1951; 2. Pesce, 1941; 3.Gunstone et al., 1995.

Tabela 3: Composição em ácidos graxos da gordura de ucuúba

| Ácido Graxo % | Referência | | |
|----------------------|-------------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| C8: 0 | 0,7 | - | - |
| C10:0 | 0 | 0,6 | - |
| C12: 0 | 19,7 | 11,4 | 12,2 |
| C14: 0 | 68,1 | 61,3 | 63,4 |
| C14: 1 | 1,7 | - | - |
| C16: 0 | 4,2 | 2,7 | 8,6 |
| C16: 1 | 0,2 | - | - |
| C18: 0 | 0,2 | 0,8 | 1,0 |
| C18: 1 | 3,5 | 6,7 | 6,7 |
| C18: 2 | 0,7 | 4,5 | 2,9 |

Fonte: 1. Baruffaldi et al. 1975; 2. Rodrigues, W.A., 1972;
3. USDA, 1999.

Tabela 4: Triacilgliceróis principais da gordura de ucuúba.

| N. átomos de carbono | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Triacilgliceróis | LLL | LLM | LLP + MLM | LLO + MLP | PLP | POL + MOM | MOP + OOL |
| % | 0,1 | 0,5 | 3,6 | 4,2 | 0,8 | 0,6 | 0,8 |
| | | LML | MML | MMM + LMP | MMP | PMP | |
| % | | 3,6 | 25,0 | 29,7 | 5,7 | 2,3 | |
| | | | LPL | LPM | LPP + MPM | PPM | |
| % | | | 2,4 | 2,8 | 0,5 | 0,2 | |
| | | | | LOL | LOM | | |
| % | | | | 4,2 | 0,8 | | |
| Total 87,8% | 0,1 | 4,1 | 31,0 | 40,9 | 7,8 | 3,1 | 0,8 |

Fonte: Baruffaldi et al. 1975.

A gordura de ucuúba é usada popularmente para tratar reumatismo, artrite, dores de estômago, devido a gases, e dispepsia (Rodrigues, 1972). Lucent (citado por Sampaio, 1993) relatou que a casca cozida era utilizada para esterilizar feridas e ajudar no processo de cura.

As ucuúbas ainda provam o seu elevado valor nas confeitarias com a obtenção da trilaurina, um triacilglicerol de especial poder nutritivo (Rodrigues, 1980).

O resíduo do material gorduroso (torta), apresenta teores consideráveis de nitrogênio, podendo ser usado como ração para o gado, ou como adubo, se misturado com cinzas (Rodrigues, 1980).

Prance e Schultes (citados por Sampaio, 1993) relataram que a casca do fruto de várias espécies de *Virola*, inclusive a ucuúba, é fumada por muitas tribos amazônicas devido a seus efeitos alucinógenos que chamam de "parica". Schultes (citado por Sampaio, 1993) relatou que os agentes alucinógenos são o 5-etóxi-N, N-dimetilpritmamina e outras triptaminas, todos alucinógenos poderosos.

No interior do Estado do Pará, a gordura de ucuúba é preparada em pequenas, mas numerosas fábricas instaladas no interior do Estado. O rendimento da gordura, nestas fábricas, não vai além de 35-40 kg de gordura por 100 kg de semente seca com casca, Este baixo rendimento é atribuído ao uso de prensas obsoletas. Em Belém, existem fábricas que trabalham melhor e conseguem um rendimento de 50% ou mais (Rodrigues, 1972).

As pesquisas recentes com variedades do gênero *Viola* (Blumenthal et al., 1997) concentram-se nas propriedades medicinais de compostos das folhas, troncos e sementes. Há vários estudos sobre lignantes e neolignantes (Rezende & Kato, 2002), (Nunomura & Yoshida, 2002), fotoquímicos diversos (Kuroshima et al., 2001) e propriedades fungicidas e antileishmaniose (Lopes et al., 1999; Barata et al., 2000; Valderrama, 2000). Não foi encontrada nenhuma pesquisa recente enfocando o gordura de ucuúba.

1.2 - Óleo de Canola

A canola é uma variedade originária da colza (rapeseed) modificada geneticamente com o objetivo de reduzir o alto teor de ácido erúico (C22:1) e outros componentes indesejáveis como glucosinolatos. Os grãos de canola possuem teor de gordura superior a 50%, o qual é extraído geralmente por meio de um processo misto (expeller-solvente). Este óleo tem uma grande importância econômica.

A canola é a terceira oleaginosa mais importante no agronegócio mundial, atrás da soja e milho, e está sendo cultivada no Brasil desde 1974. No período 2002/2003 a produção cresceu 42%, passando de 14.633 para 20.826 toneladas. Em 2004 a área plantada foi de 15 mil hectares, com uma produção estimada em 18 mil toneladas. (Antunes, 2004).

O óleo de canola já conquistou 20% do mercado norte-americano. A rotatividade do mercado brasileiro, e a expansão da produção do óleo de canola nos estados de Rio Grande do Sul e Goiás, estão favorecendo o produtor (Antunes, 2004).

A demanda de grãos de canola no Brasil é muito superior à oferta, segundo Emílio Figer, da empresa CAMERA Ind. e Com. (Santa Rosa, RS) (citado por Tomm, 2004), o percentual de consumo de óleo de canola no Brasil é inferior a 0,5% enquanto que o de girassol ocupa aproximadamente 10% do mercado, o qual é abastecido basicamente mediante importações (Tomm, 2004).

1.2.1 - Características Físico-Químicas do Óleo de Canola.

Análises de óleos de canola mostram que os triacilgliceróis constituem 94,4 a 99,1% dos lipídios totais (Mag citado por Przybylski, 2001). As composições dos óleos de canola, colza e soja são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5: Constituintes dos Óleos de Canola, Colza e Soja.

| Componente | Canola | Colza | Soja |
|--------------------------|---------------|--------------|-------------|
| Triacilgliceróis (%) | 94,4 - 99,1 | 91,8 - 99,0 | 93,0 - 99,2 |
| Fosfolipídios (%) | | | |
| Óleo Bruto | até 2,5 | até 3,5 | até 4,0 |
| Degomado-Água | até 0,6 | até 0,8 | até 0,4 |
| Degomado-Ácido | até 0,1 | - | até 0,2 |
| Ácidos Graxos Livres (%) | 0,4 - 1,2 | 0,5 - 1,8 | 0,3 - 1,0 |
| Insaponificáveis (%) | 0,5 - 1,2 | 0,5 - 1,2 | 0,5 - 1,6 |
| Tocoferóis (mg/kg) | 700 – 1200 | 700 - 1000 | 1700 - 2200 |
| Clorofilas (mg/kg) | 5 - 35 | 5 - 35 | Traços |

Fonte: Przybylski, 2001, adaptado de Mag , 1990 e Ying, et al, 1989.

O óleo de canola tem uma composição em ácidos graxos homogênea, com 95% de ácidos graxos de 18 carbonos (Ackman citado por Przybylski, 2001) (Figura 1). O óleo de canola é intermediário entre os óleos vegetais em conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Contém níveis apreciavelmente mais altos de PUFA que o óleo de palma ou o azeite de oliva mas níveis mais baixos de PUFA que o óleo de milho, óleo de algodão, óleo de açafrão, óleo de soja e óleo de girassol . O interesse em PUFA ocorre em função do seu papel como ácidos graxos essenciais e a sua efetividade em reduzir o nível de colesterol plasmático, um dos fatores de risco mais importantes em doenças coronárias (McDonnald, 2001)

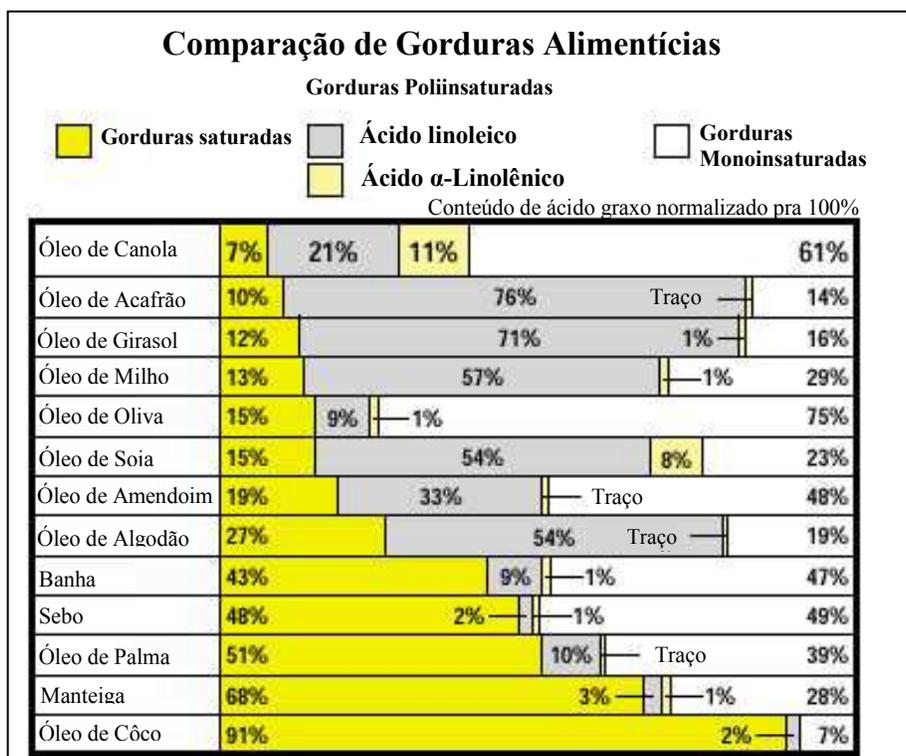


Figura 1: Comparação do grau de insaturação de algumas gorduras alimentícias (McDonnald, 2001).

Da mesma forma que o ácido linoléico, o ácido linolênico pode ser convertido a outros membros da família ômega-3, isto é, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). O DHA é o componente principal de lipídios no cérebro e retina do olho. Além disso, os membros de cadeia longa altamente insaturados da família ômega-3 agem como precursores para a síntese de uma série análoga de diferentes eicosanóides. O óleo de canola contém uma quantidade apreciável (11%) de ácido linolênico. Conseqüentemente, há um equilíbrio muito favorável (aprox. 2:1) entre o ácido linoléico (ômega-6 PUFA) e o ácido linolênico (ômega-3 PUFA) em óleo de canola. O óleo de soja é outro óleo comestível que contém uma quantidade significativa de ácido linolênico (aprox. 8%). Porém, a relação de linoleato/linolenato em óleo de soja é quase 7:1 (McDonnald, 2001).

O ácido α -linolênico é um dos dois ácidos graxos essenciais para humanos. Estudos epidemiológicos e testes nutricionais sugerem que este ácido graxo seja importante com relação à patogênese (e prevenção) de doenças coronárias (de Lorgeril et al., 2001).

No óleo de canola ácidos graxos de cadeia longa (C20:0-C24:0) e saturados ocorrem principalmente nas posições 1 e 3, enquanto os ácidos graxos octadecaenóicos (C18), especialmente linoléico e linolênico, são integrados na posição 2 (Kallio e Currie, 1993). Paterson (citado por Przybylski, 2001) examinou a composição de triacilgliceróis de óleo de canola e encontrando que 25% do total de TAGs são trioleínas. A composição de triacilgliceróis de óleos de canola modificados é apresentada na Figura 2. A composição de triacilgliceróis é governada pelo tipo e quantidade de ácidos graxos presentes em um óleo. Como pode ser predito em óleo de canola com alto ácido oléico, o triacilglicerol principal será a trioleína (Figura 2). Em óleo de canola normal quatro triacilgliceróis, isto é: oleína-dilinoleína, linolenina-dilinoleína, trioleína e linoleína-dioleína estão presentes em proporções quase iguais (Przybylski, 2001).

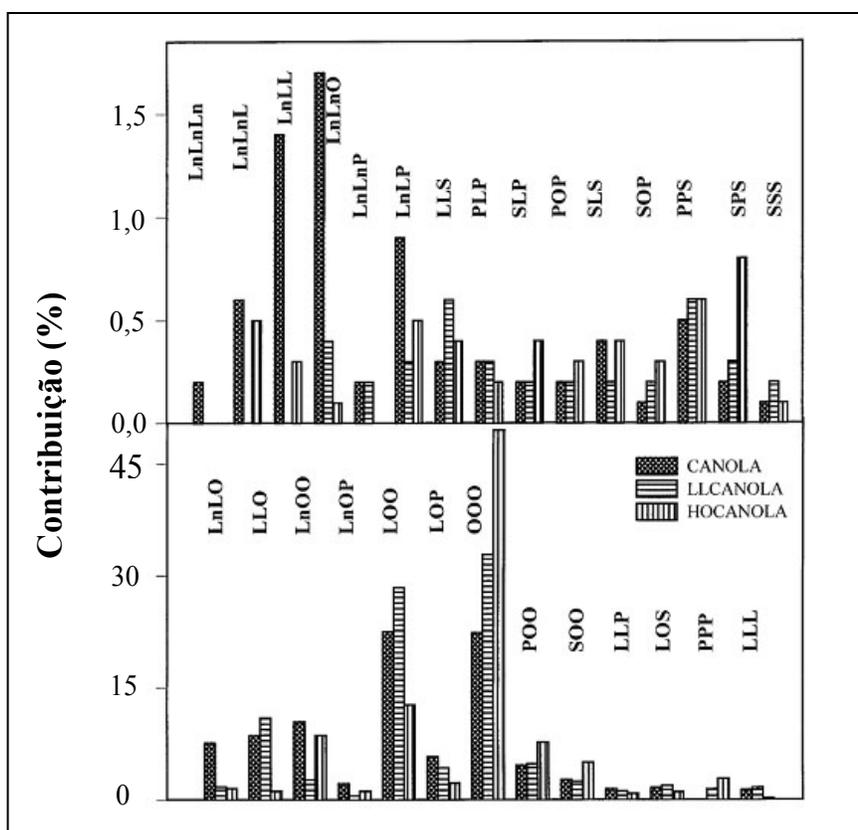


Figura 2: Composição de Triacilgliceróis em Óleos canola. Abreviações: Ln - Linolênico; L - Linoléico; O - Oléico; P - Palmítico; S - Estearico; LLCanola – Canola de Baixo Linolênico; HOCanola - Canola de Alto Oléico (Neff et al, 1994).

A Tabela 6 mostra algumas propriedades físicas do óleo de canola.

Tabela 6: Propriedades físicas do óleo de canola

| Parâmetro | Valor |
|---|---------------|
| Densidade Relativa (g/cm ³ ; 20°C/água a 20°C) | 0,914 – 0,917 |
| Índice de Refração (nD 40°C) | 1,465 – 1,467 |
| Viscosidade (cinemática a 20°C, mm ² /s) | 78,2 |
| Ponto de Fumaça (°C) | 220 – 230 |
| Flash Point, Open cup (°C) | 275 – 290 |
| Calor Específico (J/g a 20°C) | 1,910 – 1,916 |
| Condutividade Térmica (W/m ² K) | 0,179 – 0,188 |

Fonte: Przybylski, 2001

1.3 - Óleos Poliinsaturados

Anteriormente os ácidos graxos eram rotulados como meros combustíveis, mas atualmente estes compostos atraem pesquisas sofisticadas pois se mostram como precursores na síntese de eicosanóides, substâncias metabolicamente ativas, semelhantes a hormônios, com curto tempo de vida e que têm a habilidade de alterar rapidamente as funções celulares (Nettleton,1995; Murphy,1990).

Quando as prostaglandinas e leucotrienos são produzidos em pequenas quantidades estes regulam as funções das células e órgãos e as interações entre as células, porém, quando produzidos em excesso, podem provocar ou agravar doenças crônicas (Watkins & German, 2002).

Os ácidos graxos insaturados podem dividir-se em famílias de acordo com a posição de dupla ligação, assim, os ácidos graxos ω -3 apresentam sua primeira dupla ligação três carbonos contados a partir do grupo metila. Com exceção do ácido α -linolênico muitos destes ω -3 são altamente insaturados apresentando 5 ou mais insaturações.

O ácido α -linolênico (LNA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são os ácidos graxos ω -3 mais abundantes nos alimentos.

A Tabela 7 mostra algumas fontes mais comuns de ácidos graxos poliinsaturados ω -3, ω -6 e ω -9.

Tabela 7: Famílias de ácidos graxos insaturados e suas fontes mais comuns.

| Família | Ácido Graxo | Estrutura | Fontes |
|----------------|--------------------|------------------|--------------------------------------|
| ω -3 | Linolênico | 18:3 ω -3 | Óleos Vegetais (Soja, Linhaça) |
| | Eicosapentaenóico | 20:5 ω -3 | Peixes, Crustáceos Bactérias e Algas |
| | Docosahexaenóico | 22:6 ω -3 | Peixes, Crustáceos Bactérias e Algas |
| ω -6 | Linoléico | 18:2 ω -6 | Óleos Vegetais |
| | Araquidônico | 20:4 ω -6 | Tecido animal |
| ω -9 | Oléico | 18:1 ω -9 | Óleos Vegetais |

Fonte: Nettleton,1995.

Os óleos vegetais de gérmen de trigo, soja e canola apresentam 5, 8 a 9%, respectivamente, de ácido α -linolênico (LNA) em sua constituição enquanto que a maior fonte deste tipo de ácido graxo ω -3 é o óleo de linhaça que apresenta cerca de 50% de LNA. O óleo de linhaça apresenta-se como uma fonte de LNA de baixo custo e grande disponibilidade porém, de baixa estabilidade. Além disso, este tipo de ácido graxo ω -3 possui eficiência limitada como precursor de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (Gerster,1997).

Os peixes e os crustáceos são o outro grupo de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados do tipo EPA e DHA. Algumas espécies podem apresentar cerca de 2/3 de seus ácidos graxos como insaturados sendo que usualmente os ω -3 excedem os ω -6. Nos óleos de pescado a proporção é geralmente de 66% de EPA para 33% de DHA enquanto que na farinha de pescado esta proporção é variável (Reeves & Weihrauch,1979).

As principais inconveniências das fontes animais de ω -3 são o sabor e odor de pescado e o risco de contaminação destas fontes por metais pesados. Além disso, a oferta deste tipo de alimento é limitada e somente alguns tipos de peixes são ricos em ω -3 tais como: salmão, truta, cavala, arenque, sardinha (Ackman,1992).

Muitas bactérias são capazes de sintetizar todos os ácidos graxos requeridos para seu crescimento normal e reprodução.

Os microrganismos apresentam uma capacidade inigualável de produzir ácidos graxos, EPA e DHA, em quantidades não usuais. O EPA e DHA são produzidos, em escala comercial, via bactérias (Neidelman & Hunter-Cervera,1992).

Além disso, os microrganismos permitem sua manipulação para produzirem maior quantidade de ácidos graxos com estrutura que favoreça a digestão e absorção.

Por exemplo, na maioria dos peixes os ácidos graxos ω -3 estão localizados na posição 2 dos triacilgliceróis o que acontece também com as plantas superiores. A posição 2 dificulta a absorção destes ácidos graxos e este problema pode ser contornado nos processos de fermentação (Setser & Racette,1992).

Alguns fungos e algas podem produzir altos níveis de EPA e DHA. Estes organismos possuem também a habilidade de retirar ácidos graxos de determinado meio e incorporá-los nos triacilgliceróis e fosfolipídios, mas de uma maneira não específica.

Os óleos ricos em DHA originados de microalgas têm apresentado (Becker & Kyle,1998):

- segurança, têm-se firmado como GRAS (“generally recognized as safe”) após severos testes toxicológicos;
- estabilidade, os óleos provenientes de algas (25% em DHA) mostraram maior estabilidade oxidativa (152 horas) se comparados com óleos de peixe 12% de DHA (89 horas) utilizando tempo de indução a 60 °C em um Metrohm Rancimat;
- biodisponibilidade, a forma química do DHA em óleos provenientes de microalgas é mais efetivamente absorvida e utilizada pelo organismo se comparado aos óleos de peixe ricos nestes ácidos graxos ω -3.

No início das pesquisas na área dos ácidos graxos poliinsaturados ω -3 os efeitos benéficos da ingestão de óleo de peixe foram atribuídos quase que inteiramente ao EPA. Entretanto estudos realizados com EPA e DHA isoladamente revelam:

- DHA é mais efetivo no aumento do colesterol HDL e na diminuição dos níveis de triacilgliceróis no plasma (Conquer & Holub,1996);
- DHA é essencial no desenvolvimento cerebral e visual de crianças (Connor et al.,1992);
- DHA pode aumentar a biossíntese de óxido nítrico diminuindo o risco de arteriosclerose (Harris et al.,1997);
- Baixos níveis de DHA em adultos podem ocasionar disfunções cerebrais como a depressão e doenças senis (Stevens et al.,1995).

EPA e DHA são usualmente consumidos na forma de triacilgliceróis e é esperada uma rota de absorção usual para ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

A enzima lipase pancreática remove dois ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, levando a dois ácidos graxos livres e um 2-monoacilglicerídio. Estes produtos entram pela parede intestinal onde são reconstituídos a triacilglicerídio.

Desta forma, EPA e DHA são encontrados principalmente na posição 2 dos triacilgliceróis. Podem aparecer na posição 3 em peixes como cavala, óleo de fígado de bacalhau e salmão do Atlântico. EPA é encontrado randomicamente distribuído nas três posições em óleo de sardinha e óleos de peixe comerciais enquanto que o DHA é encontrado principalmente na posição 2. Em mamíferos marinhos, focas, baleias, EPA e DHA estão distribuídos nas posições 1 e 3 (Ackman,1992).

A posição do ácido graxo na molécula do triacilglicerídeo determina sua suscetibilidade à hidrólise pela lipase pancreática no intestino e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade para os órgãos e tecidos. Ácidos graxos na posição 2 não são substratos para as lipases intestinais (Ackman,1992).

1.4 - Lipídios Estruturados

Inicialmente os lipídios estruturados foram definidos como misturas de triacilgliceróis produzidos por hidrólise e interesterificação, por tratamentos com lipases e interesterificação, por métodos químicos tradicionais ou por modificações genéticas ou ambientais das células produtoras de óleo (Latta, 1990).

Os lipídios estruturados (Figura 3) são triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta e/ou média e ácidos graxos de cadeia longa, preferencialmente na mesma molécula de glicerol (Akoh, 1995).

Segundo a definição proposta por Akoh, 1995, duas categorias podem ser estabelecidas dependendo da localização dos ácidos graxos: lipídios estruturados e lipídios estruturados específicos.

Lipídios estruturados (LE): óleos e gorduras sintéticos ou modificados que contêm tanto ácidos graxos de cadeia longa, média ou curta.

Lipídios estruturados específicos (LEE): óleos e gorduras sintéticos ou modificados que contêm ácidos graxos de cadeia longa (principalmente essenciais) e ácidos graxos de cadeia média ou curta, no qual cada grupo foi localizado especificamente nas posições sn-2 ou sn-1,3 da molécula do glicerol (Akoh, 1995).

