

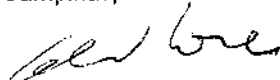
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE LIPASES NO
ENRIQUECIMENTO DE ÓLEOS DE SARDINHA E
Mucor sp EM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Patrícia de Oliveira Carvalho aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de abril de 1998.

Campinas, 24 de abril de 1998.



Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE
Presidente da Banca

PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO

Farmacêutica-Bioquímica

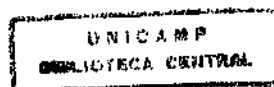
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

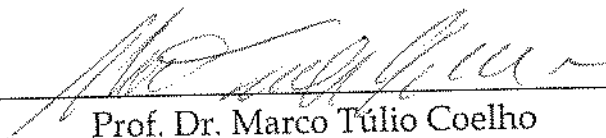
Campinas, 1998



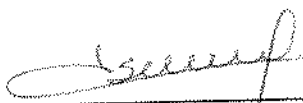
BANCA EXAMINADORA



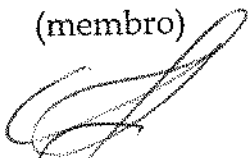
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(orientadora)



Prof. Dr. Marco Túlio Coelho
(membro)



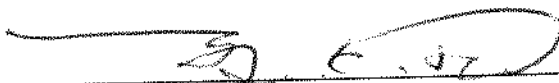
Prof. Dr. Osvaldo de Freitas
(membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(membro)



Profa. Dra. Heloísa Mascia Cecchi
(membro)



Prof. Dr. Yong Kun Park
(membro)

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
(membro)

Campinas, de de 1998.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela sua valiosa orientação, ensinamentos e amizade.

Aos Professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos que me auxiliaram com seus conhecimentos, em especial aos Professores do Laboratório de Bioquímica, Dr. Yong Kun Park e Dra. Hélia Harumi Sato pela colaboração e ensinamentos prestados.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e valiosas sugestões apresentadas.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos, pelos bons momentos e convivência.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, Secretaria de Pós graduação e Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela gentileza e atenção.

À minha família pela confiança, dedicação e carinho.

De uma forma muito especial ao Paulo pelo apoio permanente e incentivo.

À DEUS agradeço por tudo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Ácidos graxos poliinsaturados	03
2.1.1. Metabolismo e fontes	03
2.1.2. Importância nutricional e médica.....	11
2.1.3. Técnicas de fracionamento para concentração	27
2.2. Lipases.....	34
2.2.1. Fontes e propriedades	34
2.2.2. Especificidade das lipases.....	36
2.2.3. Reações catalisadas por lipases para concentração de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)	38
2.2.3.1. Hidrólise	41
2.2.3.2. Esterificação	46
2.2.3.3. Interesterificação	50

3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1. MATERIAIS.....	54
3.1.1. Amostras de óleos	54
3.1.2. Enzimas.....	54
3.1.3. Reagentes específicos	54
3.1.4. Equipamentos	55
3.2. MÉTODOS.....	56
3.2.1. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DO ÓLEO DE <i>Mucor sp</i>	56
3.2.1.1. Microorganismo	56
3.2.1.2. Manutenção da cultura	56
3.2.1.3. Preparação do inóculo.....	56
3.2.1.4. Condições do processo fermentativo	56
3.2.1.5. Obtenção do óleo de <i>Mucor sp</i>	57
3.2.2. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS.....	58
3.2.2.1. Produção de lipase de <i>Rhizopus sp</i>	58
3.2.2.2. Produção de lipase de <i>Geotrichum sp</i>	58
3.2.2.3. Produção de lipase de <i>Aspergillus sp</i>	59
3.2.2.4. Produção de lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	60
3.2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	61
3.2.3.1. Análises químicas	61
3.2.3.2. Determinação de ácidos graxos totais e matéria insaponificável	61
3.2.3.3. Preparo de ácidos graxos livres para a reação de esterificação	62
3.2.3.4. Preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos por derivatização.....	63
3.2.3.5. Determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia a gás (CG).....	63

3.2.3.6. Confirmação da composição em ácidos graxos por espectrometria de massa (CG-MS)	64
3.2.3.7. Quantificação das frações de acilgliceróis por cromatografia em camada delgada com detector de ionização de chama (CCD - DIC)	65
3.2.3.8. Separação dos acilgliceróis totais e ácidos graxos livres após a reação de hidrólise catalisada por lipases	66
3.2.3.9. Separação dos constituintes por cromatografia em camada delgada (CCD) após reação de hidrólise e esterificação catalisada por lipases	67
3.2.4. ESTUDO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE	68
3.2.4.1. Determinação da atividade hidrolítica das lipases	68
3.2.4.2. Seleção das enzimas para a reação de hidrólise	69
3.2.4.3. Estudo das condições ideais da reação de hidrólise	70
3.2.4.3.1. Influência do tempo de reação na hidrólise	70
3.2.4.3.2. Influência da temperatura de reação na hidrólise	70
3.2.4.3.3. Influência da concentração de enzima na reação de hidrólise	71
3.2.4.4. Análise dos produtos após reação hidrolítica	71
3.2.5. ESTUDO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	72
3.2.5.1. Reação de esterificação com o n-butanol catalisada por lipases microbianas	72
3.2.5.2. Reação de esterificação com o glicerol catalisada por lipases microbianas	73
3.2.5.3. Estudo das condições ideais da reação de esterificação	74
3.2.5.3.1. Influência do tipo de solvente orgânico na reação de síntese de acilgliceróis	74
3.2.5.3.2. Influência da relação molar de ácidos graxos livres e glicerol na síntese de acilgliceróis	74
3.2.5.3.3. Influência da temperatura na síntese de acilgliceróis	75
3.2.5.4. Análise dos produtos após reação de esterificação	75

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1. ÓLEOS UTILIZADOS COMO MATÉRIA-PRIMA.....	76
4.1.1. Características químicas dos óleos usados como matéria prima.....	76
4.1.2. Composição em ácidos graxos dos óleos usados como matéria prima.....	78
4.1.3. Análise dos ácidos graxos por espectrometria de massa.....	82
4.2. REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES MICROBIANAS.....	85
4.2.1. Determinação da atividade das lipases.....	85
4.2.2. Estudo da hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp e óleo de sardinha por lipases microbianas	87
4.2.2.1. Efeito do tempo de reação na atividade hidrolítica.....	91
4.2.2.2. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica	94
4.2.2.3. Efeito da concentração de enzima na atividade hidrolítica.....	97
4.2.2.4. Análise dos produtos após a reação hidrolítica catalisada por lipases microbianas.....	100
4.2.2.5. Hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp por lipase de <i>Rhizopus</i> sp	109
4.2.2.6. Hidrólise do óleo de sardinha por lipase de <i>Candida cylindracea</i>	118
4.2.3. Estudo da esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp e óleo de sardinha por lipases microbianas.....	125
4.2.3.1. Reação de esterificação com o n-butanol catalisada por lipases microbianas.....	125
4.2.3.2. Reação de esterificação com o glicerol catalisada por lipases microbianas.....	134
4.2.3.2.1. Efeito do tempo de reação na atividade da esterificação	134
4.2.3.2.2. Efeito do tipo de solvente na atividade da esterificação	137

4.2.3.2.3. Efeito da proporção molar entre ácidos graxos e álcoois na atividade de esterificação	139
4.2.3.2.4. Efeito da temperatura na atividade de esterificação	141
4.2.3.2.5. Análise dos produtos da reação de esterificação catalisada por lipases microbianas.....	143
5 - CONCLUSÕES	148
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150

INDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Mecanismos propostos para os efeitos dos ácidos graxos ômega-6 e ácidos graxos saturados nos níveis dos lipídeos plasmáticos.....	16
Tabela 2. Enriquecimento de ácidos graxos poliinsaturados por reações de hidrólise, esterificação e interesterificação usando lipases.....	33
Tabela 3. Lipases microbianas testadas na catálise das reações de hidrólise e esterificação.....	68
Tabela 4. Características químicas dos óleos usados como matéria-prima para atuação de lipases microbianas.....	77
Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%) do óleo da linhagem de <i>Mucor</i> sp usado como matéria-prima.....	79
Tabela 6. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de sardinha refinado usado como matéria-prima.....	79
Tabela 7. Atividade de lipases microbianas testadas na catálise das reações de hidrólise e esterificação.....	85
Tabela 8. Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipases de <i>Candida cylindracea</i> , <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	103
Tabela 9. Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após 16 horas de hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipases de <i>Candida cylindracea</i> , <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	107
Tabela 10. Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após a hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipase de <i>Rhizopus</i> sp	111

Tabela 11.	Composição em ácidos graxos (%) das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	116
Tabela 12.	Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após a hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de <i>Candida cylindracea</i>	119
Tabela 13.	Composição em ácidos graxos (%) das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 16 horas de hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de <i>Candida cylindracea</i>	123
Tabela 14.	Composição em ácidos graxos das frações de ésteres butílicos e ácidos graxos não esterificados após 16 horas de reação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com n-butanol por lipases de <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	128
Tabela 15.	Efeito de diferentes solventes orgânicos na esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	138
Tabela 16.	Efeito de diferentes proporções de glicerol : ácidos graxos na esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	140
Tabela 17.	Efeito da temperatura de incubação na esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	142
Tabela 18.	Composição em ácidos graxos das frações esterificadas e não esterificadas após 20 horas de reação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com glicerol catalisada por lipases de <i>Rhizopus</i> sp e <i>Geotrichum</i> sp.....	145

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6).....	05
Figura 2. Estrutura dos principais ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6).....	05
Figura 3. Representação esquemática das reações de hidrólise e esterificação catalisadas por lipases.....	39
Figura 4. Representação esquemática das reações de interesterificação catalisadas por lipases.....	40
Figura 5. Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) do óleo da linhagem de <i>Mucor</i> sp.....	80
Figura 6. Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) do óleo de sardinha.....	81
Figura 7. Espectro de massa do éster metílico de ácido γ -linolênico do óleo de <i>Mucor</i> sp (A) e de seu padrão autêntico (B).....	83
Figura 8. Espectro de massa do éster metílico de ácido eicosapentaenóico do óleo de sardinha (A) e de seu padrão autêntico (B).....	84
Figura 9. Curva padrão da concentração de Ácido oleico $\times$ Volume de KOH 0,05N (mL) para determinação da atividade de lipase.....	86
Figura 10. Hidrólise (%) do óleo de <i>Mucor</i> sp e do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas após 2 horas de reação hidrolítica `a 40°C.....	89
Figura 11. Hidrólise (%) de óleos vegetais catalisada por lipases microbianas após 2 horas de reação hidrolítica `a 40°C.....	90
Figura 12. Efeito do tempo de reação na hidrólise (%) do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipases microbianas.....	93

Figura 13.	Efeito do tempo de reação na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.....	93
Figura 14.	Efeito da temperatura de reação na hidrólise (%) do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipases microbianas	96
Figura 15.	Efeito da temperatura de reação na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.....	96
Figura 16.	Efeito da concentração de enzima na hidrólise (%) do óleo de <i>Mucor</i> sp catalisada por lipases microbianas.....	99
Figura 17.	Efeito da concentração de enzima na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.....	99
Figura 18.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp por ação de lipases microbianas.....	104
Figura 19.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de sardinha por ação de lipases microbianas.....	108
Figura 20.	Variação dos níveis dos principais ácidos graxos da fração acilglicerol do óleo de <i>Mucor</i> sp em função do tempo de reação hidrolítica catalisada por lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	112
Figura 21.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de <i>Mucor</i> sp por ação de lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	113
Figura 22.	Variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp após a hidrólise catalisada por lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	117
Figura 23.	Variação dos níveis dos principais ácidos graxos da fração acilglicerol do óleo de sardinha em função do tempo de reação hidrolítica catalisada por lipase de <i>Candida cylindracea</i> ...	120
Figura 24.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de sardinha por ação de lipase de <i>Candida cylindracea</i> ...	121

Figura 25.	Variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos do óleo de sardinha após a hidrólise catalisada por lipase de <i>Candida cylindracea</i>	124
Figura 26.	Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com n-butanol catalisada por lipases microbianas.....	126
Figura 27.	Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de sardinha com n-butanol catalisada por lipases microbianas.....	126
Figura 28.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com n-butanol por ação de lipases de <i>Geotrichum</i> sp e <i>Rhizopus</i> sp em diferentes tempos de reação.....	129
Figura 29.	Conteúdo de GLA (%) nas frações de ésteres butílicos e ácidos graxos não esterificados do óleo de <i>Mucor</i> sp, catalisada pela lipase de <i>Geotrichum</i> sp, em diferentes tempos de reação.....	132
Figura 30.	Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) da fração não esterificada dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp após a reação de esterificação com n-butanol, catalisada por lipase de <i>Geotrichum</i> sp, em diferentes tempos de reação.....	133
Figura 31.	Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com glicerol catalisada por lipases microbianas.....	136
Figura 32.	Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases microbianas.....	136
Figura 33.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com glicerol por ação de lipase de <i>Geotrichum</i> sp.....	146
Figura 34.	Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de <i>Mucor</i> sp com glicerol por ação de lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	147

LISTA DE ABREVIACÕES

AGL = ácido graxo livre

AGPI = ácido graxo poliinsaturado

AGS = ácido graxo saturado

CCD = cromatografia em camada delgada

CCD-DIC = cromatografia em camada delgada/detector de ionização em chama

CG = cromatografia à gás

DAG = diacilglicerol

DHA = ácido docosahexaenóico

EPA = ácido eicosapentaenóico

GLA = ácido gama linolênico

HDL = lipoproteína de densidade alta

LDL = lipoproteína de densidade baixa

LT = leucotrieno

MAG = monoacilglicerol

PG = prostaglandina

TAG = triacilglicerol

TX = tromboxana

VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo das reações de hidrólise e esterificação catalisadas por novas lipases microbianas isoladas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos (FEA - UNICAMP), pertencentes ao gênero *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp e a lipase comercial de *Candida cylindracea* visando o enriquecimento em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) o óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e o óleo de fungo (*Mucor* sp).

As lipases de *Rhizopus* sp (específica posicionalmente), *Geotrichum* sp (especificidade para ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação cis na posição 9) e *Candida cylindracea* (inespecífica posicionalmente), selecionadas para o estudo, promoveram aumento significativo nos níveis de ácido gama-linolênico (GLA) em óleo de *Mucor* sp e de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha.

As frações de acilgliceróis e ácidos graxos livres resultantes da ação enzimática foram separadas por cromatografia em camada delgada (CCD), quantificadas por cromatografia em camada delgada com detector de ionização de chama (CCD - DIC) e analisadas quanto à composição em ácidos graxos por cromatografia à gas (CG) .

A lipase de *Rhizopus* sp nas condições ótimas de reação se mostrou a mais eficiente na reação de hidrólise entre as lipases testadas. Esta lipase hidrolisa mais eficientemente o substrato óleo de *Mucor* sp do que o óleo de sardinha. Após 8 horas de reação hidrolítica resultaram 18,5% de GLA em relação aos ácidos graxos totais da constituição do óleo de *Mucor* sp (óleo original contendo 11,4% de GLA).

A lipase de *Candida cylindracea* demonstrou alta eficiência na catálise da hidrólise do óleo de sardinha. O nível de DHA foi duplicado após 16 horas de reação hidrolítica, enquanto que o nível de EPA mostrou um acréscimo de 35% em relação a quantidade presente nos acilgliceróis antes da hidrólise.

A lipase de *Geotrichum candidum* demonstrou baixa atividade hidrolítica para os substratos analisados, entretanto alta capacidade da esterificação. A esterificação preferencial de ácidos graxos monoinsaturados (16:1 e 18:1) com n-butanol por esta enzima levou a um acréscimo de 3,4 vezes do conteúdo de GLA nos ácidos graxos não esterificados do óleo de *Mucor* sp em relação ao valor presente no tempo zero da esterificação.

As lipases microbianas não apresentaram boa eficiência na reação de esterificação usando o álcool glicerol nas condições analisadas. Nos acilgliceróis formados (triacilglicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol) separados por cromatografia em camada delgada e analisados por cromatografia à gás foram detectados quantidades insuficientes de AGPI para possibilitar o seu enriquecimento.

ABSTRACT

The present work reports the study of the hydrolysis and esterification reactions catalyzed by microorganism lipases, which were isolated at the "Laboratorio de Bioquímica de Alimentos - FEA - UNICAMP", belonging to *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp and the commercial lipase *Candida cylindracea*. The aim was the enrichment of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on sardine oil (*Sardinella brasiliensis*) and fungal oil from *Mucor* sp.

The lipases of *Rhizopus* sp (1,3 - positional specificity), *Geotrichum* sp (specific for the long chain fatty acids with cis- double link on position 9) and *Candida cylindracea* (unspecific positionally), chosen for the study, provided an expressive increase in the concentration of gamma-linolenic acid (GLA) on the fungal oil from *Mucor* sp and in the concentration of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids on sardine oil.

The fractions of glycerides and free fatty acids, obtained from an enzymatic action, were separated by thin-layer chromatography (TLC), quantified by thin layer chromatography - flame ionization detector (TLC-FID) and had the fatty acids composition analyzed by gas chromatography (CG).

The lipase from *Rhizopus* sp, in optimum reaction conditions, was found to be the most efficient for the hydrolysis reaction among all the lipases tested. This lipase hydrolyzes the substrate oil from *Mucor* sp much more efficiently than the sardine oil. After 8 hours of hydrolytical reaction, 18.5% of GLA were obtained, in relation to all the fatty acids that compose the oil from *Mucor* sp (original oil contains 11.4% of GLA).

Candida cylindracea's lipase showed high efficiency for the hydrolysis catalysis of sardine oil. DHA's concentration was doubled after 16 hours of hydrolytical reaction while EPA's concentration increased 35% in relation to the situation before the hydrolysis.

Geotrichum candidum's lipase showed a low hydrolytical activity for the analyzed substrates, but a high esterification capability. This enzyme esterificated chiefly monounsaturated fatty acids with butanol and GLA's concentration in the unesterificated fatty acids of the oil from *Mucor* sp increased 3.4 times if compared to the situation before the reaction.

Microorganisms lipases were found to be less effective in the esterification, when glycerol was used at the analyzed conditions. In the formed glycerides (triglyceride, diglyceride e monoglyceride), which were separated by thin-layer chromatography and analyzed by gas chromatography, not a sufficient quantity of polyunsaturated fatty acids was found to make the enrichment possible.

1 - INTRODUÇÃO

Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos tem firmemente estabelecido os efeitos benéficos dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), em especial os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) da família ômega-3 (ω 3) e ácido gama - linolênico (GLA) da família ômega-6 (ω 6). A administração de óleos ricos em AGPI ou seus concentrados em humanos, tem demonstrado efeitos benéficos em várias doenças cardiovasculares, como aterosclerose, trombose e arritmia (NORDOY, 1989; HORROBIN, 1992). Outros efeitos resultantes da ingestão dos AGPI, foram observados em certas doenças como eczema atópico, psoríase, alcoolismo, síndrome pré-menstrual, diabetes, artrite reumatóide, hipertensão, obesidade e de certos tipos de câncer (BARLOW, 1987; CARTER, 1988).

Em vista deste potencial, torna-se de grande interesse estudar métodos para concentração dos AGPI visando obter acilgliceróis enriquecidos em AGPI a partir de fontes de fácil obtenção e baixo custo.

Os estudos relatados na literatura incluem métodos físicos e químicos tais como complexação com uréia (HAAGSMA *et al.*, 1982), resfriamento por solvente (YOKOCHI *et al.*, 1990), cristalização fracionada à baixa temperatura (MOFFAT *et al.*, 1993), método de Corey (COREY & WRIGHT, 1988), separação em coluna de Zeolita-Y (ARAI *et al.*, 1987), extração com fluido super crítico (NILSSON *et al.*, 1991) entre outros.

Estudos de aplicação das enzimas lipases (Triacilglicerol acilhidrolase - E.C. 3.1.1.3) na catálise de reações visando concentrar AGPI é assunto recente, demonstrando resultados promissores. Os processos enzimáticos para modificação dos lipídeos permitem três tipos de reações, de hidrólise, síntese de ésteres e interesterificação desses compostos na presença de lipases.

A aplicação industrial de lipases nestas reações de biotransformação tem especial importância devido à sua especificidade (posicional ou de ácidos graxos), uma vez que os produtos formados não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais.

Nesse sentido, o presente trabalho visa estudar reações catalisadas por lipases microbianas para concentrar os AGPI de fontes marinhas (óleo de sardinha - *Sardinella brasiliensis*) e fonte fúngica (*Mucor* sp). Para tal objetivo, serão testadas as lipases isoladas e produzidas recentemente no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP) identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp e a lipase comercial obtida de *Candida cylindracea*.

O trabalho realizado pode ser dividido em dois experimentos que são descritos abaixo:

1. Estudar as reações de hidrólise visando enriquecer com ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) os acilgliceróis presentes no óleo de sardinha e com ácido gama - linolênico (GLA) aqueles presentes no óleo de *Mucor* sp.
2. Estudar as reações de esterificação visando a obtenção de acilgliceróis (mono, di ou triacilglicerol) ou ésteres primários de ácidos graxos poliinsaturados.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

2.1.1. METABOLISMO E FONTES

Os lipídeos formam um grupo de compostos de natureza química complexa e variada, possuindo a propriedade de serem solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. No organismo, de maneira geral, a gordura da dieta desempenha várias funções biológicas importantes entre as quais, fornecimento de energia e como componentes de membrana para proteção de estruturas celulares, conferindo fluibilidade, flexibilidade e estabilidade estrutural. Além dessas funções, algumas substâncias lipídicas podem atuar como hormônios, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e com funções metabólicas essenciais como é o caso do colesterol e dos ácidos graxos essenciais (ácido linoléico e ácido linolênico).

Os ácidos graxos são ingeridos principalmente como triacilglicerol e fosfolipídeos. A presença de duplas ligações nas moléculas permite separá-los em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, tendo suas cadeias carbônicas variando, em geral, de 4 - 20 átomos de carbono. Os ácidos graxos com 2 - 4 átomos de carbono são considerados ácidos graxos de cadeia curta ou voláteis; de C6 - C12, cadeia média e C14 - C24 de cadeia longa. Os AGPI podem ser subdivididos em duas famílias de acordo com a localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metílico terminal: família ômega-6 ($\omega 6$) representada pelo ácido linoléico ($18:2 \Delta^{9,12} \omega 6$) e a família ômega-3 ($\omega 3$) representada pelo ácido α -linolênico ($18:3 \Delta^{9,12,15} \omega 3$).

A essencialidade das duas séries foi primeiramente reportada por BURR & BURR (1929) como resultado da alimentação de ratos jovens por dieta livre de gordura. Os ratos apresentaram retardamento mental, dermatite escamativa, alterações no transporte de lipídeos pelo sangue e problemas

reprodutivos. Hoje, sabe-se que estas duas famílias de ácidos graxos desempenham importantes efeitos metabólicos e nutricionais no organismo (LANDS, 1986).

Esses dois tipos de ácidos graxos são chamados essenciais porque não podem ser sintetizados no organismo humano e devem ser fornecidos através da dieta. O ácido linoléico é encontrado em óleo de semente de vegetais como girassol, milho, soja e colza; e sua presença tem sido associada com cloroplastos. O ácido α -linolênico está presente principalmente no fitoplâncton e zooplâncton marinho, bem como em peixes, foca, cavalo marinho e baleia. Tais organismos são a base da cadeia alimentar marinha, de forma que, toda a vida marinha pode ser enriquecida com este ácido graxo e seus metabólitos, o qual pode fornecer o grau de insaturação requerido para permitir que as membranas celulares permaneçam fluidas na água gelada.

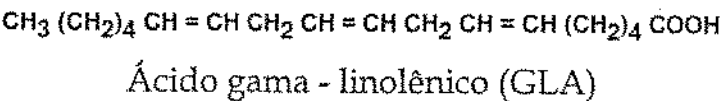
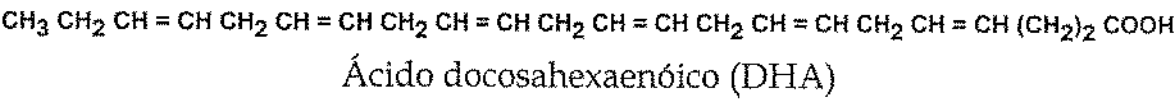
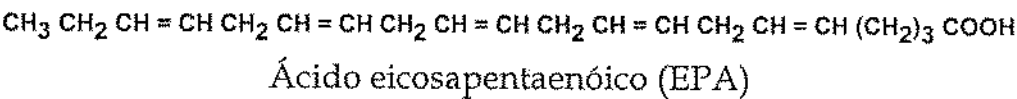
Após a ingestão, os ácidos graxos, uma vez absorvidos nas células e tecidos, podem ser dessaturados e alongados a AGPI de cadeia longa com 20 ou mais átomos de carbono entrando na constituição de lipídeos estruturais de membrana. Os processos de alongação e dessaturação do ácido linoléico (18:2 ω 6) e α -linolênico (18:3 ω 3), ocorrem nos animais e vagarosamente nos homens originando diversos metabólitos como representado na Figura 1.

A figura 2 representa a estrutura química do ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$) e docosahexaenóico (DHA - 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) da família dos ômega-3, e o ácido γ -linolênico (GLA - 18:3 $\Delta^{6,9,12}$) da família dos ômega-6, os quais tem sido apontados como os AGPI chaves para prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, processos inflamatórios e outras patologias (DREVON, 1992; HORROBIN, 1992).

Figura 1 - Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família ômega-3 (ω3) e ômega-6 (ω6).

Família ω6		Família ω3	
Linoléico (18:2)		α-Linolênico (18:3)	
↓	Δ 6 - dessaturase	↓	
γ-Linolênico (18:3)		Octadecatetraenóico (18:4)	
↓	alongase	↓	
Dihomo-γ-linolênico(20:3)		Eicosatetraenóico (20:4)	
↓	Δ 5 - dessaturase	↓	
Araquidônico (20:4)		Eicosapentaenóico (20:5)	
↓	alongase	↓	
Adrenico (22:4)		Docosapentaenóico (22:5)	
↓	Δ 4 - dessaturase	↓	
Docosapentaenóico (22:5)		Docosahexaenóico (22:6)	

Figura 2 - Estrutura dos principais ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega-3 (ω3) e ômega-6 (ω6).



A importância dos ácidos graxos essenciais na dieta humana foi assunto de grande interesse nas décadas passadas. Na atualidade, pesquisas tem enfatizado o papel de seus metabólitos tais como ácido γ -linolênico (GLA), ácido dihomog γ -linolênico (DHGLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). Estes componentes são requeridos por todas as membranas do corpo, conferindo a propriedade da fluidibilidade, flexibilidade e estabilidade estrutural. São importantes como precursores de substâncias biologicamente ativas tais como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, hidroxí e hidro-peroxi-ácidos graxos, como é o caso do ácido dihomog γ -linolênico (trienóico) precursor da prostaglandina E_1 (PGE_1) pela ação da enzima cicloxigenase, ácido araquidônico (tetraenóico) que é precursor de tromboxana A_2 (TXA_2), prostaciclina I_2 (PGI_2) e prostaglandina da série 2 (PGE_2) e o ácido eicosapentaenóico (pentaenóico) que é precursor de tromboxana A_3 (TXA_3), prostaciclina I_3 (PGI_3) e prostaglandina da série 3 (PGE_3). Os ácidos tri, tetra e pentaenóicos também são responsáveis pela produção de leucotrienos das séries 3, 4 e 5, respectivamente, substâncias com estrutura química conjugada de trienos, descobertas primeiramente em leucócitos.

Os produtos que contém estrutura em anel (prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclinas) resultam da ação inicial da enzima cicloxigenase, ao passo que os derivados hidroxilados dos ácidos graxos de cadeia reta (leucotrienos) resultam da ação de diversas lipoxigenases.

No organismo humano os ácidos graxos podem ser encontrados como ácidos graxos não esterificados ou como componentes de ésteres de colesterol, triacilglicerol e fosfolipídeos tais como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol.

A presença dos ácidos graxos das séries $n-6$ e $n-3$ no corpo humano em especial nos tecidos em desenvolvimento é dependente da quantidade e do tipo de lipídeo da dieta, da atividade das enzimas dessaturases responsáveis pela síntese dos metabólitos e ao próprio processo de oxidação e acilação dos ácidos $18:3\ n-3$ e $18:3\ n-6$ (MANKU *et al.*, 1988).