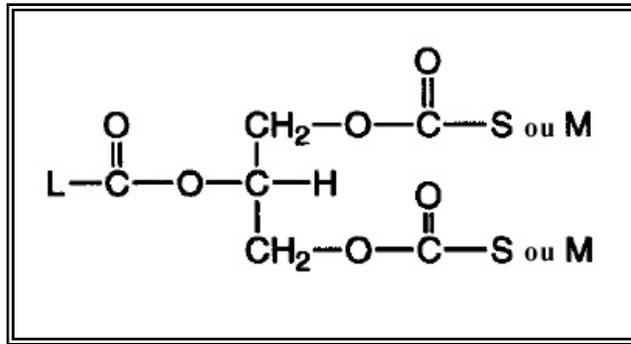


Figura 3: Estrutura geral dos Triacilgliceróis Estruturados Específicos (LEE). S, M e L são ácidos graxos de cadeia curta, média e longa respectivamente. As posições de S, M e L são intercambiáveis (Fonte: Akoh, 1998)

A interesterificação química frequentemente resulta em triacilgliceróis aleatórios e apresenta reações paralelas e indesejadas. Os lipídios estruturados também são produzidos pelas misturas físicas de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e longa (TCL). A Figura 4 ilustra a diferença entre lipídios estruturados derivados de TCM e TCL de uma mistura física dos dois. Os TCM são mais rapidamente absorvidos e convertidos em energia comparados aos TCL. A mistura física, dos dois TCM e TCL, apresenta as taxas de absorção originais dos triacilgliceróis individuais (Akoh, 1995), conseqüentemente pacientes com quadros de má-absorção não podem efetivamente utilizá-las (Akoh, 1997).

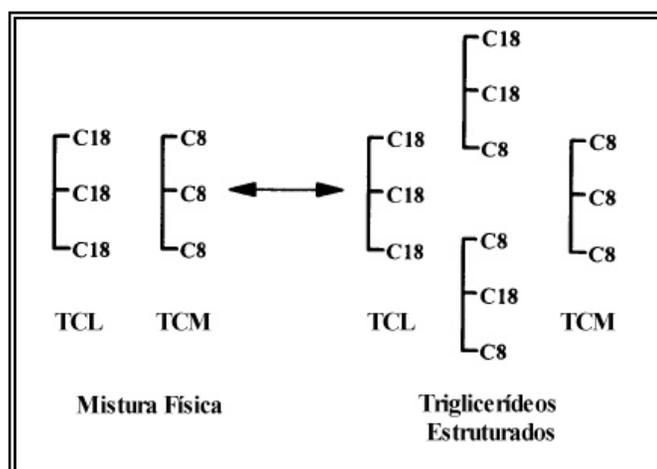


Figura 4: Diferença entre uma mistura física de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e longa (TCL) e os lipídios estruturados contendo aleatoriamente ácidos graxos de cadeia média e longa na mesma molécula (Fonte: Akoh, 1995).

1.4.1 - Considerações Nutricionais

A primeira aplicação dos LEs com propósitos nutricionais foi a utilização de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) no tratamento clínico de má absorção de gordura. Devido aos requerimentos nutricionais de ácidos graxos essenciais, óleos vegetais naturais contendo estes ácidos graxos são frequentemente misturados com TCM para aplicações médicas (Gottschlich, 1992 citado por Alex, 1997).

Os TCM fornecem uma fonte rápida e concentrada de energia que é facilmente absorvida e digerida (Gottschlich citado por Merolli, 1997). Além disso, os TCM melhoram a absorção de outras gorduras (Ross Products Division citado por Merolli, 1997). Quando os AGCM (ácidos graxos de cadeia média) são parte de um lipídio estruturado de ótima configuração, isto é com os AGCM em sn-1 e -3 somente, a hidrólise da molécula de triacilglicerol acontece mais rapidamente assim como a absorção de ácidos graxos essenciais (Ikeda, 1991, Jandacek, 1987).

As vantagens dos TCM, particularmente para indivíduos com digestão prejudicada, derivam principalmente da sua absorção e transporte rápido ao fígado pela via portal (Figura 5). A hidrólise dos TCM não requer lipase pancreática, e a absorção não necessita envolver o sistema linfático (Bach, Peters citados por Merolli, 1997). Os AGCM são absorvidos no intestino tão rapidamente quanto a glicose, mas os TCM fornecem duas vezes mais calorias que os carboidratos. Uma vez no fígado, os AGCM são oxidados rapidamente, e nem C8:0 nem C10:0 requerem carnitina para cruzarem a membrana mitocondrial, uma vantagem para pessoas extremamente doentes, que podem apresentar uma deficiência em carnitina. O ácido caprílico (C8:0) é o melhor ácido graxo como fonte de energia rápida, uma vez que o ácido de cáprico (C10:0) mais provavelmente será absorvido no sistema linfático e distribuído aos tecidos periféricos antes de se oxidar (Dias citado por Merolli, 1997).

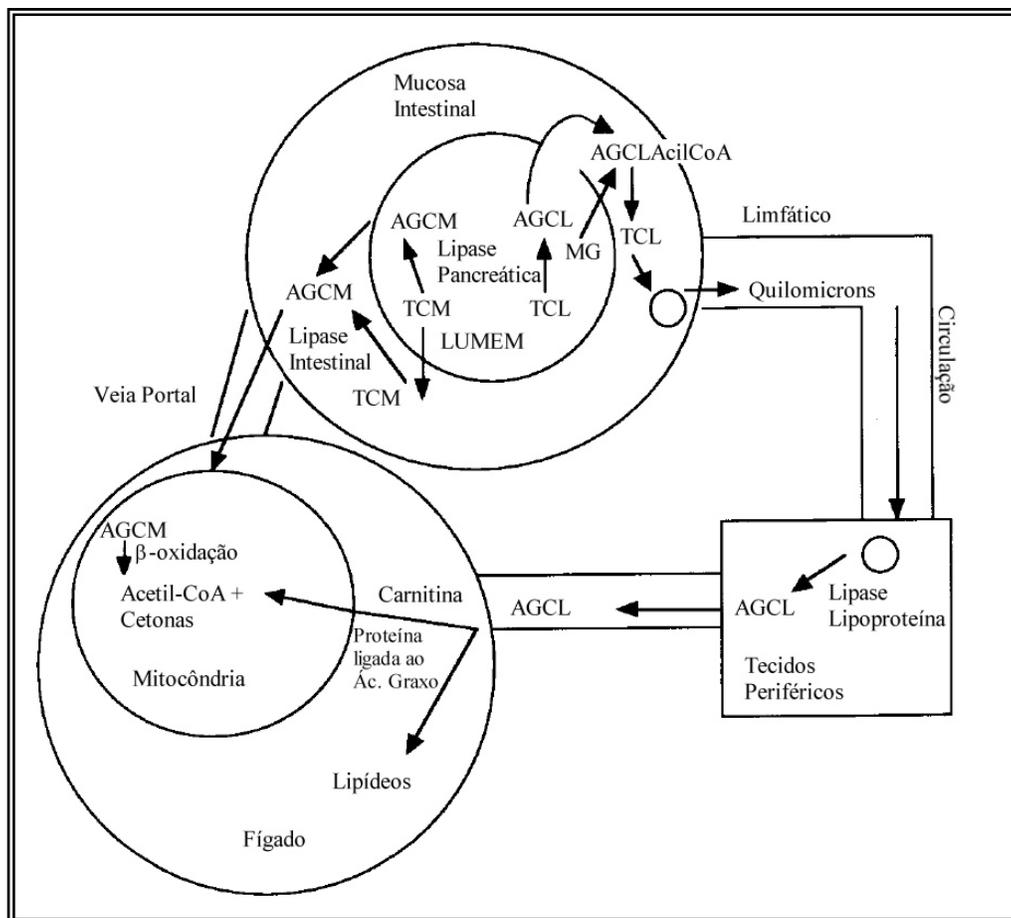


Figura 5: Absorção e metabolismo de triacilgliceróis de cadeias médias e longas. (AGCM = ácido graxo de cadeia média; AGCL = ácido graxo de cadeia longa; TCM = triacilglicerol de cadeia média; MG – monoglicerídeo; TCL = triacilglicerol de cadeia longa) (Fonte: Merolli, 1997).

Akoh et al., 1998b, relataram que os AGCM não foram encontrados em fígados de ratos alimentados com lipídio estruturado (Captex). A descoberta confirma a afirmação de que os AGCM são rapidamente oxidados.

O valor nutricional dos triacilgliceróis e as suas propriedades físico-químicas não só são determinados pela composição em ácidos graxos, mas também pela distribuição posicional dos grupos de acila ligados ao glicerol. Triacilgliceróis especiais do tipo ABA que contém ácidos graxos de cadeia média (por exemplo, C8) nas posições sn - 1,3 (A) e um ácido graxo de cadeia longa não saturado (por exemplo, C16-C22), na posição sn-2 (B), é uma fonte de energia efetiva para pacientes com mal-absorção, por exemplo, insuficiência pancreática (Jandacek, 1987).

A síntese bioquímica e o uso de triacilgliceróis estruturados foram recentemente documentados (Christophe, 1998 citado por Schmid et al., 1998). Um triacilglicerol estruturado importante na nutrição infantil é 1,3-oleil-2-palmitoil-glicerol (OPO). O leite humano contém ácido palmítico predominantemente na posição sn-2 do triacilglicerol, mas a maioria das fórmulas infantis contém ácido palmítico predominantemente nas posições sn-1,3 e a sua liberação durante a digestão pode causar a formação de sabões de cálcio que são pobremente absorvidos. Em contraste, gorduras que contêm ácido palmítico exclusivamente na posição sn-2 são mais eficazmente absorvidas (Lien, 1997 citado por Schmid et al., 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de cadeia longa como ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6) comparados a ácidos graxos convencionais têm várias vantagens, como redução de pressão sanguínea e dos níveis de triacilgliceróis no plasma e controle de funções imunológicas (McNeill et al., 1996). O DHA é reconhecido como sendo importante para o desenvolvimento do cérebro e dos olhos em crianças (Moore & McNeill, 1996). Poderia ser vantajoso fornecer dietas que contenham somente um destes PUFA, porque em alguns estudos relataram-se efeitos negativos no crescimento quando crianças foram alimentadas com DHA em combinação com altos níveis de EPA (Moore & McNeill, 1996).

Rao & Lokesh (2003) fizeram um estudo com ratos alimentados com uma dieta contendo óleo de coco, mistura de óleo de coco - açafrão (1: 0,7 p/ p) ou LE a níveis de 10% por um período de 60 dias, os LEs diminuíram os níveis de colesterol LDL do soro de 10,3 e 10,5% respectivamente em comparação com aqueles alimentados com óleo de coco e misturas (controle). Similarmente os níveis de colesterol LDL do fígado foram também diminuídos em 35,9 e 26,6% em animais alimentados com LE e controle, respectivamente. Os níveis de triacilgliceróis no soro mostraram uma diminuição de 17,5 e 17,4% enquanto no fígado a redução foi de 45,8 e 23,5% em animais alimentados com LE e controle respectivamente.

1.4.2 – Síntese Enzimática de LEEs

Um grande número de reações pode ser usado para a produção de LEE com lipases régio-específicas, dependendo dos processos e substratos. Estes incluem a acidólise, alcoólise, troca éster-éster, esterificação, interesterificação e transesterificação (Xu, 2000a).

Dois possíveis métodos para a produção de LE do tipo MLM são mostrados na Figura 6 (A e B). Um ponto chave para ambas as estratégias é o uso de lipases sn-1,3 régio-específicas especialmente de origem fúngica como *Rhizomucor miehei* e *Rhizopus delemar* (Iwasaki & Yamane, 2000).

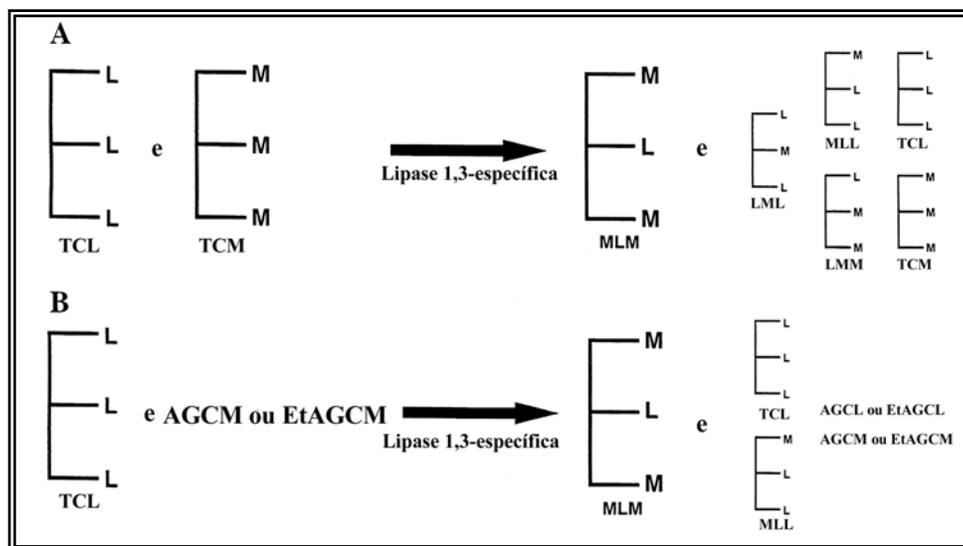


Figura 6 A e B: Síntese enzimática de LE do tipo MLM. A) Interesterificação entre TCL e TCM. B) Acidólise de TCL com AGCM ou interesterificação entre TCL e EtAGCM (éster etílico de AGCM). Os triacilgliceróis estão representados esquematicamente. “M” e “L” indicam resíduos de AGCM e AGCL, respectivamente. Os subprodutos possíveis (e impurezas) são mostrados em tamanho menor no esquema (Iwasaki & Yamane, 2000).

Na interesterificação de uma mistura TCM e TCL com uma lipase 1,3-específica (Figura 6 A), se a hidrólise dos substratos for suprimida, todos os compostos na mistura (isto é, os produtos interesterificados e substratos que não reagiram) são teoricamente

triacilgliceróis (TG),. Assim, o produto é facilmente recuperado como “uma fração de TG” apenas removendo-se o catalisador. Porém, a reação sempre resulta numa mistura não-homogênea de muitas espécies de TG (isto é, MLM, LML, MLL, LMM, TCM e TCL), os quais são muito difíceis de purificar através de meios convencionais. Portanto esta estratégia poderia ser preferível para alterar as propriedades de uma mistura física de TCM e TCL por um método simples (Iwasaki & Yamane, 2000).

O segundo método mostrado na Figura 6 B é a troca de acila de óleos com excesso de AGCM (por acidólise) (Shimada et al., 1996) ou seu etilester (EtAGCM, por interesterificação) (Huang, 1996a). A estratégia é substituir os resíduos de AG especificamente nas posições sn-1 e 3 dos óleos pelos desejados com uma lipase 1,3-específica, deixando os resíduos de AG nas posições sn-2 inalterados. Teoricamente, estas reações dão misturas de TGs (que contém o LEs desejados) e AGs ou seus ésteres EtAGs. Os AGs ou EtAGs podem ser removidos depois da reação através de destilação molecular para ambos ou por extração de álcali para os AGs. Portanto, se todos os resíduos de AG nas posições sn-1,3 são substituídos pelos AGs desejados (de forma que nem TCL nem MML permaneçam), pode se obter, eventualmente, a espécie de TG com a estrutura específica e com uma pureza bastante alta (Iwasaki, 2000).

A reação principal pode ser monitorada determinando-se o conteúdo de MLM e MLL/LLM por cromatografia líquida de alta-eficiência, cromatografia com fluido supercrítico ou usando-se cromatografia de gás para se determinar a quantia de M incorporado nos acilgliceróis (Xu, 2000a).

Os biocatalisadores (lipases) e outros parâmetros de reação não afetam o equilíbrio de reação, só mudam a taxa de equilíbrio. Um nível mais alto de M favorece a produção de MLM e uma maior incorporação de acila. Estas relações de equilíbrio entre o conteúdo de cada espécie de triacilglicerol ou incorporação de acila e relação molar de substrato podem ser analisadas sob certas suposições, isto é, contanto que as lipases tenham a mesma especificidade para L e M e posições sn-1 e -3 e que nenhuma reação paralela aconteça (Figura 7). A figura é útil para a escolha de uma relação molar de substrato satisfatória ao

se fazer um desenho experimental ou de processo; porém, deveria ser notado que relações molares de substrato mais altas conduzirão a tempo de equilíbrio mais longo devido à inibição de substrato ou outras limitações difusionais (Xu, 2000a).

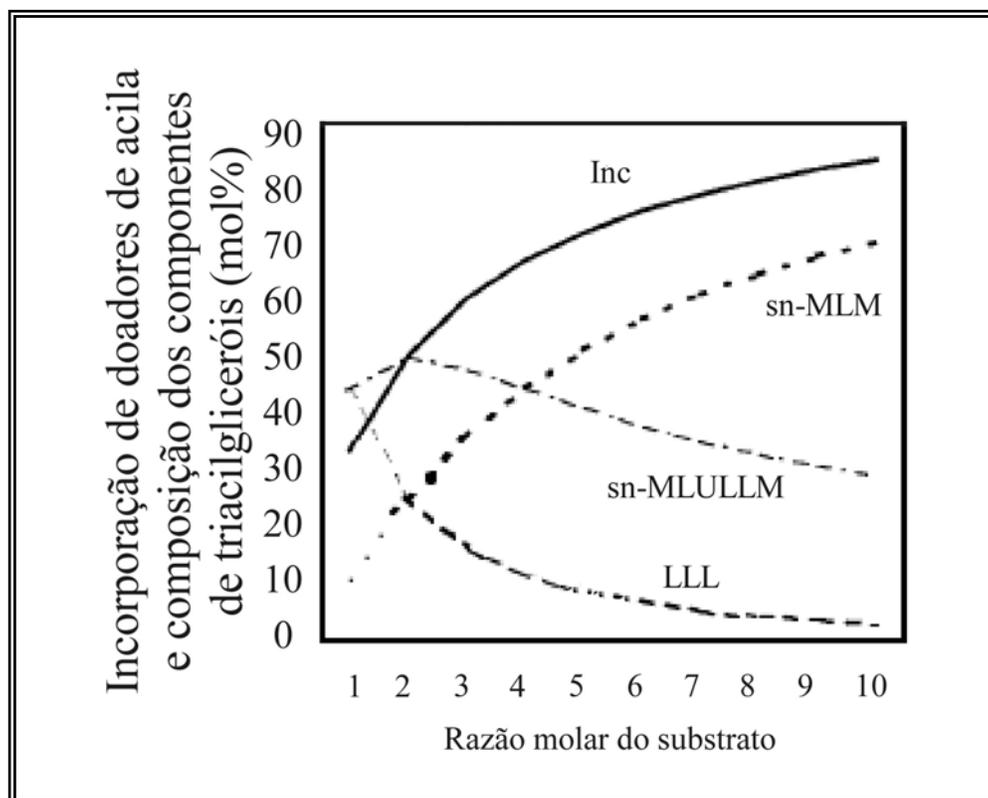


Figura 7: Relação entre a razão molar do substrato e a composição das espécies de triacilgliceróis no equilíbrio durante reações catalisadas por lipases específicas sn-1,3. (Inc é o equilíbrio de incorporação dos doadores de acila) (Xu, 2000a).

Os subprodutos da reação de transesterificação catalisada por lipases são difíceis de separar do produto desejado. Recentemente, foi desenvolvida uma alternativa eficiente, para a síntese de triacilgliceróis estruturados, baseada em um processo em duas etapas (Soumanou, 1998a; Soumanou, 1998b). Primeiro, os triacilgliceróis da posição sn-2 são submetidos a alcoólise catalisada por lipases sn-1,3 régio-específicas, produzindo os correspondentes 2-monoglicerídios (2-MG). Os 2-MG são isolados através de cristalização e esterificados com os ácidos graxos sn-1,3 usando-se as mesmas lipases para formar os triacilgliceróis estruturados desejados (Soumanou, 1998a; Soumanou, 1998b).

A etapa chave deste processo é suprimir a migração acila (“acyl migration”), a qual isomeriza 2-MG em 1(3)-monooleoilglicerol (1-MG) durante a primeira e a segunda etapa. Realizando-se a desacilação da trioleína por alcoólise (não hidrólise) em metil-t-butil éter (solventes de éter suprimem a migração acila), com lipases fúngicas imobilizadas em celite (os suportes de imobilização influenciam em grande parte a pureza isomérica do 2-MG), suprimiu-se com sucesso a migração acila, resultando em 2-MG sem a formação de 1-MG em 71,8% de rendimento (após a recristalização) (Schmid et al., 1998).

A esterificação do 2-MG purificado com ácido caprílico resultou no triacilglicerídeo estruturado COC desejado com mais de 91% de pureza. Uma desvantagem deste método é que ele requer a recristalização dos 2-MGs em baixas temperaturas, que podem não ser aplicáveis para 2-MGs com pontos de fusão muito baixos, tais como 2-MGs contendo PUFA (Schmid et al., 1998)

Além das reações de LLL para MLM na Figura 8, a migração acila acontece também devido à existência de diacilgliceróis (DAG) que conduzem à formação de triacilgliceróis não-específicos como LML, MML/LMM, ou mesmo MMM em vez de MLL/LLM e MLM. A migração acila geralmente envolve os doadores de acila de posições sn-1, 3 para sn-2 mas também pode acontecer com migração acilas de posições sn-2 para as sn-1,3. Considerando que região-especificidade é um dos objetivos principais do processo e determina a qualidade do produto, esta reação paralela tem que ser minimizada. Nas reações mostradas na Figura 6, são formados DAG como intermediários. Esta é a razão principal para a ocorrência de migração acila. O esquema de migração detalhado que resulta na formação de LML, MML/LMM, e MMM é realmente muito mais complicado que as reações principais (Xu, 2000a).

A migração acila, com a premissa dos DAGs serem os precursores, acontece pela formação de um intermediário cíclico instável e é iniciada pelo ataque nucleofílico de um par isolado de elétrons do oxigênio da hidroxila livre na carbonila do éster que resulta em um anel intermediário de cinco membros (Figura 8).

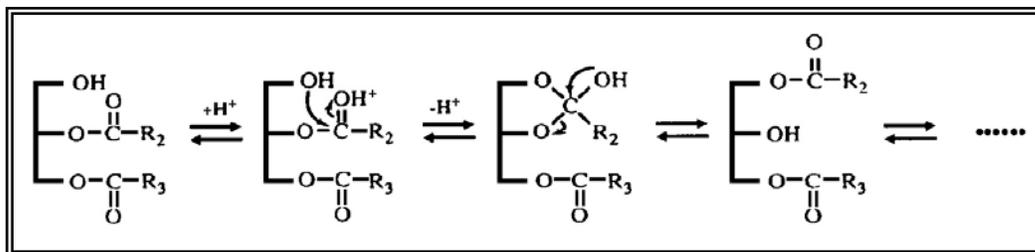


Figura 8: Mecanismo de reação da migração acila (Xu, 2000a).

Subseqüentemente, o anel se abre resultando em dois produtos, o DAG original e um DAG que migrou. A migração acila da posição 2 para posição 1(3) ou vice-versa acontece da mesma maneira. Esta migração continua até que um equilíbrio dinâmico seja alcançado. Quando os DAGs que migraram são re-sintetizados em triacilgliceróis, são formados subprodutos. Os 1,2(2,3)-DAGs são termodinamicamente instáveis e tendem a mudar para 1,3-DAG. A razão de 1,2(2,3)-DAG e 1,3-DAG é aproximadamente dois terços no equilíbrio. Em muitos casos, fatores como temperatura, conteúdo de água, tempo de reação, etc., que favorecem uma incorporação de acila mais alta, favorecem um grau mais alto de migração acila como também um conteúdo de DAG alto (Xu, 2000a).

1.4.3 - Efeito das Condições de Reação

O efeito das condições de reação, como tempo, teor de enzima, temperatura, teor de água e relação dos substratos, no grau da reação ou no rendimento da espécie de triacilglicerol, foram estudados amplamente. Geralmente, a incorporação de acila ou rendimento da espécie alvo de triacilglicerol podem ser aumentados utilizando-se tempos de reação mais longos, maiores teores de enzima e uma relação molar de substrato mais alta, se o tempo de reação for suficientemente longo. A temperatura de reação também é importante e diferentes lipases podem ter faixas ótimas de temperatura diferentes. Na faixa de 40-70°C, se a viscosidade do substrato for suficientemente baixa, a temperatura não é um fator crucial para o desempenho da reação. A influência do teor de água é muito complexa na interesterificação catalisada por lipases. Em certas faixas, um aumento do teor

de água aumenta a atividade inicial das lipases, porém, um excesso de água não aumenta a reação como um todo ou o rendimento de produto final, mas conduz a uma diminuição da atividade da lipase e à formação de mais subprodutos. Então, o teor ótimo de água deve ser determinado para uma determinada reação. O controle do teor de água nas lipases é muito importante em reatores em batelada ou em reatores de leito empacotado contínuos (PBR), principalmente quando se reutilizam as lipases (Xu, 2000a).

Estas considerações se aplicam na faixa normalmente usada, isto é, temperatura 20-65°C, teor de enzima 1-20%, tempo de reação 1-20 h, teor de água 1-12%, e relação molar de substrato (ácidos graxos /triacilglicerol) 2-8 mol/mol. Em reatores de leito empacotado, a tendência global do efeito com tempo de residência, temperatura de reação, e relação de substrato é semelhante ao observado em reatores em batelada. A faixa aplicável de tempo de residência pode conseqüentemente ser reduzida para 0,5-5h. O teor de água tem pouco efeito na reação para operações em curto prazo; porém, afeta a estabilidade do leito empacotado para produção por longo prazo (Xu, 2000a).

Segundo Ko, et al. (2003), na síntese de LE contendo alto ácido linolênico por transesterificação de óleo de perilla (*Perilla frutescens*) e ácido caprílico usando duas lipases imobilizadas, Lipozyme IM de *Rhizomucor miehei* e Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosa*, à medida que a carga de enzima e o tempo de reação aumentaram, a porcentagem molar de incorporação de ácido caprílico com ambas lipases aumentou. Contudo o teor ótimo de água adicionada para máxima incorporação de ácido caprílico foi de 2% (Lipozyme IM) ou 3% (Lipozyme TL IM). A máxima incorporação de ácido caprílico (61,9 mol%) foi obtida com Lipozyme TL IM a 24 hr, 55 °C, 3% de água adicionada e 10% de carga enzimática.

1.4.4 - Efeito da atividade de água

A atividade de água é um parâmetro dinâmico em uma reação enzimática. Água pode ter um papel duplo na atividade de lipases em solventes orgânicos (Brozowisk, 1991 citado por Lee, 1996). Ela atua como um agente essencial para a reação por manter camadas ao redor das lipases. Acima da quantidade crítica de água, ela promove hidrólise que é a reação inversa da interesterificação (Lee, 1996). A atividade de água mais apropriada deve ser sempre determinada (Schmid et al., 1998).

As reações de esterificação catalisadas por lipases são reversíveis e como a água é um dos produtos da reação, o equilíbrio é afetado pela quantidade de água na mistura da reação (Cerdán et al., 1998).

Cerdán et al., 1998, concluíram que ao se usar uma peneira molecular (como agente desidratante), em grande quantidade adicionada no início da reação, eliminava-se muita água e a atividade da enzima diminuía. Uma pequena quantidade de peneira molecular adicionada mais tarde aumentava a atividade enzimática.

Lee, Ki-Teak e Akoh C. C. (1996) determinaram que a porcentagem molar de ácido eicosapentaenóico (EPA) incorporado nos triacilgliceróis foi aumentada pela adição de água quando a trilaurina e tricaprilina foram os substratos e a lipase IM 60 (de *Mucor miehei*, sn- 1,3 específica) foi o biocatalizador. Com a lipase SP 435 (de *Candida Antarctica*, não específica), a incorporação de EPA foi sempre menor na presença de água do que em sua ausência.

Hamam e Shahidi (2004) analisaram cinco lipases comercialmente disponíveis para a incorporação de ácido cáprico (CA) em ácido docosaheptaenóico (DHA). Para um conteúdo de 2% água, as condições ótimas determinadas foram uma relação molar de 1:3 (DHA/CA) a uma temperatura de 45°C, e um tempo de reação de 24 h na presença de 4% enzima.

Até o momento, a atividade de água em experiências de laboratório normalmente é regulada por soluções salinas saturadas ou pares de sais e o controle da atividade de água é executado normalmente antes que uma reação aconteça. (Xu, 2000a)

1.4.5 - Efeito do Bioreator

A maioria dos trabalhos em aplicações de lipase na produção de LEE foi conduzida utilizando-se reatores em batelada, inclusive tubos ou frascos com vibrador ou agitador magnético e/ou em sistemas com solventes em níveis de miligrama/grama. Também foram executados ensaios, nestes tipos de reatores, em planta piloto em escala de 1 a 30 kg com sistemas sem solvente. Muito recentemente, estudos de processos na produção enzimática de LEE foram realizados em reatores de leito empacotado (RLE). Todos estes estudos são resumidos nas Tabelas 8 e 9 para reatores em batelada e em leito empacotado, respectivamente, para fornecer uma visão global do estado da arte. Geralmente observa-se que a migração acila não pode ser totalmente evitada, especialmente em reatores em batelada de maior escala. Um ajuste deve ser feito para se obter tanto uma incorporação de acila alta, quanto sua baixa migração. A alta migração acila em reatores de batelada deve-se principalmente ao tempo de reação mais longo necessário para um certo grau de incorporação. Esta é uma desvantagem particular do uso de reatores de batelada para a produção de LEE. A migração acila nos RLE é baixa se comparada aos reatores de batelada. Devido ao baixo grau da migração acila, a consideração desta pode ser desprezada no desenho de um RLE e na otimização do processo (Xu, 2000a).

Tabela 8: Síntese catalisada por lipase e produção de lipídios estruturados específicos em reatores de batelada.

| Lipase | Substrato | Produto | Referências |
|-------------------------|--|---|------------------------------|
| Lipozyme IM e LPS | Óleos de células únicas e CyA | 23% incorporação com Lipozyme IM | Iwasaki, Y., et al., 1999. |
| LRS, LMR e R D L | OOO, LLL, óleo de semente de algodão e CyA | 45% CyOCy e 46% CyOO com acidólise de OOO, 95% de incorporação sn-1,3 com processo em duas etapas | Soumanou, et al. 1999. |
| Lipozyme IM | Óleo de canola e CyA | 59,9% de novos triacilgliceróis com acidólise e 82,8% com esterificação | Willis, 1999. |
| Lipozyme IM | Óleo de amendoim e CyA | 30% incorporação | Lee & Akoh, 1998. |
| Lipozyme IM | Óleo de colza e CA | Incorporação líquida 77% com menos de 2% de DAG | Xu, et al., 1998a. |
| Lipozyme IM | Óleo de peixe e CA, ou TCM e SFFA | 60-70% incorporação sn-1,3 com 8-12% migração acil, rendimento relativo 95% | Xu, et al., 1998b. |
| Lipozyme IM | Óleo de borragem e CA, EPA | Incorporação de 10,2% CA e 27,3% EPA | Akoh e Moussata, 1998. |
| Lipozyme IM, LRD, e LRJ | OOO, LLL, óleo de amendoim e CyA | 90,9% incorporação sn-1,3, CyA na posição sn-2 abaixo de 0,1% | Soumanou, et al. 1998a. |
| Lipozyme IM, LRD, e LRJ | OOO, LLL, óleo de semente de algodão e CyA | 94% incorporação sn-1,3, CyA na posição sn-2 menos que 1,9% | Soumanou, et al., 1998b. |
| Lipozyme IM | LLL e CyA-EE | 32,1% LEE Di-incorporado | Lee & Akoh, 1997. |
| Lipozyme IM | OOO e ácido capríco, ácido butírico | 49% LEE di-incorporado e 38% mono-incorporado | Fomuso e Akoh, 1997. |
| Lipozyme IM | OOO e CyA-EE | 41,7% MLM foi obtido | Huang e Akoh, 1996a. |
| Lipozyme IM | TCM e EPA-EE | 32-36% EPA foi incorporado em TCM | Lee & Akoh, 1996. |
| R D L | Óleo de açafrão, óleo de linhaça e CyA | Incorporação 45-50%. 0,7% CyA foi encontrado na posição sn-2 | Shimada, et al., 1996. |
| Lipozyme IM | Trisun 90 e CA | C49 e C41 rendimento total 95-96% | Shieh, Akoh e Koehler, 1995. |

Abreviações: LRM, Lipase *Rhizomucor miehei*; LPS, Lipase *Pseudomonas* sp.; LRS, Lipase *Rhizopus* sp.; LRD, Lipase *Rhizopus delemar*, LRJ, Lipase *Rhizopus javanicus*; OOO, trioleína; LLL, trilinoleína; TCM, triacilgliceróis de cadeia média; CA, ácido cáprico ; CyA, ácido caprílico; SFFA, ácidos graxos livres de girassol; DAG, diacilgliceróis; EE, etil éster; EPA, ácido eicosapentaenóico; MLM, triacilgliceróis di-incorporados; LEE, lipídios estruturados específicos. (Fonte: Xu, 2000a.)

Tabela 9: Síntese e produção de lipídios estruturados específicos catalisadas por lipases em reatores de leito empacotado.

| Lípase | Substrato | Produto | Referências |
|---------------------------|---|---|------------------------|
| Lipozyme IM | Óleo de “menhaden” | Produtos contendo 40% CyA e 30% EPA e DHA com menos de 3% migração acil | Xu, et al., 2000b. |
| Lipozyme IM | Óleo de canola e CyA | Produtos contendo 40,1% CyA com 3,4% CyA na posição w-2 | Xu, et al., 2000c. |
| RAL imobilizado em Celite | Óleo de borragem e CyA | Incorporação de 50-55% | Shimada, et al., 1996. |
| Lipozyme IM | TCM e OA | LEE 58% di-incorporado, incorporação calculada 75% | Xu, et al., 1999. |
| Lipozyme IM | Óleo de colza, óleo de açafrão e CyA | 60-70% incorporação sn-1,3 com 1-4% migração acil | Xu, et al., 1998c. |
| Lipozyme IM | Óleos de girassol, açafrão, borragem, linhaça e CA, CyA | 35-47% incorporação com menos de 1% migração acil, 40% MLM | Mu, et al., 1998. |

Abreviações: LRAL, Lipase *Rhizopus arrhizus* ; OA, ácido oléico; DHA, ácido docosahexaenóico.

Veja Tabela 2 para outras abreviações. (Fonte: Xu, 2000a).

1.4.6 – Purificação de LEs

A produção de lipídios estruturados em larga escala apresenta alguns problemas de processamento. Por exemplo, a separação dos ácidos graxos livres (AGLs), ésteres etílicos de ácidos graxos, diacilgliceróis ou triacilgliceróis indesejáveis que podem ser formados como resultado da esterificação ou transesterificação (Akoh, 1995). Podem-se usar métodos convencionais de fracionamento de lipídios tais como cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia flash ou de coluna, cromatografia de alta eficiência preparatória (prep-CLAE), cromatografia de fluido supercrítico (SFC) e técnicas de destilação molecular (“short-path distillation”), para remover os reagentes e subprodutos dos LEs produzidos pela reação (Akoh, 1995).

A migração acila também acontece ao longo das etapas de purificação do LEE. A mistura de reação contém freqüentemente 2-10% DAG, além de triacilgliceróis e ácidos graxos livres. Quando tal mistura é aquecida a temperaturas altas, algumas reações podem acontecer. Um nível considerável de migração acila (até 10%) foi observado em um desodorizador de batelada convencional com destilação a vapor (Xu, et al., 1998b). Foi encontrado que ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais e vapor eram responsáveis pela migração acila em temperaturas altas; porém, identificaram-se os DAG como a causa principal (Xu, et al., 1998b).

Dois parâmetros de operação influenciam o grau de migração acila para a purificação de LEE por evaporação ou destilação; tempo e temperatura. Quanto maior o tempo de processo ou mais alta a temperatura aplicada, maior migração acila é produzida. Porém, estes dois parâmetros também afetam a separação de ácidos graxos livres da mistura sob vácuo (Xu, 2000a). Em sistemas de evaporação de batelada, requer-se uma temperatura até 220°C e tempo de operação de até algumas horas, dependendo do vácuo aplicado. Para se reduzir o grau de migração acila, sistemas de purificação altamente eficientes são necessários. Uma das técnicas mais eficientes para purificação é a destilação molecular (“short-path distillation”), que é extensamente usada para separações de materiais de alta qualidade em condições menos rigorosas. Equipamentos modernos de destilação molecular podem ser operados a pressões menores de 0,01 mbar que torna possível utilizar baixas temperaturas de operação. O tempo de residência é freqüentemente apenas de alguns segundos devido ao tamanho requerido do evaporador, mas é suficiente para a separação, porque a distância evaporador-condensador é de somente alguns centímetros (Xu, 2000a).

A purificação de LEE acontece freqüentemente em duas etapas. A primeira etapa é remover os ácidos graxos de cadeia curta ou média a uma temperatura de evaporação de 40-80°C. O segundo passo é separar os ácidos graxos de cadeia longa restantes a uma temperatura de evaporação de 175-190°C. Em tal sistema, nenhuma migração acila é observada. A destilação molecular também pode remover os acilgliceróis parciais da mistura da reação. A Figura 9 apresenta um processo simplificado da purificação de LEE.

Um procedimento de deaeração e condensação são partes essenciais do processo e precisam ser eficientes para produzir um baixo vácuo. (Xu, 2000a):

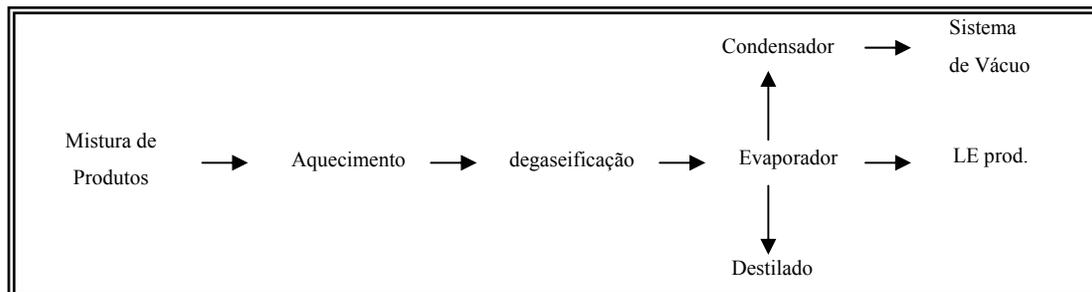


Figura 9: Etapas do processo simplificado para a aplicação na purificação de LEE (Xu, 2000a).

2 - Material e Métodos

2.1 - Matérias Primas e Insumos

1) Gordura bruta de ucuúba (Fábrica Santa Maria Óleos e Sabão Ltda, PA, Brasil)

2) Óleo de canola refinado (Cargill Corp., MN, USA)

3) Óleo de algas DHASCO® (Martek Biosciences Corp., KY, USA)

4) Lipase IM60 1,3 específica (*Rhizomucor miehei*) e lipase SP435 não específica (*Candida Antarctica*) (Novo Nordisk Bioindustrial Inc).

5) Reagentes - grau analítico (FisherScientific, Fair Lawn, NJ, USA)

6) Reagentes - grau CLAE (J.T. Baker, Phillipsbug, NJ, USA)

7) Argila clarificante Pure-flo Supreme B81 (OilDri Corp. of America, IL, USA)

8) Argila clarificante Clarion 450 (American Colloid Company – Absorbent Prod Div., MS, USA)

2.2 - Equipamentos e Instrumentos

- Reator de vidro encamisado, diâmetro interno de 10,5 cm e altura de 16 cm, com capacidade de 950 mL. Tampa com duas tomadas, haste de agitação tipo hélice, vedação com selo mecânico. Agitador StedFast modelo SL 2400 e Aquecedor/Resfriador Polystat modelo 12101-00. O reator é mostrado na Figura 10.



Figura 10 : Reator utilizado nos testes de escala piloto

- Oxidative Stability Instrument, fabricado por Omnion, Inc., com 24 canais, conectado a um computador PC.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência PERKIN ELMER modelo Isocratic Series LC-250.
- Detector de Índice de Refração Sicon Analytic modelo LCD 201.
- PeakSimple Chromatography Data System SRI.
- Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies 6890N, com detector de ionização de chama, Injetor 7683 series e 7683 series Autosampler 01-100 vials.
- Calorímetro de Varredura Diferencial - DSC-7 Thermal Analysis Perkin Elmer
- Sistema de destilação molecular (“short-path distillation system”), UIC Inc., Joliet, IL, USA, modelo KDL-4 (Figura 10).

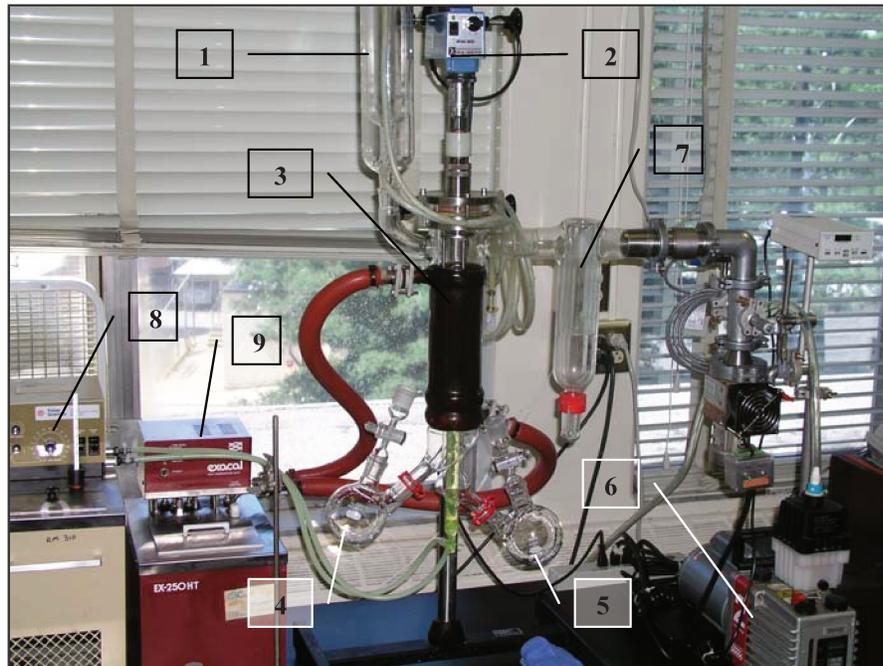


Figura 11: Destilador “Short Path” utilizado na purificação dos lipídios estruturados. Legenda: 1: Reservatório da amostra; 2: Agitador de superfície raspada; 3: Evaporador encamisado; 4: Coletor do destilado; 5: Coletor do resíduo; 6: Bomba de vácuo; 7: Trap; 8: Banho de resfriamento; 9 Banho de aquecimento

- Banhos Rotativos Orbitais modelos C76 e G76D Water Bath Shaker, New Brunswick Scientific classic series, Edison, NJ, USA.
- Equipamento para Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Fisherbrand, sílica gel G).
- Vidraria comumente utilizada em laboratórios de análises químicas.

2.3 - Métodos Analíticos

- Ácidos Graxos Livres – Método AOCS Ca 5a-40 (2003).
- Estabilidade Oxidativa – OSI – Método AOCS Cd 12b-92 (2003).
- Composição em Ácidos Graxos – Método AOCS Ce 1-62 (2003) nas seguintes condições:

Coluna capilar de sílica empacotada modelo NJ&W 122-2232 DB-225 com 30,0m x 250 μ m x 0,25 μ m.

Fluxo de gás de arraste (He) 1,5 mL/min;

Pressão de gás de arraste 21.39 psi;

Temperatura do injetor: 250°C,

Temperatura do detector: 260°C;

Temperatura do forno: 130°C por 3 minutos, 130°C a 215°C a 20°C/min e 215°C por 27,8 minutos.

- Composição Triacilglicerídica Método AOCS Ce 5b-89 (2003) nas seguintes condições:

Coluna: Lichrosorb 5 μ m, RP 18, 250 X 4 mm, METACHEM.

Fase móvel: acetona / acetonitrila 62:38;

Fluxo - 1mL/minuto;

Amostra: 5% em acetona;

Volume injetado :20 μ L.

A identificação dos triacilgliceróis presentes foi feita utilizando-se padrões de triacilgliceróis (Nu-Chek Prep, Inc. USA) e com auxílio do programa Trinel (Antoniosi et al., 1995), que baseado nos cromatogramas de composição em ácidos graxos, propõem a distribuição mais provável dos ácidos graxos na molécula de glicerol.

- Índice de Iodo – Método AOCS Cd 1b-87 (2003).
- Índice de Peróxido – Método AOCS Cd 8-53 (2003).
- Ponto de Fusão Capilar Aberto – Método AOCS Cc 3-25 (2003).

- Sabão em Óleo - Método AOCS Cc 17-95 (2003).
- Análise Térmica - Método AOCS Cj 1-94 (2003), por Calorimetria de varredura diferencial (DSC), nas seguintes condições:

Amostra: ~10mg

Curvas de resfriamento: 10min a 80°C; 80° C a -40°C (10°C/min);
30min a -40°C.

Curvas de fusão : 1min. a -40°C; -40°C a 80°C (50C/min

2.4 - Procedimento Experimental

2.4.1 – Caracterização dos Óleos

Os substratos gordura de ucuúba e dos óleos de canola e algas (DHASCO®) foram caracterizados quanto à sua composição em ácidos graxos, composição triacilglicerídica, estabilidade oxidativa, índice de peróxido, índice de iodo, ponto de fusão em capilar aberto e análise térmica (perfis de fusão e cristalização).

2.4.2 - Purificação da Gordura de Ucuúba

As amostras de gordura bruta de ucuúba (2Kg), devido à forma como são extraídas (“expeller”) e as condições de armazenamento, apresentam normalmente altos índices de ácidos graxos livres e impurezas, o que faz necessária sua purificação.

Duas amostras de gordura de ucuúba bruta foram fundidas e homogeneizadas a 60°C e neutralizadas utilizando o processo segundo Lee & Akoh (1998), modificado como segue:

Utilizando um funil de separação o óleo filtrado foi dissolvido em hexano (100g em 500mL) adicionando-se 145 mL de solução 0,5 N de NaOH em 20% etanol e um mL de solução 1% fenolftaleína. A mistura foi agitada e após decantação a fase superior foi coletada. Em seguida adicionou-se 100 mL de solução NaCL saturada, e a fase orgânica foi separada novamente.

A fase orgânica contendo os triacilgliceróis de ucuúba foi filtrada em uma coluna, contendo sulfato de sódio anidro, em seguida o hexano foi evaporado para recuperar a gordura de ucuúba neutralizada.