A obtenção destes importantes metabólitos parece ser fácil, pela simples ingestão dos ácidos linoléico e α -linolênico, uma vez que o próprio metabolismo do organismo se encarregaria das transformações restantes. Entretanto este processo tem como etapa crucial a enzima $\Delta 6$ dessaturase a qual, além de insuficiente em humanos pode ser inibida por fatores como o baixo consumo energético de proteínas, envelhecimento, diabete, álcool, problemas nutricionais como deficiência de piridoxina, zinco, magnésio, biotina e cálcio e também pelo colesterol (KINSELLA, 1991). Além disto, os caminhos biossintéticos das famílias de AG $\omega 3$ e $\omega 6$ utilizam o mesmo sistema enzimático, ocorrendo uma competição por cada enzima envolvida (DYEBERG, 1986).

Esta competição altera todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como prostaglandinas (PG), tromboxanas (TX) e leucotrienos (LT), os quais são provenientes dos ácidos graxos contendo 20 (vinte) átomos de carbono (FISCHER, 1989).

A administração de 30-40g por dia de ácido linoléico não foi capaz de alterar significativamente a concentração de ácido dihomog γ -linolênico ou ácido araquidônico no sangue humano (LASSERRE *et al.*, 1985), enquanto a administração de menos de 500mg/dia de GLA demonstrou ser capaz de produzir uma significativa elevação no nível de ácido dihomog γ -linolênico e um pequeno aumento do ácido araquidônico nos fosfolipídeos plasmáticos (MANKU *et al.*, 1988).

Ao contrário do que se acreditava anos atrás, o GLA e não o ácido linoléico pode elevar os níveis dos metabólitos da série *n*-6 em humanos. Evidências indicam que somente 5-10% da ingestão diária de ácido linoléico pode ser convertida para GLA. A conversão *in vivo* do ácido dihomô γ -linolênico para ácido araquidônico nos lipídeos plasmáticos em humanos demonstrou que este processo ocorre principalmente na fração fosfolipídica, sendo dificultada na fração de triacilglicerol (EL BOUSTANI *et al*, 1986).

As experiências tem relatado que o consumo de ácido α -linolênico pode aumentar a concentração dos AGPI ω 3 (EPA e DHA) e reduzir a de ácido araquidônico no plasma e tecidos (ZOLLNER, 1986). O ácido α -linolênico parece ser um substrato com maior afinidade pelas enzimas dessaturases e alongases do que o ácido linoléico. Isso é aparentemente efetivo na redução da agregabilidade plaquetária, já que os eicosanóides provenientes do EPA são substancialmente menos ativos do que os correspondentes produtos do ácido araquidônico (LEAF & WEBER, 1988).

O EPA serve de substrato para as cicloxigenases e lipoxigenases, que são as enzimas responsáveis pelo início da síntese de prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclina e leucotrienos. Uma vez que os ácidos graxos ω 3 podem ser alongados e dessaturados, o embasamento para muitos dos efeitos dos AGPI ω 3 podem estar relacionados ao metabolismo dos eicosanóides.

Além da disponibilidade de ácido araquidônico (dependente da concentração de ácido linoléico na dieta e da Δ 6 dessaturase), a quantidade de eicosanóides sintetizada é influenciada pela atividade da fosfolipase A₂ (que pode ser regulada pelos glicocorticóides), da cicloxigenase (que pode ser inibida por drogas anti-inflamatórias não esteroideais como a aspirina e a indometacina) e da lipoxigenase (que pode ser inibida por anti-oxidantes) (BAILEY, 1985).

Recomendações nutricionais indicam que a dieta em lipídeos deve conter AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ numa provável proporção ótima de 4-10:1 (GURR, 1984). Uma ingestão acima de 2g/dia de AGPI de cadeia longa com 20 ou mais átomos de carbono da família $\omega 3$ parece ser uma recomendação razoável baseado nas informações disponíveis. Para isto seria requerido a ingestão de 100 - 200g de alimento marinho (DREVON, 1992). Esta dificuldade pode ser eliminada com a preparação de concentrados de AGPI os quais seriam mais eficientes e podem ser facilmente administrados. A administração direta dos metabólitos ativos eliminaria a etapa limitante ($\Delta 6$ -dessaturase) no metabolismo de AGPI.

Como intermediário na bioconversão do ácido linoléico para ácido araquidônico, o GLA é encontrado em baixos níveis nos lipídeos animais. A gordura de leite humano, a maior fonte de GLA animal contém em média 100-400 mg/l, enquanto que a gordura bruta de vaca, porco e galinha contém 60,4, 20,9 e 77,6 mg de GLA por 100g de fonte respectivamente (HORROBIN, 1992). Em geral, as fontes alimentares convencionais que poderiam suprir este ácido graxo via direta apresentam escasso conteúdo de GLA.

Fontes vegetais raras no Brasil, como as plantas *prímula* (*Oenothera biennis*), *borragem* (*Borago officinallis*) e *groselha negra* (*Ribes nigrum*) contém em média 15% de GLA (RATLEDGE; 1987, GUNSTONE, 1992). A fonte mais comum é o óleo de *prímula* de diferentes variedades utilizado para a obtenção de produtos comerciais como "Efamol", "Epogam" e "Efamast", comercializado nos Estados Unidos e Europa.

A composição em ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais, causando moderadas modificações nos níveis de GLA.

No presente, as fontes comerciais ricas em EPA e DHA são os peixes marinhos, em especial dos óleos obtidos de arenque, anchova, “menhaden”, atum e do fígado de bacalhau. É característico destes óleos apresentar grande variedade de ácidos graxos e, em especial ácidos graxos de cadeia longa com 20 a 22 átomos de carbono, altamente insaturados (5 a 6 duplas ligações). Estes ácidos graxos característicos de peixes marinhos, tem origem no fitoplâncton unicelular e algas que fazem parte da sua cadeia alimentar. A composição e o conteúdo dos ácidos graxos estão relacionados com fatores biológicos, tais como a espécie de peixe, idade, ciclo sexual, tipo de alimento e a localização geográfica, apresentando em média 20% destes AGPI (REICHWALD, 1976).

A composição de triacilglicerol de óleos de peixes marinhos é muito complexa, devido ao grande número de ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa. Num estudo sobre a distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, sugere-se que existe um ácido graxo poliinsaturado ocupando a posição 2 e frequentemente um monoinsaturado (C16:1 ou 18:1) na posição 1, sendo que os ácidos graxos monoinsaturados de cadeia muito longa tendem a ocuparem a posição 3 (BROCKERHOFF *et al.*, 1969; LITCHFIELD *et al.*, 1978).

As fontes microbianas visando a obtenção de óleos por processos fermentativos tem sido exaustivamente estudadas (WHITWORTH & RATLEDGE, 1974; RATLEDGE, 1982, RATLEDGE, 1987). Estas possíveis fontes visando a produção de AGPI foram descritas por YONGMANITCHAI & WARD (1989). Dentre elas merece destaque a obtenção de ácido araquidônico e EPA por linhagens de *Mortierella* sp (SHIMIZU *et al.*, 1988) e a obtenção de GLA por diferentes linhagens de *Mucor* sp (SHIN & SHIN, 1988; KANG & SHIN, 1989).

Preparações comerciais em cápsulas contendo AGPI já são disponíveis no Brasil com os nomes de PROEPA (Prodome), LIPCOR (Carlo Erba), EPA PLUS (Life-Plus), PRÍMURIS (Herbarium) e GAMALINE (Herbarium).

2.1.2. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E MÉDICA

Inúmeras experiências tem comprovado os efeitos benéficos da ingestão de AGPI na aterosclerose, trombose, arritmia, fluidez das membranas, hipertensão, obesidade, câncer e atividades dos eicosanóides (BARLOW, 1987; CARTER, 1988). As doenças inflamatórias como asma, eczema atópico e psoríase foram diretamente relacionadas com a carência de AGPI (WRIHT & BURTON, 1982).

Os primeiros estudos epidemiológicos referentes aos efeitos dos ácidos graxos $\omega 3$ sobre a saúde, começaram na década de 70, a partir dos estudos conduzidos em esquimós da Groelândia. Comparações realizadas em relação ao consumo de ácidos graxos marinhos entre essa população (7g/dia), com as populações ocidentais (0,06g/dia) indicaram a possível causa da baixa incidência de doenças cardiovasculares entre os esquimós (DYEBERG & BANG, 1979). Foi verificado que a incidência de doenças isquêmicas do coração entre os esquimós era aproximadamente 8% da observada entre os dinamarqueses (KROMANN & GREEN, 1980).

O grupo de esquimós apresentava uma taxa elevada de ácidos graxos $\omega 3$, com uma diminuição acentuada dos ácidos graxos da família $\omega 6$ (DYEBERG *et al.*, 1978). Foi verificado que estes indivíduos apresentavam além da baixa incidência de doenças cardiovasculares, um tempo de sangramento prolongado que pode ser explicado pelo abaixamento da agregabilidade plaquetária devido a formação alterada de prostanóides (DYEBERG & JORGENSEN, 1982; BANG & DYEBERG, 1985). Estes indivíduos apresentaram um baixo índice de trombose, porém com fortes tendências a hemorragias (DYEBERG, 1978).

A administração de óleos ricos em AGPI ou seus concentrados em humanos, resultam inúmeros efeitos benéficos, com ênfase especial na diminuição dos níveis de triacilglicerol e colesterol plasmáticos (HARRIS, 1989). Os resultados dos estudos sobre a capacidade dos AGPI ω 3 e ω 6 de atuarem como redutores dos níveis de triacilglicerol, de colesterol e de lipoproteínas LDL (lipoproteína de densidade baixa) e VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) no plasma foram confirmados em diversos estudos em humanos (RAMBJOR *et al.*, 1996; HWANG *et al.*, 1997).

É conhecido que a quantidade de colesterol na dieta tem pouca influência na sua concentração plasmática, devido a limitada quantidade de colesterol absorvido e ao mecanismo de controle de síntese deste composto. Os fatores da dieta de maior influência na concentração plasmática de colesterol são as gorduras: gorduras saturadas são capazes de aumentar até 20 vezes o nível de colesterol, enquanto gorduras insaturadas são potentes em diminuí-lo. Uma relação de ácido graxo poliinsaturado para ácido graxo saturado (AGPI/AGS) de 0,5 é capaz de estabilizar o colesterol sanguíneo. Uma maior relação diminuiria e uma menor seria capaz de aumentar o nível plasmático de colesterol (GURR, 1984).

Desde 1956, sugere-se que o óleo de peixe pode reduzir níveis altos de colesterol no sangue (BRONTE-STEWART *et al.*, 1956). O óleo de peixe, rico em AGPI ω 3, mostrou atuar mais eficientemente na redução do colesterol, do que os óleos de milho e girassol, ricos em AGPI ω 6 (KEYS *et al.*, 1957). A ingestão diária de DHA mostrou ser cerca de 6 a 7 vezes mais eficiente do que o ácido linoléico e, 1,4 vezes mais eficaz que o ácido araquidônico (WORNE & SMITH, 1959). No entanto, o uso do ácido araquidônico para diminuição dos níveis de colesterol não é aconselhável, uma vez que após sua ingestão foi relatado aumento na reatividade das plaquetas (SEYBERTH *et al.*, 1975).

As diferenças existentes entre os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$, em relação ao metabolismo de lipídeos, ainda não foram bem estabelecidas. Os estudos realizados tem demonstrado que os AGPI $\omega 3$ parecem atuar principalmente na diminuição dos níveis de triacilglicerol plasmáticos, enquanto os AGPI $\omega 6$ diminuem a concentração de LDL-colesterol. Outros fatores, como fibras na dieta, antioxidantes, sais minerais e vitaminas também afetam os níveis plasmáticos de lipídeos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 1988).

É estabelecido que a ingestão de óleo de peixe diminui a concentração de triacilglicerol do plasma em indivíduos normais e hipertrigliceridêmicos (SANDERS *et al.*, 1985). O consumo elevado de óleo de peixe (90-120g/dia) demonstrou reduzir também as concentrações de LDL-colesterol e LDL apoproteína B (apo B). Contudo, o efeito redutor de triacilglicerol plasmático é manifestado mesmo em baixas ingestões de óleo de peixe, na faixa de 10-15g/dia (SIMONS *et al.*, 1985). Os efeitos hipotrigliceridêmicos dos ácidos graxos $\omega 3$ de cadeia longa tem sido estudados no homem (HARRIS, 1989), em diferentes espécies de animais (DREVON, 1992) e em culturas de células (RUSTAN *et al.*, 1988).

De acordo com SANDERS *et al.* (1985) os AGPI $\omega 3$ de cadeia longa atuam inibindo a síntese hepática de triacilglicerol e reduzindo a síntese de apoproteína B nas VLDL. Esse efeito foi atribuído ao fato destes ácidos serem substratos pobres para as enzimas que sintetizam triacilglicerol.

O mecanismo de inibição da secreção de triacilglicerol pelos AGPI $\omega 3$ de cadeia longa ocorre, provavelmente, através da redução da via de síntese do triacilglicerol. Foi demonstrado que o EPA pode causar diminuição da síntese do triacilglicerol hepático, através da redução da atividade das principais enzimas responsáveis pela síntese de NADPH (enzima málica e desidrogenase 6-fosfato) (NOSSEN *et al.*, 1980).

De acordo com HARRIS *et al.* (1988), a redução na concentração de triacilgliceróis do plasma pode ser atribuída à queda da secreção de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis provenientes do fígado (VLDL) ou do intestino delgado (VLDL e Quilomicrons), aumento da taxa de suas remoções, ou uma combinação desses fatores. Alguns dos mecanismos propostos pelos quais isto pode ocorrer se devem a atividade aumentada das enzimas responsáveis pela hidrólise de triacilglicerol, lipase lipoproteica (LPL) e a lipase hepática de triacilglicerol (LHP) e facilidade de interação entre os quilomicrons e essas enzimas devido a diminuição da concentração de VLDL.

Mudanças na composição em ácidos graxos das membranas celulares podem afetar a atividade das enzimas ligadas à membrana. Tal efeito poderia alterar a atividade das enzimas lipolíticas (DREVON, 1992).

De acordo com observações clínicas e laboratoriais, dietas contendo gorduras saturadas resultam uma maior lipemia que dietas contendo AGPI. A diminuição da concentração de triacilglicerol no plasma ocorre devido a diminuição do nível de Quilomicrons e VLDL circulantes. AGPI de cadeia longa podem resultar quilomicrons maiores que são metabolizados mais rapidamente que os menores devido ao aumento da susceptibilidade pela lipase lipoproteica (NORUM, 1992).

Outros mecanismos, tais como redução de ácidos graxos livres no plasma devido reduzida lipólise de triacilglicerol nos tecidos adiposos (SINGER *et al.*, 1990) ou aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado (LOTTENBERG, 1992) foram propostos para elucidar a diminuição de VLDL frente a dietas ricas em AGPI de cadeia longa.

Existem muitos dados disponíveis sobre o abaixamento dos níveis de colesterol em humanos e em animais experimentais decorrentes da ação de AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ de cadeia longa. As diferenças metabólicas existentes entre os ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$, em relação às suas capacidades redutoras de colesterol, ainda não são bem estabelecidas. Em vários estudos os níveis de lipoproteínas LDL e VLDL foram reduzidos após a ingestão de dieta rica destes AGPI, o que pode ser explicado pelo aumento da remoção dessas lipoproteínas ou pela diminuição de sua produção (NESTEL, 1987; NORUM, 1992).

Os efeitos do óleo de peixe podem ser explicados pela inibição da formação de triacilgliceróis (HARRIS *et al.*, 1988), apolipoproteína B VLDL (NESTEL *et al.*, 1984) e de LDL (ILLINGWORTH *et al.*, 1984). Os ácidos graxos $\omega 6$ parecem atuar por mecanismos bem parecidos a nível de lipoproteínas. Um acréscimo da remoção de VLDL através de tecido periféricos ou pelo fígado e um acréscimo na excreção de bile pelas fezes também tem sido relatados (KRIS-ETHERTON *et al.*, 1988).

Em vários estudos, os níveis de HDL (lipoproteína de densidade alta) plasmáticos foram aumentados após a ingestão de dietas ricas em óleos de peixe (DREVON, 1992). Frequentemente, o aumento da concentração de HDL ocorre simultaneamente com a queda de concentração de LDL e VLDL. Este aumento da concentração de HDL, lipoproteína responsável pelo transporte do colesterol de tecidos periféricos para o fígado onde sofrerá degradação ou biotransformação, pode ser explicado pela redução na concentração de ácidos graxos livres presentes no plasma (SINGER *et al.*, 1990), e em consequência uma redução no fluxo de ésteres de colesterol da HDL para LDL e VLDL (ABBEY *et al.*, 1990).

De acordo com NORUM (1992) os níveis de colesterol são diminuídos através do aumento do catabolismo das LDL e o efeito das gorduras saturadas em aumentar o colesterol plasmático ocorre devido ao aumento da concentração de LDL. O mecanismo proposto parece envolver a atividade de receptores de LDL. Gorduras insaturadas aumentam a atividade de receptores de LDL, enquanto as gorduras saturadas diminuem ou suprimem a atividade prejudicando a remoção de LDL. Receptores de LDL com atividade aumentada são capazes de internalizar para as células maiores quantidades de LDL, reduzindo sua concentração plasmática e consequentemente a síntese de colesterol.

Os mecanismos propostos pelos quais AGPI $\omega 6$ de cadeia longa diminuíram e ácidos graxos saturados aumentariam o colesterol total do plasma estão apresentados de maneira resumida na tabela abaixo, a partir de trabalhos de diversos pesquisadores (KRIS-ETHERTON *et al.* , 1988).

Tabela 1 - Mecanismos propostos para os efeitos dos ácidos graxos $\omega 6$ e ácidos graxos saturados nos níveis dos lipídeos plasmáticos

Ácidos graxos $\omega 6$
-aumentam os esteróis fecais e a excreção de sais biliares
-induzem troca na composição de LDL e outras lipoproteínas
-diminuem síntese de VLDL hepático
-decrecem a síntese e aumentam o catabolismo de apolipoproteína
Ácidos graxos saturados
-diminuem a síntese hepática e a atividade da LDL-receptor
-induzem trocas na composição de VLDL e HDL
-aumentam todas as lipoproteínas
-diminuem o tamanho dos quilomicrons

HORROBIN & MANKU (1983) analisaram a eficácia do tratamento com "Efamol" (45 mg de GLA e 360mg de ácido linoléico) na diminuição do nível de colesterol plasmático de 84 pacientes. Foi verificado que em pacientes contendo nível de colesterol total acima de 5 nmol/l, o tratamento mostrou-se efetivo como agente redutor do colesterol plasmático, em oposição, aqueles com nível abaixo, aceito como normal, não mostraram resposta ao tratamento. Isto sugere que os principais componentes do medicamento, ácido linoléico e GLA, possuem ação fisiológica de regulação do metabolismo de colesterol, à qual foi atribuída à falha na fração LDL colesterol. O tratamento não teve efeito no nível de HDL colesterol e no nível de triacilgliceróis nos indivíduos testados.

Experimentos em animais alimentados com óleo de primula, contendo 71% de ácido linoléico e 9% de GLA, o colesterol foi detectado em altas quantidades no fígado e baixos níveis plasmáticos comparados ao óleo de côco (0,1% de ácido linoléico) e óleo de açafoa (79,5% de ácido linoléico) (HUANG *et al.*, 1984).

Estes resultados foram novamente confirmados por SUGANO *et al.* (1986a e 1986b) que compararam a eficácia dos ácidos graxos essenciais em reduzir o nível de colesterol plasmático de ratos. Os grupos tratados com óleo de primula, contendo 9% de GLA (SUGANO *et al.*, 1986a) ou com óleo de fungo obtido da *Mortierella ramanniana*, contendo 6% de GLA (SUGANO *et al.*, 1986b) apresentaram níveis de colesterol sérico consideravelmente menores que os outros grupos alimentados com óleo de açafoa e soja. O efeito de hipocolesterolemia tem sido associado ao próprio GLA ou à sua conversão para ácido dihomog- γ -linolênico. Nos ratos alimentados com óleo de fungo, a produção aórtica de PGE₁ foi significativamente maior, enquanto os níveis plasmáticos de TXB₂ e PGE₂ se mostraram similares ao óleo de açafoa.

Os diversos efeitos dos AGPI $\omega 3$ e $\omega 6$ no metabolismo de lipoproteínas, síntese de eicosanóides e funcionamento das plaquetas e das paredes dos vasos, os fazem de especial interesse em relação à prevenção do desenvolvimento de **aterosclerose** e de **complicações tromboembólicas**.

A aterosclerose é uma doença multifatorial de evolução lenta e longa que inicia-se pela formação nas artérias de um ateroma. Em geral, a ativação de plaquetas, monócitos e outras células brancas do sangue que se aglomeram nos sítios de injúrias endoteliais estimuladas por fatores quimioatraentes são os eventos característicos do início da formação do ateroma. O trombo formado é capaz de captar lipídeos circulantes por meio de receptores coletores, resultando o acúmulo de colesterol (LEAF & WEBER, 1988).

Um dos fatores responsáveis pela prevenção da aterosclerose é a alteração no metabolismo das lipoproteínas, como discutido anteriormente. Os ácidos graxos saturados, quando ingeridos em excesso, tendem a impedir a remoção de LDL. Por sua vez, os AGPI facilitam a remoção de LDL -colesterol tida como subfração aterogênica, que é capaz de se depositar na camada interna das artérias, responsável pela formação do ateroma (NESTEL, 1987).

A diminuição de LDL-colesterol e suas frações e o aumento da concentração de HDL quando são administrados dietas ricas em gorduras insaturadas apresentam benefícios aos indivíduos propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON *et al.*, 1988).

A suplementação de óleos de peixe na dieta parece influenciar a relação íntima no metabolismo de eicosanóides. Quando AGPI $\omega 3$ são incluídos na dieta, o EPA inibe a síntese do ácido araquidônico por utilizar o mesmo sistema enzimático, inibindo assim a produção de TXA_2 pelas plaquetas e resultando na produção de uma pequena quantidade da inativa TXA_3 . Por sua vez, a síntese de PGI_2 nas células endoteliais não é marcadamente inibida, e a atividade de outra PGI_3 de ação vasodilatadora originada do EPA é adicionada

à PGI₂. Isto resulta numa mudança no balanço hemostático o que causa um maior estágio vasodilatador com menor agregação de plaquetas. Há também inibição da produção dos potentes leucotrienos B₄ (LTB₄) originados do ácido araquidônico, diminuindo a resposta inflamatória da aterosclerose (KLOR *et al.*, 1997).

Observações epidemiológicas sugeriram que a incidência de mortes devido a ocorrência de doenças isquêmicas do coração é inversamente correlacionada ao consumo de peixe (KROMHOUT, 1989). A trombose ocorre geralmente na presença de aterosclerose e a tonificação vascular pode contribuir com o processo de oclusão trombótica vascular. Embora ainda não tenha sido provado que os AGPI influenciam favoravelmente a evolução de doenças cardiovasculares independentemente da redução do consumo de gorduras saturadas, são promissores os seus efeitos sobre a pressão sanguínea no homem (KNAPP & FITZGERALD, 1988) e nas respostas proliferativas vasculares em modelos animais (FITZGERALD *et al.*, 1983).

A ação antiarrítmica atribuída aos óleos de peixes ocorre devido à incorporação dos AGPI na estrutura da membrana do miocárdio com consequente alteração do estímulo e dos canais de cálcio (NAIR *et al.*, 1997). Estes efeitos em células cardíacas mostraram prevenir ou retardar a isquemia induzida em ratos após administração de AGPI ω 3 (KANG & LEAF, 1996).

MILLER *et al.* (1988) relataram que o 15-hidroxi ácido dihomog γ -linolênico, produto da conversão endógena do ácido dihomog γ -linolênico, é um potente inibidor endógeno do sistema lipoxigenase, conjunto de enzimas responsáveis pela síntese de compostos potencialmente perigosos em doenças cardiovasculares, os leucotrienos B₄, originados do ácido araquidônico. O nível deste inibidor foi aumentado pela administração de GLA.

As alterações em processos inflamatórios e alérgicos (asma, rinite, eczema e gota) relatados quando da administração de AGPI parecem ser resultado da inibição da formação de compostos mediadores da inflamação (MASUEV, 1997).

As prostaglandinas e os leucotrienos são liberados por uma série de estímulos nocivos mecânicos, térmicos, químicos, bacterianos e outros, contribuindo de modo importante para a gênese dos sinais e sintomas da inflamação. As PGE_2 e PGI_2 , originárias do ácido araquidônico, exacerbam a formação do edema e a infiltração leucocitária por aumentarem o fluxo sanguíneo na região inflamada. Além disso estas substâncias potencializam a atividade das bradicininas e outras aminas vasodilatadoras. Os leucotrienos (LTB_4) por sua vez, exercem ações quimiostáticas em relação aos leucócitos polimorfonucleares podendo promover a exudação do plasma por aumento da permeabilidade vascular (HORROBIN, 1992).

É conhecido que os ácidos graxos da série $\omega 6$ e $\omega 3$ desempenham funções diferentes sobre os lipídeos plasmáticos, as lipoproteínas e os eicosanóides (DYERBERG, 1986). Os efeitos antagônicos destas duas séries de ácidos graxos que utilizam os mesmos sistemas enzimáticos resultam alterações significativas na produção dos eicosanóides (WHELAN, 1997).

Os endoperóxidos prostaglandina G_2 , prostaglandina H_2 e tromboxana A_2 , produzidos a partir do ácido araquidônico nas plaquetas estimuladas constituem potentes vasoconstritores e agregadores de plaquetas, porém os correspondentes endoperóxidos derivados do EPA, prostaglandina G_3 , H_3 e tromboxana A_3 são menos ativos biologicamente (LEAF & WEBER, 1988).

Os leucotrienos B_5 (LTB_5) tem sido citados como agentes benéficos a saúde humana em alguns tipos de reações inflamatórias como a dermatite atópica e artrite reumatóide. O mecanismo parece envolver a substituição do LTB_4 , que é um dos agentes inflamatórios e quimiostático mais potentes, pelo

LTB₅ originado do EPA que é menos ativo. Isto então explicaria uma menor reação inflamatória observada com o acréscimo de AGPI ω 3 na dieta (KREMER *et al.*, 1987).

A prostaglandina E₁ (PGE₁), originada do ácido dihomio γ -linolênico possui potente ação desejável como agente antiinflamatório. Foram relatados diferentes efeitos terapêuticos tais como diminuição da pressão sanguínea, inibição da agregação plaquetária, inibição da biossíntese do colesterol e estímulo à formação de AMP cíclico, um agente antiinflamatório e inibidor da biossíntese do colesterol (HORROBIN & HUANG, 1987).

O tratamento de pacientes adultos com **eczema atópico** usando "Efamol" (*Oenothera biennis*) mostrou correção parcial desta anormalidade. Os níveis dos metabólitos poliinsaturados oriundos dos ácidos essenciais nos pacientes foram abaixo da taxa normal. Os resultados sugerem que o eczema atópico deve estar associado com a dificuldade no metabolismo envolvendo a enzima Δ 6-dessaturase e não com a ausência de ácidos graxos essenciais na dieta (WRIHT & BURTON, 1982; MANKU *et al.*, 1984).

SCHALIN-KARRILA *et al.* (1987), utilizando cápsulas de "Efamol" (45 mg de GLA) em pacientes com eczema atópico relataram a elevação no nível de ácido dihomio γ -linolênico nos fosfolipídeos do plasma, enquanto os níveis de ácido araquidônico, EPA, PGE₂ e TXB₂ não mostraram mudanças significativas.

Resultados de tratamentos clínicos de **psoríase** realizados nos EUA e África do Sul indicam que, em alguns casos, o efeito com o tratamento à base de óleo de peixe tem se mostrado superior a outros tratamentos convencionais (BARLOW, 1987).

O tratamento da **síndrome pré-menstrual** com dietas suplementadas em AGPI tem demonstrado efeitos satisfatórios. O tratamento de mulheres com cápsulas de "Efamol" mostrou eficaz em aliviar a maioria dos sintomas, como síndrome depressiva, ansiedade, irritabilidade e mastalgia (PUOLAKKA *et al.*, 1985). A suplementação com cápsulas de óleo de peixe demonstrou reduzir os sintomas da dismenorreia em adolescentes (HAREL *et al.*, 1996).

O tratamento de **neuropatia diabética** em humanos com ingestão de cápsulas de "Epogam" (*Oenothera biennis*) demonstrou ser capaz de prevenir diferentes sintomas e em alguns casos reverter as condições. A melhora dos sintomas neurológicos decorrentes da diabetes se mostrou significativamente superior ao placebo (KEEN *et al.*, 1993).

Com relação a **pressão e a coagulação sanguínea**, tem sido sugerido que a administração de óleos de peixe promove uma diminuição da pressão sanguínea e um aumento no tempo de coagulação do sangue. Estes fatores são devidos aos metabólitos do EPA, que tem como principal função uma maior vasodilatação e anti-agregação plaquetária.