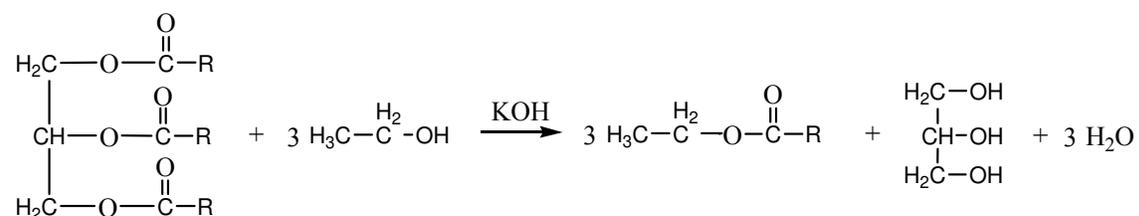
A gordura neutra foi lavada com solução salina até desaparecimento da coloração rósea do indicador.

Em seguida, o óleo neutro foi clarificado sob vácuo a 80°C e agitação por 5 minutos com adição sequencial de 0,5% de argilas clarificantes (Pure-flo Supreme B81 e Clarion 450).

A gordura purificada resultante foi utilizada nas etapas subseqüentes.

2.4.3 - Produção de Ésteres Etilícos a partir de Óleos de Canola e Algas

Na reação de transesterificação química para a produção de ésteres etílicos, empregando-se o método descrito por Peterson et al. (1996) as seguintes proporções foram utilizadas: hidróxido de potássio 13 g, etanol anidro 10,7 g para 1,0 L de óleo. A reação de transesterificação ocorre como segue:



O hidróxido de potássio é dissolvido no etanol (65% em excesso) e em seguida esta mistura catalítica é adicionada ao óleo. A reação ocorre em 6 horas com agitação vigorosa a temperatura ambiente. Numa reação completa o glicerol começa a se separar imediatamente ao cessar a agitação e a decantação se completa em uma hora.

Após a decantação inicial o conteúdo do reator é misturado e agitado vigorosamente por 40 minutos em duas etapas de 20 minutos cada. Após os 20 minutos iniciais, adiciona-se 15% de água em relação à quantidade inicial do óleo no reator. A agitação deve continuar por mais 20 minutos.

A mistura é então deixada decantar por 24 horas, após a decantação a fase pesada de glicerol e água é separada.

Finalmente para remover o álcool remanescente e traços de potássio, glicerol e sabão, o éster é lavado com cerca de 30% de água em relação ao volume de éster. Após a agitação e decantação a água é separada. Esta etapa de lavagem deve ser repetida até que o pH neutro.

2.4.4 – Reação de Síntese de Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba

O método utilizado na síntese de LEs por reação enzimática em meio orgânico foi descrito por Yankah (2000) como segue:

O hexano foi adicionado à mistura da reação contendo os substratos (gordura de ucuúba mais ésteres etílicos), na proporção estabelecida no desenho experimental, até um volume total de 3,2 mL, colocados em tubos de ensaio, com tampa, e em seguida foi adicionada a enzima, na proporção estabelecida. Os tubos tampados foram colocados em um banho rotativo orbital, pelo tempo de reação e na temperatura de acordo com o desenho experimental.

Após o tempo de reação, as amostras foram removidas, resfriadas em gelo, e passadas por uma coluna com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remover a enzima e qualquer resíduo de água e em seguida foram purificadas.

2.4.5 - Purificação dos Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba:

A purificação e concentração dos lipídios estruturados foi conduzida segundo o método descrito por Huang (1996a e b) descrito a seguir:

Uma alíquota da amostra filtrada, contendo 50 µL dos LEs, produzidos de acordo com o item anterior, foi aplicada à uma placa cromatográfica de sílica gel (CCD), utilizando-se éter de petróleo/éter etílico/ácido acético (90:10:1 mL) como eluente para separar os Triacilgliceróis. As bandas dos Triacilgliceróis foram visualizadas sob luz ultravioleta após a aspensão de 2,7-diclorofluoresceína em metanol 0,2%. As bandas correspondentes aos triacilgliceróis foram raspadas das placas e metiladas com 3,0 mL de HCL 6,0 % em metanol a 75° C por 2 horas juntamente com 30 µL de padrão interno C17:0. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram extraídos com 2,0 mL de hexano e lavados duas vezes com 1,0 mL de KCl 0,1M. Os ésteres metílicos foram centrifugados (1000 rpm/ 3 minutos) e o solvente evaporado sob nitrogênio. Todas as soluções foram mantidas em gelo para se evitar a oxidação de ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos, na forma de ésteres metílicos, foram analisados por cromatografia gasosa.

2.4.6 - Otimização da Reação e Desenho Experimental

A reação de transesterificação enzimática foi otimizada utilizando-se a metodologia de superfície de resposta (Barros, 1996). Os desenhos experimentais foram gerados utilizando-se o programa de computador Modde 5.0 da Umetrics AB.

Todos os experimentos foram feitos em duplicata e as médias dos resultados foram posteriormente analisadas pelo programa de computador supracitado.

2.4.6.1 - Transesterificação Enzimática de Ucuúba com Éster Etilico de Óleo de Canola

Foi estudado o comportamento da enzima Lipozyme IM 60 sn-1,3-específica na reação de transesterificação da gordura de ucuúba com o éster etílico de óleo de canola.

As variáveis do processo são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Variáveis do processo de transesterificação enzimática de ucuúba com éster etílico de óleo de canola :

| Variáveis | Níveis | | |
|---|--------|-----|-----|
| Razão Molar Gordura de ucuúba : Éster etílico de Óleo de Canola | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
| Tempo de reação (horas) | 12 | 24 | 36 |
| % Enzima em relação ao substrato (%) | 5 | 10 | 15 |
| Temperatura (°C) | 45 | 55 | 65 |

Constantes do processo:

Agitação: 200 rpm

Desenho Experimental: desenho fatorial completo cúbico de face centrada (pontos axiais colocados no centro das faces laterais)

Ensaio do desenho: 24

Pontos centrais = 3 ensaios

Total = 27 ensaios

Análises dos Resultados por superfície de resposta (Barros, 1996).

Parâmetro de Resposta: Incorporação (%) de ácido oléico nos triacilgliceróis formados (LEs).

2.4.6.2 Transesterificação Enzimática de Ucuúba com Éster Etilico de Óleo de Algas

Foi estudado o comportamento da enzima lipase SP435 não específica na reação de transesterificação da gordura de ucuúba com o éster etílico de óleo de algas.

As variáveis do processo são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11: Variáveis do processo de transesterificação enzimática de ucuúba com éster etílico de óleo de algas.

| Variáveis | Níveis | | |
|--|--------|-----|-----|
| Razão Molar Gordura de ucuúba : Éster etílico de Óleo de Algas | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
| Tempo de reação (horas) | 12 | 24 | 36 |
| % Enzima em relação ao substrato (%) | 5 | 10 | 15 |
| Temperatura (°C) | 45 | 55 | 65 |

Constantes do processo:

Agitação: 200 rpm

Desenho Experimental: desenho fatorial completo cúbico de face centrada (pontos axiais colocados no centro das faces laterais)

Ensaio do desenho: 24

Pontos centrais = 3 ensaios

Total = 27 ensaios

Análises dos Resultados por superfície de resposta (Barros, 1996).

Parâmetro de Resposta: Incorporação (%) de ácido docosahexaenóico (DHA) nos triacilgliceróis formados (LEs).

Os dados de incorporação de ácidos graxos oléico e DHA, na formação dos LEs obtidos em cada série de ensaios indicados pelo desenho experimental, foram processados através do programa Modde 5.0 (Umetrics, 2002).

A análise estatística dos dados de incorporação de ácidos graxos na síntese dos LEs foi realizada através do programa supracitado a partir do qual foi verificada a qualidade e falta de ajuste do modelo, assim como a aplicação do teste de ANOVA, a probabilidade normal dos resíduos, o cálculo dos coeficientes da equação do modelo e a produção dos gráficos de superfície de resposta.

Os valores de R^2 e Q^2 apresentados no Gráfico de Qualidade de Ajuste representam a fração da variação da resposta explicada pelo modelo e a fração da variação da resposta que pode ser predita pelo modelo, respectivamente. R^2 é uma medida superestimada e Q^2 é uma medida subestimada do ajuste do modelo.

O gráfico de Falta de Ajuste (“Lack of Fit”) compara a falta de ajuste (erro do modelo) com o erro puro. A primeira barra representa o desvio padrão da falta de ajuste e a terceira barra representa o desvio padrão do erro puro multiplicado pela raiz quadrada do valor crítico F (o valor da distribuição F sobre a qual o desvio padrão da falta de ajuste é

significante ao nível de 95%). Portanto se a primeira barra for maior que a terceira o modelo terá uma falta de ajuste significativa.

Os resíduos, diferença entre valores previstos e observados, foram graficados numa escala de probabilidade normal cumulativa. Este gráfico torna fácil identificar:

- Normalidade dos resíduos: se os resíduos estão normalmente distribuídos, os pontos no gráfico da probabilidade seguem próximos de uma linha reta.
- Marginais (“Outliers”): São pontos que desviam da linha de probabilidade normal, e têm altos valores absolutos dos resíduos studentizados, isto é, maiores que ± 4 .

2.4.7 - Produção e Purificação de LEs em Escala Piloto

Uma vez estabelecidas as faixas ótimas de trabalho, pelos testes realizados nos ensaios com ésteres de óleo de canola (item 2.4.6.1) e ésteres com óleo de algas (item 2.4.6.2), foram realizados testes nestas faixas para a produção de 100g de lipídios estruturados.

Nos estudos em escala piloto foi utilizado um reator de vidro com capacidade de 950 mL, onde se adicionaram os substratos, o hexano e finalmente a enzima. O reator foi tampado e coberto com folha de alumínio para minimizar os efeitos da foto-oxidação. O processo foi repetido até obter-se a quantidade necessária de LEs para as análises subseqüentes.

A purificação dos LEs em escala piloto foi feita segundo Moussata e Akok, 1998 foi utilizado um sistema de destilação molecular (fluxo descendente) da UIC Inc., modelo KDL-4, com 0,04 m² de superfície de evaporação aquecida, recipientes de 500 mL com dois gargalos com adaptadores para válvulas para operação semicontínua.

Os LEs foram recirculados no destilador até obter se uma concentração de AGL (como ácido mirístico) menor que 1%. Posteriormente eles foram purificados em temperaturas de 170 a 185° C, com os AGL removidos por vácuo de 0,2 mTorr. As amostras de LEs foram armazenadas em frascos âmbar, com atmosfera de N₂ sob temperatura de -96° C para posterior análise (Akoh e Moussata, 2001).

Foi testado o ajuste da equação da superfície de resposta comparando-se os valores calculados pela equação com os obtidos experimentalmente.

Os LEs resultantes foram analisados em sua composição em ácidos graxos, estabilidade oxidativa, índice de peróxido, acidez, índice de iodo e curvas de cristalização e fusão por calorimetria de varredura diferencial (DSC).

3 - Resultados

3.1 - Caracterização dos substratos

Gordura de ucuúba

A gordura bruta de ucuúba apresentava um teor de AGL = 12,9% (como mirístico), o qual foi reduzido para 0,8 durante o processo de purificação. A gordura purificada ficou isenta de sabões.

Composição em ácidos graxos

A Figura 12 e a Tabela 12 apresentam o cromatograma e dados referentes à composição em ácidos graxos da gordura purificada de ucuúba.

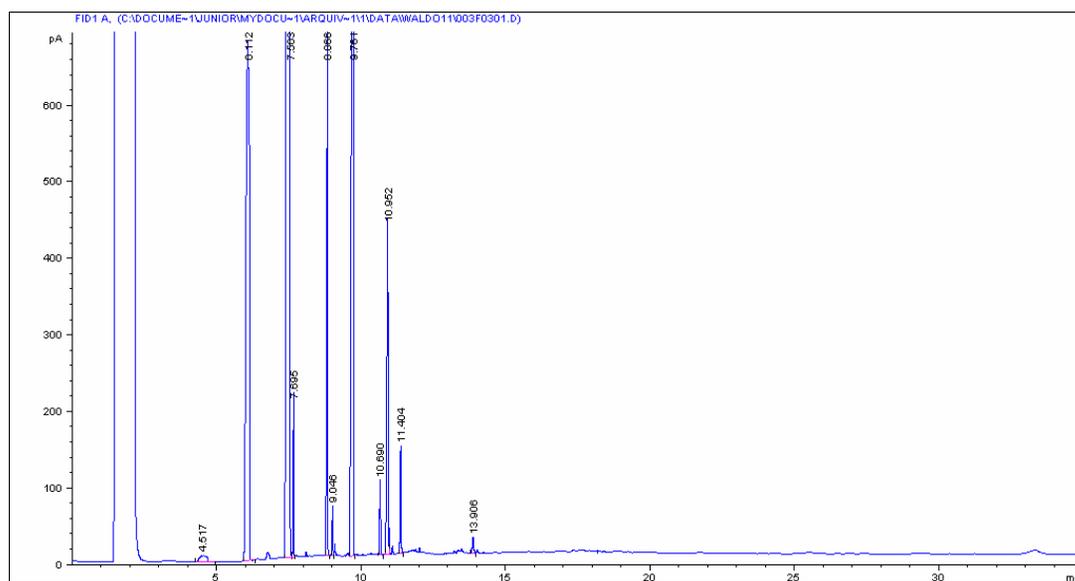


Figura 12: Cromatograma da gordura purificada de ucuúba.

Tabela 12: Composição em ácidos graxos da gordura purificada de ucuúba:

| Ácido Graxo | Mol % |
|-------------|-------|
| C8: 0 | - |
| 10:0 | 0,7 |
| 12:0 | 17,3 |
| 14:0 | 72,9 |
| 14:1 | 0,8 |
| 16:0 | 3,9 |
| 16:1 | 0,3 |
| 18:0 | 0,5 |
| 18:1 | 2,7 |
| 18:2 | 0,8 |
| 20:0 | 0,1 |

O ácido graxo predominante na gordura de ucuúba é o ácido mirístico (C14:0) com 72,9%, sendo que o ácido láurico (C12:0) foi o segundo em maior quantidade (17,3%).

O perfil de ácidos graxos encontrado é muito semelhante ao reportado por Barufaldi et al., 1975, porém apresenta valores superiores de ácido mirístico que os obtidos por Rodrigues (1972) e USDA (1999) de 61,3 e 63,4% respectivamente.

Composição Triacilglicerídica

A composição triacilglicerídica da gordura purificada de ucuúba é mostrada na Figura 13 pelo cromatograma (CLAE) e na Tabela 13.

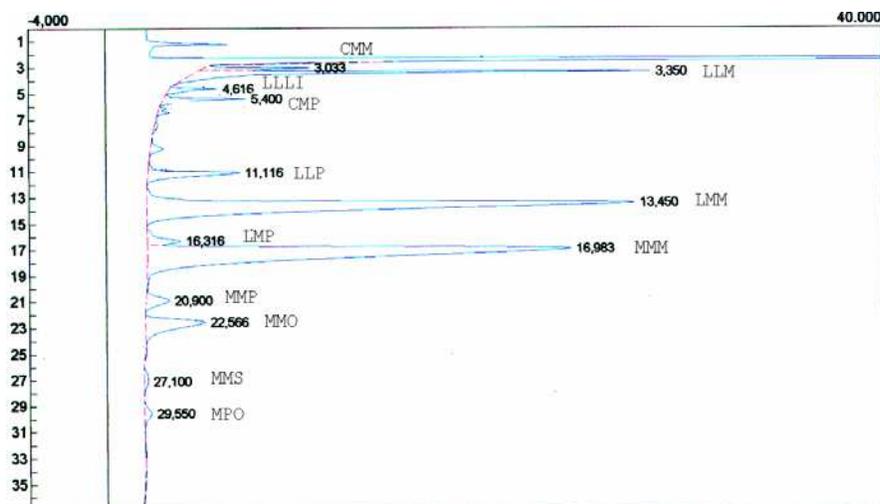


Figura 13: Cromatograma da gordura purificada de ucuúba. C= ácido cáprico; L= láurico; M= mirístico; P= palmítico; S= esteárico; O= oléico; LI = linoléico.

Tabela 13: Composição triacilglicerídica da gordura purificada da ucuúba.

| Triacilgliceróis | Isômeros Possíveis | Num. de Carbonos | Num. de duplas | Num. de partição | % |
|------------------|--------------------|------------------|----------------|------------------|------|
| CMM | 3 | 38 | 0 | 38 | 1,9 |
| LLM | 3 | 38 | 0 | 38 | 9,0 |
| LLLI | 2 | 42 | 2 | 38 | 1,2 |
| CMP | 6 | 40 | 0 | 40 | 2,0 |
| LLP | 3 | 40 | 0 | 40 | 4,0 |
| LMM | 3 | 40 | 0 | 40 | 34,3 |
| LMP | 6 | 42 | 0 | 42 | 1,8 |
| MMM | 1 | 42 | 0 | 42 | 38,4 |
| MMP | 3 | 44 | 0 | 44 | 1,7 |
| MMO | 2 | 46 | 1 | 44 | 4,9 |
| MMS | 3 | 46 | 0 | 46 | 0,2 |
| MPO | 4 | 48 | 1 | 46 | 0,7 |

Dado o alto teor de ácido mirístico presente na gordura purificada de ucuúba, praticamente 10 triacilgliceróis estão presentes na mesma, sendo a trimiristina (MMM= 38,4%) e a lauril dimiristina (LMM= 34,3%), os mais importantes. A composição triacilglicerídica é semelhante à proposta por Barufaldi (1975) (Tabela 4), considerando que esta última foi determinada em gordura bruta (87,8% de triacilgliceróis).

Estabilidade Oxidativa OSI

O gráfico da estabilidade oxidativa da gordura de ucuúba determinado no OSI pode ser visto na Figura 14.

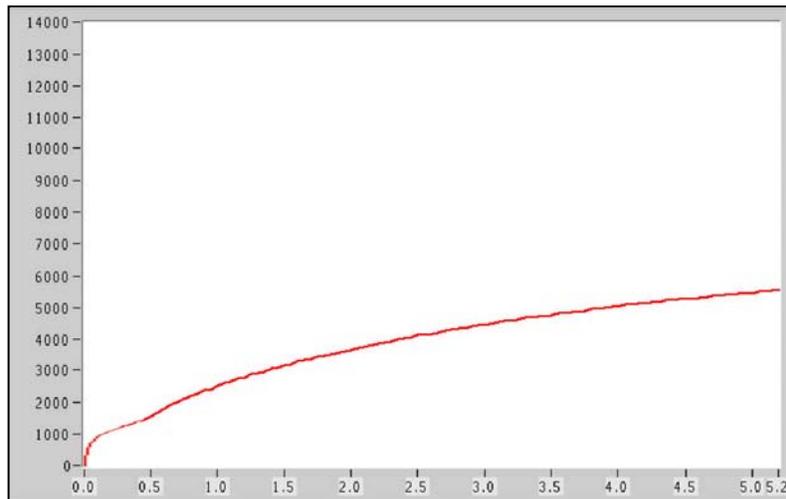


Figura 14: Estabilidade oxidativa da gordura purificada de ucuúba (110°C).

Por ser uma gordura com alto teor de ácidos graxos saturados, observa-se uma alta estabilidade oxidativa (maior que 44,6 horas).

Índice de Peróxido, Ácidos Graxos Livres e Índice de Iodo.

A Tabela 14 mostra os resultados das determinações de índice de peróxido, ácidos graxos livres, ponto de fusão em capilar aberto e índice de iodo, para a gordura de ucuúba bruta e purificada.

Tabela 14: Índice de peróxido, acidez e índice de iodo na gordura de ucuúba bruta e purificada.

| Análise | Ucuúba Bruta | Ucuúba Purificada |
|---|---------------------|--------------------------|
| Ácidos Graxos Livres (% mirístico) | 12,9 | 0,6 |
| Índice de Peróxido (meq O ₂ /kg amostra) | nd | nd |
| Índice de Iodo (% iodo absorvido) | 16 | 15 |
| Ponto de Fusão Capilar Aberto (°C) | 41 | 41,4 |

Obs: nd = não detectado

A gordura de ucuúba bruta apresentava alto teor de ácidos graxos livres (12,9%) e foi reduzido para 0,6%, uma eficiência de 95%. O índice de peróxido não foi detectado nas condições do teste e o índice de iodo e o ponto de fusão em capilar aberto, da gordura de ucuúba purificada, não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores relativos à gordura de ucuúba bruta.

Os valores de ácidos graxos livres, índice de iodo são muito semelhantes aos reportados por Pinto (1951) (10,7-17,2; 9,0-16,9, respectivamente). O ponto de fusão capilar reportado por Pesce (1941) foi de 45° C enquanto que as análises das amostras de gordura de ucuúba resultaram em um ponto de fusão em capilar aberto em torno de 41° C.

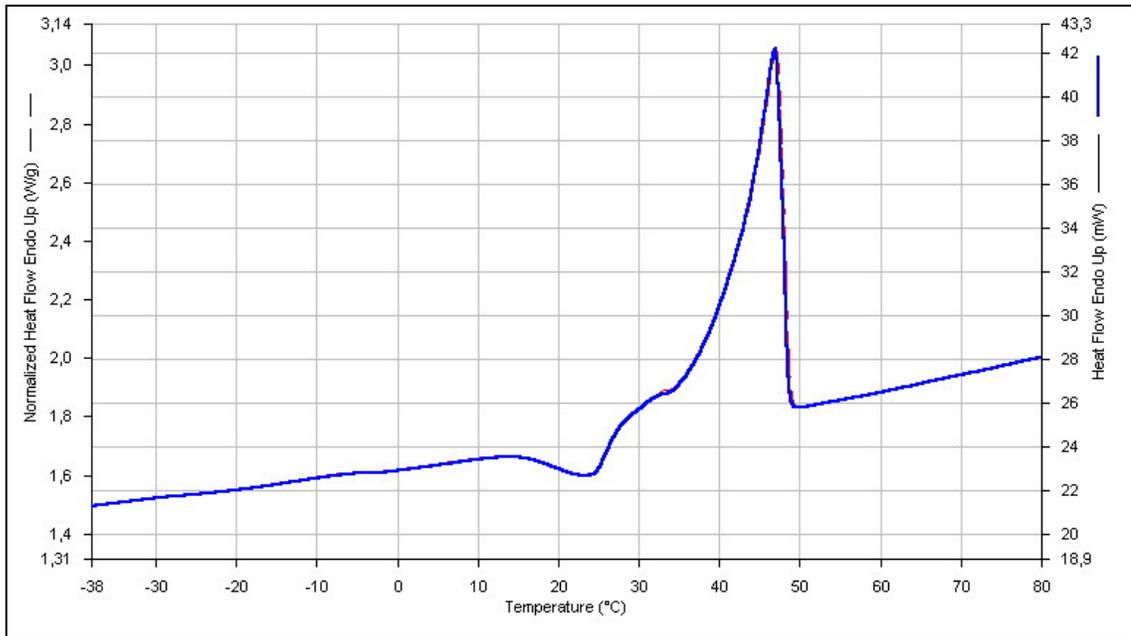
Curvas de Fusão e Cristalização da gordura purificada de ucuúba determinadas por DSC

Existem poucos trabalhos disponíveis relacionados à gordura de ucuúba e nenhum relata as propriedades térmicas desta gordura.

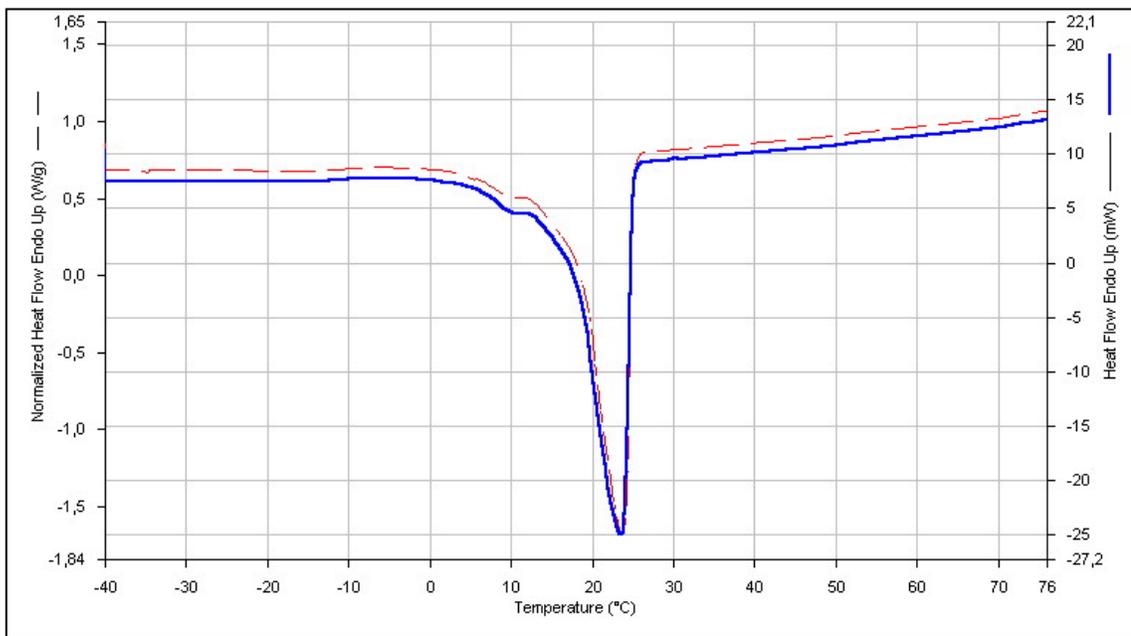
A Figura 15 mostra os termogramas de fusão (a) e cristalização (b) da gordura de ucuúba. Os parâmetros de avaliação, calculados a partir dos termogramas foram:

Para fusão: Temperatura onset = 40,47°C, Temperatura de Pico = 46,85°C.

Para Cristalização: Temperatura onset = 20,22°C, Temperatura de Pico = 23,67°C.



(a)



(b)

Figura 15: Termogramas de Fusão 5°C/min. (a) e Cristalização 10°C/min. (b) da gordura de ucuúba.

Analisando a curva de fusão (Figura 15a) nota-se um único pico endotérmico e uma faixa de fusão estreita, típico de gorduras com triacilgliceróis trisaturados, não foram observados picos na região dos insaturados. A gordura de ucuúba possui um pico estreito e localizado na faixa de 40 a 50° C denotando uma gordura onde se predomina apenas alguns tipos de triacilgliceróis. Este pico agudo e único também denota a ausência de formas polimórficas de cristalização. Este resultado já poderia ser previsto ao analisar-se o perfil de ácidos graxos (Tabela 11) e a sua composição triacilglicerídica (Tabela 12).

Tieko (1994) relatou o comportamento térmico da estearina de palmiste possuindo perfil semelhante ao da gordura de ucuúba, mas deslocado a uma temperatura mais baixa. Ambas possuem picos bem estreitos e agudos.

A curva de cristalização mostra também a presença de um pico único e agudo na região dos saturados e denota a também a ausência de polimorfismos.

A partir do termograma de fusão pode-se calcular o teor de sólidos da gordura, os quais são apresentados obtidos são apresentados na Figura 16.

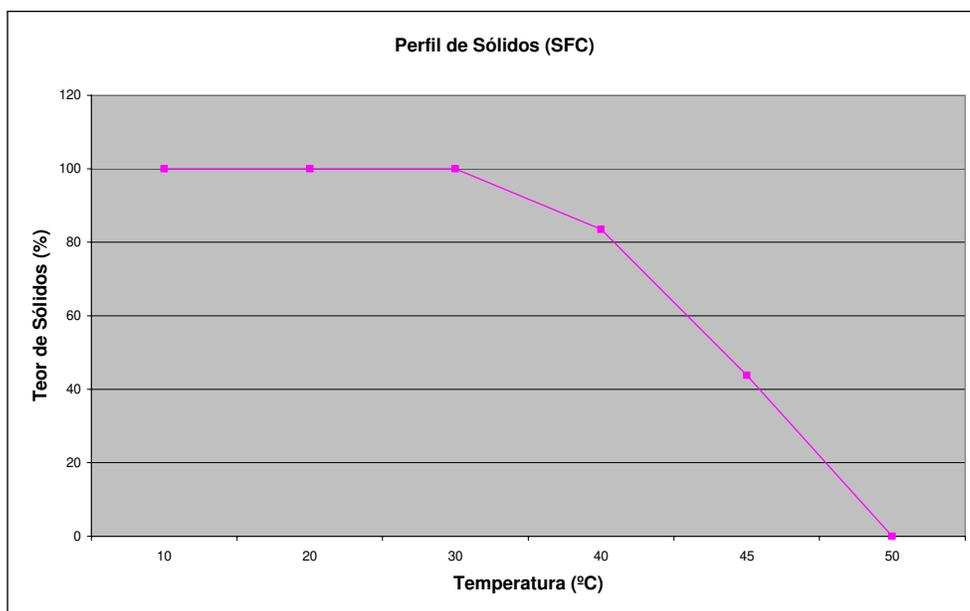


Figura 16: Curva de sólidos da gordura de ucuúba, obtido a partir do termograma de fusão (Figura 13a).

A curva de sólidos mostra que a gordura de ucuúba ainda possui um teor de sólidos de 83,5% a 40° C somente a 50° C ela está totalmente fundida. Portanto trata-se de um material extremamente duro para aplicações em alimentos. A única alternativa para sua utilização é a modificação de suas propriedades térmicas, por exemplo via interesterificação.

Produção de Ésteres a partir de Óleos de Canola e Algas (DHASCO®).

Os óleos de canola e algas (DHASCO®) foram totalmente transformados em ésteres etílicos neutros, para que os únicos triacilgliceróis envolvidos na reação de transesterificação fossem os provenientes da gordura purificada de ucuúba.

Nas Figuras 17 a 18 e Tabelas 15 e 16 mostram-se os dados da composição dos ésteres etílicos de óleo de canola e algas.

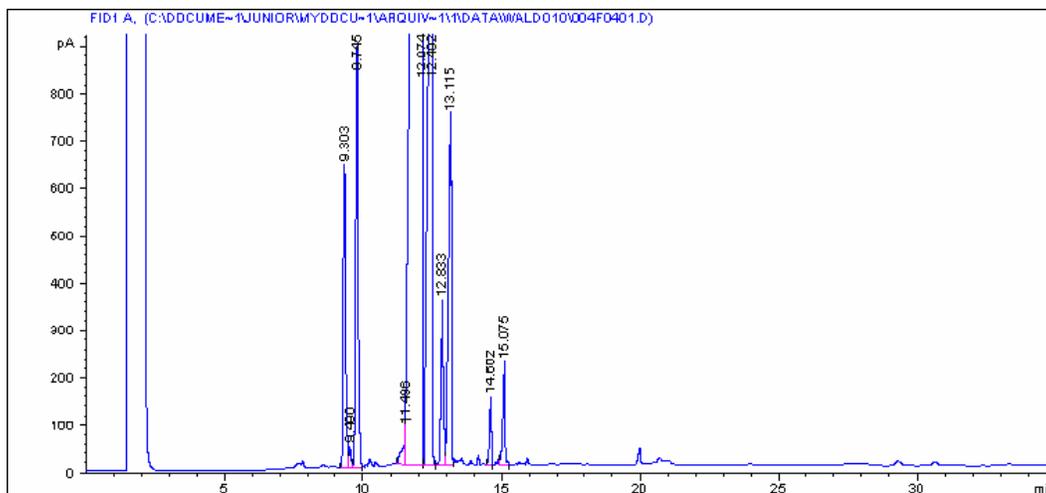


Figura 17: Cromatograma da Composição dos ésteres etílicos obtidos a partir de óleo de canola.

Tabela 15: Composição em ácidos graxos do éster etílico de óleo de canola.

| Ácido Graxo | % |
|-------------|------|
| 16:0 | 5,3 |
| 16:1 n-7 | 0,3 |
| 18:0 | 0,5 |
| 18:1 n-9 | 63,4 |
| 18:2 n-6 | 20,0 |
| 18:3 n-6 | 2,3 |
| 18:3 n-3 | 6,6 |
| 20:0 | 0,5 |
| 20:1 | 1,0 |

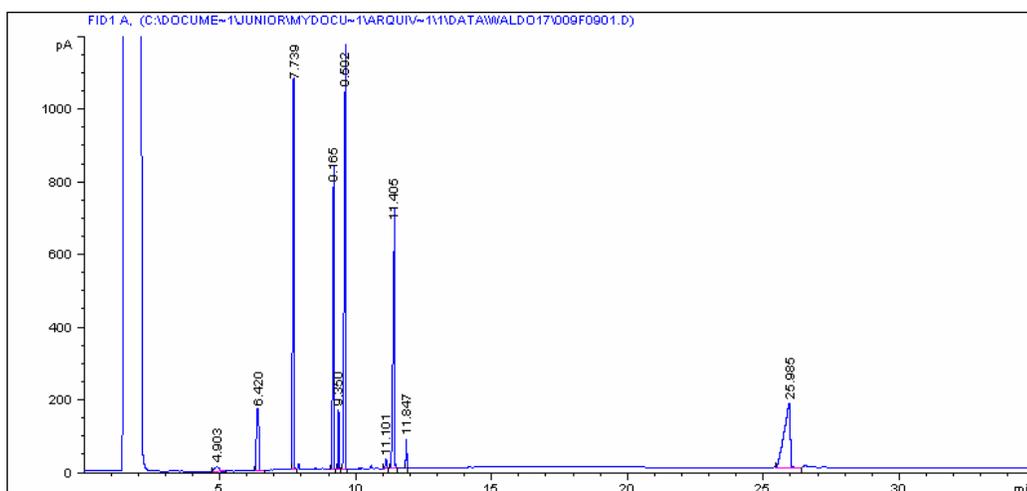


Figura 18: Cromatograma da Composição dos ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

Tabela 16: Composição em ácidos graxos do éster etílico de óleo de algas (DHASCO®).

| Ácido Graxo | % | Especificação* (%) |
|-------------|------|--------------------|
| 10:0 | 1,1 | 0,58 |
| 12:0 | 5,9 | 3,87 |
| 14:0 | 18,5 | 14,22 |
| 14:1 | 0,6 | 0,17 |
| 16:0 | 15,3 | 13,61 |
| 16:1 n-7 | 2,1 | 1,75 |
| 18:0 | 0,7 | 0,61 |
| 18:1 n-9 | 21,9 | 20,28 |
| 18:2 n-6 | 1,6 | 1,62 |
| 22:6n-3 | 32,4 | 42,34 |

*Martek Biosciences Co. Lot num.: 1800000957.

Os ésteres obtidos a partir de óleos de canola e algas refletem sua composição em ácidos graxos. Canola com alta proporção de ácido graxo oléico (18:1 63,4%) e algas com alto teor de DHA (C22:6 32,4%).

Ao se comparar o perfil de ácidos graxos relatados na especificação do fabricante (Martek) com as determinações no éster etílico, nota-se uma diminuição do teor de DHA possivelmente devido às várias etapas envolvidas no processo de obtenção dos ésteres, que expõem o óleo a condições que propiciam a sua oxidação.

3.2 - Síntese de Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba

3.2.1 - Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba e Ésteres Etilícos de Óleo de Canola

A Tabela 17 apresenta os resultados de incorporação de ácido oléico (%) na molécula de triacilglicerol da gordura de ucuúba e as condições de cada experimento realizado. Esta tabela foi organizada no sentido crescente das temperaturas.

Os resultados mostram uma taxa de incorporação entre 41,8 e 56,1% de ácido oléico. Considerando que a enzima utilizada Lipozyme IM 60 é uma enzima sn 1,3 específica, a incorporação teórica máxima seria 66,6%. Portanto, observa-se que nas faixas testadas a incorporação foi alta.

Diversos pesquisadores trabalhando com Lipozyme IM 60 têm obtido taxas de incorporação de ácido caprílico em diferentes óleos utilizando condições específicas, por exemplo: óleo de amendoim com 30% de incorporação (Lee & Akoh, 1998), óleo de canola com 59,9% (Willis, 1999) e 40,1% (Xu et al, 200c).

Tabela 17: Desenho experimental e porcentagem molar do ácido oléico incorporado no lipídio resultante da transesterificação enzimática da gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de canola.

| Razão Molar 1: | Óleo de Ucuúba (mg) | Éster Etílico de Canola (mg) | Substrato (mg) | Enzima* | | Tempo (h) | Temperat. (°C) | Oléico Incorporado (%) |
|----------------|---------------------|------------------------------|----------------|---------|------|-----------|----------------|------------------------|
| | | | | (%) | (mg) | | | |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 5 | 18,6 | 12 | 45 | 44,0 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 5 | 18,6 | 36 | 45 | 43,9 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 5 | 32,2 | 12 | 45 | 52,9 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 5 | 32,2 | 36 | 45 | 52,1 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 15 | 55,8 | 12 | 45 | 43,5 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 15 | 55,8 | 36 | 45 | 44,4 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 15 | 96,6 | 12 | 45 | 53,5 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 15 | 96,6 | 36 | 45 | 52,2 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 24 | 45 | 51,2 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 12 | 55 | 51,7 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 36 | 55 | 51,0 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 10 | 37,2 | 24 | 55 | 41,8 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 10 | 64,4 | 24 | 55 | 52,5 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 5 | 25,4 | 24 | 55 | 55,4 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 15 | 76,2 | 24 | 55 | 56,1 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 24 | 55 | 48,2 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 24 | 55 | 48,8 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 24 | 55 | 54,2 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 5 | 18,6 | 12 | 65 | 44,2 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 5 | 18,6 | 36 | 65 | 44,5 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 5 | 32,2 | 12 | 65 | 52,7 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 5 | 32,2 | 36 | 65 | 52,5 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 15 | 55,8 | 12 | 65 | 44,9 |
| 4 | 100 | 272 | 372 | 15 | 55,8 | 36 | 65 | 45,2 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 15 | 96,6 | 12 | 65 | 52,5 |
| 8 | 100 | 544 | 644 | 15 | 96,6 | 36 | 65 | 52,4 |
| 6 | 100 | 408 | 508 | 10 | 50,8 | 24 | 65 | 49,8 |

* Lipozyme IM 60, Novo Nordisk

Com os resultados da Tabela 17, processados pelo programa de computador Modde 5.0, foi determinada, inicialmente, a qualidade de ajuste do modelo (após seu refinamento) para a resposta de incorporação de ácido oléico nos triacilglicerídeos da ucuúba, mostrada na Figura 19 (Resumo de Ajuste). Os valores de R^2 e Q^2 foram 0,929 e 0,867, respectivamente. Valores próximos de 1 indicam um modelo excelente. Para um modelo pobre o valor de Q^2 pode ser negativo. Portanto o modelo gerado foi considerado excelente.

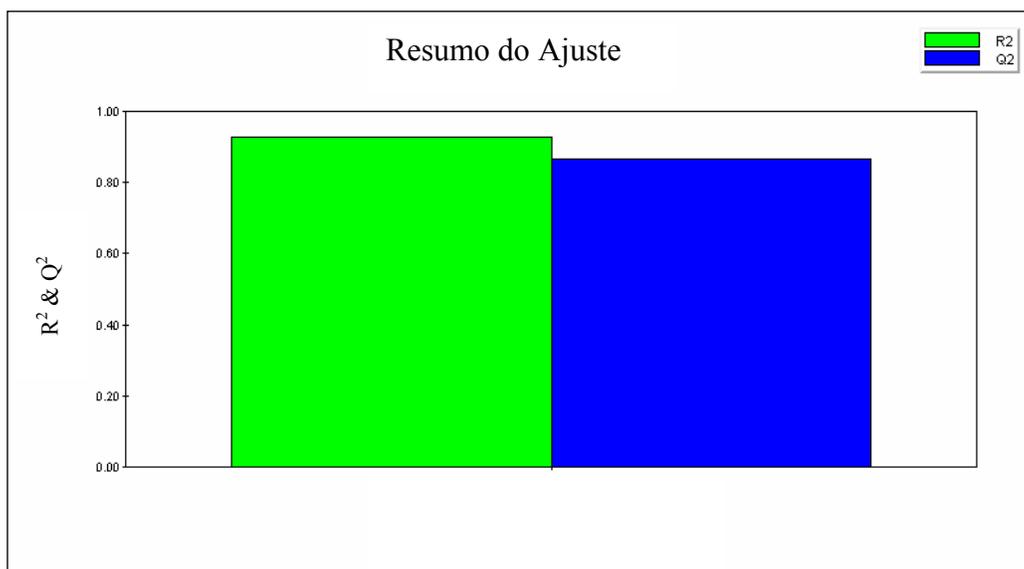


Figura 19: Valores de R^2 e Q^2 mostrando o ajuste do modelo estatístico na incorporação de ácido oléico no triacilglicerídeo transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.

A Figura 20 mostra o gráfico de falta de ajuste ANOVA (erro do modelo), onde:

- **SD-LoF:** Mostra a variação da resposta devido à falta de ajuste do modelo ajustada para os graus de liberdade e na mesma unidade. Este é a raiz quadrada da media quadrada da falta de ajuste.
- **SD-Pe:** Mostra a variação devido a observação replicada ajustada para os graus de liberdade e na mesma unidade. Este é a raiz quadrada da media quadrada do erro puro.

- **SD-Pe*sqrt(F(crit))**: Mostra o SD-Pe (segunda barra) multiplicado pela raiz quadrada do F crítico. Este é o valor da distribuição F sobre a qual o Sd-LoF é estatisticamente significativo em um nível de confiança de 95%.

Como a terceira barra é maior que a primeira, ou seja $SD-Pe * \sqrt{F(crit)} > SD-LoF$, o modelo não apresenta falta de ajuste significativa ao nível de 5%.

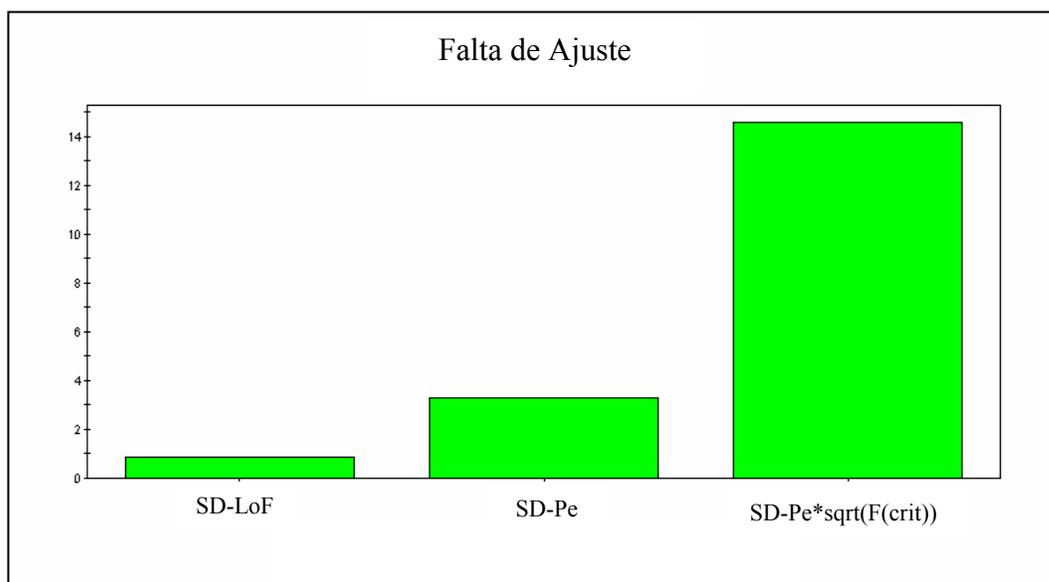


Figura 20: Gráfico ANOVA da Falta de Ajuste do modelo para incorporação de ácido oléico no triacilglicerídeo transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.

A Figura 21 apresenta a curva de probabilidade normal dos resíduos, nota-se que eles razoavelmente seguem uma linha reta e que não há pontos marginais, indicando que os resíduos estão normalmente distribuídos.

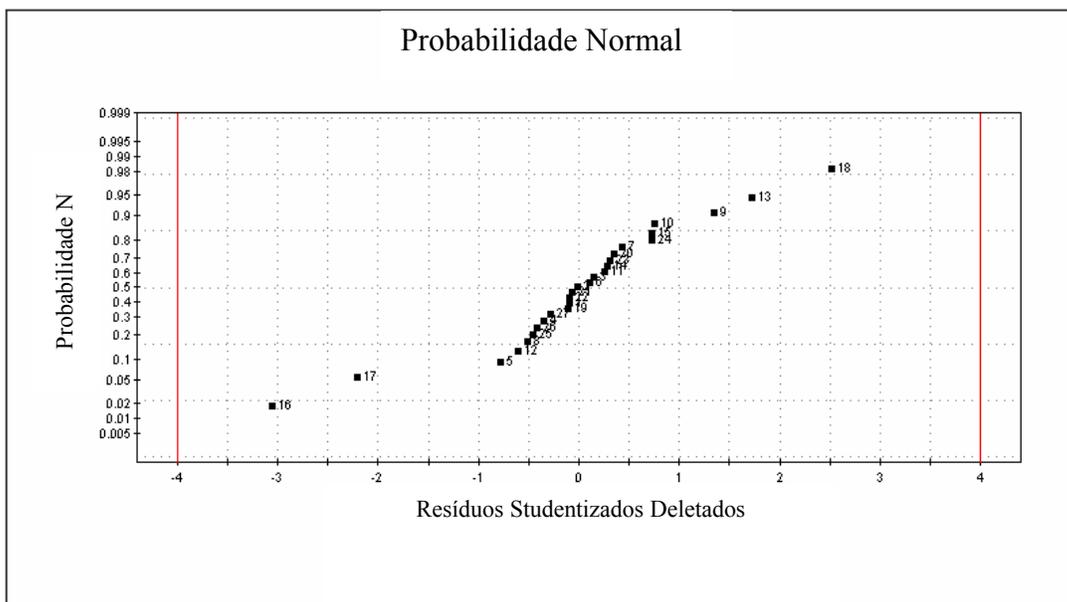


Figura 21: Curva de probabilidade normal dos resíduos para incorporação de ácido oléico no triacilglicerídeo transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.

Os coeficientes da equação que descreve o modelo, referente aos dados escalonados e centrados, com intervalos de confiança representados por barras de erro são mostrados na Figura 22 e na Tabela 18, os coeficientes referem-se aos dados escalonados e centrados.

Pelo gráfico nota-se que a temperatura, o tempo de reação e a % de enzima em relação ao substrato apresentaram menor influência na resposta quando comparada a % molar ou às interações de segunda ordem.