De acordo com HAMBERG (1980), o EPA atua como inibidor plaquetário, competindo com o ácido araquidônico pela cicloxigenase plaquetária. A agregação plaquetária é o resultado da alta taxa de tromboxana A₂ (TXA₂), que é um metabólito do ácido araquidônico produzido pelas plaquetas.

O ácido araquidônico é o precursor da prostaciclina (PGI₂) e do tromboxana A₂ (TXA₂), sintetizados respectivamente, pelas células endoteliais e pelas plaquetas. Esses dois compostos apresentam efeitos opostos sobre a agregação de plaquetas e vasoconstrição, representando papéis importantes na homeostase. O EPA pode substituir o ácido araquidônico como substrato para a enzima cicloxigenase e, assim alterar o balanço fisiológico (WHELAN, 1997).

Quando o EPA é adicionado na dieta, ocorre uma diminuição da produção de TXA_2 e um acréscimo da produção de TXA_3 , a qual tem um poder de agregação e vasoconstrição inferior ao TXA_2 . Nas células endoteliais, a produção de prostaglandinas I_2 (PGI_2) não é marcadamente inibida, e a atividade fisiológica da nova prostaglandina I_3 (PGI_3) sintetizada a partir do EPA, é somada a PGI_2 . O resultado final, como citado anteriormente, é uma mudança no balanço homeostático para uma maior vasodilatação e uma menor agregação plaquetária (NORDOY, 1989).

Do experimento descrito por BORDET *et al.* (1986) em que células endoteliais humanas foram incubadas com ácido araquidônico e EPA, concluiu-se que, em quantidades presentes em concentrações fisiológicas, o ácido araquidônico modula positivamente a oxigenação do EPA ao invés de inibi-lo competitivamente.

A prostaciclina (PGI_2) tem demonstrado reduzir a pressão arterial em animais experimentais por sua ação vasodilatadora e inibidora da reabsorção de cloreto (natriúria, caliúria) (KNAPP & FITZGERALD, 1988).

Estudos enfatizam que os AGPI das séries ω_6 e ω_3 afetam também as funções imunológicas. A PGE_2 , originária do ácido araquidônico, quando em baixas concentrações ativa células do sistema imunológico, enquanto em altas concentrações ($> 10^{-8}$ M) exerce efeitos imunossupressores sobre os linfócitos e macrófagos (OTA *et al.*, 1979).

Supõe-se que a PGE_2 sejam capazes de influenciar as funções do linfócito T e linfócito B, deprimindo a responsividade imunológica. O linfócito T_K ("Killer") ativo na inibição do crescimento tumoral e na supressão de células malignas pode ser inibido pelas prostaglandinas quanto à sua capacidade de rejeitar células *in vitro* (BAILEY, 1985).

A possibilidade de supressão da função imunológica (inibição das funções de macrófagos e neutrófilos) pode ter importantes aplicações práticas, particularmente em pacientes desnutridos, com câncer ou politraumatizados. Por isso, sugeriu-se que as prostaglandinas, ao inibirem as funções dos linfócitos B e T, poderiam facilitar a aceitação de enxertos (OTA *et al.*, 1979).

Embora os mecanismos pelos quais os AGPI afetam a resposta imunológica não sejam completamente conhecidos, existem hoje várias teorias demonstrando que esses ácidos graxos podem regular a resposta imunológica através de alterações estruturais e bioquímicas.

As alterações estruturais estão relacionadas à ação a nível de membrana celular, as quais podem afetar sua fluidez e permeabilidade, e assim o transporte de íons, água e outros nutrientes essenciais. Estas alterações de membrana influenciarão diretamente a função dos receptores presentes envolvidos nos processos de iniciação da resposta imunológica, afetando assim os mecanismos de transdução dos sinais hormonais (OTA *et al.*, 1979; WOOD, 1990).

As alterações bioquímicas dizem respeito às modificações na síntese de eicosanóides. Embora estas substâncias possam ser sintetizados por várias células do sistema imunológico (esplenócitos, timócitos, linfócitos, leucócitos), os macrófagos são as principais fontes de prostaglandinas, enquanto os linfócitos geram quantidades limitadas. As prostaglandinas, especialmente as PGE₂, inibem vários aspectos da resposta imunológica, incluindo a proliferação dos linfócitos, secreção de linfocinas, síntese de collagenase pelos macrófagos e atividade tumoricida de macrófagos ativados (MARSHALL & JOHNSTON, 1983; WEBB *et al.*, 1980).

Os ácidos graxos apresentam uma participação relevante nos processos de carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, como o de cólon, fígado, endométrio, próstata, mamário e outros. Um alto consumo de AGPI tem sido associado com a diminuição da incidência, crescimento e dispersão de diversos tumores experimentais (BAGGA *et al.*, 1997).

Além dos fatores nutricionais envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese humana, os fatores ambientais tais como fumo, álcool, higiene, stress, drogas, clima e poluição também devem ser levados em consideração (HILL, 1981).

TAHIN *et al.* (1982) demonstraram que durante a carcinogênese mamária humana, ocorre uma acentuada alteração na composição em ácidos graxos do tecido tumoral em relação ao tecido mamário normal, com o aumento da taxa de AGS, e subsequente diminuição da taxa de AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ e da quantidade de ácidos graxos com mais de 20 átomos de carbono.

NORDOY (1989) relata testes de atividades antitumorais dos AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ avaliados em ratos como por exemplo: tumor mamário, pancreático e outras desordens neoplásticas. Nesses estudos, segundo o autor, grandes quantidades de óleo de peixe tem sido necessária para suprimir a oncogênese.

As investigações mais recentes tem concluído que os AGPI $\omega 6$ e $\omega 3$ atuam de forma diferente no processo de carcinogênese. O aumento na ingestão de AGPI $\omega 3$ é capaz de causar uma paralização ou redução no desenvolvimento do tumor cancerígeno, enquanto a administração de quantidades equivalentes de AGPI $\omega 6$ podem resultar no aumento do desenvolvimento do tumor (CAVE, 1996; HARVEI *et al.*, 1997).

A contestação dos efeitos benéficos dos AGPI foram relatados por alguns autores (CURB & REED, 1985). Dentre as razões atribuídas para explicar a falta de reprodutibilidade desses dados, destacam-se os seguintes: a possibilidade de que os efeitos benéficos em doenças cardiovasculares poderia ser uma variação de um outro fator presente na dieta como a redução de gorduras saturadas, a pobre relação entre as taxas de mortes devido a problemas coronarianos e o consumo de peixe num estudo realizado em sete países (KROMHOUT *et al.*, 1988) e a possibilidade de peroxidação dos AGPI (STEINBERG *et al.*, 1989).

Deve-se levar em consideração que o alto nível de poliinsaturação destes ácidos graxos torna-os mais susceptíveis aos processos oxidativos com consequente formação de compostos indesejáveis como os radicais livres, peróxidos, hidroperóxidos e outros produtos secundários e terciários da oxidação.

A suplementação de AGPI na dieta visando seus efeitos benéficos tem sido contestada por alguns autores, uma vez que, a possibilidade de oxidação dos AGPI poderia ser em fator prejudicial. STEINBERG *et al.* (1989) relataram que a peroxidação das LDL pode causar significativas alterações das propriedades físicas e biológicas das LDL no homem. Estas alterações poderiam provocar acúmulo de colesterol nas paredes dos vasos arteriais e consequente aumento da aterogenicidade.

Experimentos posteriores realizados com AGPI adicionados de antioxidantes reforçaram a possibilidade de que os resultados controversos de seus efeitos foram em sua maioria em decorrência da produção de peróxidos por oxidação dos AGPI (FITZGERALD *et al.*, 1983).

2.1.3. TÉCNICAS DE FRACIONAMENTO PARA CONCENTRAÇÃO

Em vista do grande potencial médico e nutricional dos AGPI relatado anteriormente, torna-se de interesse estudar métodos para extração, concentração e purificação dos AGPI a partir de fontes de fácil obtenção e baixo custo.

As principais fontes de obtenção de ácidos graxos são os óleos vegetais, seguido em menor escala de fontes animais e pequenas quantidades das fontes microbianas (WHITWORTH & RATLEDGE, 1974). A disponibilidade da fonte, facilidade de obtenção e os tipos de ácidos graxos encontrados, uma característica peculiar de cada fonte, determinarão sua importância nutricional e comercial. Os ácidos graxos predominantes em óleos vegetais são: ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1) e linoléico (18:2). Em óleos de peixe, em especial os de água salgada, merecem destaque a presença dos AGPI de cadeia longa pertencentes à família $\omega 3$ (20:5 e 22:6) (ANONIMOUS, 1993).

As fontes microbianas (bactérias, algas, leveduras e fungos) para obtenção de óleos contendo AGPI por processos fermentativos foram relatadas por YONGMANITCHAI & WARD (1989). Dentre elas merecem destaque a obtenção de EPA por linhagens de *Mortierella* sp (SHIMIZU *et al.*, 1988) e a obtenção de GLA por diferentes linhagens de *Mucor* sp (KANG & SHIN, 1989).

Os diferentes métodos relatados para extração, concentração e purificação dos AGPI de diferentes fontes incluem principalmente métodos físicos e químicos. A complexação com uréia, a cristalização fracionada a baixas temperaturas, o fracionamento com solvente e a extração com fluido super crítico são alguns dos métodos usados capazes de remover os componentes mais saturados do óleo.

A técnica de complexar os ácidos graxos ou seus ésteres com compostos de uréia, formando cristais, é relatada como a mais eficiente no sentido de concentrar AGPI (ABU-NASR *et al.*, 1954; HAA GSMA *et al.*, 1982; ACKMAN *et al.*, 1988; TRAITLER *et al.*, 1988).

O trabalhos referentes ao método de fracionamento com complexação com uréia ou também chamada inclusão em uréia abordam técnicas de concentração de AGPI, principalmente EPA e DHA. A técnica baseia-se no grau de insaturação, sendo que os ácidos graxos mais insaturados são menos incluídos nos aductos de uréia.

HAAGSMA *et al.* (1982) prepararam um concentrado de ácidos graxos $\omega 3$ via complexação com uréia em metanol utilizando 1kg de óleo de fígado de bacalhau. Os autores obtiveram um concentrado contendo 85% de AGPI $\omega 3$. O processo foi dividido nas seguintes etapas: saponificação do óleo; extração dos ácidos graxos após acidificação do meio; formação dos compostos de inclusão com uréia onde os ácidos graxos livres são misturados com solução de uréia em metanol sob aquecimento de 60-65°C e deixados em repouso por 12 horas à temperatura ambiente e por fim a extração dos ácidos graxos feitas após filtração a 4°C por 3 horas onde o filtrado tratado com hexano apresentou grandes quantidades de AGPI $\omega 3$.

Os compostos de inclusão com uréia foram formados em uma solução de uréia com metanol muito próxima à saturação à temperatura de 60-65°C. A influência da proporção de uréia (mmol) / ácido graxo para a formação dos complexos de inclusão tem demonstrado que a eficiência máxima pode ser obtida numa relação em torno de 3 (ACKMAN *et al.*, 1988).

A obtenção de concentrado de GLA (95%) a partir do óleo de groselha negra foi possível a partir da técnica de fracionamento por inclusão em uréia seguida de HPLC preparativa em coluna de fase reversa. Procedimentos de destilação e cristalização fracionada não mostraram a mesma eficiência (TRAITLER *et al.*, 1988).

O procedimento usando as duas etapas, inclusão em uréia (4:1 uréia/ácidos graxos a temperatura final de 4°C) seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativa em coluna de fase reversa C18 permitiu a obtenção de concentrados de EPA e DHA obtidos de óleo de fígado de bacalhau e da microalga *Isochrysis galbana*. A associação dos métodos se mostrou altamente eficiente resultando um concentrado contendo 95% de AGPI de interesse (MEDINA *et al.*, 1995).

A cristalização fracionada a baixas temperaturas consiste numa separação termomecânica, na qual os componentes do óleo com diferentes pontos de fusão são separados por cristalização parcial seguida da extração em uma fase líquida (solvente). A metodologia descrita por MOFFAT *et al.* (1993) envolve a rápida solidificação de gotas de óleo de peixe em nitrogênio líquido seguida de extração com acetona a 60°C. Os triacilgliceróis contendo ácidos graxos saturados ou monoenólicos são totalmente removidos pelo processo, permitindo a obtenção de triacilgliceróis insaturados. O óleo de sardinha original contendo 30% de AGPI (EPA e DHA) teve seu conteúdo aumentado para 46% após concentração.

Este processo tem a vantagem de ser simples e evitar modificações químicas dos triacilgliceróis insaturados. Entretanto esta cristalização tem sido descrita como um método lento de purificação, sendo que seu sucesso depende da pureza da matéria prima utilizada e do solvente aplicado (TIRTIAUX, 1976).

O método "solvent winterization" tem sido largamente estudado para obtenção de concentrados de AGPI. O fracionamento com solventes promovem a separação dos componentes baseado na diferença de solubilidade dos triacilglicerol a uma certa temperatura. Os solventes mais usados são acetona, nitrometano, álcool isopropílico, álcool etílico, hexano e éter de petróleo.

YANG *et al.* (1992) estudaram o efeito da polaridade do solvente e da temperatura de fracionamento nas propriedades físico-químicas no óleo das vísceras de lula (*Illex argentinus*). O fracionamento do óleo de lula resultou em uma fração líquida (oleína) e em uma fração sólida (estearina) separadas por fracionamento à seco à 4°C. A fração oleína apresentou os maiores níveis de AGPI enquanto a fração sólida considerada inicialmente um sub produto de baixo valor também foi capaz de fornecer AGPI após fracionamento com quatro misturas de solventes a partir de hexano e acetona. As misturas mais polares foram capazes de extrair menores quantidades de ácidos graxos saturados e conseqüentemente altos níveis de EPA e DHA. A porcentagem de EPA e DHA extraída da estearina diminuiu com o decréscimo da temperatura de fracionamento em todas as misturas de solventes avaliadas, isto pode se dar devido ao fato dos triacilgliceróis contendo principalmente ácidos graxos saturados cristalizam-se mais rapidamente com o decréscimo da temperatura de fracionamento.

O óleo obtido do fungo *Mortierella ramanniana* var *angulispora* após submetido ao fracionamento com diferentes solventes e temperaturas resultou na duplicação nos níveis de GLA (conteúdo de 10,5% em relação aos ácidos graxos totais) após extração dos glicerídeos com etanol à 4°C. Apesar da eficiência do processo ($\approx 60\%$), devido ao alto investimento e custos de operação, tem sido pouco empregado em escala industrial (YOKOCHI *et al.*, 1990).

O método de extração em fluido super crítico com dióxido de carbono tem recebido destaque nas publicações mais recentes. Esta técnica tem sido apontada de larga aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos que envolvem o manuseio de compostos bioativos e termolábeis. O CO₂ é o solvente escolhido devido à sua temperatura e pressão crítica moderadas (31°C e 7,3 Mpa), inércia e disponibilidade.

Os princípios físicos que regem a tecnologia da extração super crítica tem sido revisados por vários autores. Um fluido super crítico é um fluido à temperatura e pressão acima do seu ponto crítico. A possibilidade de variar a capacidade de solvatação de um fluido permite promover a extração e separação dos solutos em uma estreita faixa de temperatura e pressão. A viabilidade de aplicação deste processo tem se mostrado promissora e bons resultados foram obtidos usando ésteres metílicos ou etílicos de AGPI apesar do alto custo operacional (NILSSON *et al.*, 1991; GUNNLAUGSDOTTIR & BJÖRN, 1995).

A separação seletiva de AGPI por outros métodos como cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HIDAJAT *et al.*, 1995), coluna de troca iônica usando zeolite-Y (ARAI *et al.*, 1987) e o método de Corey (COREY & WRIGHT, 1988, WRIGHT *et al.*, 1987) constituíram outras alternativas relatadas a nível experimental.

A obtenção dos AGPI pelos processos químicos convencionais tem demonstrado ser desvantajosa. O processo consome muita energia (alta temperatura e pressão), além de deixar resíduos tóxicos e os ácidos graxos obtidos serem escuros e impuros, devido às reações secundárias que ocorrem no processo e, desse modo, para se chegar aos produtos finais são necessárias etapas adicionais de purificação que aumentam o custo do processo.

A utilização de processos biotecnológicos com aplicação de enzimas tem possibilitado a obtenção de óleos e gorduras modificadas. As lipases tem um importante papel devido ao fato de serem disponíveis comercialmente em grandes quantidades, obtidas a partir de fontes microbianas, animais ou vegetais, serem seletivas em relação aos seus substratos e também catalisadores muito eficientes os quais são efetivos sob condições brandas de operação, onde os grupos acilas não sofrem alterações químicas indesejáveis.

A principal vantagem das lipases comparadas aos processos químicos convencionais se refere à sua seletividade em relação aos seus substratos. As técnicas químicas não demonstram especificidade de posição, ocorrendo ao acaso, por esta razão dificultam que óleos e gorduras obtidos por processo químicos demonstrem propriedades desejáveis. Algumas lipases são específicas para as posições sn-1 e sn-3 dos triacilglicerol permitindo que o processo seja dirigido para a formação de gorduras com composição e propriedades peculiares. Em contrapartida, a interesterificação química ocorre com redistribuição aleatória dos ácidos graxos nos triacilgliceróis (randomização) (YAMANE, 1987, MACRAE, 1983).

Embora as lipases tenham sido estudadas por muitos anos e possam ser produzidas em larga escala, estas enzimas têm sido de uso restrito da maioria das indústrias. Muitos estudos tem sido realizados com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos de gorduras catalisados por lipases, estes estudos incluem a imobilização da enzima, estudos cinéticos, modificações químicas e desenvolvimento de bioreatores (MALCATA *et al.*, 1990, QUINLAN & MOORE, 1993, VALENZUELLA & NIETO, 1994).

A tabela 2 traz um sumário das principais literaturas disponíveis sobre a obtenção de concentrados de AGPI usando lipases.

Tabela 2 - Enriquecimento de ácidos graxos poliinsaturados por reações de hidrólise, esterificação e interesterificação usando lipases.

Enzima	Estado:	Reação catalisada	AGPI enriquecido	Referência
MM	Imobilizada	Interesterificação	EPA/DHA	HARALDSSON, 1989
LN	Livre	Hidrólise	GLA	HILLS, 1989
LN	Livre	Esterificação	GLA	HILLS, 1989
MM	Imobilizada	Hidrólise	DHA	LANGHOLZ, 1989
CC e AN	Livre	Hidrólise	EPA/DHA/ DPA	HOSHINO, 1990
CC e CV	Livre	Esterificação	EPA/DHA/GLA	OSADA, 1990
MM e LN	Imobilizada	Esterificação	DHA/GLA	HILLS, 1990
MM	Livre	Hidrólise	GLA	MUKHERJEE, 1991
MM	Livre	Esterificação	GLA	MUKHERJEE, 1991
CC	Livre	Hidrólise	DHA	TANAKA, 1992
MM e CV	Livre	Esterificação	EPA/DHA	LIE & MOLIN, 1992
MM	Imobilizada	Interesterificação	EPA/DHA	ZU-YI & WARD, 1993
CC	Imobilizada	Hidrólise	GLA	RAHMATULAH, 1994
MM	Imobilizada	Esterificação	GLA	RAHMATULAH, 1994
GC RD	Livre	Hidrólise	EPA/DHA	SHIMADA, 1994
CV	Imobilizada	Esterificação	DHA	TANAKA, 1994
GC	Imobilizada	Esterificação	GLA	FOGLIA,1995
GC	Livre	Hidrólise	EPA/DHA	SHIMADA, 1995
CC	Livre	Hidrólise	AA	SHIMADA, 1995a

MM: *Mucor miehei* (Lipozyme)
LN: Lipase vegetal de nabo
CC: *Candida cylindracea*
AN: *Aspergillus niger*
CV: *Chromobacterium viscosum*
RA: *Rhizopus delemar*
GC: *Geotrichum candidum*

EPA: ácido eicosapentaenóico
DHA: ácido docosahenaenóico
DPA: ácido docosapentaenóico
GLA: ácido γ-linolênico
AA: ácido araquidônico

2.2. LIPASES

2.2.1. FONTES E PROPRIEDADES

As lipases verdadeiras (E.C.3.1.1.3) são definidas como enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (TAG) para produzir ácidos graxos livres (AGL), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e glicerol. Essa reação é reversível catalisando a formação de acilgliceróis a partir de glicerol e ácidos graxos. Estas enzimas, apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. (BROCKMAN *et al.*, 1988). Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídeos (acilhidrolases, colesterolesterase, tioesterases, etc).

O interesse pelas enzimas lipolíticas iniciou-se em 1846 quando foi primeiramente demonstrada a atividade da lipase no pâncreas; seguiram-se os estudos de lipase do estômago e lipases em sementes de plantas. Desde 1904 tem-se conhecimento da presença de enzimas lipolíticas em leite de vaca, cabra, porca e humano. Somente na década de 1950 foi observado notável avanço no conhecimento destas enzimas (MATTSON & BECK, 1955).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microorganismos. As lipases provenientes de microorganismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento à partir do caldo fermentativo, são geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. Uma grande variedade de microorganismos produzem lipase. Os gêneros principais constituem as leveduras *Candida* e *Torulopsis*; fungos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor*; e bactérias *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Na maioria dos casos estas lipases são extracelulares, permitindo sua extração, isolamento e purificação (BORGSTON & BROCKMAN, 1984).

Numerosas frutas, vegetais e principalmente sementes oleaginosas, como mamona, aveia, trigo, soja, algodão, centeio, cevada e colza também exibem atividade lipolítica. A atividade máxima tem sido demonstrada durante o processo de germinação das sementes, enquanto durante o crescimento da planta a atividade lipolítica diminui concomitantemente com a diminuição dos TAG armazenados. (URQUHART *et al.*, 1984).

As lipases vegetais e de frutas são relativamente pouco conhecidas quando comparadas às microbianas. A importância destas enzimas está relacionada ao próprio metabolismo dos vegetais no fornecimento de energia e esqueleto de carbono para crescimento do embrião. Enquanto lipases microbianas são primordialmente específicas quanto a posição, as lipases de origem botânica estão relacionadas à especificidade de ácidos graxos, sendo em sua maioria inespecífica posicionalmente. A lipase encontrada em milho se mostrou ativa em acilglicerol contendo ácido linoléico e oleico, os quais são os maiores constituintes do óleo de milho (LIN *et al.*, 1983). A lipase de aveia, a mais ativa das lipases obtidas de grãos de cereais, mostrou atuar na presença de CaCl_2 , agindo seletivamente sobre ácido oleico do TAG do óleo de oliva (PIAZZA, 1989). A lipase de milho demonstrou alta atividade na hidrólise na posição primária do TAG, sendo mais ativa contra éster do oleil do que estearil (HUANG *et al.*, 1988).

As lipases de várias fontes foram purificadas e suas propriedades investigadas. Geralmente são glicoproteínas de peso molecular na faixa de 20000 a 60000 daltons dependendo de sua fonte de origem. A maioria das lipases purificadas, contém aproximadamente 2% a 15% de carboidratos. A composição mostra aminoácidos hidrofóbicos, o que talvez explique sua capacidade de agir na interface óleo / água. As lipases extracelulares perdem atividade na estocagem acima de 45° C. Em geral, lipases têm pH ótimo entre 5 e 9 com um máximo de 6 e 8.

2.2.2. ESPECIFICIDADE DAS LIPASES

As lipases demonstram especificidade em relação à posição do ácido graxo no triacilglicerol ou em alguns casos ao próprio ácido graxo e seu grau de insaturação. De acordo com sua especificidade as lipases podem ser divididas segundo MACRAE & HAMMOND (1985) em três grupos:

Lipases 1,3 específicas: lipases que catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições sn-1 e sn-3 dos acilgliceróis. A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2-monoacilglicerol (MAG) ou 1,2 (2,3)-diacilglicerol (DAG) formados, ambos quimicamente instáveis podem ser isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3, produzindo 1,3- diacilglicerol e 1(3)- monoacilglicerol.

As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* pertencem a este grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase sn-1,3 específica, e algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) tem demonstrado possuir este tipo de especificidade (HASSANIEN & MUKHERJEE, 1986).

Lipases não específicas: lipases que catalisam a hidrólise de triacilglicerol (TAG) para ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, de modo aleatório. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou a posição em que este está esterificado no glicerol. Resultam em glicerol, ácidos graxos mono e diacilglicerol como intermediários da reação.

As lipases de *Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*, demonstram ausência de especificidade.

Lipases ácido graxo específicas: lipases que catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilglicerol. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa que contenham dupla ligação *cis* na posição $\Delta 9$. Observa-se que ácidos graxos saturados e insaturados em outras posições, que não $\Delta 9$, são fracamente hidrolisados.

As lipases podem ainda possuir estereoespecificidade que é a habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. A enantiespecificidade das lipases pode mudar com o tipo de substrato dependendo da natureza química do éster (CASTRO & ANDERSON, 1995).

2.2.3. REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPI)

A utilização de lipases tem aberto um novo caminho para a biotecnologia industrial de óleos e gorduras, tornando os processos biotecnológicos com boas perspectivas de aplicação.

A aplicação de lipases com o objetivo de obter concentrados de AGPI de importância nutricional depende em primeira instância da capacidade de absorção destes ácidos pelos humanos. É conhecido que os ésteres de AGPI com álcoois primários apresentam absorção praticamente nula e podem resultar em metabólitos tóxicos. Por sua vez, os AGPI livres apresentam uma extensão de absorção significativa mas possuem a desvantagem de sofrerem facilmente deterioração oxidativa. Em contrapartida, os AGPI esterificado ao glicerol na forma de acilgliceróis são melhores absorvidos sendo esta a forma menos obtida pelos processos químicos disponíveis (HORROBIN, 1992).

Entre os processos mais promissores para modificação dos lipídeos estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e interesterificação na presença de lipases (MALCATA *et al.*, 1990; QUINLAN & MOORE, 1993). Genericamente, a interesterificação refere-se às reações de acidólise, alcoólise e transesterificação que estão demonstradas esquematicamente nas figuras 3 e 4.

Numerosas aplicações destas reações, catalisadas por lipases tem sido empregadas para obtenção de gorduras estruturadas, visando a concentração de AGPI obtidos de diferentes fontes e em variadas condições experimentais (MURKHERJEE, 1990).

Os principais trabalhos publicados sobre este assunto serão aqui apresentados em ordem cronológica visando demonstrar a evolução dos processos biotecnológicos para concentração de AGPI por reações catalisadas por lipases.

Figura 3 - Representação esquemática das reações de hidrólise e esterificação catalisadas por lipases.

1. REAÇÃO DE HIDRÓLISE



2. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO



Figura 4 - Representação esquemática das reações de interesterificação catalisadas por lipases.

REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO:

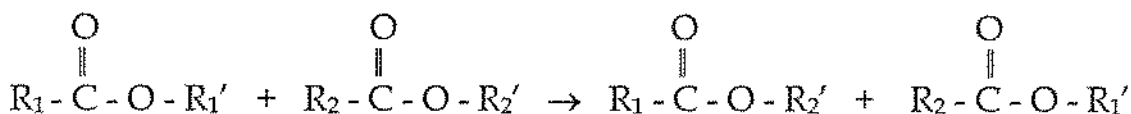
a - Acidólise (reação de éster com ácido)



b - Alcoólise (reação de éster com álcool)



c - Transesterificação (reação de éster com éster)



2.2.3.1. HIDRÓLISE

A reação de hidrólise do TAG envolve ataque na sua ligação éster na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. Esta reação procede em estágios, resultando os intermediários DAG e MAG. Na primeira etapa da reação a molécula de lipase forma um complexo com a molécula do lipídeo. Se há excesso de água no sistema, parte do ácido graxo no complexo recebe a molécula de água, liberando ácido graxo. A alta especificidade das lipases em relação ao tipo e posição do resíduo de ácido graxo permite um grande número de modificações dos óleos e gorduras.

A hidrólise parcial de óleos contendo AGPI por métodos enzimáticos tem se mostrado promissora para a obtenção de acilgliceróis enriquecidos em AGPI. Em sua maioria, os AGPI dos óleos de peixe estão localizados na posição sn-2 do TAG, portanto os acilgliceróis resultantes da hidrólise por lipases com especificidade posicional sn-1 e sn-3 perderão os ácidos saturados e monoinsaturados normalmente presentes nestas posições resultando aumento no conteúdo de AGPI (BROCKERHOFF *et al.*, 1969).

Entretanto a obtenção de acilgliceróis ricos em AGPI após a ação de lipase inespecífica de *Candida cylindracea* tem demonstrado a resistência destes ácidos à ação enzimática e a possibilidade de aplicação das enzimas inespecíficas visando concentrar AGPI (TANAKA *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1993).

Os trabalhos pioneiros iniciaram-se com BOTTINO *et al.* (1967) demonstrando que os componentes EPA e DHA presentes em óleo de baleia resistiam à ação hidrolítica por lipase pancreática. Os AGPI foram encontrados em altas quantidades nas frações DAG e TAG após atuação da enzima.

Posteriormente, HILLS *et al.* (1989) deram início à uma série de estudos visando concentrar o GLA obtido de fontes vegetais por reações de hidrólise e esterificação catalisadas por lipases. Os autores descreveram a hidrólise de óleo de prímula (*Oenothera biennis* L. contendo 9,5% de GLA) catalisada por lipase vegetal (*Brassica napus* L.). Nas frações MAG e DAG o conteúdo de GLA foi de 45 e 28% respectivamente, após 1 hora de reação, demonstrando resistência do GLA à atuação enzimática.

Lipases microbianas obtidas de *Candida cylindracea* e *Aspergillus niger* foram capazes de duplicar o conteúdo de AGPI, em especial EPA e DHA, presentes em óleo de sardinha e óleo de fígado de bacalhau comparados ao óleo original após 100 horas de reação hidrolítica a 20°C. O curso da hidrólise foi acompanhado demonstrando o acréscimo na porcentagem de AGL e a redução dos acilgliceróis, dos quais os remanescentes apresentaram altos níveis de AGPI (HOSHINO *et al.*, 1990).

Lipase obtida de uma linhagem de bactéria marinha capaz de hidrolisar óleo de peixe foi relatada por ANDO *et al.* (1991). Ácidos graxos saturados e monoinsaturados foram facilmente liberados do TAG do óleo de peixe após atuação da linhagem VB-5 selecionada. Os AGPI permaneceram esterificados (40%) nos acilgliceróis resultantes da hidrólise e a fração restante (60%) foi liberada como AGL.

TANAKA *et al.* (1992) analisaram diferentes lipases microbianas visando aumentar o conteúdo dos AGPI de óleos de peixe por reação hidrolítica. Lipase de *Candida cylindracea* demonstrou efeito significativo na concentração de DHA nos acilgliceróis resultantes, chegando a triplicar sua concentração original após 60% de hidrólise. Lipases de *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas* e *Chromobacterium viscosum* não demonstraram efeitos satisfatórios.

Os mesmos autores relataram posteriormente a hidrólise enzimática de óleo de atum com lipase de *Candida cylindracea* e posterior separação de DHA por precipitação titulométrica dos outros ácidos graxos do óleo. A subsequente esterificação do concentrado de DHA com glicerol por lipase imobilizada de *Chromobacterium viscosum*, resultou na obtenção de acilgliceróis contendo acima de 46,5% de DHA (TANAKA *et al.*, 1994).

A lipase extracelular obtida de *Fusarium oxysporum* foi avaliada quanto a habilidade em concentrar AGPI ω 3 presentes em óleo de sardinha e de fígado de bacalhau. A reação hidrolítica realizada com 49U (unidades) de enzima resultou em um conteúdo máximo de 30% de AGPI nos acilgliceróis após 60 horas de reação (HOSHINO *et al.*, 1992).

A relação entre especificidade das lipase (posicional ou de ácidos graxos) e sua possível capacidade para aumentar a concentração de AGPI nos acilgliceróis foi analisada por SHIMADA *et al.* (1994). A lipase obtida de *Candida cylindracea* (não específica), foi comparada com as lipases de *Geotrichum candidum* (especificidade de ácido graxo) e *Rhizopus delemar* (sn 1, 3 específica). A hidrólise do óleo de atum (16h à 30°C) por lipase de *G. candidum* resultou em acilgliceróis contendo 48,7% de DHA e EPA. Na hidrólise com lipase de *C. cylindracea* os acilgliceróis apresentaram 56,3% de AGPI.

SYED RAHMATULLAH *et al.* (1994a) descreveram a hidrólise parcial do óleo de semente de primula (*Oenothera biennis* L.) e borragem (*Borago officinalis* L.) usando lipase de *Candida cylindracea* o que levou a um acréscimo no conteúdo de GLA de 9,4% de GLA para 46,5% na fração acilglicerol não hidrolisada do óleo de primula após 2 horas de reação à 40°C. Outras lipases testadas, como *Lipozyme* e lipase pancreática não apresentaram resultados significativos (aproximadamente 1,3× de acréscimo).

A resistência do DHA à ação hidrolítica da lipase inespecífica de *Candida cylindracea* foi confirmada por TANAKA *et al.* (1993). Os autores obtiveram uma mistura de acilgliceróis (tri, di e mono) nos quais as concentrações de DHA foram duplicados em relação ao teor inicial do óleo de atum.

MAERH *et al.* (1994) estudaram a aplicação da lipase de *Pseudomonas* sp (Amano P) para aumentar a concentração de AGPI nos acilgliceróis obtidos após a hidrólise de óleos marinhos. A estabilidade da ligação éster dos AGPI e a regioseletividade da enzima para atuar nas posições sn-1 e sn-3 determinaram a resistência à hidrólise desses ácidos, resultando acilgliceróis em que os níveis de AGPI foram duplicados.

A possível aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* para concentrar AGPI foi novamente analisada por SHIMADA *et al.* (1995a). Os autores descreveram a hidrólise de óleo de atum tendo em vista a obtenção de acilgliceróis enriquecidos em EPA e DHA. A eficiência da hidrólise foi testada em diferentes substratos: em óleo de atum previamente fracionados de acordo com o grau de insaturação em HPLC preparativa ; em mono, di e tri-DHA obtidos por hidrólise prévia do óleo de atum com lipase de *Candida cylindracea*; e finalmente em ésteres etílicos de AGPI (GLA, EPA e DHA). Os resultados comprovam que a porcentagem de hidrólise decresceu de acordo com o aumento das insaturações das frações do óleo de atum; a ordem de atividade hidrolítica da enzima foi de MAG > DAG > TAG. A lipase de *G. candidum* não hidrolisa ésteres etílicos de AGPI. Os autores sugeriram que a especificidade demonstrada pela lipase de *Geotrichum candidum* poderá se útil para obtenção de TAG ricos em AGPI após hidrólise do óleo de atum. Altos níveis de TAG (98%) foram obtidos por possíveis reações de transacilação e/ou condensação dos acilgliceróis após 16 horas de reação.

A reação de hidrólise de óleo de fungo obtido de *Mortierella alpina* (óleo contendo ácido araquidônico) por diferentes lipases microbianas (*Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delemar* e *Fusarium heterosporum*) foi relatada por SHIMADA *et al.* (1995b). A enzima obtida de *Candida cylindracea* se mostrou mais eficiente no aumento da concentração de ácido araquidônico neste óleo. A hidrólise do óleo de fungo (52% de hidrólise após 16hs de reação à 35°C) catalisada por lipase de *Candida cylindracea* (90U) duplicou o conteúdo de ácido araquidônico (25% no óleo original para 50% após hidrólise) nos acilgliceróis remanescentes.

McNEILL *et al.* (1996) sintetizaram TAG ricos em AGPI por hidrólise de óleo de peixe catalisada por lipases de *Candida rugosa* ou *Geotrichum candidum* seguida da interesterificação dos acilgliceróis com AGPI livres por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*. A porcentagem de AGPI ω 3 (DHA + EPA) aumentou de 31% no óleo original para o valor final de 45% em relação aos outros ácidos graxos da constituição após 50% de hidrólise com as lipases de *Candida rugosa* ou *Geotrichum candidum* (resultados similares) em 24 horas de reação à 25°C. A concentração dos AGPI, em especial do DHA refletiu no aumento da proporção DHA/EPA e concomitante redução dos níveis de ácidos saturados (C14-C18) e monoinsaturados. A reação posterior para esterificar os acilgliceróis parciais obtidos da hidrólise com AG livres provindos de óleo de peixe ou girassol resultou em 95% de TAG após 100hs de reação à 55°C catalizada por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*.

2.2.3.2. ESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação entre álcoois polihídricos e AGL é a reação inversa da hidrólise do acilglicerol correspondente. A relação entre as velocidades das reações direta (hidrólise) e inversa (esterificação) é usualmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação.

A reação de esterificação por métodos enzimáticos pode ser aplicável para a produção de acilgliceróis enriquecidos com AGPI que podem facilmente ser absorvidos pelo organismo humano.

A aplicação da reação reversa da hidrólise de TAG foi demonstrada primeiramente por TSUJISAKA *et al.* (1977). As lipases microbianas analisadas se mostraram eficientes para incorporar ácido monoinsaturado no glicerol (70% de esterificação). Os produtos da reação após esterificação do glicerol com ácido oleico foram: 1(3)-monoleína, 1,3-dioleína para as enzimas de *Aspergillus* e *Rhizopus*. Por outro lado, 1(3) e 2-monoleína, 1,2(2,3) e 1,3-dioleína e trioleína foram detectados como produtos de síntese da ação de lipases de *Geotrichum* e *Penicillium*, demonstrando que estas enzimas esterificam preferencialmente ácidos graxos de cadeia longa, sem nenhuma especificidade de posição.

HILLS *et al.* (1989), relataram a utilização de lipase vegetal (*Brassica napus* L.) imobilizada em celite para obtenção de concentrado de GLA à partir de óleo de prímula (*Oenothera biennis* L. contendo 10% de GLA). A pesquisa demonstrou que a lipase de colza discrimina o cis-6, 9, 12 - 18:3 (GLA) na reação de hidrólise e esterificação. A reação de esterificação entre butanol e AG livres obtidos da prímula resultou em 62% de GLA nos ácidos graxos não esterificados confirmando a discriminação de ácidos graxos com dupla ligação no carbono 6 pela lipase de colza.

Em continuidade ao estudo anterior, HILLS *et al.* (1990) analisaram as lipases imobilizadas de colza (*Brassica napus* L.) e *Mucor miehei* (Lipozyme). A reação de esterificação entre os AGL obtidos do óleo de prímula (*Oenothera biennis* L.) e butanol resultou no acréscimo de 7 a 9 vezes o conteúdo de GLA, o qual permaneceu na fração não esterificada. De maneira similar, o DHA obtido do óleo de fígado de bacalhau aumentou de 4 a 5 vezes o seu nível após esterificação dos outros ácidos graxos com butanol. A análise da composição dos ésteres butílicos demonstraram quantidades traços de GLA e DHA.

As lipases microbianas obtidas de *Chromobacterium viscosum* e *Candida cylindracea* foram analisadas para a síntese de acilgliceróis a partir do glicerol com diferentes ácidos graxos livres (C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:4}, C_{20:4}, C_{20:5}, C_{22:6}). A esterificação resultou em um elevado grau de incorporação dos ácidos graxos do óleo de sardinha quando testadas as lipases de *Chromobacterium viscosum* (89-90%) e *Candida cylindracea* (70%), sugerindo ser este um método praticável para produção de acilgliceróis ricos em AGPI (OSADA *et al.*, 1990).

O aumento da concentração de GLA (10,4% para 68,8%) do óleo de *Mucor* sp com a lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme) foi obtido após 4 horas de esterificação dos AGL obtidos do óleo do fungo com butanol. A reação de hidrólise, por sua vez resultou no acréscimo máximo de 1,5 vezes o conteúdo de GLA nos acilgliceróis após ação da lipase de *Rhizopus arrhizus* comparado ao seu valor inicial (MUKHERJEE & KIEWITT, 1991).

As lipases obtidas de *Rhizopus arrhizus*, *Candida cylindracea*, *Mucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, lipase pancreática e lipase de gérmen de trigo foram analisadas na reação de esterificação de glicerol com AGPI. As lipases de *Mucor* e *Chromobacterium* foram capazes de incorporar 75 a 80% dos AGL no glicerol. Os acilgliceróis resultantes apresentaram o conteúdo máximo de 40% de EPA na fração MAG com lipase de *Mucor miehei* (LIE & MOLIN, 1992).

LI ZU-YI & WARD (1993b) estudaram as condições ótimas para a síntese enzimática de acilgliceróis contendo AGPI em meio orgânico. A reação com lipase obtida de *Pseudomonas* sp resultou na formação de 23,8, 40,6 e 18,1% de MAG, DAG e TAG contendo 75,9, 78,5 e 76,8% de AGPI (EPA + DHA), respectivamente após 24 horas de reação de esterificação em mistura de reação contendo 2,0g de glicerol, 0,4g de AGPI, 3,0 mL de hexano, 5% de água e 5.000U da enzima.

Os mesmos autores relataram posteriormente um método enzimático de síntese de MAG contendo AGPI por lipase microbiana obtida de *Mucor miehei* (Novo) em solvente orgânico. Os substratos da reação, 1,2-isopropileno glicerol (1g) e concentrado de AGPI obtidos de óleo de fígado de bacalhau (2,5g) em meio hexano foram incubados por vários períodos de tempo à 37°C. A reação catalisada por lipase de *Mucor miehei* resultou na produção de 80% de MAG contendo 76,2% de AGPI (LI ZU YI & WARD, 1994).

A lipase obtida de *Geotrichum candidum* foi relatada como sendo capaz de esterificar os ácidos oleico (18:1, δ -9), linoléico (18:2, δ -9,12) e linolênico (18:3, δ -9,12,15) com butanol, enquanto os ácidos graxos de cadeia carbônica maior que C18 como o ácido erúico (C22:1, δ -6) ou ácidos insaturados como petroselinico (18:3, δ -6) e GLA (18:3, δ -6,9,12) mostraram uma taxa de esterificação nula (SONNET *et al.*, 1993).

A possibilidade de utilização da lipase obtida de *Geotrichum candidum* para o enriquecimento de GLA após a reação de esterificação foi descrita por FOGLIA & SONNET (1995). A concentração de GLA de 24,9% em relação aos ácidos graxos totais do óleo de borragem (*Borago officinalis*) subiu para 71,8% na fração ácidos graxos não esterificados com butanol após 48 horas de reação. O estudo novamente confirma a esterificação preferencial dos ácidos oleico e linoléico quando catalisada por lipase obtida de *Geotrichum candidum*.

A reação preferencial de esterificação do butanol com os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoléico dos óleos de prímula e borragem e a discriminação contra GLA foi utilizada para obter concentrados de GLA na fração ácidos graxos não esterificadas (70%) após catálise por lipase imobilizada de *Lipozyme* (SYED RAHMATULLAH *et al.*, 1994b).

KOSUGI & AZUMA (1994) sintetizaram TAG ricos em AGPI por esterificação de glicerol com AGPI livres e com seus ésteres etílicos catalisada por lipases imobilizadas de *Candida antarctica* e *Lipozyme*. A esterificação se mostrou mais eficiente usando como substrato os ésteres etílicos de AG (reduziu perdas por polimerização) e lipase de *Candida antarctica* o que resultou em 96% de TAG, 3,0% de DAG e 0,6% de MAG após 24 horas de reação à 60°C. Os tridocosahexanoil, triicosapentanoil e triaraquidonoil glicerol foram purificados em coluna de alumina. Em contrapartida o uso da lipase de *Lipozyme* não catalisa a formação de tri-DHA, resultando preferencialmente em di (17,5%) e mono-DHA (12,3%).

SHIMADA *et al.* (1997) descreveram a obtenção de DHA purificado (aproximadamente 90%) utilizando a reação de esterificação dos AGL obtidos de óleo de atum com lauril álcool, catalisada por lipase de *Rhizopus delemar*. Com base na discriminação do DHA pela enzima, 84% do DHA manteve-se como ácido graxo não esterificado após 72% de esterificação obtida em 20 horas de reação à 30°C.

2.2.3.3. INTERESTERIFICAÇÃO

A reação de interesterificação refere-se a troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou um éster e outro éster (transesterificação). Nessas reações o TAG reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em um rearranjo dos ácidos graxos do TAG formando um novo TAG, com propriedades químicas e físicas diversas.

O rearranjo durante a interesterificação é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio de reação deve ser suficientemente baixa para minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça ativa. Em geral, sob condições nas quais a quantidade de água no sistema é restrita, a hidrólise de gordura pode ser minimizada de tal forma que a interesterificação seja a reação dominante (GOLDBERG, 1990).

A reação de interesterificação tem sido empregada quando se deseja alterar a composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula do TAG para se obter óleos e gorduras com propriedades físicas e químicas diversas, as quais podem ser empregados em produtos industriais específicos, como margarinas, chocolates e obtenção de óleos ricos em ácidos graxos insaturados. Um dos principais exemplos do uso da lipase nessas reações, é a interesterificação de 1,3-dipalmitoil-2-monoleína (POP), principal TAG do óleo de palma com ácido esteárico para produzir 1(3) palmitoil-3 (1)-estearil 2 monoleína (POS) e 1,3 diestearil 2 monoleína (SOS), componentes da manteiga de cacau (MACRAE, 1983).

O processo de interesterificação química é realizado através do aquecimento de misturas de óleos e ácidos graxos na presença de catalisadores como o sódio metálico, metilato ou etilato de sódio e outros alquilatos de metais alcalinos (Na, K e suas ligas). Durante este processo a mistura é aquecida e os ácidos graxos trocam de posição na molécula do TAG. A inespecificidade do processo, a variabilidade na qualidade do catalisador, a necessidade de um período de indução e perdas de óleo pela formação de sabões de ésteres metílicos são algumas das desvantagens da interesterificação química.

Numerosas aplicações de interesterificação enzimática de óleos, tem sido empregadas para produção de gorduras especiais (MACRAE, 1983; MUKHERJEE, 1990). Nos processos testados para as reações enzimáticas, os catalisadores são em sua maioria imobilizados para permitir a sua separação do meio de reação e posterior reutilização (MALCATA *et al.*, 1990).

A reação de acidólise em presença ou não de solventes tem demonstrado aumentar significativamente os níveis de AGPI nos acilgliceróis resultantes. HARALDSSON & HÖSKULDSSON (1989) obtiveram acilgliceróis contendo 70% de AGPI ω 3, em especial DHA (48%) e EPA (12%), via interesterificação de óleo de fígado de bacalhau e concentrados de AGPI livres ou seus ésteres catalisada por lipase imobilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme).

A aplicação de lipase imobilizada de *Mucor miehei* para concentrar AGPI foi novamente confirmada por LANGHOLZ *et al.* (1989). A enzima mostrou discriminar DHA na reação de acidólise de óleo marinho com concentrado de EPA e DHA livres preparados por complexação com uréia. O conteúdo de DHA nos AG livres aumentou marcadamente (27% à 80%) após a reação de acidólise, demonstrando baixa incorporação deste ácido nos acilgliceróis. Os ésteres metílicos dos outros ácidos graxos foram preferencialmente formados, concentrando DHA na fração de AG livres.

A obtenção de óleo de sardinha rico em AGPI ω 3 contendo 25% de EPA e 40% de DHA por acidólise enzimática catalisada pela lipase imobilizada de *Mucor miehei* foi realizada entre o óleo de sardinha e AGPI livres na ausência de solvente, conforme descrito por YAMANE *et al.* (1992).

TOTANI & HARA (1991) descreveram um método de preparação de fosfolipídeos de soja (ausência de AGPI) com alto grau de insaturação por transesterificação dos fosfolipídeos com óleo de sardinha catalisada por lipases de *Candida cylindracea* e *Rhizopus delemar*. O uso da lipase obtida de *Candida cylindracea* em meio de reação contendo 4g de óleo de sardinha, 3g de fosfolipídeos, 10mL de hexano e 0,7g da enzima resultou fosfolipídeos com 14,5% de EPA e 3,1% de DHA após 48 horas de reação à temperatura de 37°C.

O estudo da interesterificação dos óleos de soja, girassol, açafrão e linhaça com metil oleato em meio com solvente orgânico, catalisada por lipase de *Mucor miehei* foi descrito por SRIDHAR *et al.* (1991). Os acilgliceróis resultantes após 4 horas de reação tiveram seus níveis de ácido oleico acrescidos em 50% em relação ao valor inicial.

LI ZU YI & WARD (1993a) obtiveram níveis de 17,7, 17,6, 16,8, 14,9, 13,9 e 10,5% de AGPI nos óleos de milho, girassol, amendoim, oliva e soja, respectivamente após reação de interesterificação de misturas contendo 1g de óleo vegetal, 0,5g de AGPI livres, 4mL de hexano e 7U de lipase imobilizada obtida de *Mucor miehei* foi incubado por 12 horas à 40°C.

Em continuidade ao estudo da reação de interesterificação, LI ZU YI & WARD (1993c) analisaram a estabilidade de lipases microbianas para sua reutilização na alcóolise de óleo de fígado de bacalhau com isopropanol. Lipase de *Pseudomonas* sp mostrou alta atividade catalítica e permitiu o uso repetido da enzima imobilizada sem perda significativa na sua atividade.

A incorporação de AGPI ω 3 em óleo de soja óleos vegetais foi relatada por HUANG & AKOH (1994) após transesterificação enzimática de óleo de soja com ésteres etílicos de AGPI. Após a reação catalisada por lipase de *Candida cylindracea* foram detectados nos triacilgliceróis 34,7% e 32,9% de EPA e DHA respectivamente.

Na seleção de lipases microbianas utilizadas para concentrar AGPI de óleo de sardinha após reação de acidólise, a lipase de *Pseudomonas* sp apresentou a maior capacidade para realizar tal concentração, tendo o conteúdo total destes ácidos graxos atingindo 44% nos acilgliceróis comparado com 29% do óleo de sardinha original (ADACHI *et al.*, 1993).

AKOH *et al.* (1996) descreveram a reação de transesterificação entre óleo de prímula (GLA) e éster etílico de EPA como doadores de grupo acil catalisada por lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Os ácido linoléico (18:2 ω 6) e ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) do óleo vegetal tiveram seus níveis reduzidos em 32% e 50%, respectivamente após 24 horas de reação à 55°C. A incorporação de EPA foi de 34%, enquanto os níveis de GLA não sofreram mudanças significativas, o que resultou em uma modificação favorável na taxa de ω 3/ ω 6 de 0,01 para 0,60 após reação de transesterificação.

A reação de transesterificação de TAG de cadeia média (tricaprilina, tricaprina e trilaurina) com éster etílico de EPA catalisada por lipase de *Candida antarctica* e de *Mucor miehei* foi estudada por LEE *et al.* (1996). A incorporação de EPA nos TAG ocorreu preferencialmente na molécula de trilaurina, obtendo 36,2 e 40,5% para as enzimas de *Candida antarctica* e *Mucor miehei*. A análise dos ácidos graxos na posição sn-2, determinados após hidrólise com lipase pancreática, demonstrou que nos produtos da reação catalisado por lipase de *Mucor miehei* não foi detectado EPA, em contrapartida a reação catalisada por *Candida antarctica* o EPA foi detectado em todas as posições na molécula de TAG.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1 - Amostras de óleos

- Óleo do fungo *Mucor* sp obtido por fermentação conforme descrito por CARVALHO (1994).
- Óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) refinado fornecidos por QUAKER ALIMENTOS LTDA de São Gonçalo - RJ e por R. P. SCHERER de Sorocaba - SP.

3.1.2 - Enzimas

- Lipase comercial proveniente de *Candida cylindracea* da Meito Sangyo Co (Nagoya - Japan), usada como padrão comparativo das reações.
- Lipases isoladas no Laboratório de Bioquímica da FEA (UNICAMP): *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp. As lipases foram usadas em forma de extrato em pó liofilizado da enzima bruta.

3.1.3 - Reagentes específicos

- Reagentes químicos: Ácidos, bases e solventes (grau P.A. de marcas Merck)
- Meios de cultura: Potato dextrose ágar (PDA), Extrato de levedura microbiológico e Glicose (marcas Difco e Biobrás)
- Padrões para cromatografia a gás : Ésteres metílicos de ácidos graxos: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido alfa-linolênico, ácido gama-linolênico (GLA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA). (Sigma).
- Padrões para cromatografia em camada delgada : trioleína, 1,2(2,3)-dioleína, 1,3- dioleína 1(3)-monoleína, 2-monoleína ácido oleico (Sigma).
- Sílicagel 60G, Art. 7731.1000, Merck, para cromatografia em camada delgada.

3.1.4 - Equipamentos :

- Agitador rotatório New Brunswick Scientific
- Balança analítica Mettler, mod. H-10
- Banhos-Maria termostatzado, Fanem
- Câmara climática Fanem Modelo 346
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod. J-2183
- Cromatógrafo à gás marca CHROMPACK modelo CP9001 com detector de ionização de chama.
- Espectrofotômetro Beckman DU - 70
- Estufas bacteriológicas, Fanem
- Estufa à vácuo, Fanem, Mod.099EV
- Evaporador rotativo, Tecnal, TE 130
- Iatroscan MK-5 TLC - FID Analyser da Iatron Laboratories INC, com aplicador de amostra modelo SES 3202/IS-01.
- Incubador Shaker rotatório, New Brunswick Scientific CO, INC. Série G-24
- Placas de cromatografia em camada delgada de Sílica gel G-60, 25cm, Merck
- Placas de cromatografia em camada delgada de Sílica G60 F254, 10cm, Merck
- Potenciômetro Digimed TE-902

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO DE *Mucor* sp

3.2.1.1. Microorganismo

O microorganismo utilizado nos experimentos para obtenção de óleo contendo GLA foi a linhagem de *Mucor* sp. Esta linhagem obtida de amostras do solo, foi selecionada por CARVALHO (1994) por apresentar maior produção de GLA entre as 384 linhagens de fungos analisadas.

3.2.1.2. Manutenção da cultura

O microorganismo foi cultivado em tubos contendo o meio de cultura ágar batata dextrosado (PDA) inclinado e incubado por 96 horas à 30°C. Esses tubos foram repicados periodicamente e usados como cultura estoque. A cultura foi conservada à 5°C em vaselina líquida esterilizada.

3.2.1.3. Preparação do inóculo

A linhagem de *Mucor* sp mantida em tubos de ensaio com o meio ágar batata dextrosado (PDA) foi suspensa em 10mL de água destilada estéril. O tubo foi raspado na superfície a fim de resultar numa suspensão homogênea de esporos.

3.2.1.4. Condições do processo fermentativo

Um mililitro da suspensão de esporos (7×10^7 esporos) foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL do meio de cultura líquido previamente esterilizado composto de 20g/l glicose, e 10g/l de extrato de levedura em pH 6,5. Os frascos contendo o meio inoculado foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 28°C durante 4 dias.

3.2.1.5. Obtenção de óleo de *Mucor* sp

Após o tempo de incubação, os meios de cultura foram centrifugados a 15.000 rpm por 15 minutos a 10°C. A massa celular obtida foi lavada duas vezes com água destilada e em seguida novamente centrifugada. As células foram recolhidas em papel de filtro, secas em acetona e levadas para extração dos lipídeos totais.

Empregou-se o método de BLIGH & DYER (1959) modificado para a extração dos lipídeos totais dos microorganismos, seguindo-se as proporções recomendadas entre os solventes metanol, clorofórmio e água. A biomassa seca foi transferida para tubos de ensaio com rêsca de 50mL e foram adicionados exatamente 10mL de metanol, 5mL de clorofórmio e 4mL de água (2:1:0,8). A mistura foi agitada em agitador rotativo durante duas horas, e uma nova diluição foi feita com auxílio de 5mL de clorofórmio e 4mL de solução de sulfato de sódio 1,5% (2:1:0,8), resultando em um sistema bifásico após agitação vigorosa por 2 minutos. Após a separação das camadas por centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos a camada metanólica superior foi descartada, e a camada clorofórmica inferior contendo os lipídeos extraídos do microorganismos *Mucor* sp foi filtrada em papel de filtro contendo 1g de Na₂SO₄ e recolhida em frasco vedado. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo e os lipídeos acondicionados em frascos escuros e guardados à temperatura de 4°C para posteriores testes nas reações catalisadas por lipases microbianas.

Após extração dos lipídeos totais do micélio de *Mucor* sp, obteve-se aproximadamente 2,5g de óleo de *Mucor* sp a partir de 2 (dois) litros de meio de cultura.

3.2.2. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

3.2.2.1. Produção de lipase de *Rhizopus* sp (COSTA, 1997)

A linhagem de *Rhizopus* sp foi inoculada em frascos erlenmeyer com capacidade de 500mL contendo 20g de meio de cultura sólido, previamente esterilizado, composto de farelo de trigo (60%) e água (40%). Os frascos foram incubados à temperatura de 30°C durante 120 horas. Após o tempo de fermentação foram adicionados 100mL de água destilada estéril em cada frasco, homogeneizados com bastão de vidro e após permanecerem em extração por 1 hora com agitação ocasional foram filtrados em papel Whatman nº 1. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada (7000 rpm por 15 minutos) e o precipitado dialisado contra água por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e usado para os estudos posteriores.