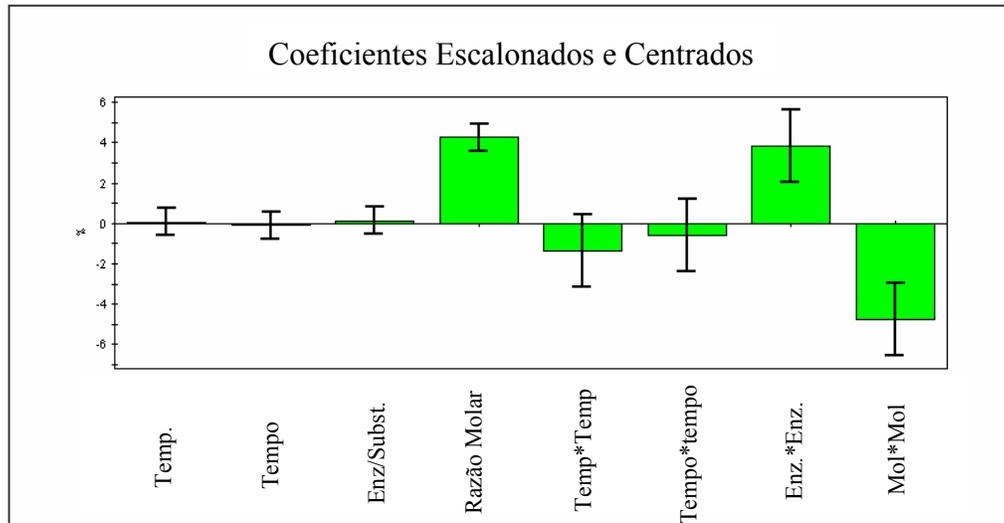


Figura 22: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.

Tabela 18: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola.

| Parâmetros da Equação | Coefficientes | Erro Padrão |
|-----------------------------|---------------|-------------|
| Constante | 51,4 | 0,50 |
| Temperatura | 0,06 | 0,32 |
| Tempo | -0,08 | 0,32 |
| %Enzima/Subs. | 0,12 | 0,32 |
| Razão Molar | 4,26 | 0,32 |
| (Temperatura) ² | -1,38 | 0,85 |
| (Tempo) ² | -0,57 | 0,85 |
| (Enzima/Subs.) ² | 3,87 | 0,85 |
| (Razão Molar) ² | -4,79 | 0,85 |

Como se pode observar as variáveis tempo e temperatura apresentaram menor influência na incorporação de ácido oléico em relação a %enzima/Subs. e a razão molar

Com o modelo ajustado podem-se analisar as condições nas quais há uma maior incorporação de ácido oléico. As Figuras 23 e 24 mostram as superfícies geradas na incorporação de ácido oléico nos LEs produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de canola em relação ao tempo e temperatura dos experimentos.

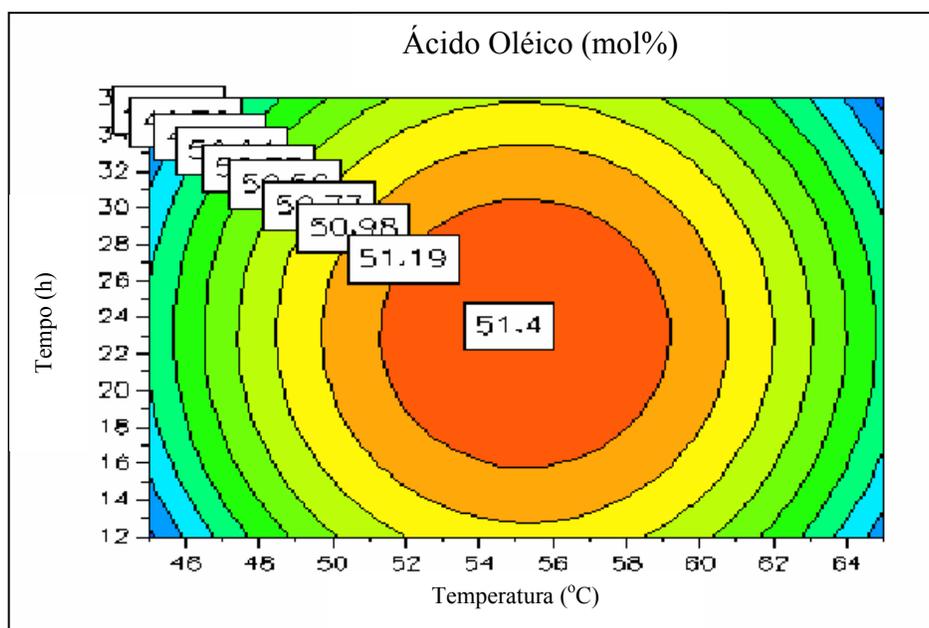


Figura 23: Superfície de contorno da incorporação de ácido oléico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).

A análise da Figura 23 mostra que se a temperatura estiver fora da faixa ótima da enzima a incorporação de ácido oléico diminuí. Com relação ao tempo de reação, se ele for curto demais a reação não ocorre totalmente e se ele for longo demais a enzima, provavelmente, atuará nos próprios LEs formados (explicando a diminuição da incorporação de ácido oléico após um tempo de reação superior a cerca de 30h).

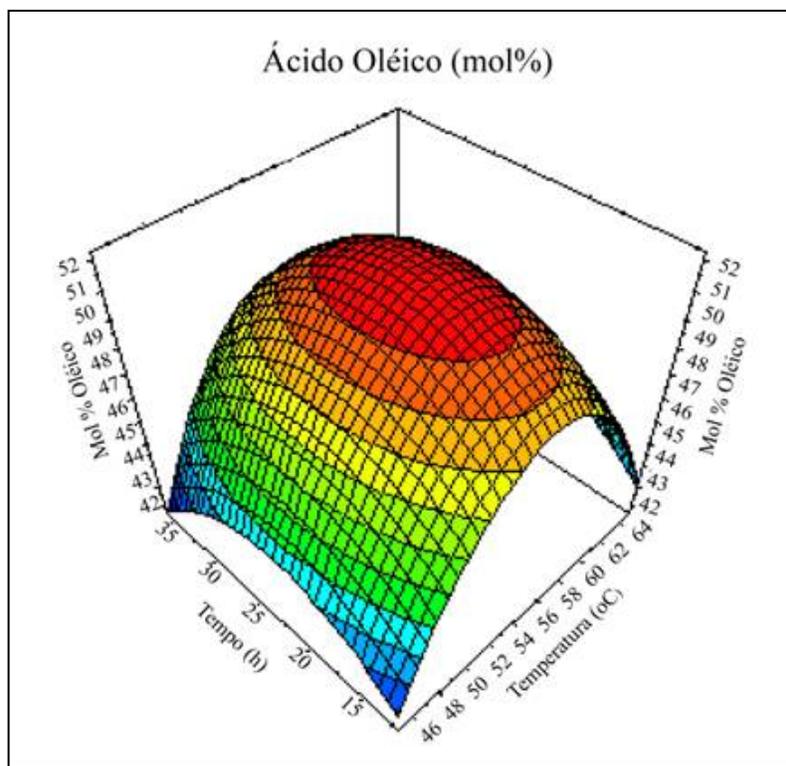


Figura 24: Superfície de resposta da incorporação de ácido oléico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).

Como se pode observar, segundo o modelo, a maior incorporação de ácido oléico (51,4 %) ocorre numa faixa de temperatura entre 49,8 °C até 60,8 °C e um tempo de contato de 12,7 até 33,3 horas.

As Figuras 25 e 26 mostram a variação da incorporação do ácido oléico com a razão molar e com a % de enzima em relação ao substrato.

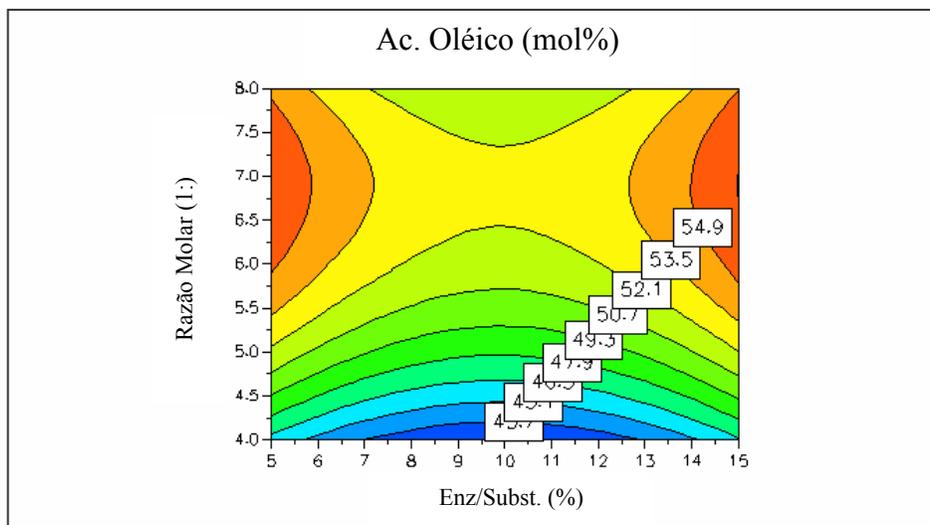


Figura 25: Superfície de contorno da incorporação do ácido oléico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).

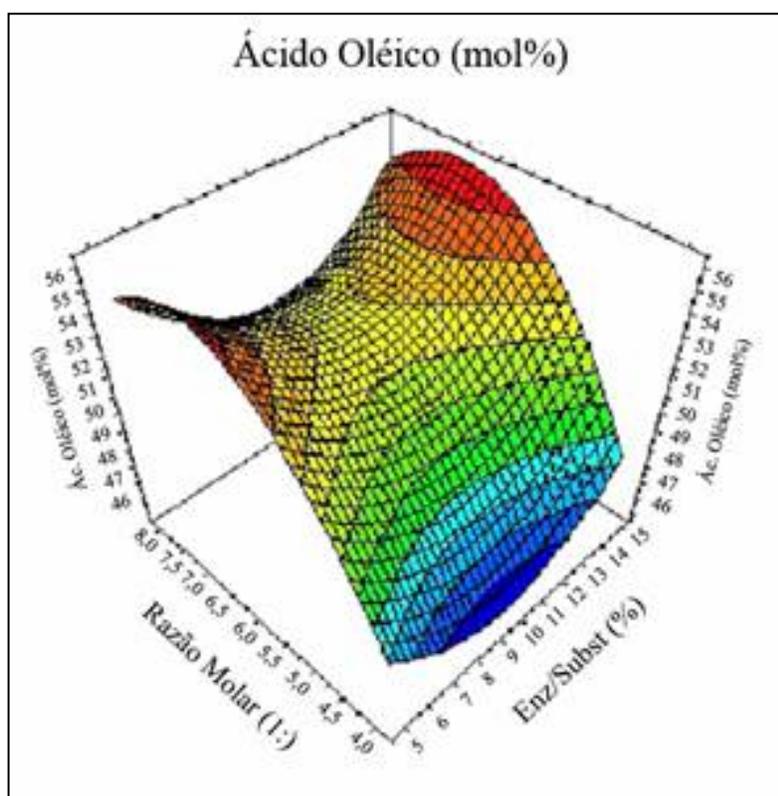


Figura 26: Superfície de resposta da incorporação do ácido oléico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).

Pelas Figuras 25 e 26 conclui-se que a maior incorporação de ácido oléico (54,9%) ocorre nas faixas de porcentagem de enzima entre 5 a 7 % e a razão molar entre 1:6 e 1:8.

Dos resultados obtidos para a reação de transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de canola pode-se afirmar que as condições ótimas são:

Temperatura (° C): 49,8 – 60,8

Tempo (h): 12,7 – 33,3

Enz/Substr (%): 5 – 7

Razão Molar: 1:6 – 1:8

Considerando o ponto de vista prático ou econômico, poder-se-ia realizar a transesterificação nos valores mínimos de cada variável, ou seja, 49,8° C, 12,7 h, 5% de enzima e razão molar de 1:6. Mas teoricamente qualquer ponto escolhido arbitrariamente dentro das faixas encontradas produziria resultados com máxima incorporação de ácido oléico.

Shieh, Akoh *et al.* (1995) estudaram a incorporação de ácido cáprico em trioleína pela Lipozyme IM. Avaliando as variáveis da reação através de metodologia de superfície de resposta. Para uma incorporação de cerca de 95% as condições da reação foram: razão molar de 1:6, % de enzima de 10%, tempo de reação de 30 h e temperatura de 25°C.

3.2.2 - Lipídios Estruturados (LEs) de Ucuúba e Ésteres Etilícos de Óleo de Algas (DHASCO®).

A Tabela 19 mostra os resultados da incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA) (%) na molécula de triacilglicerol da gordura de ucuúba e as condições de cada experimento realizado. Esta tabela foi organizada no sentido crescente das temperaturas.

Os resultados mostram uma taxa de incorporação entre 20,6 e 27,6% de ácido oléico. Considerando que a enzima utilizada SP435 é uma enzima não específica, o LE resultante seria uma combinação aleatória dos diversos ácidos graxos na molécula de glicerol. Como o óleo de algas contém no máximo 32,4% de DHA, a incorporação deste ácido graxo nas faixas testadas foi considerável, pois corresponde a 85% do ácido DHA disponível.

Diversos pesquisadores trabalhando com a lipase SP435 têm obtido diferentes taxas de incorporação em diferentes substratos utilizando condições específicas, por exemplo:

Fomuso e Akoh (1998) analisaram a produção de LEs utilizando trilinoleína e tricaproína com a lipase SP 435 obtendo 41% dicaproillinoleína e 18% monocaproildilinoleína.

Huang e Akoh (1996a) trabalharam com éster etílico de ácido caprílico e trioleína na síntese de LEs catalizada pela lipase SP435 produzindo 62,0% dicaprilooleína e 33,5% monocaprilooleína.

Borg, et al., 2000 estudou a síntese enzimática de tri-docosahexaenoilglicerol a partir de glicerol e etil docosahexaenoato em um meio sem solvente utilizando Novozym SP 435 obtendo 100% de conversão após 10 h.

Tabela 19: Desenho experimental e porcentagem molar do ácido docosahexaenóico (DHA) incorporado no lipídio resultante da transesterificação enzimática de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

| Razão Molar 1: | Óleo Ucuúba (mg) | Etil Éster de DHASCO® (mg) | Substrato (mg) | Enzima* | | Tempo (h) | Temperat. (°C) | DHA Incorporado (%) |
|----------------|------------------|----------------------------|----------------|---------|-------|-----------|----------------|---------------------|
| | | | | (%) | (mg) | | | |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 5 | 34 | 12 | 45 | 24,2 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 5 | 34 | 36 | 45 | 25,5 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 5 | 63 | 12 | 45 | 22,2 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 5 | 63 | 36 | 45 | 25,9 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 15 | 102 | 12 | 45 | 25,9 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 15 | 102 | 36 | 45 | 26,5 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 15 | 189 | 12 | 45 | 22,6 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 15 | 189 | 36 | 45 | 27,5 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 24 | 45 | 27,4 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 12 | 55 | 23,9 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 36 | 55 | 27,5 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 10 | 68 | 24 | 55 | 26,4 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 10 | 126 | 24 | 55 | 27,1 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 5 | 48,5 | 24 | 55 | 26,4 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 15 | 145,5 | 24 | 55 | 26,2 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 24 | 55 | 26,9 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 24 | 55 | 27,6 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 24 | 55 | 26,5 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 5 | 34 | 12 | 65 | 20,6 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 5 | 34 | 36 | 65 | 22,3 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 5 | 63 | 12 | 65 | 23,9 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 5 | 63 | 36 | 65 | 26,6 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 15 | 102 | 12 | 65 | 24,9 |
| 4 | 100 | 580 | 680 | 15 | 102 | 36 | 65 | 21,3 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 15 | 189 | 12 | 65 | 25,7 |
| 8 | 100 | 1160 | 1260 | 15 | 189 | 36 | 65 | 25,4 |
| 6 | 100 | 870 | 970 | 10 | 97 | 24 | 65 | 24,9 |

* Lipase SP435, Novo Nordisk

A Figura 27 mostra a qualidade do ajuste do modelo para a resposta, após o seu refinamento. Os valores de R^2 e Q^2 muito próximos de 1 indicam que o modelo gerado pelo programa Modde 5.0 está bem ajustado.

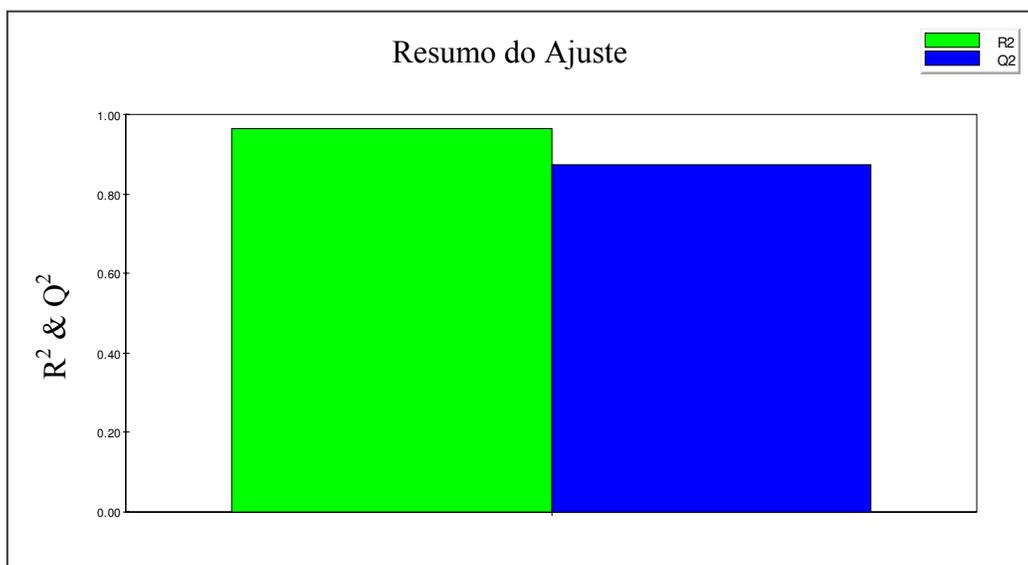


Figura 27: Valores de R^2 e Q^2 mostrando o ajuste do modelo estatístico na incorporação de ácido docosahexaenóico no triacilglicerídio transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

O gráfico ANOVA de falta de ajuste é apresentado na Figura 28, nota-se que o modelo não apresenta falta de ajuste.

A Figura 29 apresenta a curva de probabilidade normal dos resíduos, mostrando que eles razoavelmente seguem uma linha reta e que não há pontos marginais.

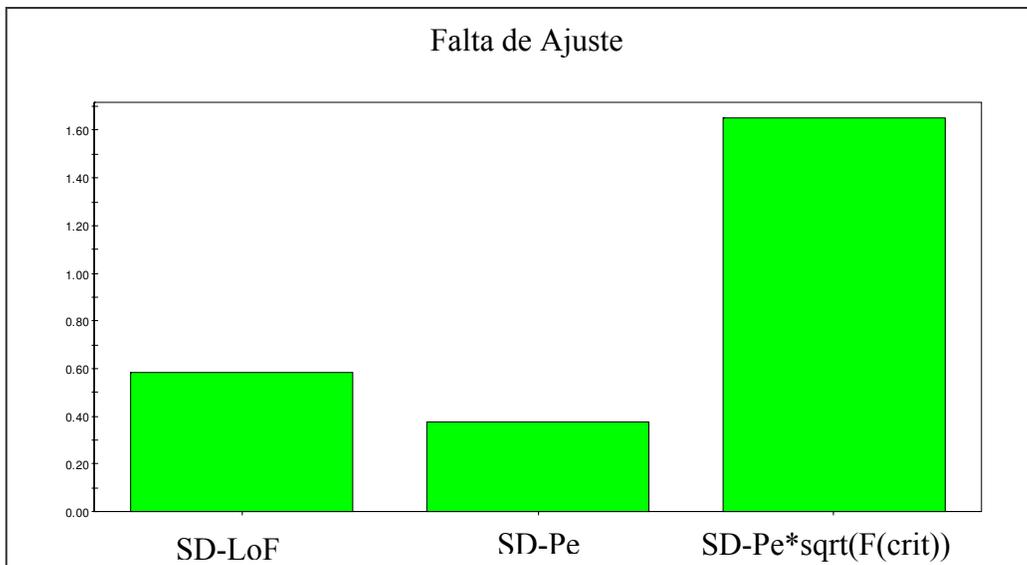


Figura 28: Gráfico ANOVA da Falta de Ajuste do modelo para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

Como descrito anteriormente (página 65) o modelo não apresenta falta de ajuste (3ª barra maior que a primeira) significativa ao nível de 5%.

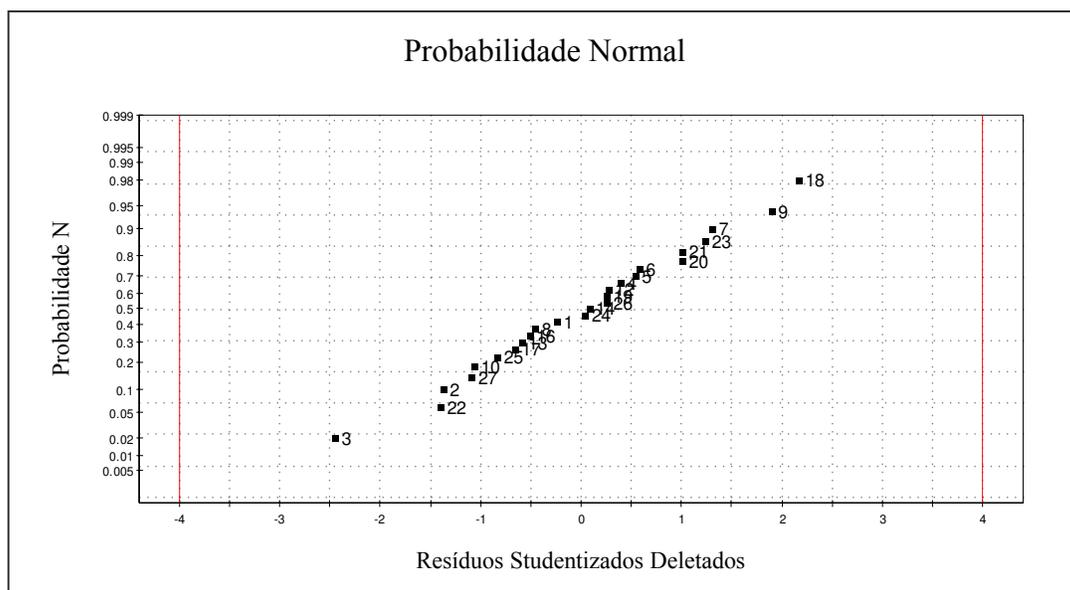


Figura 29: Curva de probabilidade normal dos resíduos para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

Os coeficientes da equação que descreve o modelo com intervalos de confiança representados por barras de erro são mostrados na Figura 30 e Tabela 20, os coeficientes referem-se aos dados escalados e centrados.