3.2.2.2. Produção de lipase de *Geotrichum* sp (MACEDO, 1995)

A linhagem de *Geotrichum* sp foi inoculada em frascos erlenmeyer com capacidade de 50mL contendo 15mL de meio de cultura líquido, previamente esterilizado, composto de 1,5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farelo de trigo, 0,2% de nitrato de amônio e 3% de extrato de levedura. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C com agitação de 200rpm durante 48 horas. Após o tempo de fermentação os meios foram centrifugados (400rpm por 25 min.) e ao extrato aquoso enzimático recolhido foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para

fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada (4000 rpm por 20 minutos) e o precipitado dialisado contra tampão fosfato pH7,0 por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e usado para os estudos posteriores.

3.2.2.3. Produção de lipase de *Aspergillus* sp (COSTA, 1996)

A linhagem de *Aspergillus* sp (linhagem 1068) foi inoculada em frascos erlenmeyer com capacidade de 500mL contendo 20g de meio de cultura sólido, previamente esterilizado, composto de farelo de trigo e água, na proporção de 1:1 (m/m). Os frascos foram incubados à temperatura de 30°C durante 72 horas. Após o tempo de fermentação foram adicionados 100mL de água destilada estéril em cada frasco, homogeneizados com bastão de vidro e após permaneceram em extração por 1 hora com agitação ocasional foram filtrados em papel Whatman n° 1. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada (7000 rpm por 15 minutos) e o precipitado dialisado contra água por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e usado para os estudos posteriores.

3.2.2.4. Produção de lipase de *Alcaligenes* sp (NETO, 1996)

A linhagem de *Alcaligenes* sp foi inoculada em frascos erlenmeyer com capacidade de 50mL contendo 20mL de meio de cultura líquido, previamente esterilizado, composto de 1% de água de maceração de milho, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato dibásico de potássio e 2% de farinha de soja torrada em pH9,0. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C com agitação de 200 rpm durante 72 horas. Após o tempo de fermentação os meios foram centrifugados (10.000 rpm por 10 min.) e ao extrato aquoso enzimático recolhido foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada (4000 rpm por 20 minutos) e o precipitado dialisado contra tampão pH 9,0 por 48 horas a 5°C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e usado para os estudos posteriores.

3.2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.2.3.1. Análises químicas

As características químicas dos óleos de *Mucor* sp e óleo de peixe foram determinadas segundo os métodos oficiais da AOCS (1993).

Ácidos graxos livres (acidez)_____	Ca 5a - 40
Índice de iodo_____	Cd 1b - 87
Índice de saponificação_____	Cd 3 - 25

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média das determinações.

3.2.3.2. Determinação de ácidos graxos totais e matéria insaponificável :

O procedimento utilizado neste trabalho segue o método de KATES (1972), o qual permite a determinação da porcentagem de ácidos graxos presentes na amostra e a porcentagem de matéria insaponificável.

Amostras de peso conhecido de lipídeos (15-30 mg) colocadas em balão de fundo redondo e boca esmerilhada foram saponificadas pela adição de 5mL de NaOH 0,3N em metanol com aquecimento e refluxo por cerca de 1-2 horas até completa saponificação.

Após resfriamento, a solução foi retirada do refluxo e foram adicionadas gotas de fenolftaleína a 1% em etanol 90% e 10mL de metanol 90% em água, seguida da extração da matéria insaponificável com 3 a 4 porções de 5mL de éter de petróleo em funil de separação. A solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos e deixada em repouso até a separação das camadas. A camada superior, contendo a fração insaponificável foi recolhida em béquer previamente tarado.

O solvente foi evaporado em atmosfera de nitrogênio em estufa à vácuo até peso constante. O peso da matéria insaponificável foi determinado gravimetricamente, de acordo com o seguinte cálculo :

$$\% \text{ matéria insaponificável} = \frac{\text{peso insaponificável (mg)}}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

O volume total da fase metanólica recolhida na etapa anterior foi acidificado com 0,3mL de HCl 6N. Os ácidos graxos foram extraídos com 3 a 4 porções de éter de petróleo, no mesmo procedimento descrito anteriormente. A camada superior contendo os ácidos graxos da amostra foram recolhidas em bequer tarado. A quantidade de ácidos graxos foi determinada gravimetricamente, de acordo com o seguinte cálculo :

$$\% \text{ ácidos graxos total} = \frac{\text{peso ácidos graxos (mg)}}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

3.2.3.3. Preparo de ácidos graxos livres para a reação de esterificação

Os ácidos graxos livres obtidos dos substratos óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha foram preparados segundo o experimento descrito acima (KATES, 1972). As frações separadas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidos à temperatura de 4°C.

Após a extração, os ácidos graxos livres foram utilizados no estudo da reação de esterificação catalisadas por lipases microbianas.

3.2.3.4. Preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos por derivatização

Os lipídeos (100mg) e suas frações obtidas após a atuação das lipases foram convertidas em ésteres metílicos de ácidos graxos com o reagente esterificante BF_3 - metanol de acordo com o método oficial da AOCS (Ce 2-66, 1993).

Após derivação, os ésteres metílicos diluídos em hexano foram analisados por cromatografia a gás (CG).

3.2.3.5. Determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia a gás (CG)

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia a gás em um cromatógrafo marca CHROMPACK modelo CP 9001 com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Chrompack ("WCOT Fused Sílica" CP-Sil 88 50m x 0,25 mm). A temperatura do detector foi de 280°C, a do injetor, 250°C e a temperatura inicial da coluna de 180°C por 7 minutos com programação de 5°C/min até a temperatura máxima de 220°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (H_2) com fluxo de 2,0 mL/min na coluna.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos de ésteres de ácidos graxos injetados nas mesmas condições. Foi utilizado também a técnica de co-eluição ("spiking") de padrões junto com a amostra.

A quantificação foi realizada por normalização das áreas calculadas por meio de integrador (Chromato-Integrator) e expressa em porcentagem relativa de cada ácido graxo em relação aos ácidos graxos totais.

3.2.3.6. Confirmação da composição em ácidos graxos por espectrometria de massa (CG-MS)

Cromatógrafo gasoso - espectrômetro de massa de marca SHIMADZU, modelo GCMS-QP 5000 foi usado para obtenção do espectro de massa dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados em coluna capilar do tipo SHIMADZU, modelo CBP₁-M50-025 (60m × 0,2mm) e identificados após fragmentação por um impacto eletrônico de 70eV.

A cromatografia foi realizada com a temperatura do detector de 280°C, temperatura do injetor, 250°C e a temperatura da coluna de 180°C por 7 minutos, programada para aumento de 6°C /min. até a temperatura máxima de 250°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,0 mL/min. O volume da amostra injetado foi de 1,0 µL.

Os padrões de ésteres metílico dos ácidos graxos (marca SIGMA) tiveram seus espectros de massa registrados e comparados com os das amostras de óleo de *Mucor* sp e do óleo de sardinha.

3.2.3.7. Quantificação das frações de acilgliceróis por cromatografia em camada delgada com detector de ionização de chama (CCD - DIC)

Os acilgliceróis (TAG, DAG, MAG) e ácidos graxos das amostras orginais ou após reações enzimáticas catalisadas por lipases foram quantificados por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando IATROSCAN modelo MK-5 com detector de ionização de chama (DIC).

A técnica consiste na utilização de finas hastes de quartzo (1mm de espessura e 150mm de comprimento) chamadas de "Chromarods" recobertas com sílica gel (75 μ m de espessura), onde a amostra é aplicada na base da haste e o cromatograma desenvolvido de maneira usual em cuba cromatográfica contendo a fase móvel adequada para a separação dos compostos. Posteriormente as hastes são secas em estufa (Rod Dryer Tk-5), levadas ao Iatroscan e queimadas no detector de ionização de chama. Os "Chromarods" são estocados em cuba contendo sílica gel como dessecante e ativados através de queima em Iatroscan pouco tempo antes da análise. Um microlito (1 μ L) de solução contendo os acilgliceróis em éter etílico na concentração de 10mg/mL, é aplicado na origem dos "Chromarods" usando aplicador automático SES 3202.

A separação dos acilgliceróis foi conseguida utilizando-se o sistema solvente composto de hexano : éter dietílico : ácido acético na proporção de 70:30:0,8 (v/v/v) como fase móvel. Os "Chromarods" foram desenvolvidos até 10 cm da origem em cuba apropriada, sendo então secos a 50°C por 10 minutos e analisados em Iatroscan. As condições de operação foram: fluxo de hidrogênio à 160 mL/min, fluxo de ar à 2000 mL/min e velocidade de queima de 30 seg. A identificação dos acilgliceróis foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos obtidos da SIGMA.

3.2.3.8. Separação dos acilgliceróis totais e ácidos graxos livres após a reação de hidrólise catalisada por lipases

Os acilgliceróis totais (TAG, DAG, MAG) e ácidos graxos livres obtidos das amostras após reação hidrolítica foram separados e quantificados de acordo com o procedimento descrito por SYED RAHMATULLAH *et al.* (1994a). Após a ação enzimática os componentes lipídicos da mistura de reação foram extraídos três vezes com 10mL de éter dietílico. Os extratos foram posteriormente combinados e lavados três vezes com água contendo 20% de metanol. A fase orgânica contendo os compostos lipídicos foi levada para evaporação em atmosfera de nitrogênio.

A separação de acilgliceróis dos ácidos graxos livres foi obtida pela adição de 10mL de hexano e 40mL de NaOH (1N em 50% da mistura água:metanol). Após a separação das duas fases, a fase superior contendo os acilgliceróis foi filtrada em papel de filtro contendo 1g de Na_2SO_4 e recolhida em tubo de ensaio previamente tarado. Na fase aquosa inferior contendo ácidos graxos livres foram adicionados 10mL de HCl 6N e os ácidos graxos extraídos com 20mL de éter dietílico, os quais foram recolhidos em tubo de ensaio previamente tarado. As fases com solventes foram levadas à evaporação em atmosfera de nitrogênio e quantificadas por gravimetria até peso constante.

As frações obtidas foram analisadas quanto à composição em ácidos graxos conforme descrito item 3.2.3.5.

3.2.3.9. Separação dos constituintes por cromatografia em camada delgada (CCD) após reação de hidrólise e esterificação catalisada por lipases

As placas de cromatografia em camada delgada foram preparadas misturando-se 45g de sílica gel G-60 (Merck) com 90mL de solução de ácido bórico 0,6M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20×20cm com 2mm de espessura, com aplicador Desaga. As placas foram aquecidas a 120°C por 1 - 2 horas para ativação antes de serem utilizadas.

As frações de acilgliceróis (TAG, DAG, MAG) e ácidos graxos livres resultantes da reação de hidrólise dos óleos de sardinha e óleo de *Mucor* sp ou àquelas resultantes da esterificação dos ácidos graxos livres (item 3.2.3.3.) destes substratos com glicerol, foram separadas utilizando como fase móvel a mistura hexano : éter dietílico : ácido acético (80:20:1). Foram utilizados como padrões trioleína, 1,3-dioleína, 1,2 (2,3)-dioleína, 2-monoleína, 1(3)-monoleína e ácido oleico livre na concentração de 1% em éter de petróleo.

Após reação de esterificação dos ácidos graxos livres do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha os ésteres butílicos resultantes da reação foram separados dos ácidos graxos remanescentes não esterificados em placas de sílica gel preparadas como descrito anteriormente usando o sistema solvente hexano : éter etílico (90:10). A visualização dos cromatogramas foi feita aquecendo-se as placas em câmara Iodo sublimado por 45 minutos a 110°C.

Placas preparativas de Sílica gel G-60 (CCD - preparativa) foram usadas para separação e extração dos constituintes após as reações catalisadas por lipases. A placa foi rapidamente exposta aos vapores de iodo para visualização das frações de lipídeos. Os produtos resultantes da hidrólise e da esterificação foram raspados da placa, eluídos com éter etílico saturado com água e metilados (item 3.2.3.5) para posterior análise da composição em ácidos graxos em cromatografia a gás de acordo com o método descrito no item 3.2.3.5.

3.2.4. ESTUDO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE

3.2.4.1. Determinação da atividade hidrolítica das lipases

A atividade hidrolítica das enzimas foi determinada pela titulação de ácidos graxos liberados utilizando-se 1g de óleo de oliva extra virgem, 4mL de tampão de valor de pH conforme especificado na tabela abaixo e 1mL de extrato enzimático aquoso na concentração de 10mg/mL. Os frascos erlenmeyer contendo esta mistura de reação foram incubados a 40°C por 1 hora em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 15mL de solução de etanol:acetona (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com KOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo /minuto de reação, nas condições descritas. Foi usado como branco a mistura de reação em tempo zero. As lipases testadas nas condições descritas acima estão mostradas na tabela 3.

Tabela 3 - Lipases microbianas testadas na catálise das reações de hidrólise e esterificação.

ENZIMAS	pH ótimo	Sistema tampão	Referência
<i>Candida cylindracea</i> (comercial)	7,0	Fosfato	Meito Sagyo Co
<i>Rhizopus</i> sp	6,0	Citrato	COSTA, 1997
<i>Geotrichum</i> sp	7,0	Fosfato	MACEDO, 1995
<i>Aspergillus</i> sp	5,6	Acetato	COSTA, 1996
<i>Alcaligenes</i> sp	9,0	Carbonato- Bicarbonato	NETO, 1996

3.2.4.3. Estudo das condições ideais da reação de hidrólise

Para otimizar as condições de reação, foram analisados o tempo, a temperatura e a concentração de enzima sobre a atividade hidrolítica das enzimas microbianas. Através da análise dos resultados obtidos, as condições ideais para cada enzima foram utilizadas para a reação hidrolítica.

3.2.4.3.1. Influência do tempo de reação na hidrólise

Para estudar a influência do tempo de reação na hidrólise do óleo de *Mucor* sp e óleo de peixe por lipases microbianas, o sistema contendo a mistura para a reação hidrolítica foi incubado à 40°C por 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto conforme descrito no item 3.2.4.2. Após paralisação da reação com a solução de etanol:acetona (1:1), os ácidos graxos liberados foram titulados e calculados conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.2.4.3.2. Influência da temperatura de reação na hidrólise

Para estudar a influência da temperatura de reação na hidrólise do óleo de *Mucor* sp e óleo de peixe o sistema contendo a mistura para a reação hidrolítica foi incubado às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C por 2 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto conforme descrito no item 3.2.4.2. Após paralisação da reação com a solução de etanol:acetona (1:1), os ácidos graxos liberados foram titulados e calculados conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.2.4.3.3. Influência da concentração de enzima na reação de hidrólise

Para estudar a influência da concentração de enzima na hidrólise do óleo de *Mucor* sp e óleo de peixe o sistema de reação foi preparado conforme descrito no item 3.2.4.2, variando a concentração da enzima de 25, 50, 75, 90, 120 e 130U. O sistema foi incubado à temperatura de 40°C por 2 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto. Após paralisação da reação com a solução de etanol:acetona (1:1), os ácidos graxos liberados foram titulados e calculados conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.2.4.4. Análise dos produtos após reação hidrolítica

A hidrólise foi realizada conforme os resultados obtidos no estudo das condições ideais de reação descritos anteriormente. A reação foi paralisada pela imersão do frasco com o sistema de reação à um banho de água à 100°C por 10 minutos. Após a inativação enzimática, a mistura foi centrifugada e a fase oleosa contendo as frações de acilgliceróis e ácidos graxos livres foram quantificadas por CCD-DIC (item 3.2.3.7.), separadas CCD - preparativa (item 3.2.3.9.) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.).

A porcentagem de ácidos graxos livres liberados após a ação hidrolítica foram calculados conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.2.5. ESTUDO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Para estudo da esterificação dos AGPI obtidos de óleo de *Mucor* sp e óleo de peixe (item 3.2.3.3) com alcoóis foram testadas as lipases obtidas no laboratório de *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp e a lipase comercial de *Candida cylindracea*.

3.2.5.1. Reação de esterificação com o butanol catalisada por lipases microbianas

O sistema para a reação de esterificação foi preparado com 250 mM de ácidos graxos livres dissolvidos em 1mL de hexano, 500mM de butanol e 10% (p/p substrato) da lipase bruta liofilizada (MUKHERJEE & KIEWITT, 1991). Os frascos erlenmeyer selados contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados em à 30°C por vários períodos de tempo (2, 8, 16, 20 e 40 horas) com agitação constante de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela imersão do frasco à um banho de água à 100°C por 10 min. Após a inativação enzimática, a mistura foi centrifugada e a fase oleosa contendo os ésteres butílicos e ácidos graxos não-esterificados foram separados por CCD - preparativa (item 3.2.3.9.) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.).

O mesmo procedimento descrito acima foi usado para determinar a % de esterificação. Após paralização da reação, os ácidos graxos não esterificados foram titulados com KOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador. A % de esterificação foi determinada com base no cálculo do teor de ácidos graxos que permaneceram livres após esterificação, a partir das equações:

$$\begin{array}{l} \% \text{ ácidos graxos residuais} \\ (\text{expresso em ácido oleico}) \end{array} = \frac{\text{mL KOH} \times \text{N KOH} \times 0,282}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

$$\% \text{ Esterificação} = \% \text{ Ácidos graxos residuais} - 100\%$$

3.2.5.2. Reação de esterificação com o glicerol catalisada por lipases microbianas

O sistema para a reação de esterificação foi preparado com 0,4g de ácidos graxos livres (1,2 mmol) obtidos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha, 2g de glicerol (20mmol), 150µl de água, 3mL de hexano e 5.000U de lipase bruta liofilizada (LI ZU YI & WARD, 1993). Os frascos erlenmeyer selados com parafilme e papel alumínio contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados à 30°C por vários períodos de tempo (2, 8, 16, 20 e 40 horas) com agitação constante de 130 oscilações por minuto.

Após vários períodos de incubação, 0,5 mL da mistura de reação foi recolhida e os acilgliceróis formados e ácidos graxos não esterificados foram quantificadas por CCD-DIC (item 3.2.3.7.), separadas por CCD - preparativa (item 3.2.3.9) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.).

O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para determinar a porcentagem de esterificação. Após a paralisação da reação com a adição de 5mL de solução de etanol:acetona (1:1), os ácidos graxos não esterificados foram titulados com KOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador. A % de esterificação foi determinada com base no cálculo do teor de ácidos graxos que permaneceram livres após esterificação, a partir das equações:

$$\begin{array}{l} \text{\% ácidos graxos residuais} \\ \text{(expresso em ácido oleico)} \end{array} = \frac{\text{mL KOH} \times \text{N KOH} \times 0,282}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

$$\text{\% Esterificação} = \text{\% Ácidos graxos residuais} - 100\%$$

3.2.5.3. Estudo das condições ideais da reação de esterificação

3.2.5.3.1. Influência do tipo de solvente orgânico na reação de síntese de acilgliceróis

Para o estudo da influência do tipo de solvente orgânico no grau de esterificação enzimática foi adicionada ao sistema de reação preparado com 0,4g de ácidos graxos livres, 2g de glicerol, 150μl de água, 5000U de lipase e 3mL dos seguintes solventes: hexano, heptano, isoctano, benzeno ou acetona.

Os frascos erlenmeyer contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados à 30°C por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto. A porcentagem de esterificação foi calculada conforme descrito no item 3.2.5.2.

3.2.5.3.2. Influência da relação molar de ácidos graxos livres e glicerol na síntese de acilgliceróis

Para o estudo da influência da relação molar de ácidos graxos livres e glicerol no grau de esterificação enzimática foram pesados em frascos erlenmeyer quantidades variáveis de glicerol (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0g), mantendo os demais componentes do sistema em quantidades fixas.

Os frascos erlenmeyer contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados à 30°C por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto. A porcentagem de esterificação foi calculada conforme descrito no item 3.2.5.2.

3.2.5.3.3. Influência da temperatura na síntese de acilgliceróis

Para o estudo da influência da temperatura no grau de esterificação enzimática o sistema de reação preparado com 0,4g de ácidos graxos livres, 2g de glicerol, 150µl de água, 3mL de hexano e 5000U de lipase foi incubado às temperaturas de 20, 30, 40, 50 e 60°C por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto. A porcentagem de esterificação foi calculada conforme descrito no item 3.2.5.2.

3.2.5.4. Análise dos produtos após reação de esterificação

O sistema de reação e as condições ótimas para a esterificação dos ácidos graxos livres com glicerol foram estabelecidos de acordo com os resultados obtidos nas análises descritas anteriormente. A reação foi paralisada pela imersão do frasco com o sistema de reação à um banho de água à 100°C por 10 minutos. Após a inativação enzimática, a mistura foi centrifugada e a fase oleosa contendo as frações de acilgliceróis e ácidos graxos livres foram quantificadas por CCD-DIC (item 3.2.3.7.), separadas por CCD - preparativa (item 3.2.3.9.) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ÓLEOS UTILIZADOS COMO MATÉRIA-PRIMA

4.1.1. Características químicas dos óleos usados como matéria-prima

A tabela 4 mostra as características químicas dos óleos usados como matéria-prima para a atuação de lipases microbianas. As análises foram realizadas de acordo com o descrito nos itens 3.2.3.1. e 3.2.3.2.

As características químicas do óleo de sardinha encontram-se dentro da faixa de valores relatados na literatura (POCKLINGTON, 1990). O resultado da determinação do índice de iodo do óleo de sardinha é ligeiramente menor que a média expressa por BADOLATO *et al.* (1991) após a análise de oito amostras de óleos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira (170,2g Iodo/100g óleo). Este óleo contém em sua composição lipídica 72,4% de ácidos graxos totais, em contrapartida, o óleo de *Mucor* sp apresentou uma porcentagem inferior de 49,8%.

As matérias insaponificáveis incluem as substâncias dissolvidas nos óleos e gorduras, as quais não se saponificam com álcalis, mas são solúveis em solventes orgânicos. Estão incluídos álcoois alifáticos, esteróis, pigmentos, vitaminas lipossolúveis e hidrocarbonetos diversos encontrados em fungos (LÖSEL *et al.*, 1988). A porcentagem de matéria insaponificável determinada no óleo de *Mucor* sp foi de 7,2% enquanto que no óleo de sardinha foi de 3,7%.

O índice de saponificação do óleo de *Mucor* sp, 196,3 mg de KOH/g de óleo e o Índice de iodo, 113,9 g de Iodo/100g de óleo estão próximos aos valores citados para o óleo de soja (ROSSEL *et al.*, 1967; TIMMS, 1985), indicando que o comprimento médio e o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo de fungo assemelham-se àqueles presentes na constituição do óleo de soja.

Tabela 4 - Características químicas dos óleos usados como matéria-prima para atuação de lipases microbianas¹.

Determinação	Óleo de <i>Mucor</i> sp	Óleo de sardinha
Ácidos graxos livres (% como ácido oleico)	0,78 ± 0,15	1,13 ± 0,12
Índice de iodo (g Iodo/100g óleo)	113,90 ± 0,42	162,92 ± 0,36
Índice de saponificação (mg KOH/g óleo)	196,3 ± 0,84	172,4 ± 0,76
Ácidos graxos totais (%)	49,8 ± 0,43	72,4 ± 0,29
Matéria insaponificável (%)	7,2 ± 0.22	3,7 ± 0,17

¹ média e desvio padrão de análise em triplicata

4.1.2. Composição em ácidos graxos dos óleos usados como matéria-prima

A composição em ácidos graxos dos óleos usados como matéria-prima estão nas tabelas 5 e 6. Os cromatogramas das figuras 5 e 6 ilustram o perfil da composição em ácidos graxos do microorganismo e do óleo de sardinha. A cromatografia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.5.

O nível de GLA (12%) obtido pela linhagem de *Mucor* sp usada como substrato mostrou-se próximo ao das linhagem de *Mucor ambigus* IFO 6742 (16,0%) e *Choanephora cucurbitarum* IFO 5985 (15,5%) relatados por SHIN & SHIN (1988) como microorganismos produtores de GLA. Os principais ácidos graxos da composição do óleo de *Mucor* sp foram o ácido palmítico, oleico, linoléico e GLA, sendo ausente o isômero ácido α -linolênico.

Os principais ácidos graxos do óleo de sardinha usado como substrato são representados por C16, constituindo 30% de sua composição em relação aos outros ácidos graxos. As porcentagens dos AGPI foram de 13,8% de EPA e 9,2% de DHA.

BADOLATO *et al.* (1991) relataram valores que variaram entre 15,4% à 35,0 % da soma de EPA e DHA para diferentes amostras do óleo de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*).

Nos óleos de peixes marinhos os ácidos graxos C16 e C18 constituem aproximadamente 40% da composição total de ácidos graxos, e níveis maiores geralmente são obtidos em óleos de peixes de água doce (ACKMAN, 1967). A soma dos níveis de EPA e DHA em óleo de arenque e óleo e fígado de bacalhau relatados pelo mesmo autor foram de 11,3% e 25,5%, respectivamente.

Tabela 5 - Composição em ácidos graxos (%) do óleo da linhagem de *Mucor* sp usado como matéria-prima.

	Ácidos graxos	% relativa/AG totais
1	C14:0	0,9
2	C16:0	20,2
3	C16:1 ω7	1,0
4	C18:0	7,3
5	C18:1 ω9	42,6
6	C18:2 ω6	15,9
7	C18:3 ω6	11,9
8	Outros	0,2

Tabela 6 - Composição em ácidos graxos (%) do óleo de sardinha refinado usado como matéria-prima.

	Ácidos graxos	% relativa/AG totais
1	C14:0	8,2
2	C15:0	0,9
3	C16:0	18,2
4	C16:1 ω7	11,9
5	C18:0	4,3
6	C18:1 ω9	14,1
7	C18:2 ω6	0,3
8	C20:1 ω9	3,3
9	C18:3 ω3	0,4
10	C22:0	3,2
11	C22:1 ω9	3,8
12	C20:4 ω3	1,6
13	C20:5 ω3	13,8
14	C22:5 ω6	1,7
15	C22:6 ω3	9,2
16	Outros	5,3

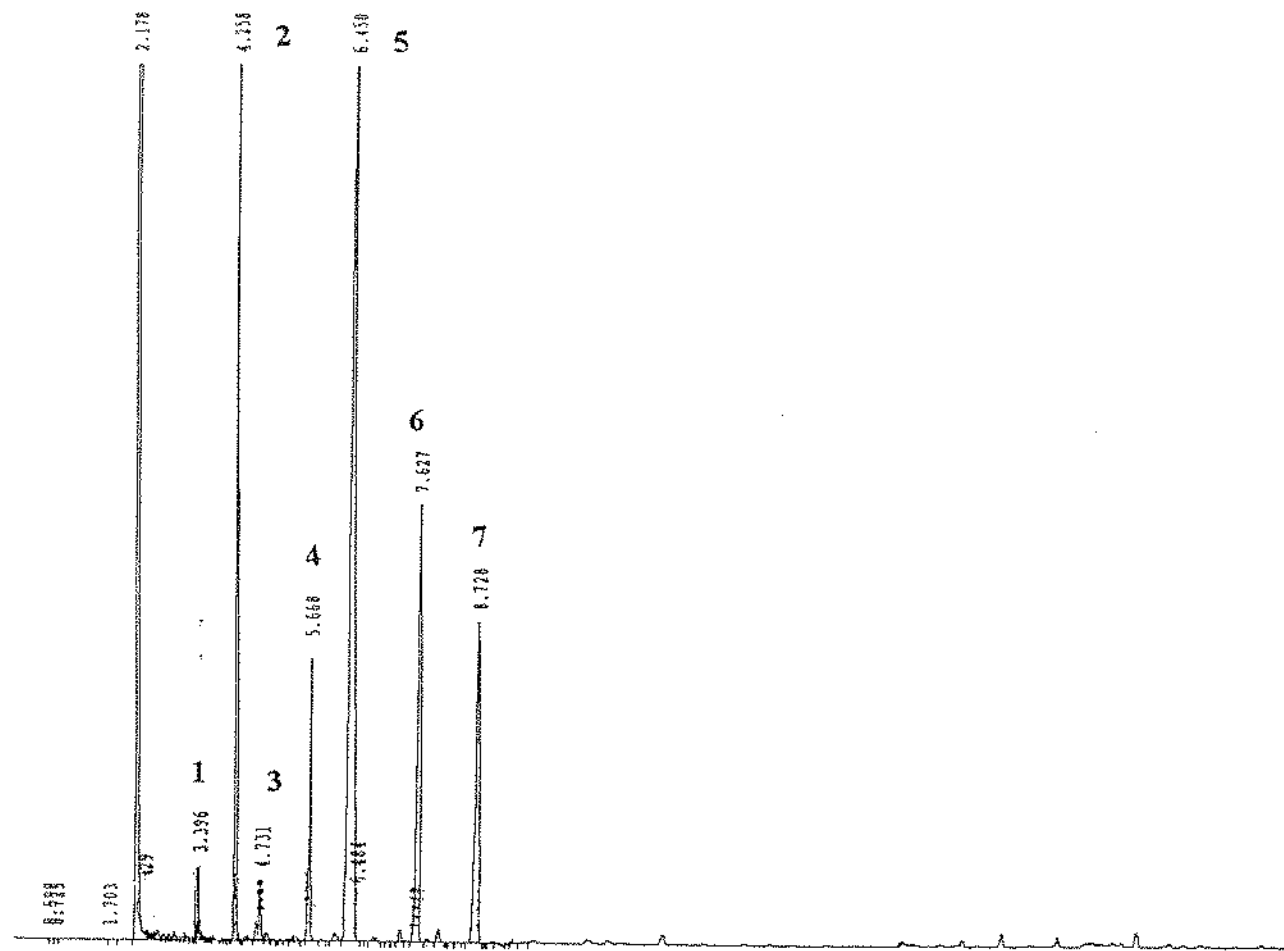


Figura 5 - Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) do óleo da linhagem de *Mucor* sp.

Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.

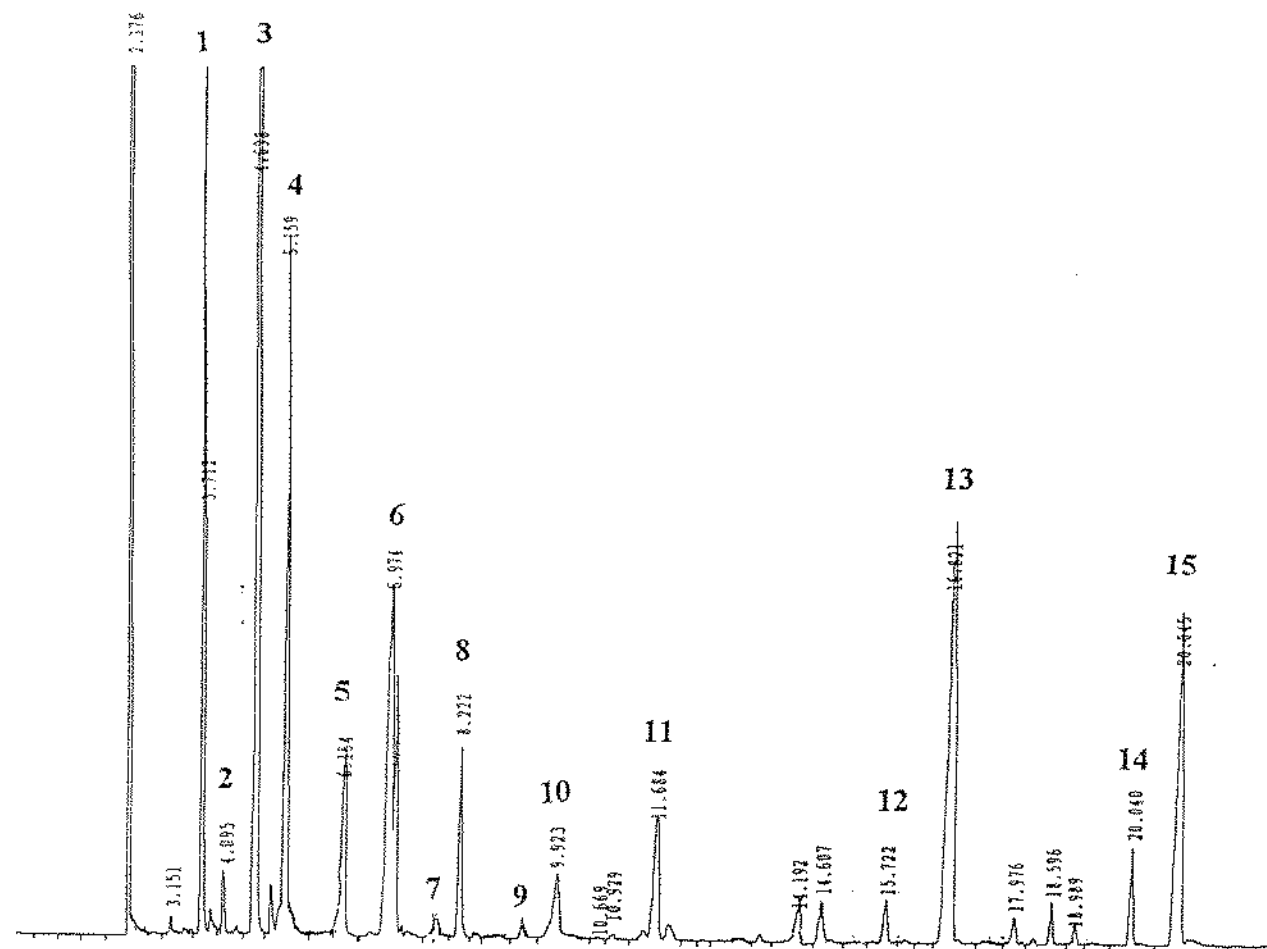


Figura 6 - Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) do óleo de sardinha.

Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.

4.1.3. Análise dos ácidos graxos por espectrometria de massa

A comprovação da composição dos ácidos graxos do óleo de *Mucor sp* e do óleo de sardinha foi realizada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa de acordo com o método descrito no item 3.2.3.6.

As figuras 7 e 8 ilustram os espectros dos ésteres metílicos de GLA da linhagem de *Mucor sp* e do éster metílico de EPA do óleo de sardinha, respectivamente. O pico do íon molecular e os picos obtidos da fragmentação após o impacto eletrônico estão de acordo com os picos correspondentes obtidos na análise dos padrões autênticos.

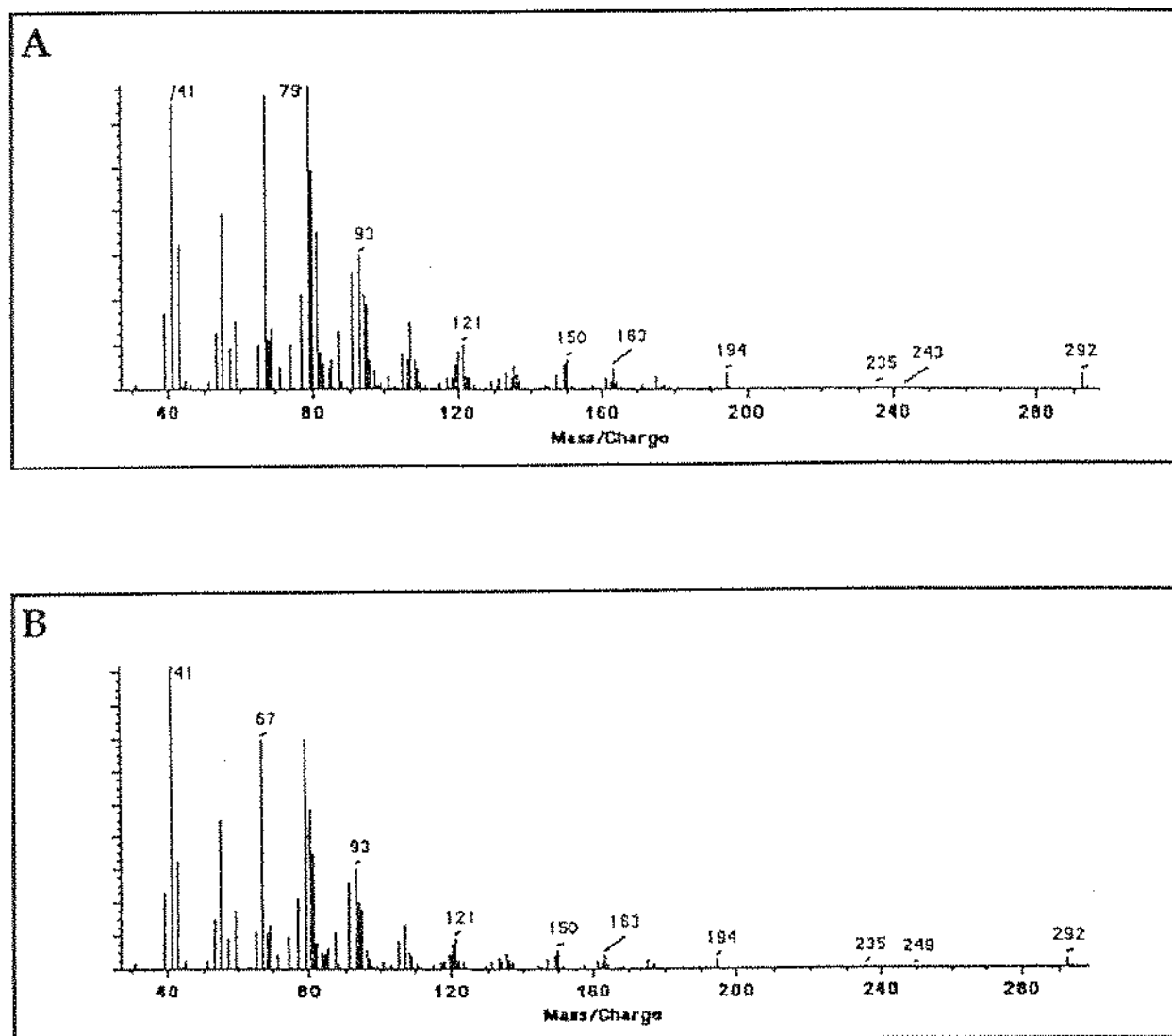


Figura 7 - Espectro de massa do éster metílico de ácido γ -linolênico do óleo de *Mucor* sp (A) e de seu padrão autêntico (B).

Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 6.

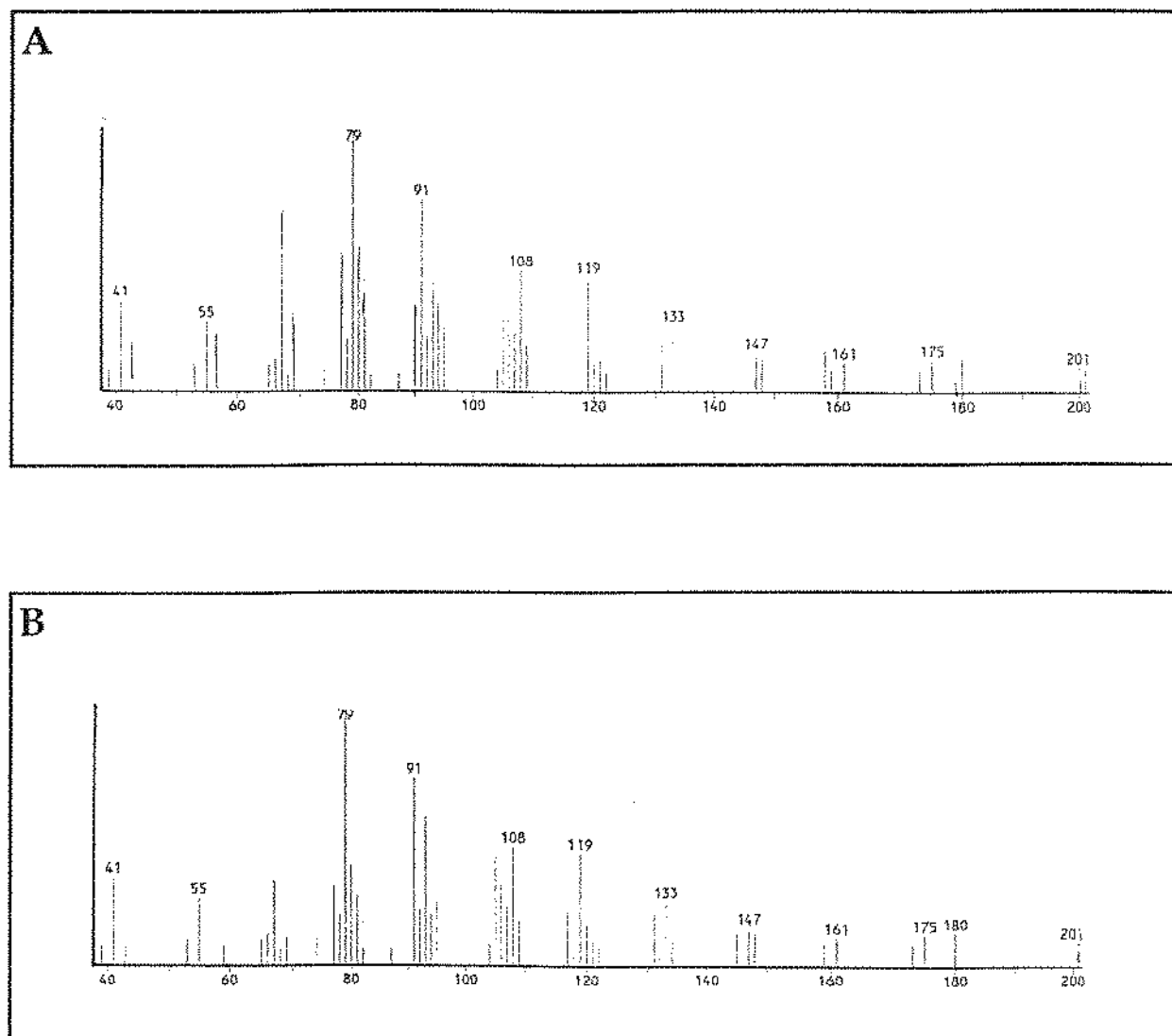


Figura 8 - Espectro de massa do éster metílico de ácido eicosapentaenóico do óleo de sardinha (A) e de seu padrão autêntico (B).
Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 6.

4.2. REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES MICROBIANAS

4.2.1. Determinação da atividade das lipases

As atividades das enzimas nos respectivos valores de pH ótimo determinadas nas condições descritas no item 3.2.4.1. estão mostradas na tabela 7.

A figura 9 apresenta a curva padrão de ácidos oleico × Volume (mL) de KOH 0,05N utilizada para a determinação da atividade enzimática.

Tabela 7 - Atividade de lipases microbianas testadas na catálise das reações da hidrólise e esterificação.

ENZIMAS	ATIVIDADE (U)	pH ótimo
<i>Candida cylindracea</i> (comercial)	85	7,0
<i>Rhizopus</i> sp	15	6,0
<i>Geotrichum</i> sp	12	7,0
<i>Aspergillus</i> sp	7,5	5,6
<i>Alcaligenes</i> sp	3	9,0

As lipases microbianas foram estudadas quanto à eficiência na catálise das reações da hidrólise e esterificação. As reações foram processadas utilizando-se a mesma quantidade de unidades de atividade enzimática permitindo a comparação entre as lipases microbianas na catálise das reações.

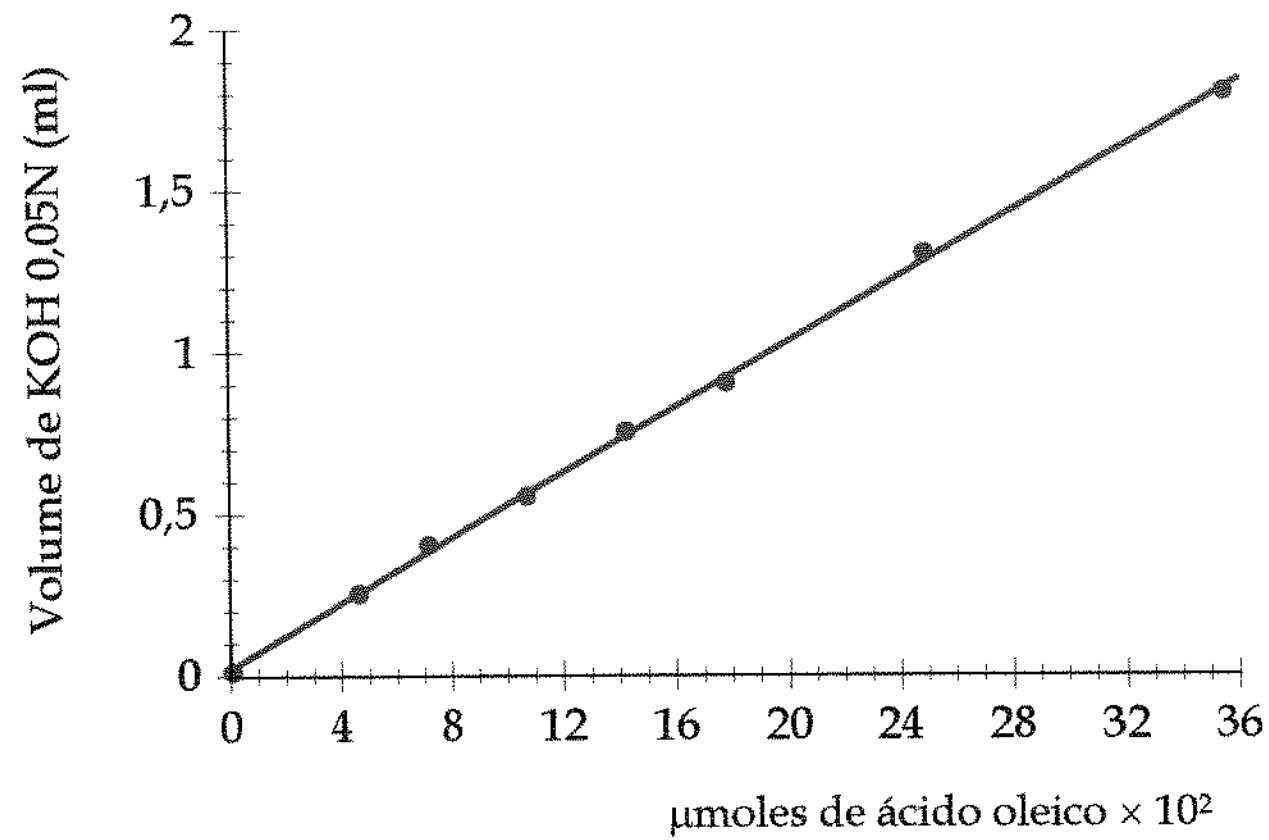


Figura 9 - Curva padrão da concentração de Ácido oleico × Volume de KOH 0,05N (mL) para determinação da atividade de lipase.

4.2.2. Estudo da hidrólise do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha por lipases microbianas

O estudo da hidrólise de óleos por lipases microbianas foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.2. A figura 10 ilustra os resultados das reações hidrolíticas com os substratos óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha. A figura 11 mostra os resultados das reações usando óleos vegetais como substrato para efeito de comparação.

As lipases estudadas (*Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp) apresentaram diferença sensível na taxa da hidrólise dos substratos óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha. Estas enzimas demonstraram hidrolisar mais facilmente o óleo de *Mucor* sp que o óleo de sardinha, como se pode verificar na figura 10.

A lipase de *Rhizopus* sp se mostrou a mais eficiente na ação hidrolítica entre as lipases isoladas no Laboratório de Bioquímica. Após 2 horas da reação hidrolítica a lipase de *Rhizopus* sp resultou em 28,3% e 18,7% de AGL para os substratos óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha respectivamente. Esta eficiência se compara a taxa da hidrólise obtida pela lipase comercial de *Candida cylindracea* para o óleo de *Mucor* sp.

As lipases obtidas de *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp se mostraram menos eficientes para hidrolisar os óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha.

A atuação destas enzimas na hidrólise dos óleos vegetais demonstra que as lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia média-longa (C12 - C18) presentes no óleo de canola, girassol, milho, soja e oliva. As lipases brutas obtidas de *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp parecem atuar mais eficientemente em ácidos graxos de cadeia curta presentes no óleo de côco.

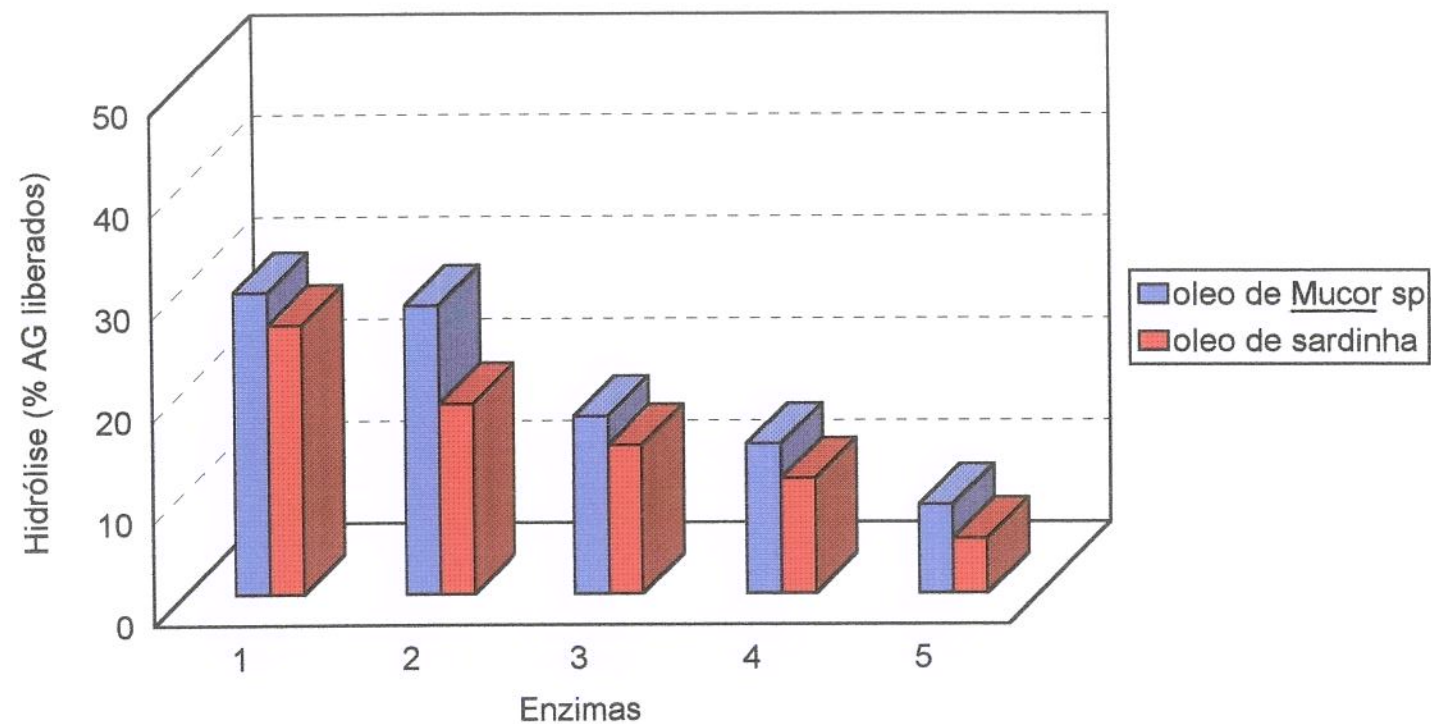
A lipase comercial de *Candida cylindracea*, em concordância aos dados relatados por LIE & LAMBERTSEN (1986) mostrou alta atividade hidrolítica para os substratos poliinsaturados analisados (~ 30% após 2hs de reação), superando os dados obtidos com as demais enzimas testadas. Esta enzima tem sido largamente utilizada nos estudos das reações hidrolíticas, promovendo a concentração de AGPI por reações da hidrólise (QUINLAN & MOORE, 1993).

A maior eficiência das lipases testadas na hidrólise do óleo de *Mucor* sp e outros óleos vegetais comparada ao óleo de sardinha pode ser explicada pela resistência à hidrólise enzimática dos AGPI de cadeia longa predominantes no óleo de sardinha (BOTTINO *et al.*, 1967)..

A dificuldade de lipases microbianas em hidrolisar óleos de peixes foi relatada por SHIMADA *et al.* (1995a). Segundo estes autores, a porcentagem máxima da hidrólise do óleo de oliva e óleo de atum obtida com lipase de *Geotrichum candidum* (600U) foi de 89% e 31% respectivamente após 16 horas de reação.

MUKHERJEE & KIEWITT (1991), no estudo da hidrólise de óleo obtido de *Mucor* sp por lipase de *Candida cylindracea* obtiveram ~ 55% de ácidos graxos liberados após 8 horas da reação hidrolítica; em contrapartida, HOSHINO *et al.* (1990) obtiveram ~50% após atuação da mesma lipase no substrato óleo de sardinha por 10 horas de reação.

SHIMADA *et al.* (1995b) relataram a eficiência na hidrólise do óleo de *Mortierella alpina* com a lipase de *Candida cylindracea* visando obter acilgliceróis enriquecidos em ácido araquidônico. O sistema de reação com uma concentração de 90U de lipase na mistura de reação com 1g do óleo de *Mortierella* e água (1:1) resultou 40% da hidrólise após 2 horas da reação hidrolítica.



1 - Lipase comercial de *Candida cylindracea*

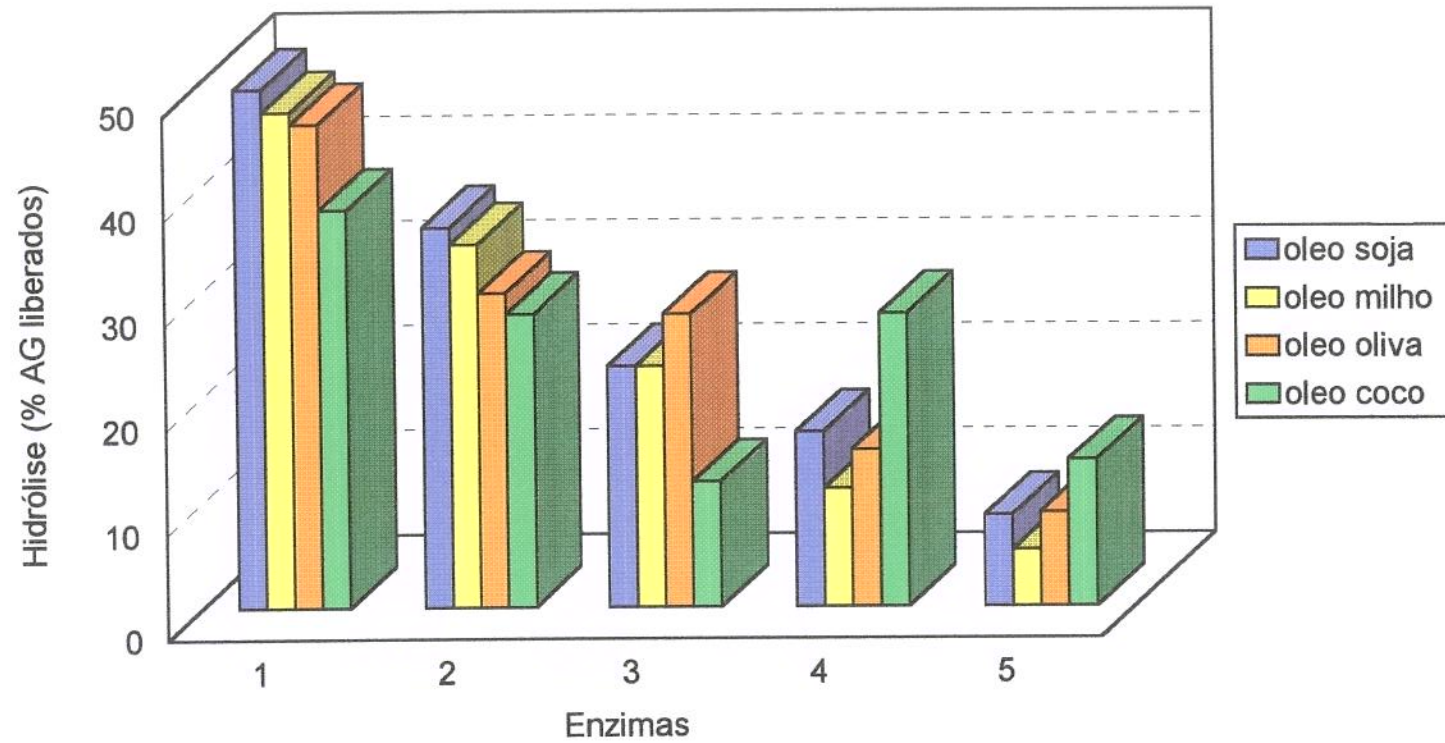
2 - Lipase obtida de *Rhizopus* sp

3 - Lipase obtida de *Geotrichum* sp

4 - Lipase obtida de *Aspergillus* sp

5 - Lipase obtida de *Alcaligenes* sp

Figura 10 - Hidrólise (%) do óleo de *Mucor* sp e do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas após 2 horas da reação hidrolítica a 40°C



1 - Lipase comercial de *Candida cylindracea*

2 - Lipase obtida de *Rhizopus* sp

3 - Lipase obtida de *Geotrichum* sp

4 - Lipase obtida de *Aspergillus* sp

5 - Lipase obtida de *Alcaligenes* sp

Figura 11 - Hidrólise (%) de óleos vegetais catalisada por lipases microbianas após 2 horas da reação hidrolítica a 40°C.

4.2.2.1. Efeito do tempo de reação na atividade hidrolítica

O efeito do tempo de reação na atividade hidrolítica de lipases microbianas nos óleos de sardinha e de *Mucor* sp foram realizados de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.3.1. As Figuras 12 e 13 ilustram os resultados.