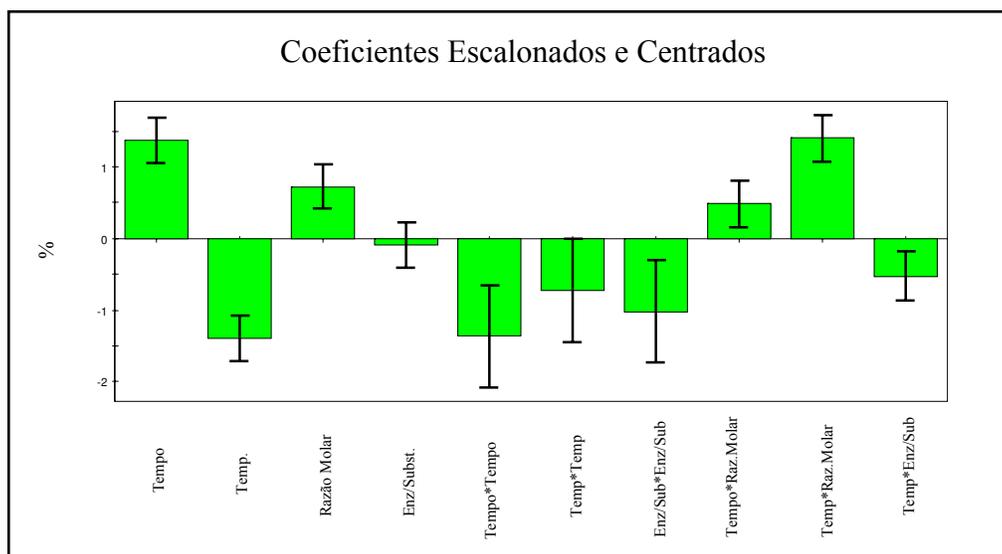


Figura 30: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalados e centrados) para incorporação de ácido docosaheptaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

Tabela 20: Coeficientes da equação que descreve o modelo (dados escalonados e centrados) para incorporação de ácido docosahexaenóico transesterificado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

| Parâmetros da Equação | Coeficientes | Erro Padrão |
|------------------------------|---------------------|--------------------|
| Constante | 26,67 | 0,2 |
| Tempo | 1,38 | 0,15 |
| Temperatura | -1,39 | 0,15 |
| Razão Molar | 0,73 | 0,14 |
| %Enz./Subs. | -0,08 | 0,15 |
| (Tempo) ² | -1,37 | 0,34 |
| (Temperatura) ² | -0,73 | 0,34 |
| (%Enz./Subs.) ² | -1,02 | 0,34 |
| Tempo*Razão Molar | 0,49 | 0,15 |
| Temperatura * Razão Molar | 1,40 | 0,15 |
| Temperatura *% Enz./Subs. | -0,53 | 0,16 |

Para esta reação a temperatura e o tempo de contato apresentaram coeficientes maiores que os da razão molar e da %Enz./Subs. O coeficiente negativo da temperatura indica que a incorporação de DHA diminui com o aumento da temperatura e o coeficiente positivo do tempo de contato indica que ao se aumentar o tempo a incorporação de DHA aumentará.

A %Enz./Subs estudada indica que, dentro da faixa estudada, a incorporação de DHA diminui com o aumento da mesma, provavelmente por limitações na transferência de massa.

Com o modelo ajustado podem-se analisar as condições nas quais há uma maior incorporação de ácido docosahexaenóico. As Figuras 31 e 32 mostram as superfícies geradas na incorporação do ácido docosahexaenóico nos LEs produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) em relação ao tempo e temperatura dos experimentos.

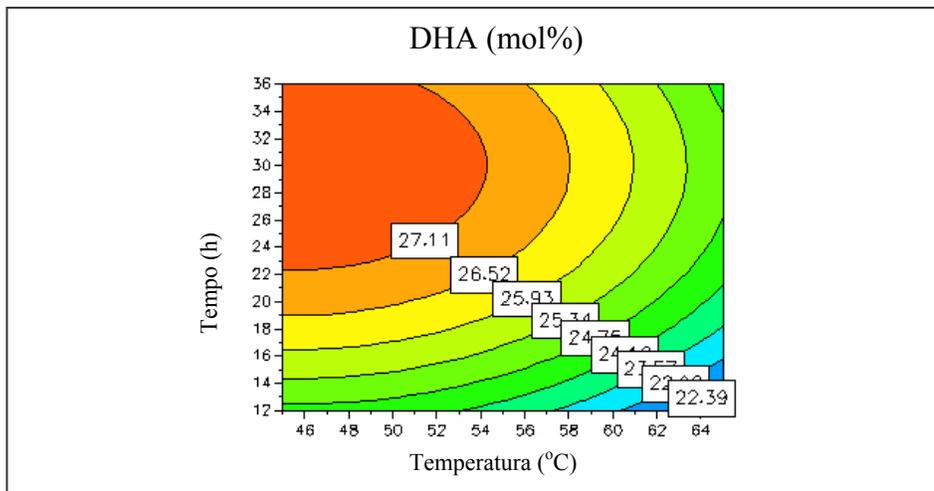


Figura 31: Superfície de contorno da incorporação de ácido docosahexaenóico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).

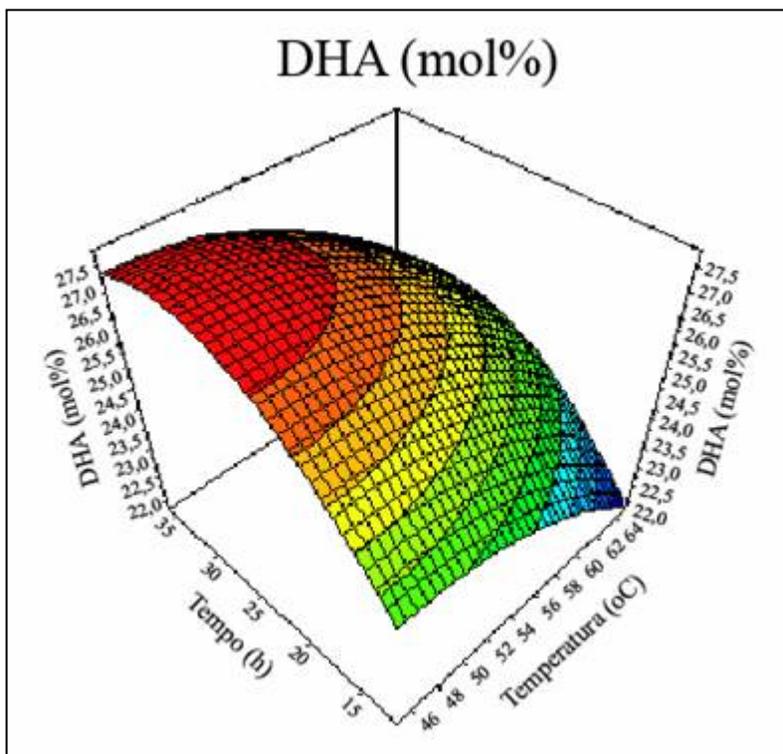


Figura 32: Superfície de resposta da incorporação de ácido docosahexaenóico em função do tempo e da temperatura na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis %Enz./Subs. e Razão Molar centradas em 10% e 1:6, respectivamente).

Muito provavelmente poder-se-ia ter escolhido uma faixa de temperatura mais baixa e um tempo de contato mais longo para se obter o ponto de inflexão da curva.

A análise das Figuras 31 e 32 mostra que a maior incorporação de DHA (27,1%) ocorre na faixa de temperatura de 45°C até 54°C e um tempo de contato acima de 22,4 horas.

As Figuras 33 e 34 mostram a variação da incorporação do DHA em função da razão molar e da % de enzima em relação ao substrato.

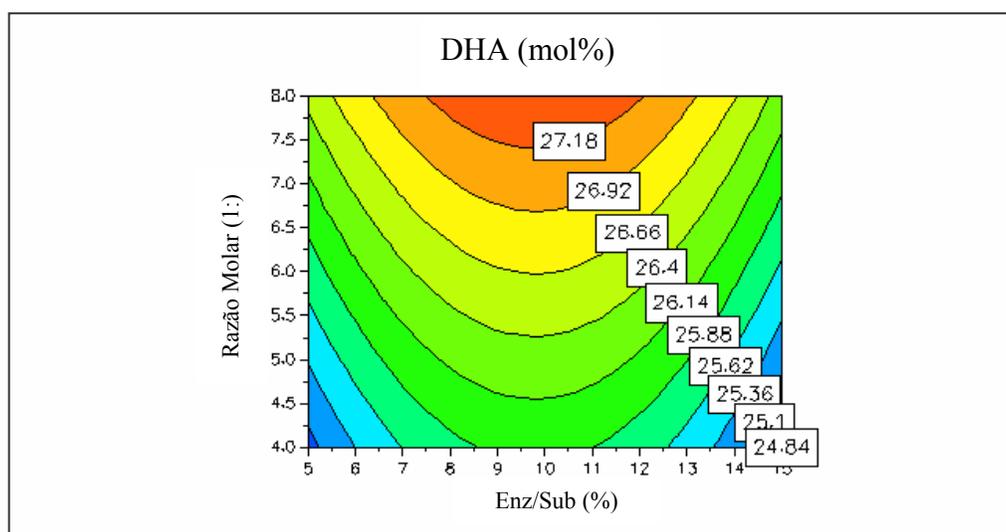


Figura 33: Superfície de contorno da incorporação do ácido docosahexaenóico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).

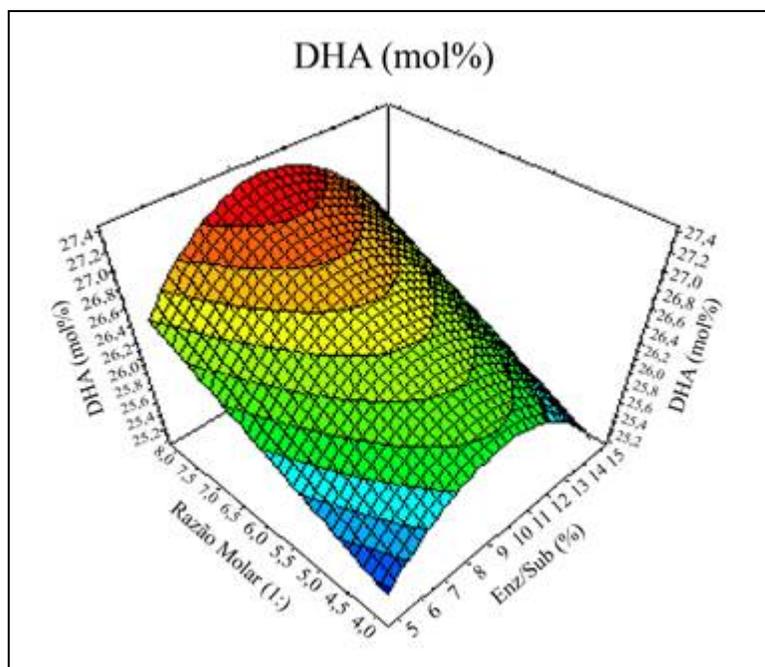


Figura 34: Superfície de resposta da incorporação do ácido docosahexaenóico em função da razão molar e da porcentagem de enzima na transesterificação de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) (Variáveis Temperatura e Tempo centradas em 55°C e 24 h, respectivamente).

Pelas Figuras 33 e 34 conclui-se que a maior incorporação de ácido docosahexaenóico (27,18%) ocorre nas faixas de razão molar maiores que 1:7 (ucuúba/substratos) e nas faixas de porcentagem de enzima em relação ao total dos substratos maiores que 6,5%.

3.3 - Ensaio em Escala Piloto

Os ensaios de produção em escala piloto foram realizados de acordo com os resultados dos experimentos anteriores considerando as faixas ótimas indicadas pela análise das superfícies de resposta:

Ensaio 1: Gordura de ucuúba e éster etílico de óleo de Canola com a enzima Lipozyme IM60:

Massa gordura de ucuúba: 100g

Massa éster de canola: 469g (razão molar 1:7 em relação ao ácido oléico)

Massa da enzima IM60: 39,8 g (7%)

Tempo de reação: 20 h

Temperatura: 52°C

Ensaio 2: Gordura de ucuúba e éster etílico de óleo de algas (DHASCO®) com a enzima SP435:

Massa gordura de ucuúba: 100g

Massa éster de canola: 932,6g (razão molar 1:7,5 em relação ao DHA)

Massa da enzima SP435: 39,8 g (7,75%)

Tempo de reação: 25 h

Temperatura: 53°C

A Figura 35 mostra o lipídio estruturado (a) e os resíduos separados (b) que foram coletados após a passagem pelo destilador.

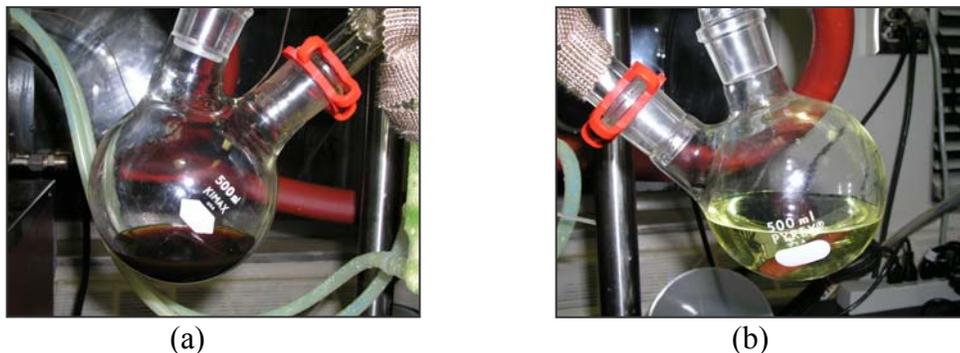


Figura 35: Lipídios estruturados (a) e resíduos (b) após destilação no “Short Path Distilator”.

A Tabela 21 apresenta o teor de ácidos graxos livres (AGL), o índice de iodo e o índice de peróxido dos lipídios estruturados resultantes dos ensaios piloto.

Tabela 21: Análises dos lipídios estruturados produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola e algas.

| Análise\Óleo | LE Canola | LE Algas |
|---|-----------|----------|
| AGL (% como ác. mirístico) | 1,2 | 2,6 |
| Índice de Iodo (% iodo absorvido) | 85 | 70 |
| Índice de Peróxido (meq peróxido/1000g) | 3,6 | 11,7 |

Os resultados, como esperado, mostram que foi incorporada uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados.

Os dados da Tabela 21 indicam que os LEs produzidos contêm uma quantidade elevada de ácidos graxos livres (AGL), indicando que o processo de purificação não foi completamente eficiente. Quando comparado com a gordura de ucuúba purificada (0,6 % AGL).

Ao se comparar o índice de iodo, constata-se um aumento em média de 400%, indicando o alto grau de eficiência da incorporação de ácidos graxos insaturados na produção de LEs nas condições dos ensaios.

Os valores de IP dos produtos (LEs) mostram que o processo ou matérias primas (ésteres) afetam o estado oxidativo dos mesmos.

A análise da composição em ácidos graxos do lipídio estruturado resultante dos Ensaios 1 e 2 é mostrado na Tabela 22 e nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

Tabela 22: Composição em ácidos graxos dos lipídios estruturados produzidos a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de canola e algas.

| Ácido Graxo | Canola (%) | Algas (%) |
|-------------|------------|-----------|
| 10:0 | - | 0.53 |
| 12:0 | 2,6 | 6.49 |
| 14:0 | 14,5 | 23.73 |
| 14:1 | | 0.23 |
| 16:0 | 4,3 | 16.12 |
| 16:1 | - | 1.79 |
| 18:0 | 2,1 | 1.54 |
| 18:1 | 473 | 21.64 |
| ni | 2,6 | - |
| 18:2 | 17,8 | - |
| ni | 1,3 | - |
| ni | 1,1 | - |
| 18:3 | 4,7 | - |
| 20:0 | 0,7 | - |
| 20:1 | 1,1 | - |
| 22:6 DHA | - | 26.2 |

Obs.: ni = não identificado

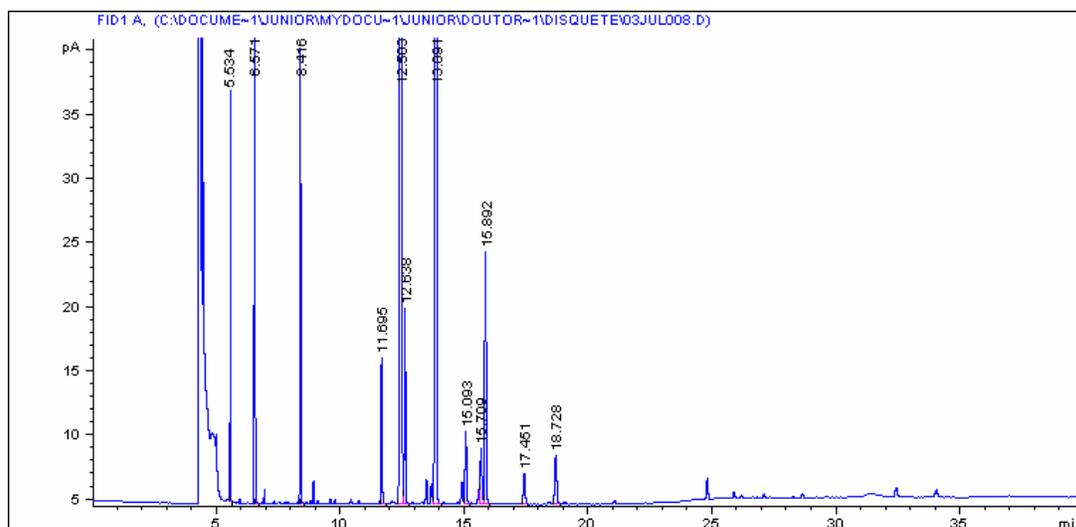


Figura 36: Cromatograma da composição em ácidos graxos do lipídio estruturado produzido a partir de gordura de ucuúba e éteres etílicos de óleo de canola.

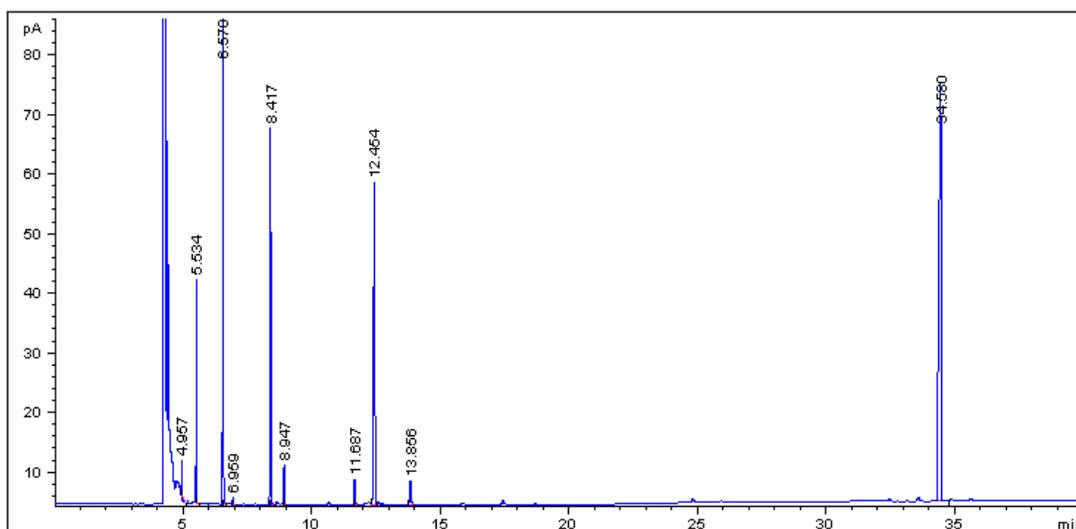


Figura 37: Cromatograma da composição em ácidos graxos do lipídio estruturado resultante da transesterificação a partir de gordura de ucuúba e éteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

Utilizando a equação dos modelos gerados pelo programa Modde 5.0 é possível prever o resultado de incorporação nas condições dos testes.

Nas condições do ensaio obteve-se um LE com 47,4 % de ácido oléico, em área, o que corresponde à cerca de 49,7% em moles, como a gordura purificada de ucuúba apresentava 2,7% em moles de ácido oléico, a incorporação foi de 47% em moles.

Segundo o modelo proposto, a incorporação de ácido oléico (com razão molar de 1:7, 7% de enzima, 20h e 52° C) deveria estar na faixa de 52,3 a 54,6% (valores calculados pelo software Modde 5.0), comparando com o valor obtido tem-se uma diferença de cerca de 6%.

Para a incorporação de DHA o modelo proposto estabelece uma faixa de 26,6 a 27,6% (valores calculados pelo software Modde 5.0), nas condições do ensaio. Foi obtido 26,2 % em área o que corresponde à cerca de 25% em moles. Portanto houve uma diferença de cerca de 2%.

HUANG. & AKOH (1996b) estudaram a otimização e produção piloto da síntese enzimática de lipídios estruturados usando metodologia de superfície de resposta, utilizando etil caprilato, óleo de soja e óleo de girassol (90% ácido oléico) e a lipase SP435. As condições ótimas relatadas foram: tempo = 26,4 h; razão molar = 8, % de óleo de soja como fonte de triacilgliceróis de cadeia longa = 75% e concentração de triacilgliceróis de cadeia longa = 0,58 M (a temperatura foi mantida constante a 55°C). Os valores previstos e experimentais para C8:0 nas condições ótimas foram 67,6 e 64,0% (escala laboratorial) e 67,2% (escala piloto), respectivamente. Os valores previstos e experimentais para C18:2 foram 14,5 e 16,6% (escala reduzida) e 15,4% (escala piloto), respectivamente.

Xu et al. (200b) otimizou a incorporação de ácido caprílico em óleo de menhaden, em um reator de leito empacotado com a enzima Lipozyme IM, utilizando a metodologia de superfície de resposta. As condições ótimas encontradas foram temperatura = 65°C, razão molar = 4 a 5 e tempo de residência de 180 a 220 min, para incorporação de ácido caprílico de 39,8%.

Curvas de Cristalização e fusão dos LEs

Os perfis de fusão e cristalização analisados por DSC, do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola, são apresentados nas Figuras 38 e 39:

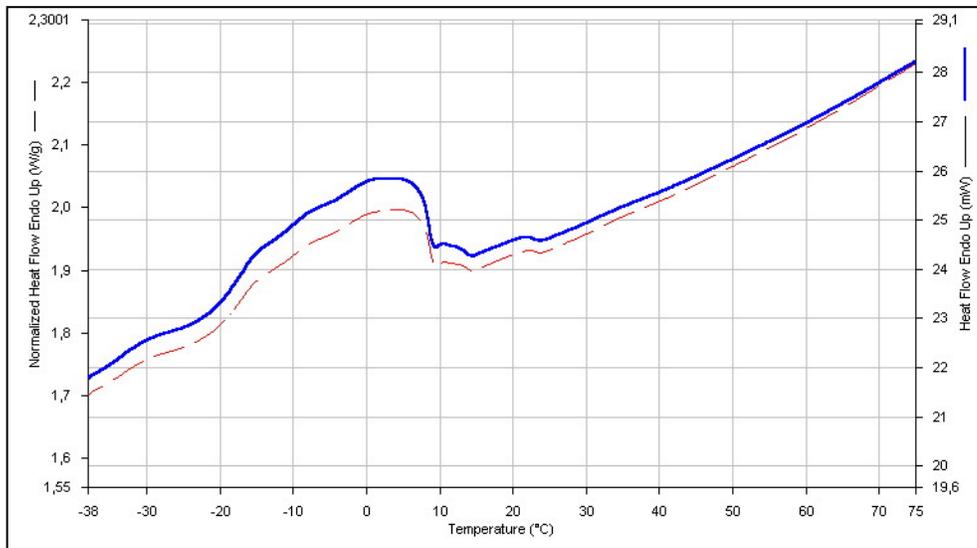


Figura 38: Termograma de fusão do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola.

O termograma de fusão do lipídio estruturado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola apresentou uma temperatura de pico de 0,76°C e onset de -19,25°C.

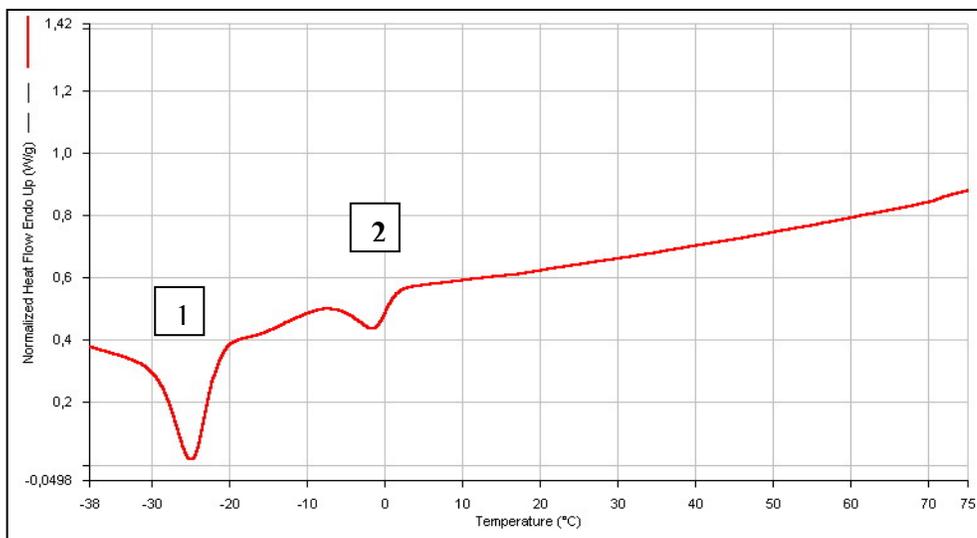


Figura 39: Termograma de cristalização do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo canola.

O termograma de cristalização do lipídio estruturado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de canola apresentou:

Ponto 1: temperatura de pico de -24,70°C e onset de -21,33°C.

Ponto 2: temperatura de pico de -1,53°C e onset de 1,33°C.

Os perfis de fusão e cristalização analisados por DSC, do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®), são apresentados nas Figuras 40 e 41:

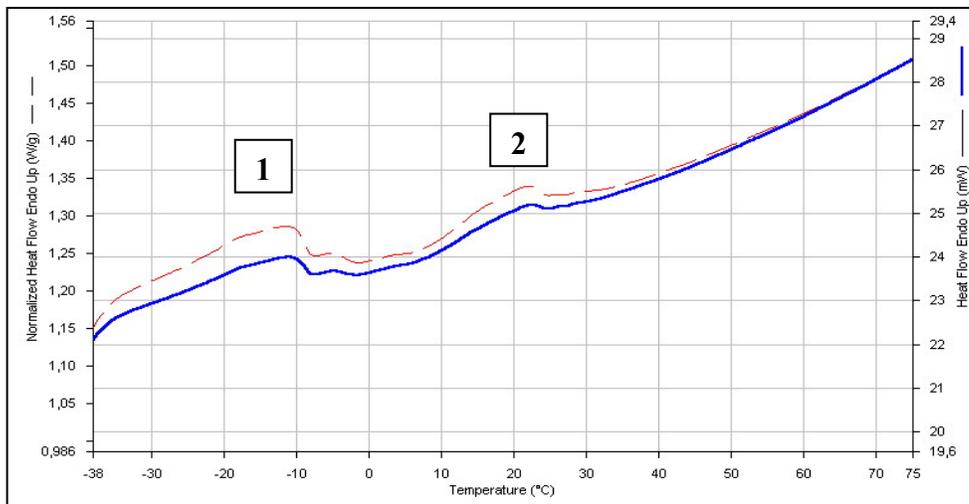


Figura 40: Termograma de fusão do LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

O termograma de fusão do lipídio estruturado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®). apresentou:

Ponto 1: temperatura de pico de $-11,06^{\circ}\text{C}$ e onset de $-8,15^{\circ}\text{C}$.

Ponto 2: temperatura de pico de $-21,35^{\circ}\text{C}$ e onset de $13,38^{\circ}\text{C}$.

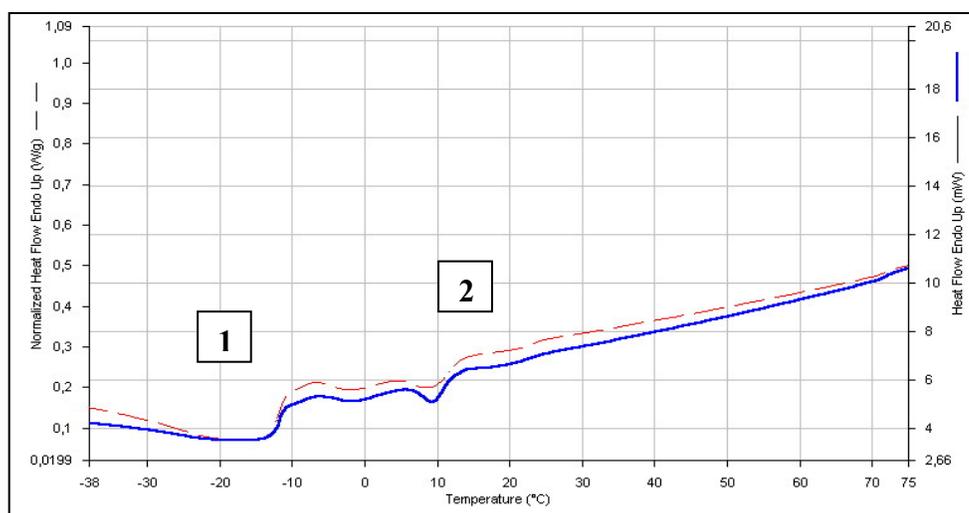


Figura 41: Termograma de Cristalização LE obtido a partir de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®).

O termograma de cristalização do lipídio estruturado de gordura de ucuúba e ésteres etílicos de óleo de algas (DHASCO®) apresentou:

Ponto 1: temperatura de pico de $-14,53^{\circ}\text{C}$ e onset de $-10,90^{\circ}\text{C}$.

Ponto 2: temperatura de pico de $9,46^{\circ}\text{C}$ e onset de $12,05^{\circ}\text{C}$.

Os LEs gerados apresentaram termogramas bastante singulares. Houve o surgimento de um segundo pico denotando polimorfismo e a presença de saturados e insaturados. De um modo geral a temperatura de fusão diminuiu, quando comparada com a gordura de ucuúba inicial, tornando o LE totalmente líquido a temperatura ambiente.

Rao & Lokesh (2003) estudaram a interesterificação de óleos de coco e açafraão e também chegaram a mesma conclusão com relação aos perfis dos termogramas. Seus estudos indicaram que o enriquecimento dos triacilgliceróis do óleo de coco com ácidos graxos ômega 6 abaixaram seu conteúdo de sólidos.

CONCLUSÕES

- O processo de transesterificação enzimática mostrou-se eficiente para a produzir lipídios estruturados de gordura de ucuúba, modificando sua composição e características iniciais.
- Mediante o processo de transesterificação enzimática foi possível enriquecer a gordura de ucuúba seja em ácido oléico ou DHA, dependendo do éster utilizado.
- A produção via enzimática de LEs a partir de gordura de ucuúba e ésteres de óleo de canola tem suas condições ótimas a 50 a 61°C, tempo de contato de 12 a 33 h, proporção enzima / substrato de 5 a 7% e razão molar entre os substratos de 1:6 a 1:8.
- A produção via enzimática de LEs a partir de gordura de ucuúba com o éster etílico de óleo de algas (DHASCO®) tem suas condições ótimas a 45 a 54°C, tempo de contato > 22h, proporção enzima / substrato de 6,5% e razão molar de 1:7.
- Utilizando o processo de transesterificação enzimática foi possível incorporar um máximo de 46% de ácido oléico e 25% de DHA nos lipídios estruturados formados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKMAN, R.G., The absorption of fish oil and concentrates. **Lipids.**, v.27, n.11, p. 858-862, 1992.
2. AKOH, C. C. Fat replacers. **Food Technology**, v. 52, n. 3, p. 47 – 53, 1998a.
3. AKOH, C. C.; LONG, K. D.; FLATT W.P.; ROSE, B. S.; & MARTIN, R. J. Effects of a structured lipid, captex, and a protein-based fat replacer, simplesse, on energy metabolism, body weight, and serum lipids in lean and obese zucker rats. **Nutritional Biochemistry**, New York, NY, v.9, p. 267-275, 1998b.
4. AKOH C.C. & MOUSSATA, C.O. Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 78, n. 1, p. 25-30, 2001.
5. AKOH, C.C. Structured lipids-enzymatic approach. **INFORM**, Champaign, IL, v. 6, n. 9, p.1055-1061, 1995.
6. AKOH, C.C. & YEE, L.N. Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 74, n. 11, 1997.
7. AKOH, C.C. & MOUSSATA, C.O. Lipase-catalyzed modification of borage oil: incorporation of capric and eicosapentaenoic acids to form structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 75, p. 697-701, 1998.
8. ALEX, M. & LINDEMANN, J. Medium-chain lipids: new sources, uses. **INFORM**, Champaign, IL, v. 8, n. 6, 1997.

9. ANTONIOSI, N R; MENDES, O L; LANCAS, F M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by hrgc. **Chromatographia**, New York, v.40, n.9-10, p.557-62, mai. 1995.
10. AOCS - **American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society.** 3rd ed., AOCS Press, Washington, 2003.
11. BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; et al. "Anti-leishmanial activity of neolignans from virola species and synthetic analogues." **Phytochemistry**. v. 55, n.6, p. 589-595, 2000
12. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, S.I.; BRUNS, E.R. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299p.
13. BARUFFALDI, R., FEDELI, E. & CORTESI, N. Pesquisa sobre a gordura de virola surinamensis. composição acídica, glicerídica e natureza química de alguns componentes insaponificáveis. **Rev. Farm. Bioquim.** v. 13, n.1, p. 91-102, 1975.
14. BECKER, C.C. & KYLE, D.J., Developing functional foods containing algal docosahexaenoic acid. **Food Tech.**, v. 52, n. 7, p. 68-71, 1998.
15. BLUMENTHAL, E. E. D. A.; DASILVA M. S.; et al. Lignoids, flavonoids and polyketides of virola surinamensis. **Phytochemistry** v. 46, n. 4, p. 745-749, 1997.
16. BORG, P.; GIRARDIN M., et al. Comparison between two processes for the enzymatic synthesis of tri-docosahexaenoylglycerol in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v.22, n.9, Maio, p.777-781. 2000.
17. CERDÁN, L.E.; MEDINA, A.R.; GIMÉNEZ, A.G.; GONZÁLES, M.J.I. & GRIMA, M. Synthesis of polyunsaturated fatty acid-enriched triglycerides by lipase-catalyzed esterification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v.75, n. 10, 1998.

18. CHAPMAN, K.W.; SAGI I.; REGENSTEIN, J.M.; BIMBO,T.; CROWTHER, J.B. & STAUFFER, C.E. oxidative stability of hydrogenated menhaden oil shortening blends in cookies, crackers, and snacks. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 73, p. 167-172, 1996.
19. CHRISTENSEN, M.S.; HØY, C.E.; BECKER, CC. & REDGRAVE, T.G. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 61, p. 56-61, 1995.
20. CONNOR, W.E.; NEURINGER, M. & REISBICK, S. Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. **Nutr. Rev.**, v. 50, p. 21-29, 1992.
21. CONQUER, J.A. & HOLUB, B.J., Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases n-3 fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. **J. Nutr.**, v. 126, p. 3032-3039, 1996.
22. DE LORGERIL, M.; SALEN, P.; et al. Alpha-linolenic acid in the prevention and treatment of coronary heart disease. **European Heart Journal Supplements** v. 3 ,Supplement 4, p. D26-D32, 2001.
23. FOMUSO, L.B. & AKOH, C.C. Enzymatic modification of triolein: incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Champaign, IL, v. 74, p. 269-272, 1997.
24. FOMUSO, L. B. & AKOH, C. C. Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.75, n.3, MAR, p.405-410. 1998.

25. GERSTER, H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v.68, p.159-173, 1997.
26. GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L & PADLEY, F.B. **The Lipids Handbook**. 2nd edition ,Chapman & Hall, England, p.105-106, 1995.
27. HAMAM, F. & SHAHIDI, F. Synthesis of structured lipids via acidolysis of docosahexaenoic acid single cell oil (DHASCO) with capric acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 2900-2906, 2004
28. HARRIS, W.S.; RAMBJOR, G.S.; WINDSOR, S.L. & DIEDERICH, D. Fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 65, p. 459-464, 1997.
29. HOLMES, M.D.; HUNTER, D.J.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J. & HANKINSON, S.E. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. **JAMA** , v.281, p. 914 – 920, 1999.
30. HUANG, K.S. & AKOH, C.C. Enzymatic synthesis of structured lipids: transesterification of triolein and caprylic acid ethyl ester. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Champaign, IL, v. 73, p. 245-250, 1996a.
31. HUANG, K.S. & AKOH, C.C. Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using rsm. **Jounal of Food Science**, v. 61, n.1, p. 137- 141, 1996b.
32. IKEDA, I.; TOMARI, Y.; SUGANO, M.; WATANABE, S. & NAGATA, J. Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. **Lipids**, v.26, p. 369-373, 1991.

33. IWASAKI, Y. & YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p.129–140, 2000.
34. IWASAKI, Y.; HAN, J.J.; NARITA, M.; ROW, R. & YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids from single cell oil of high docosahexaenoic acid content. **J. Am. Oil Chem. Soc. Champaign, IL: AOCS Press**, v. 76, p. 563-569, 1999.
35. JANDACEK, R.J.; WHITESIDE, J.A.; HOLCOMBE, B.N.; VOLPEN-HEIN, R.A. & TAULBEE, J.D. The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 45, p. 940-945, 1987.
36. KALLIO, H. AND CURRIE, G. **Lipids**. v. 28, p. 207, 1993
37. KENNEDY, J.P. Structured Lipids: fats of the future. **Food Tech.**, v. 45, p.76-83, 1991.
38. KUROSHIMA, K. N.; DE CAMPOS, F., et al. Phytochemical and pharmacological investigations of virola oleífera leaves. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences** v. 56, n. 9-10, p. 703-706, 2001
39. KO, S. N.; KIM, H.; et al. Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. **Food Science and Biotechnology** v.12, n.3, p. 253-256, 2003.
40. KOLANOWSKI, W.; SWIDERSKI, F. & BERGER, S. Possibilities of fish oil application for food products enrichment with n-3 pufa. **Intl. J. Food Sci. Nutr.**, v. 50, p. 39-49, 1999.

41. LATTA, S. Natural may be the niche for structured lipids. **INFORM**, Champaign, IL, v. 1, n. 11, p. 970-974, 1990.
42. LEE, K. T. & AKOH, C. C. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 73, n. 5, 1996.
43. LEE, K. T. & AKOH, C. C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids. **Journal of the American Oil Chemists Society** v. 75, n. 4, p. 495-499, 1998.
44. LEE, K.T.; AKOH, C.C. & DAWE, D.L. Effects of structured lipid containing omega-3 and medium chain fatty acids on serum lipids and immunological variables in mice. **J. Nutr.Biochem.**, v. 23, p. 187-208, 1999.
45. LEE, K.T. & AKOH, C.C. Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 75, p. 1533-1537, 1998.
46. LEE, K.T. & AKOH, C.C. Effects of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 74, p. 579-584, 1997.
47. LOPES, N. P.; KATO, M. J. et al. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**. v. 51, n. 1, p. 29-33, 1999.
48. MCDONALD, B. E. Canola oil: nutritional properties disponível em: <http://www.canola-council.org> July 19, 2001 Acesso em: 13 Dez. 2004.
49. MCNEILL, G.P.; ACKMAN, R.G.; & MOORE, S.R. Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 73, p. 1403-1407, 1996.

50. MEROLLI, A. & LINDEMANN, J. Medium-chain lipids: new sources, uses. **INFORM**, Champaign, IL: AOCS Press, v. 8, n. 6, p. 597-603, 1997.
51. MOORE, S.R. & MCNEILL, G.P. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 73, p. 1409-1414, 1996.
52. MOUSSATA, C.O. & AKOH, C.C. Influence of lipase-catalysed iteresterification on the oxidative stability of melon seed oil triacylglycerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 75, n. 9, p. 1155-1158, 1998.
53. MU, H.; XU, X. & HØY, C.E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 75, p. 1187-1193, 1998.
54. MURPHY, M.G. Dietary fatty acids and membrane protein function. **J. Nutr. Biochem.**, v.1, p. 68-79, 1990.
55. OPSTVEDT, J.; URDAHL, N. & PETTERSEN, J. Fish oil-an old fat source with new possibilities. In: **Edible fats and oils processing: basic principles and modern practices**, edited by D.R. Erickson, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL: AOCS Press, 1990, p. 250-259.
56. NEFF, W.E.; MOUNTS, T.L.; RINSCH, W.M.; KONISHI, H. & EL-AGAIMY, M.A. Oxidative stability of purified canola oil triacylglycerols with altered fatty acid compositions as affected by triacylglycerol composition and structure **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 71, n.10, p. 1101-1109, 1994.
57. NEIDELMEN, S.L. & HUNTER-CERVERA, J. Wax ester production by acinetobacter sp. In: **Industrial applications of single cell oils**, Kyle, D.J. & Ratledge, C., editors, American Oil Chemists' Society Press, Champaign, IL, p. 16-25, 1992

58. NETTLETON, J. A. **Omega 3 fatty acids and health**. New York: Chapman & Hall. 1995. 357p.
59. NUNOMURA, S. M. & YOSHIDA, M. Lignans and benzoic acid derivatives from pericarps of virola multinervia (myristicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 30, n. 10, p. 985-987, 2002.
60. PESCE, C. **Oleaginosas da amazônia**. Oficinas Gráficas da Revista Veterinária, Belém. p.60-64, 1941.
61. PETERSON, C.; MÖLLER, G.; HAWS, R.; ZHANG, X.; THOMPSON, J. AND REECE, D. **Ethyl ester process scale-up and biodegradability of biodiesel**. Disponível em http://www.journeytoforever.org/biofuel_library/ethyl_esters.html. Acesso em Agosto de 2002.
62. PINTO, P.G. **Contribuição ao estudo químico do sebo da ucuúba**. Bol. Tec. Inst. Agron. Norte. n. 18. Belém, Pará, 1951.
63. PRZYBYLSKI, R. Canola oil: physical and chemical properties Disponível em: <http://www.canola-council.org> July 19, 2001 Acesso em: 13 Dez. 2004.
64. RAO, R. & LOKESH, B. R. Nutritional evaluation of structured lipid containing omega-6 fatty acid synthesized from coconut oil in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 248, n. 1-2, p. 25-33, 2003.
65. REEVES, J.B. & WEIHRAUCH, J.L. Composition of foods. fats and oils. **Agriculture Handbook**. 8-4. Washington, DC:USDA, 1979.
66. REZENDE, K. R. & KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of virola sebifera. **Phytochemistry** v.61, n. 4, p. 427-432, 2000.
67. RODRIGUES, W.A. **A ucuúba da várzea e suas aplicações**. Dept. Botânica, INPA, Manaus, 1972.

68. RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de virola aublet (myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazonica**, v.10, n.1: Suplemento, 1980.
69. SAMPAIO, P.T.B. UCUÚBA IN: CLAY, J. W., CLEMENT C. R. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/v0784e/v0784e00.htm> Rome, May 1993. Acesso em: 25 Maio. 2001.
70. SETSER, C.S. & RACETTE, W.L. Macromolecular replacers in food products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 32, n. 3, p. 275, 1992.
71. SHIEH, C.J.; AKOH, C.C. & KOEHLER, P.E. Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 72, p. 619-623, 1995.
72. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAKANO, H.; YOKOTA, H. T.; NAGO,T.; KOMEMUSHI, S. & TOMINAGA,Y. Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized rhizopus delemar lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 73, p. 1415-1420, 1996.
73. SCHMID, U.; BORNSCHEUER, U.T.; SOUMANOU M.M.; MCNEILL C.P. & SCHMID, R.D. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 75, n. 11, p. 1527-1531, 1998.
74. SOUMANOU, M.M.; BORNSCHEUER, U.T. & SCHMID, R.D. Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triglycerides. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v.75, p. 703-710, 1998a.

75. SOUMANOU, M.M.; BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, U. & SCHMID, R.D. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. **Fett/Lipid**, v.100, p. 156-160, 1998b.
76. SOUMANOU, M.M., BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, U. & SCHMID, R.D. Crucial role of support and water activity on the lipase-catalyzed synthesis of structure triglycerides. **Biocatalysis Biotrans.** v. 16, p. 443-459, 1999.
77. STEVENS, L.J., ZENTALL, S.S., DECK, J.L., ABATE, M.L., WATKINS, B.A., LIPP, S.R. & BURGUESS, J.R., Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hyperactivity disorders. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 761-768, 1995.
78. TIEKO, R. **Estudo do comportamento térmico de óleo e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC)** Campinas, 1994. 98p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
79. TOMM, G. O. Situação atual e perspectivas da canola no Brasil Comunicado TÉCNICO ON-LINE N° 58, Dez./00 Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/> Acesso em: 13 Dez. 2004.
80. UMETRICS AB Modde 5.0 **Software for design of experiments and optimization** demonstrativo disponível em: <http://www.umetrics.com> , Acesso em 01 Abr. 2002.
81. USDA **Nutrient Database for Standard Reference.** Release 13 November 1999 Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/measure.pl?04573xyzOil,%20vegetable,%20ucuhuba%20butterxyz>. Acesso em: 20 Maio. 2001.
82. VALDERRAMA, J. C. M. Distribution of flavonoids in the myristicaceae. **Phytochemistry.** v. 55, n.6, p. 505-511, 2000.

83. WATKINS, S.M. & GERMAN, J.B. Unsaturated fatty acids In: AKOK, C.C & MIN, D.B **Food lipids – chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. Cap 18, p. 559-588.
84. WILLIS, W.M. & MARANGONI, A.G. Assessment of lipase and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Champaign, IL: AOCS Press, v. 76, p. 443-450, 1999.
85. XU, X.; SKANDA, A.R.H.; ADLER-NISSEN, J. & HØY, C.E. Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification: optimization of reaction by response surface design. **Fett/Lipid**, v.100, p. 463-471, 1998a.
86. XU, X.; BALCHEN, S.; HØY, C.E. & ADLER-NISSEN, J. Pilot batch production of specific structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL: AOCS Press, v.75, p. 301-308, 1998b.
87. XU, X.; BALCHEN, S.; HØY, C.E. & ADLER-NISSEN, J. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Champaign, IL: AOCS Press, v. 75, p. 1573-1579, 1998c.
88. XU, X.; MU, H.; HØY, C.E. & ADLER-NISSEN, J. Production of specifically structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot enzyme bed reactor: process optimization by response surface methodology. **Fett/Lipid**, v. 101, p. 207-214, 1999.
89. XU, X. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. **INFORM**, Champaign, IL, v.II, p.1121-1131, Out., 2000a.

90. XU, X.; FOMUSO, L.B. & AKOH, C.C. Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a packed bed reactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 77, p. 171-176, 2000b.
91. XU, X.; FOMUSO, L.B. & AKOH, C.C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3-10, 2000c.
92. YANKAH, V.V. & AKOH, C.C. Lipase-catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprylic acids to produce structured lipids **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, IL, v. 77, n. 5, p. 495-500, 2000.