A hidrólise máxima obtida com o óleo de *Mucor* sp se deu pelo uso da lipase comercial de *Candida cylindracea*, resultando 50% de ácidos graxos livres após 8 horas de reação. A lipase de *Rhizopus* sp também se mostrou eficiente na hidrólise deste substrato, resultando 40% após 8 horas de ação hidrolítica no óleo de *Mucor* sp. Após este tempo, os níveis mantiveram praticamente constante, ou sofreram um pequeno decréscimo como verificado com a lipase de *Candida cylindracea* e *Rhizopus* sp após 16 horas da reação hidrolítica.

Os dados obtidos podem ser comparados com os relatos de MURKHERJEE & KIEWITT (1991), que obtiveram 53,6, 34,8 e 32,7% de ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo obtido do fungo *Mucor* sp por lipases comerciais de *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum* e *Rhizopus arrhizus*, respectivamente. Os níveis obtidos com as lipases de *Penicillium cyclopium* e lipase de pâncreas de porco se mostraram inferiores a 15% da hidrólise.

SYED RAHMATULLAH *et al.* (1994b) na hidrólise de óleos vegetais contendo GLA por lipase comercial de *Candida cylindracea* obtiveram 97% de ácidos graxos liberados do óleo de primula após 16 horas e 84% oriundos do óleo de borragem após 5 horas da reação hidrolítica.

A lipase de colza (*Brassica napus* L) também foi relatada pela eficiência em hidrolisar óleos vegetais contendo GLA (HILLS *et al.*, 1989).

A hidrólise do óleo de sardinha pelo uso da lipase comercial de *Candida cylindracea*, resultou em aproximadamente 60% de ácidos graxos liberados após 16 horas da reação hidrolítica. As lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp, nas mesmas condições, apresentaram os máximos de 40% e 38% de ação hidrolítica, respectivamente. Após este tempo, a % de ácidos graxos hidrolisados se mantém praticamente constante. Os substratos analisados foram fracamente hidrolisados pelas lipases de *Aspergillus* sp e *Alcaligenes* sp (Figura 13).

O uso da lipase de *Candida cylindracea* tem sido relatado por vários autores na hidrólise do óleo de peixe visando à obtenção de acilgliceróis ricos em AGPI. TANAKA *et al.* (1992) obtiveram 70% da hidrólise após 40 horas da reação hidrolítica à 37°C em óleo de atum. SHIMADA *et al.* (1994) estudando diferentes lipases para hidrolisar óleo de atum relataram que lipase de *Candida cylindracea* isoladamente ou combinada com lipase de *Geotrichum* sp pode resultar em acilgliceróis ricos em EPA e DHA após liberar cerca de 60% de ácidos graxos em 16 horas da reação hidrolítica.

HOSHINO *et al.* (1990) relataram a eficiência da lipase de *Candida cylindracea* (lipase não específica) e *Aspergillus niger* (lipase 1,3-específica) para hidrolisar óleo de sardinha e óleo de fígado de bacalhau. Os autores obtiveram 80% da hidrólise após 30 horas da reação hidrolítica para ambas as lipases, quando a reação foi realizada com 10U de enzima à temperatura de 20°C. Os autores relataram que não existe nenhuma relação entre a especificidade posicional das lipases testadas e sua facilidade de hidrolisar os óleos de peixe.

Os posteriores estudos foram realizados com a lipase comercial de *Candida cylindracea* comparando os dados com as lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp, as quais apresentaram maior taxa de atividade hidrolítica para ambos os substratos analisados.

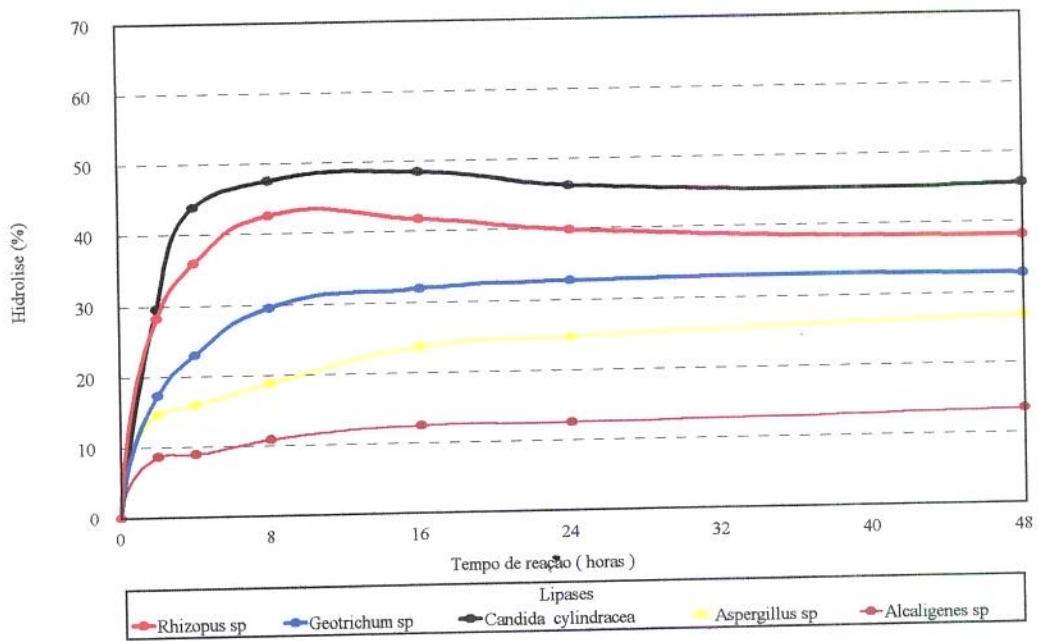


Figura 12 - Efeito do tempo de reação na hidrólise (%) do óleo de *Mucor* sp catalisada por lipases microbianas.

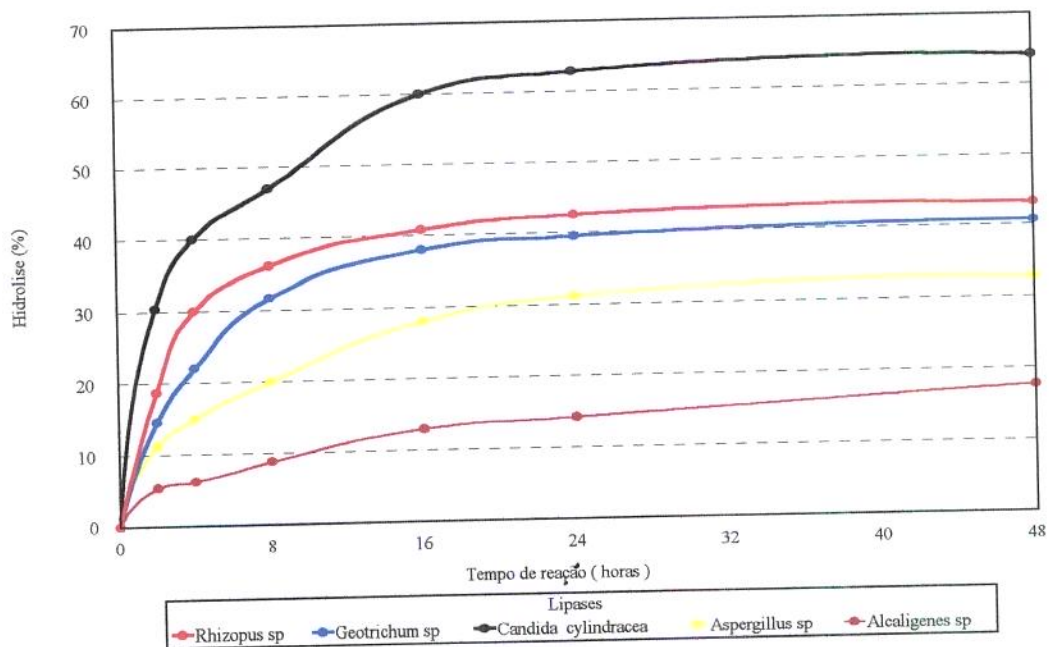


Figura 13 - Efeito do tempo de reação na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.

4.2.2.2. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica

O efeito da temperatura de reação na atividade hidrolítica de lipases microbianas nos óleos de sardinha e de *Mucor* sp foram realizados de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.3.2.

As figuras 14 e 15 ilustram os resultados obtidos.

O efeito da temperatura na ação hidrolítica das lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp se mostrou similar para ambos os substratos analisados. A temperatura ótima das enzimas foi verificado ser de 35 a 40°C para as lipases de *Candida cylindracea* e *Rhizopus* sp e entre 40 e 45°C para a lipase de *Geotrichum* sp. O uso de temperaturas acima dos valores ótimos determinados causaram a redução significativa na porcentagem da hidrólise do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha, provavelmente devido à inativação térmica destas enzimas. Em contrapartida, o uso temperaturas menores (20 à 35°C) não resultaram alterações significativas na porcentagem da hidrólise destes substratos.

A lipase de *Candida cylindracea* mostrou a mais estável frente às temperaturas testadas, resultando variações insignificantes na porcentagem da hidrólise quando usadas às temperaturas de 20, 30 ou 40°C.

Os dados obtidos estão de acordo com os resultados relatados por COSTA (1997) no estudo da lipase obtida de *Rhizopus* sp e por MACEDO (1995) no estudo da lipase obtida de *Geotrichum* sp.

JENSEN *et al.* (1974) reportam que a temperatura ótima para ação da lipase de *Geotrichum candidum* está entre 30 e 40°C.

Os dados da literatura quanto à temperatura usada para a reação hidrolítica catalisada por diferentes lipases microbianas tem demonstrado ser bastante variáveis. TANAKA *et al.* (1992) demonstraram estar preocupados em utilizar a temperatura ótima para a ação lipolítica da enzima de *Candida cylindracea* no óleo de peixe (37°C). MUKHERJEE & KIEWITT (1991) utilizaram a temperatura de 40°C para a hidrólise do óleo de fungo por diferentes lipases microbianas.

Em contrapartida, HOSHINO *et al.* (1990) realizaram os experimentos na temperatura de 20°C com o intuito de minimizar a possibilidade de acil migração não enzimática e de oxidação dos AGPI. Segundo os autores, o uso de temperaturas mais elevadas (30 e 40°C) resultaram a obtenção de 1,3-DAG e 1,2-DAG resultantes da migração de ácidos graxos nas posições do glicerol e também causaram inativação da lipase de *Aspergillus niger*.

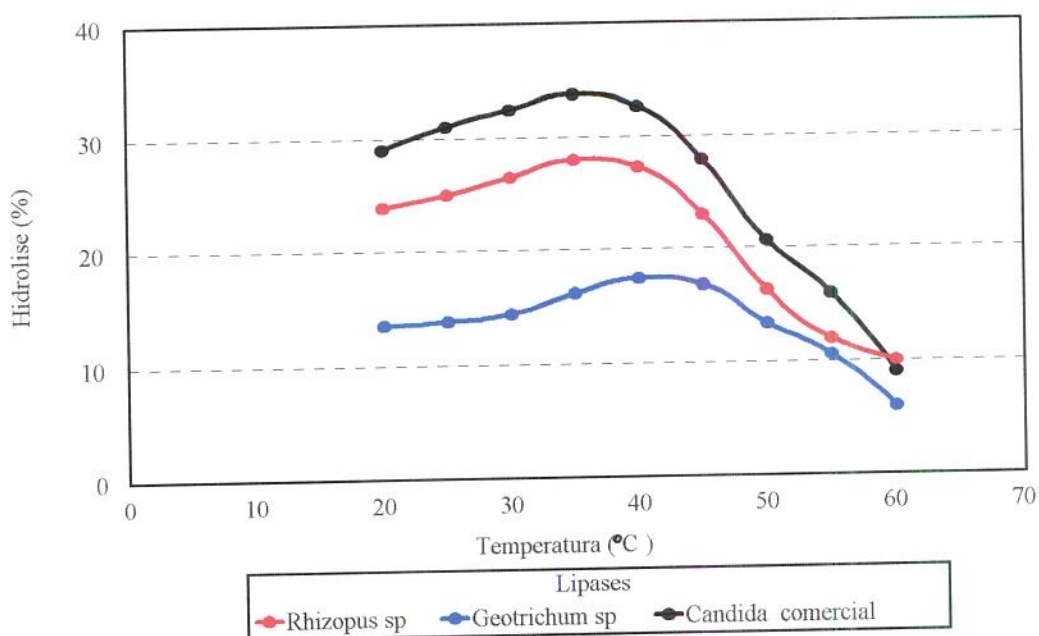


Figura 14 - Efeito da temperatura de reação na hidrólise (%) do óleo de *Mucor sp* catalisada por lipases microbianas.

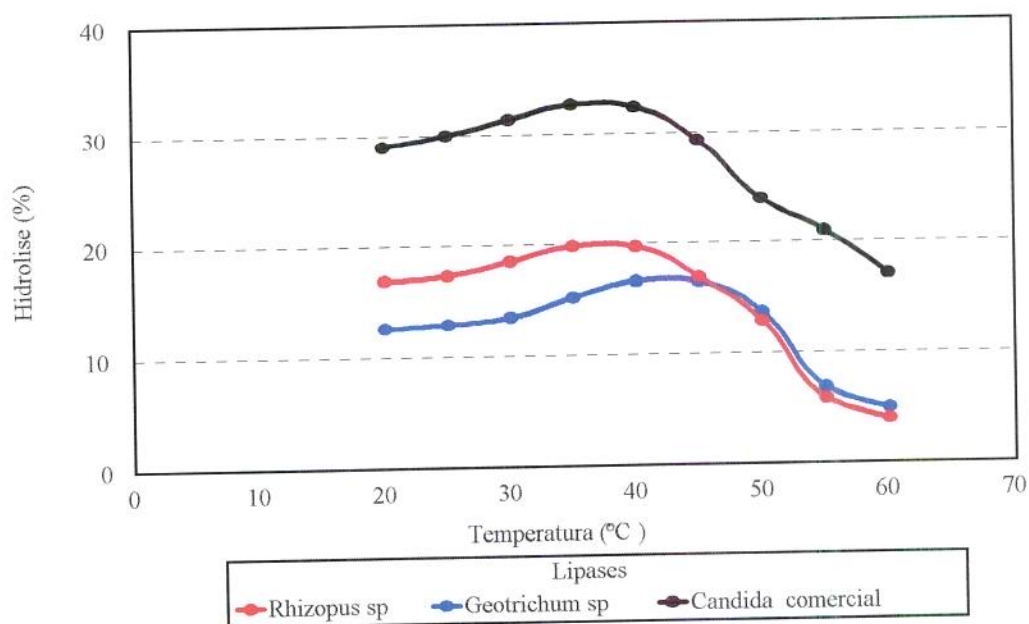


Figura 15 - Efeito da temperatura de reação na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.

4.2.2.3. Efeito da concentração de enzima na atividade hidrolítica

A influência da concentração das enzimas lipase de *Candida cylindracea*, lipase de *Rhizopus* sp e lipase de *Geotrichum* sp foi testada para os substratos conforme descrito no item 3.2.4.3.3. Os resultados estão demonstrados nas figuras 16 e 17.

A lipase de *Candida cylindracea* e de *Rhizopus* sp resultaram o máximo de ação hidrolítica utilizando a concentração de 90U no sistema de reação para o óleo de *Mucor* sp e para o óleo de sardinha. Concentrações maiores de enzima não causaram aumento significativo. Para a lipase de *Geotrichum* sp a porcentagem da hidrólise máxima foi obtida com o uso de 120U da enzima, para ambos os substratos analisados, após o tempo de duas horas da reação hidrolítica.

Os valores de porcentagens da hidrólise não foram proporcionais à concentração de enzima usada, demonstrando aumentar seus níveis até a concentração de 90U para as lipases de *Candida cylindracea* e *Rhizopus* sp e até 120U para a lipase de *Geotrichum* sp, a partir dos quais os valores se mantiveram praticamente constantes.

HOSHINO *et al.*, (1990) testaram o efeito da concentração de lipase de *Candida cylindracea* e *Aspergillus niger* na hidrólise do óleo de fígado de bacalhau. A concentração de 10U de enzima/6mL de solução enzimática resultou 100% da hidrólise após 60 horas de reação. A completa hidrólise do óleo somente foi obtida após 100 horas da reação hidrolítica quando a concentração usada foi inferior à 5U de enzima/6mL de solução enzimática para as duas lipases testadas.

A hidrólise máxima obtida com o óleo de *Mucor* sp pelo uso da lipase comercial de *Candida cylindracea* (~ 50%) e lipase de *Rhizopus* sp (~ 40%) após 2 horas da reação hidrolítica, usando 90U de enzima se mostrou similar a porcentagem obtida com a mesma enzima durante 8 horas da reação hidrolítica, utilizando a concentração de enzima de 50U. A lipase de *Geotrichum* sp resultou aproximadamente 30% da hidrólise após 2 horas da reação hidrolítica usando 120U de enzima ou por 8 horas da reação hidrolítica, usando 50U de enzima.

As lipases mantiveram o comportamento bastante parecido na hidrólise do óleo de sardinha, entretanto observou-se que o máximo da hidrólise quando as lipases atuam neste substrato foi obtido com o tempo de reação maior quando comparado ao óleo de *Mucor* sp.

A lipase obtida de *Candida cylindracea* após 2 horas da reação hidrolítica, com 90U de enzima ou após 16 horas, utilizando 50U de enzima, resultaram o máximo de 60% da hidrólise do óleo de sardinha. Com a lipase de *Rhizopus* sp, nas mesmas condições descritas acima a % da hidrólise obtida foi de 40%. A lipase de *Geotrichum* sp resultou 35% da hidrólise após 2 horas da reação hidrolítica usando 120U de enzima ou por 16 horas da reação hidrolítica, usando 50U de enzima.

Em vista destes resultados obtidos, o número de unidade das enzimas usadas para a reação de hidrólise em ambos os substratos permaneceu 50U nos experimentos seguintes, usando o tempo de 8 horas para o óleo de *Mucor* sp e 16 horas para o óleo de sardinha.

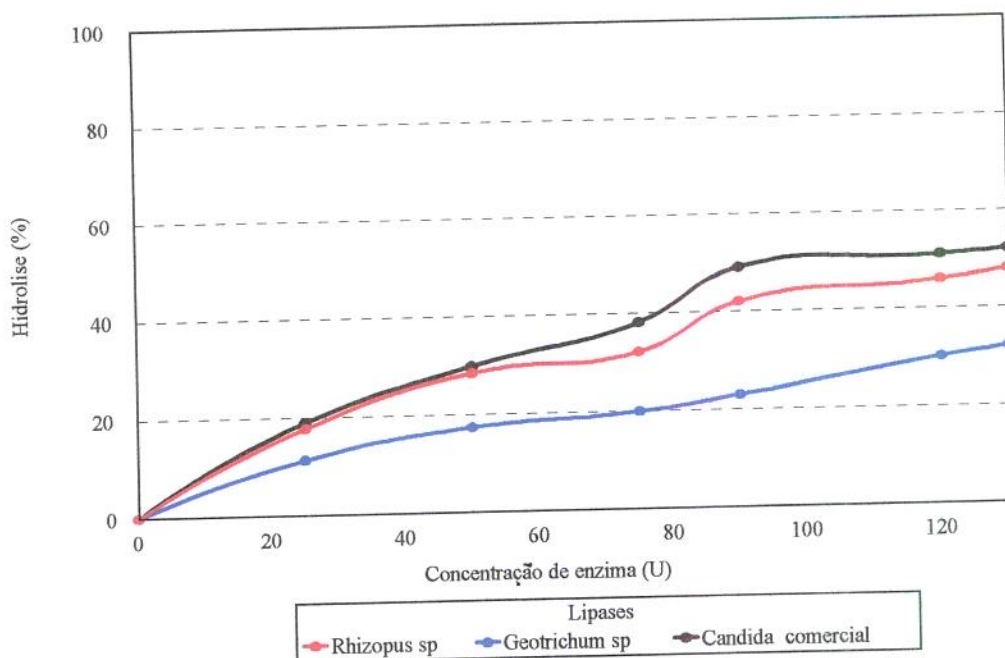


Figura 16 - Efeito da concentração de enzima na hidrólise (%) do óleo de *Mucor* sp catalisada por lipases microbianas.

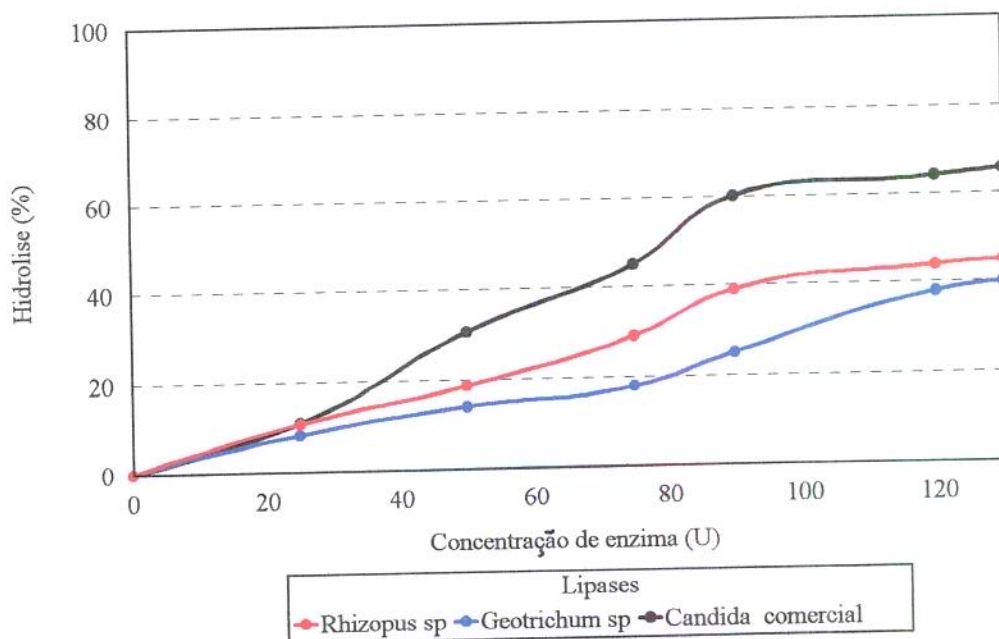


Figura 17 - Efeito da concentração de enzima na hidrólise (%) do óleo de sardinha catalisada por lipases microbianas.

4.2.2.4. Análise dos produtos após a reação hidrolítica catalisada por lipases microbianas

A hidrólise do óleo de *Mucor* sp foi realizada com o sistema de reação contendo 500mg do óleo, 50U de enzima suspensa em 3,5 mL de tampão nos valores de pH ótimo para cada lipase, incubado por um período de 8 horas, à temperatura de 35°C para as lipases de *Candida cylindracea* e *Rhizopus* e 40°C para a lipase de *Geotrichum* sp.

A hidrólise do óleo de sardinha foi realizada nas mesmas condições descritas para o óleo de *Mucor* sp, entretanto com o tempo de 16 horas da reação hidrolítica.

As frações de acilglicerol e ácidos graxos livres obtidas após hidrólise foram separadas conforme procedimento descrito no item 3.2.3.8. e analisadas quanto a composição em ácidos graxos por CG como descrito no item 3.2.3.5.

A tabela 8 permite a comparação dos resultados da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e lipase de *Geotrichum* sp após 8 horas da reação hidrolítica.

Embora a porcentagem da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp (42,6%) tenha sido menor que a hidrólise com *Candida cylindracea* (48,5%), o nível de enriquecimento de GLA se mostrou superior quando utilizado a lipase de *Rhizopus* sp. A porcentagem de GLA na fração acilglicerol após 8 horas de hidrólise com esta lipase (18,4%) teve um acréscimo de 55% comparada ao nível encontrado antes da hidrólise (11,9%).

A lipase de *Candida cylindracea*, relatada quanto à sua alta atividade hidrolítica e ação inespecífica (LI & LAMBERTSEN, 1986), e a lipase de *Rhizopus* sp capaz de hidrolisar a ligação éster na posição 1 e 3 do acilglicerol (OKUMURA *et al.*, 1981) causaram aumento nos níveis de ácido linoléico e

GLA na fração acilglicerol após a hidrólise do óleo de *Mucor* sp. Os ácidos palmítico e esteárico foram preferencialmente hidrolisados por estas enzimas, o que pode ser verificado pelo aumento de suas concentrações na fração dos ácidos graxos liberados após a reação hidrolítica. Em contrapartida, lipase de *Geotrichum* sp não resultou em aumento nos níveis de GLA nos acilgliceróis.

LAWSON & HUGHES (1988) analisaram a composição em ácidos graxos na posição sn-2 do óleo de *Mucor* sp. Os ácidos oleico, linoléico e GLA foram encontrados preferencialmente na posição 2, enquanto os ácidos palmítico e esteárico na posição 1 (3) do óleo analisado.

A lipase de *Geotrichum candidum* demonstrou claramente a sua preferência na hidrólise dos ácidos oleico e linoléico, confirmando estudos anteriores, os quais tem demonstrado a especificidade desta enzima em hidrolisar ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação cis na posição 9, independente de sua posição no TAG (ALFORD & PIERCE, 1961). Os níveis encontrados para os ácidos oleico e linoléico corresponderam a 80% dos ácidos hidrolisados por esta lipase no óleo de *Mucor* sp.

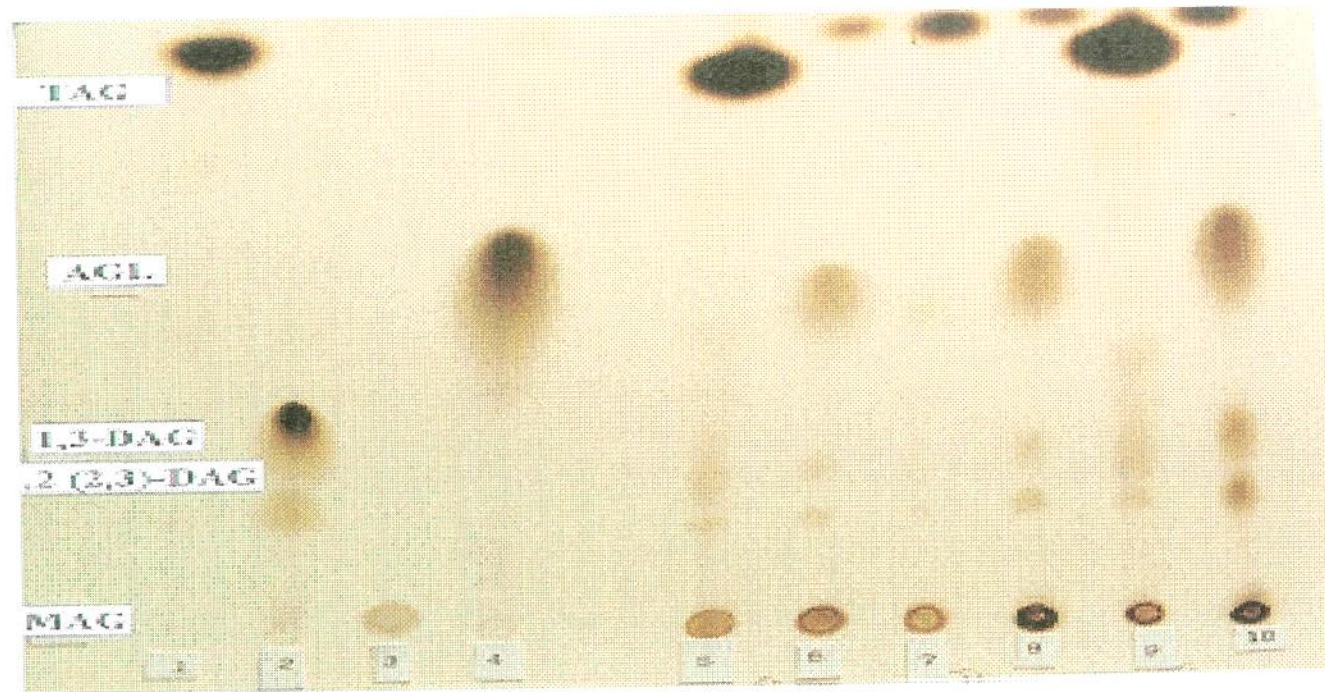
Alguns relatos recentes tem demonstrado que diferentes formas de lipases isoladas de *Geotrichum candidum* podem ter especificidade em relação à posição do ácido graxo no TAG. O pioneiro neste estudo foi SUGIHARA *et al.* (1990) que isolaram 4 formas de lipase, demonstrando que a quarta fração (IV) isolada de *Geotrichum candidum* hidrolisa a posição 2 do TAG duas vezes mais rápido que as demais posições. ASAHARA *et al.* (1993) isolaram 2 tipos de lipases de *Geotrichum* sp com especificidade posicional oposta. A lipase A hidrolisou ligação éster na posição 1 e 3, enquanto a lipase C mostrou hidrolisar mais rapidamente a posição 2 do substrato trioleína. A lipase B, provavelmente uma mistura das frações A e C foi capaz de hidrolisar todas as ligações ésteres do TAG.

A figura 18 ilustra a cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de *Mucor* sp após 2 e 8 horas da reação hidrolítica por ação das lipases microbianas, indicando que após a hidrólise por estas enzimas há a presença de dois tipos de DAG (1,3-DAG e 1,2 (2,3)-DAG) e a presença de MAG. Níveis maiores dos acilgliceróis obtidos após hidrólise do substrato com lipase de *Candida cylindracea* podem ser visualizados na figura, indicando sua alta capacidade hidrolítica.

Tabela 8 - Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo de *Mucor* sp catalisada por lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Lipases	Componentes	%	Composição em ácidos graxos (%)							Enriquecimento de GLA
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 γ	
Sem hidrólise	Acilglicerol	100	0,9	20,2	1,0	7,3	42,6	15,9	11,9	1,00
<i>Rhizopus</i> sp	Acilglicerol	57,4	0,7	17,8	1,2	5,1	36,2	20,2	18,4	1,50
	Ácidos graxos	42,6	3,1	33,6	4,5	10,0	35,2	10,6	3,0	
<i>C cylindracea</i>	Acilglicerol	52,5	1,2	16,0	1,3	4,0	45,0	17,7	14,8	1,24
	Ácidos graxos	47,5	1,4	29,1	1,4	10,9	38,4	14,0	4,5	
<i>Geotrichum</i> sp	Acilglicerol	70,4	7,3	28,8	0,8	20,3	19,5	11,9	11,4	_____
	Ácidos graxos	29,6	0,2	9,6	3,0	4,5	53,5	24,2	5,0	

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.



PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioleína e 1,2 (2,3) - Dioleína
- 3 - Monoleína
- 4 - Acido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - 2hs reação lipase de *Geotrichum* sp
- 6 - 8hs reação lipase de *Geotrichum* sp
- 7 - 2hs reação lipase de *Rhizopus* sp
- 8 - 8hs reação lipase de *Rhizopus* sp
- 9 - 2hs reação lipase de *C. cylindracea*
- 10 - 8hs reação lipase de *C. cylindracea*

Figura 18 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por ação de lipases microbianas. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

A tabela 9 permite a comparação dos resultados após a hidrólise do óleo de sardinha por lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e lipase de *Geotrichum* sp após 16 horas da reação hidrolítica.

A lipase de *Candida cylindracea* demonstrou alta eficiência na hidrólise dos ácidos graxos do óleo de sardinha, resultando 60% de ácidos graxos liberados após 16 horas da reação hidrolítica. No entanto a atividade em relação aos AGPI foi menor que em relação aos outros ácidos, uma vez que estes foram menos hidrolisados. Na fração acilglicerol restante o nível de DHA foi duplicado após 16 horas da reação hidrolítica, enquanto que o nível de EPA mostrou um acréscimo de 35% em relação a quantidade presente antes da hidrólise.

Os dados obtidos com a lipase de *Candida cylindracea* mostram resultados surpreendentes, uma vez que esta lipase se mostrou mais eficiente que a lipase de *Rhizopus* sp. A hidrólise do óleo de sardinha com a lipase 1,3-específica de *Rhizopus* sp deveria resultar acilgliceróis (2-MAG ou 1,2 (2,3)-DAG) com níveis maiores de AGPI do que a lipase inespecífica de *Candida cylindracea*, visto que os AGPI ω 3 estão preferencialmente presentes na posição 2 do TAG de óleos de peixe (BROCKEFORDHOFF *et al.* 1969).

Alguns autores relataram a resistência à hidrólise demonstrada pelo DHA presente em óleos de peixes após atuação de lipase de *Candida cylindracea*. O mecanismo da hidrólise do óleo de peixe pela lipase *Candida cylindracea* parece envolver uma especificidade em relação a cadeia acil do DHA ainda não bem elucidada (TANAKA *et al.*, 1993).

A lipase de *Geotrichum candidum* não foi eficiente para enriquecer AGPI no óleo de sardinha, embora tenha demonstrado a sua preferência na hidrólise dos ácidos monoinsaturados com dupla ligação cis na posição 9 (16:1 e 18:1).

A comparação realizada por TANAKA *et al.* (1993) entre diferentes lipases inespecíficas posicionalmente (*Candida cylindracea*, *Pseudomonas* sp, *Chromobacterium viscosum*) com lipases específica para as posições 1,3 (*Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*) demonstraram que a lipase de *Candida cylindracea* foi a mais eficiente para concentrar DHA. O uso desta lipase possibilitou 70% da hidrólise em óleo de atum e a obtenção de um mistura de acilgliceróis com o conteúdo três vezes maior de DHA.

BOTTINO *et al.* (1967) encontraram como principais componentes dos acilgliceróis do óleo de baleia os AGPI 20:5 e 22:6 após a hidrólise do óleo por lipase pancreática. A resistência dos AGPI à hidrólise foi postulada como um efeito inibitório da enzima exercida por ácidos graxos contendo duplas ligações próximas ao grupo carboxílico.

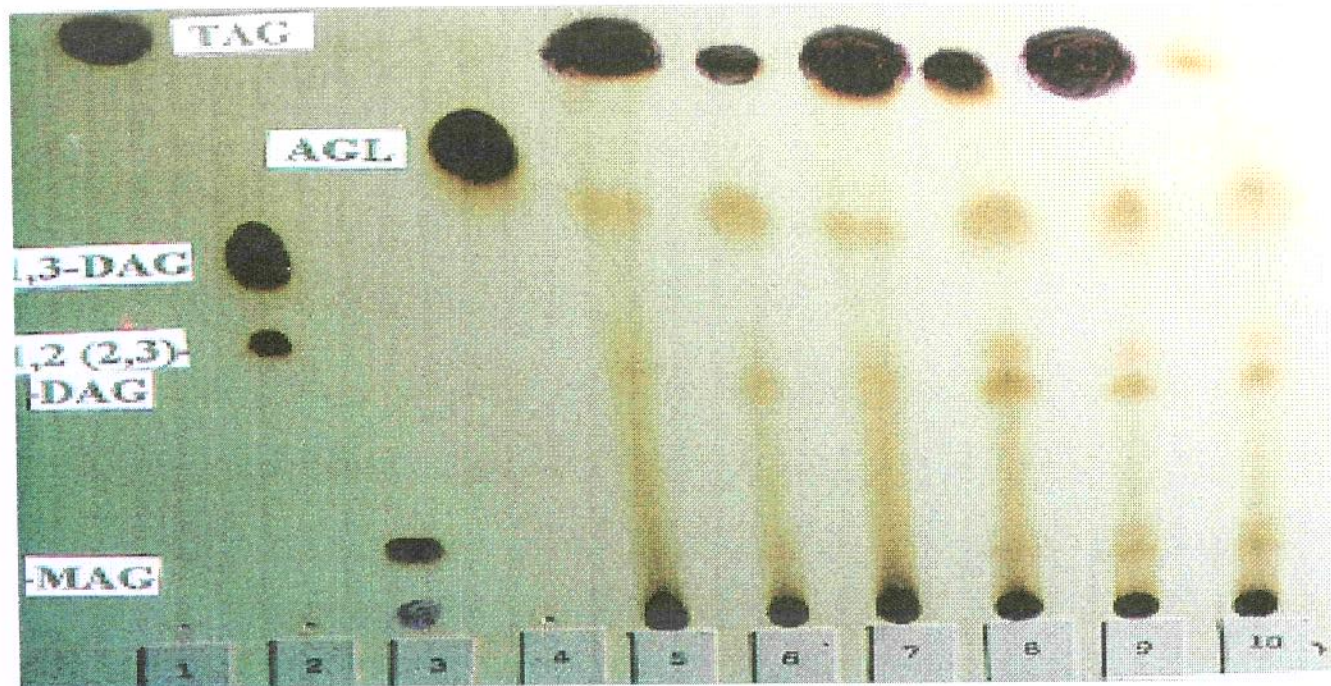
Lipase de *Fusarium oxysporum* também demonstrou um comportamento similar ao da lipase de *Candida cylindracea*. O conteúdo total de AGPI ω 3 relatado pelos autores foi de 30% nos óleos de sardinha e óleo de fígado de bacalhau (HOSHINO, 1991).

A figura 19 ilustra a cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo sardinha por lipases microbianas, indicando que após a hidrólise por estas enzimas há a presença de dois tipos de DAG (1,3-DAG e 1,2 (2,3)-DAG) e pequenas quantidades de MAG.

Tabela 9 - Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após 16 horas de hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipases de *Candida cylindracea*, *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Lipases	Componentes	%	Composição em ácidos graxos (%)										Enriquecimento	
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	20:1	22:0	22:1	20:5	22:6	EPA	DHA
Sem hidrólise	Acilglicerol	100	9,0	20,2	13,3	4,7	15,7	3,7	3,6	4,3	15,3	10,2	1,00	1,00
<i>Rhizopus</i> sp	Acilglicerol	59,2	7,9	19,0	8,5	5,0	13,9	3,0	4,0	3,5	18,5	16,5	1,20	1,62
	Ácidos graxos	40,8	12,9	23,8	16,5	6,0	18,9	0,6	3,9	3,4	9,8	4,1		
<i>C cylindracea</i>	Acilglicerol	40,0	7,6	18,5	6,6	4,4	9,7	2,6	2,7	4,6	20,7	22,5	1,35	2,20
	Ácidos graxos	60,0	12,9	23,0	18,3	6,8	21,9	3,3	3,9	3,1	4,0	2,8		
<i>Geotrichum</i> sp	Acilglicerol	62,0	12,8	28,1	6,2	7,1	8,7	2,3	3,2	2,8	14,7	13,9	_____	1,36
	Ácidos graxos	38,0	6,1	15,5	23,6	3,0	28,6	3,1	1,9	1,7	9,1	7,3		

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.



PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioléína e 1,2 (2,3) - Dioléína
- 3 - Monoléína
- 4 - Ácido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - 2hs reação lipase de *Geotrichum* sp
- 6 - 16hs reação lipase de *Geotrichum* sp
- 7 - 2hs reação lipase de *Rhizopus* sp
- 8 - 16hs reação lipase de *Rhizopus* sp
- 9 - 2hs reação lipase de *C. cylindracea*
- 10 - 16hs reação lipase de *C. cylindracea*

Figura 19 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de sardinha por ação de lipases microbianas. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

4.2.2.5. Hidrólise do óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp

A lipase de *Rhizopus* sp foi selecionada para o estudo da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por demonstrar resultados mais promissores visando a concentração de GLA no acilgliceróis.

Os produtos da hidrólise foram quantificados por Iatroscan CCD- DIC conforme descrito no item 3.2.3.7. e analisadas quanto a composição em ácidos graxos por CG conforme descrito no item 3.2.3.5.

A tabela 10 apresenta os resultados da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp em diferentes tempos de reação. Os níveis de GLA nos acilgliceróis aumentaram até se obter o máximo com 8 horas da reação hidrolítica (18,3%). Após este período, os níveis são reduzidos à 15,2% de GLA com 24 horas da reação hidrolítica.

A figura 20 ilustra as variações dos níveis dos principais ácidos graxos da composição do óleo de *Mucor* sp da fração acilglicerol em função do tempo da reação hidrolítica. Verificou-se um aumento significativo nos níveis dos ácidos linoléico e GLA e redução dos ácidos palmítico e oleico na fração acilglicerol, os quais foram preferencialmente hidrolisados após 8 horas de reação. Entretanto, estes ácidos tiveram seus níveis novamente aumentados após 16 horas da reação hidrolítica. Isto provavelmente ocorra devido a possível ação de esterificação quando a reação de hidrólise enzimática se estende por longos períodos de tempo (BROCKMAN *et al.* 1988).

MURKHERJEE & KIEWITT (1991) testaram várias lipases microbianas para hidrolisar óleo de *Mucor* sp contendo 10,4% de GLA. A lipase de *Mucor miehei* foi a mais eficiente na hidrólise do óleo após 12 horas de reação, resultando em 22,3% de ácidos graxos liberados e 15,4% de GLA nos acilgliceróis.

A taxa da hidrólise de óleos vegetais contendo GLA (óleo de borragem ou óleo de prímula) por lipases microbianas tem demonstrado ser maior que os valores obtidos para os óleos de microrganismos ou óleos de origem marinha. Óleo de prímula com conteúdo inicial de 9,4% de GLA resultou em 45,2% de GLA nos acilgliceróis após 2 horas da reação hidrolítica com lipase de *Candida cylindracea*. A mesma enzima no óleo de borragem aumentou a porcentagem de GLA de 20,4 para 47,8% em relação aos ácidos graxos totais após 5 horas da reação hidrolítica (SYED RAHMATULLAH *et al.*, 1994).

A figura 21 ilustra a cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de *Mucor* sp após a ação da lipase de *Rhizopus* sp em função do tempo de reação. A produção de ácidos graxos livres aumenta progressivamente com o decorrer da hidrólise. Quando TAG são hidrolisados por lipases, há um acúmulo inicial de DAG, subsequentemente MAG são formados, sendo estas reações reversíveis. A presença de 1,3-DAG, sugerindo uma possível hidrólise enzimática na posição 2 pode ter sido devido a migração do grupo 2 para a posição 1 ou 3 do acilglicerol.

Tabela 10 - Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após a hidrólise do óleo de *Mucor* sp catalisada por lipase de *Rhizopus* sp.

Tempo (h)	Componentes	%	Composição em ácidos graxos (%)							Enriquecimento de GLA
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 γ	
0	Acilglicerol	100	0,9	20,3	1,0	7,3	42,6	15,9	11,9	1,00
2	Acilglicerol	71,7	0,9	16,3	1,0	7,1	40,9	19,8	13,9	1,17
	Ácidos graxos	28,3	0,6	37,8	0,7	10,1	32,4	13,9	4,4	
4	Acilglicerol	60,0	0,9	16,9	1,2	7,2	36,2	22,9	14,6	1,23
	Ácidos graxos	40,0	3,1	36,1	1,4	9,9	34,6	9,8	4,8	
8	Acilglicerol	57,4	0,7	17,8	1,2	5,1	36,2	20,7	18,3	1,53
	Ácidos graxos	42,6	3,1	33,6	4,5	10,0	35,2	10,6	3,0	
16	Acilglicerol	56,0	1,6	19,2	1,5	4,1	37,2	20,3	16,1	1,35
	Ácidos graxos	44,0	3,4	36,0	3,3	12,6	23,9	16,0	4,8	
24	Acilglicerol	61,8	0,6	18,7	1,0	4,6	40,5	19,3	15,2	1,27
	Ácidos graxos	38,2	4,8	30,3	2,0	15,1	28,3	14,3	5,2	

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.

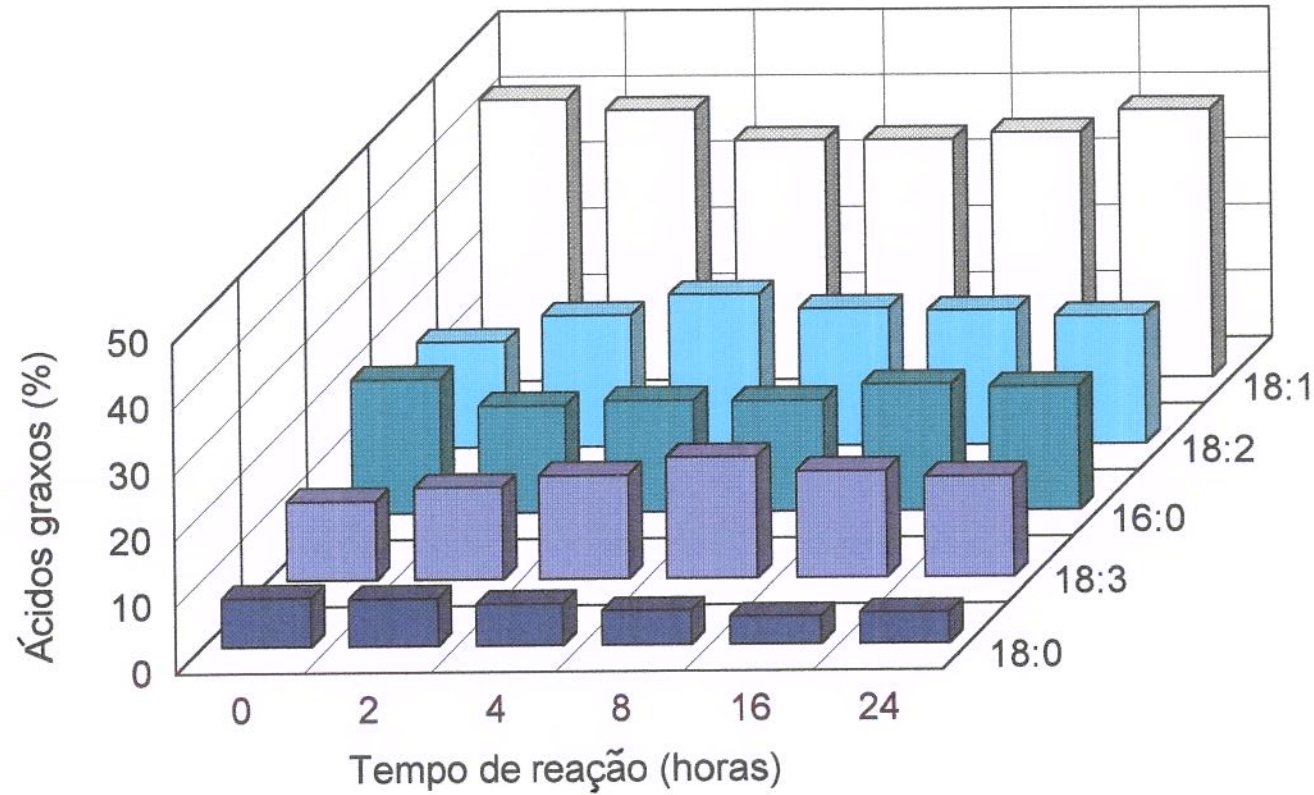
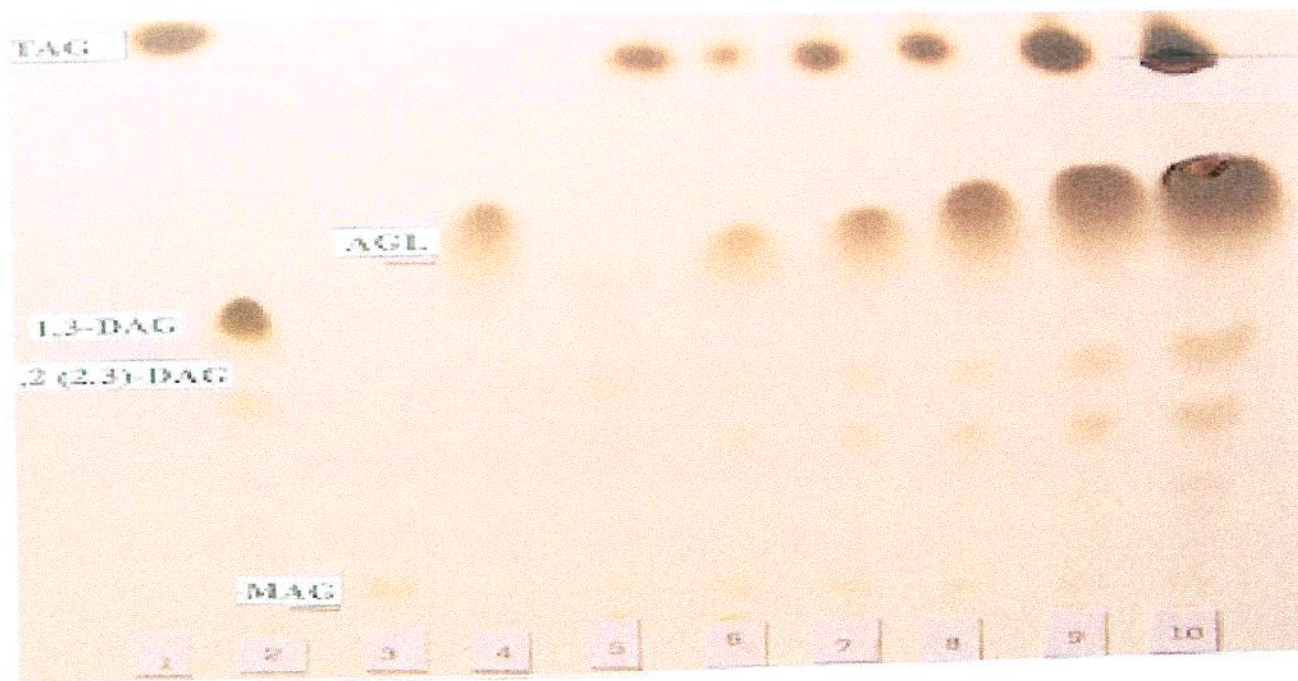


Figura 20 - Variação dos níveis dos principais ácidos graxos da fração acilglicerol do óleo de *Mucor* sp em função do tempo da reação hidrolítica catalisada por lipase de *Rhizopus* sp.
Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.



PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioleína e 1,2 (2,3) - Dioleína
- 3 - Monoleína
- 4 - Acido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - Tempo zero de reação
- 6 - 30 minutos de reação
- 7 - 1 hora de reação
- 8 - 2 horas de reação
- 9 - 4 horas de reação
- 10 - 8 horas de reação

Figura 21 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de *Mucor* sp por ação de lipase de *Rhizopus* sp. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

A composição em ácidos graxos das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp estão demonstrados na tabela 11.

Uma série de reações transformaram os TAG do óleo de *Mucor* sp em DAG e estes para MAG. Os TAG, DAG 1,2 (2,3) e 1,3 e os MAG foram separados em placas preparativas de CCD para então serem analisados por CG quanto à composição em ácidos graxos.

A ação hidrolítica da lipase de *Rhizopus* sp resultou DAG (10,2%) e quantidades significativas de MAG (12,7%). O GLA foi encontrado como um dos principais componentes das frações 1,2 (2,3) -DAG (20,4%) e MAG (18,1%). A presença de 12,7% de MAG, encontrados no sistema de reação, claramente indicam que as lipases de *Rhizopus* sp é específica para a posição primária da hidroxila do substrato analisado.

A hidrólise do óleo de prímula por lipase de colza (*Brassica napus* L.) resultou 45% de GLA nos MAG, 28% nos DAG, 15% nos TAG e somente 6% de GLA nos ácidos graxos liberados após 1 horas de reação. O conteúdo de GLA aumentou de 9,5% antes da hidrólise para 28% após 1 hora da hidrólise, resultando 2.9 vezes o enriquecimento de GLA nos acilgliceróis do óleo vegetal (HILLS *et al.*, 1989).

OKUMURA *et al.* (1976) determinaram as especificidades posicionais de quatro espécies de lipases microbianas: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Da ação destas enzimas sobre o substrato trioleína foi concluído que lipases de *A. niger* e *R. delemar* não hidrolisam a ligação éster na posição 2 do TAG. As lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium* hidrolisam todas as posições éster do TAG independentemente de sua posição no TAG.

A figura 22 ilustra a variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp após a hidrólise catalisada por lipase de *Rhizopus* sp. Os níveis de TAG vão gradativamente decrescendo, enquanto os níveis de ácidos graxos liberados vão gradativamente aumentando com o decorrer da hidrólise. Níveis significativos de MAG (12,7%) foram observados após 8 horas da reação hidrolítica. Após este tempo os componentes se mantêm praticamente constantes.

É conhecido que os AGL no meio de reação são inibidores da hidrólise. Esta sua ação deve-se ao acúmulo de ácidos graxos na interface bloqueando a formação do complexo enzima-substrato e conseqüentemente diminuindo a velocidade da reação hidrolítica (MATTSON & VOLPENHEIN, 1966).

Tabela 11 - Composição em ácidos graxos (%) das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 8 horas de hidrólise do óleo de *Mucor* sp catalisada por lipase de *Rhizopus* sp.

Fração de acilgliceróis	%	Composição em ácidos graxos (%)						
Tempo de reação: 0h		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 γ
Triacilglicerol	92,1	0,9	20,4	1,3	9,0	42,3	13,9	10,9
Diacilglicerol	6,5	1,8	19,9	1,0	7,1	36,5	17,0	17,1
Tempo de reação: 8h								
Tricilglicerol	29,1	1,0	20,2	0,9	6,3	41,6	18,9	10,9
Diacilglicerol (1,2 (2,3))	* 10,2	0,9	16,7	1,4	5,5	37,6	18,1	20,4
Diacilglicerol (1,3)		1,0	19,7	1,2	7,5	38,2	14,5	17,8
Monoacilglicerol	12,7	1,0	18,6	1,6	6,8	39,2	14,5	18,1
Ácidos graxos livres	48,0	2,5	33,8	4,5	10,3	35,1	10,3	3,4

* Corresponde à soma total dos diacilgliceróis (1,2 (2,3)) e (1,3) quantificados em CCD-DIC

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas nos itens 3. 2. 3. 5. e 3. 2. 3. 7.

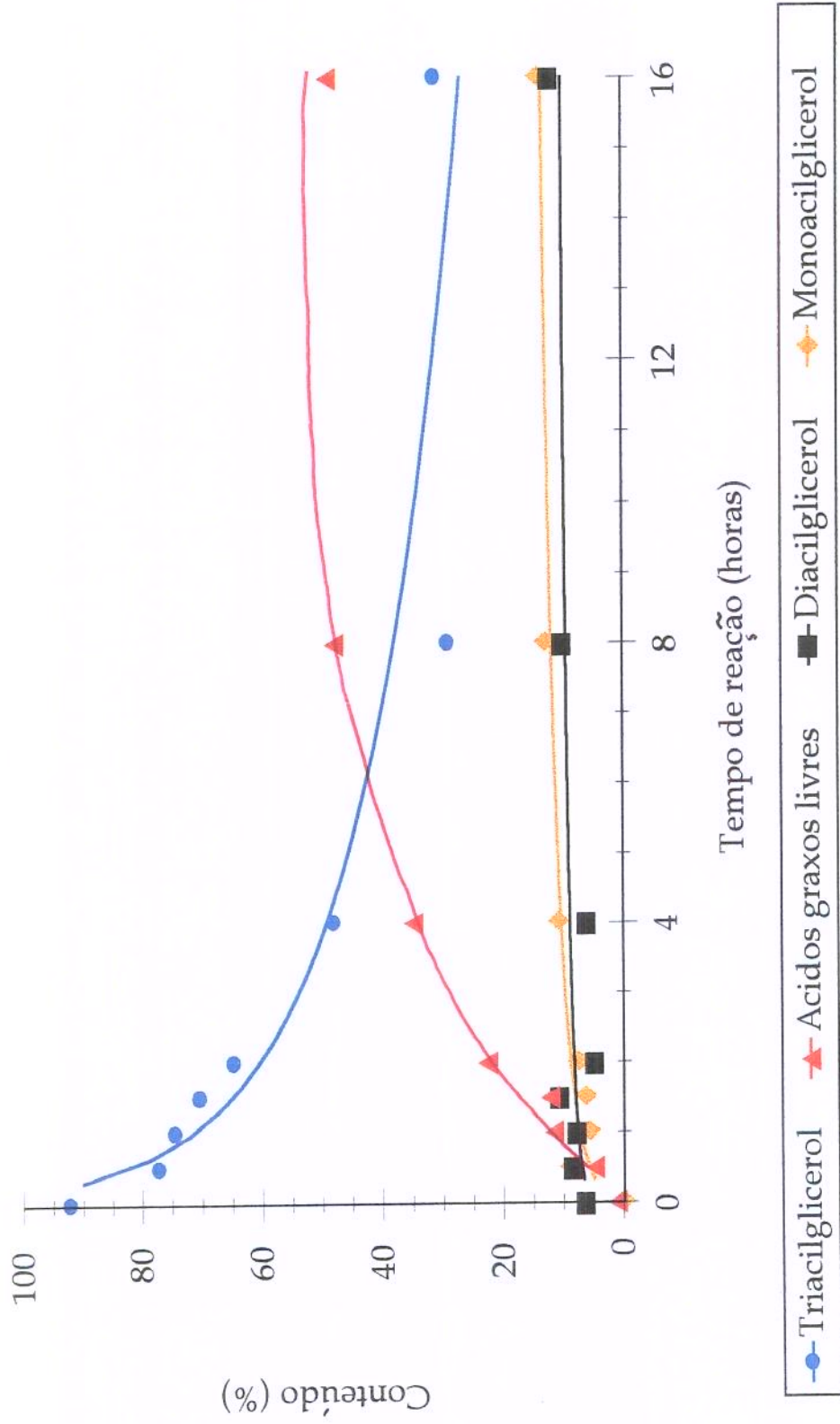


Figura 22 - Variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp após a hidrólise catalisada por lipase de *Rhizopus* sp. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 7.

4.2.2.6. Hidrólise do óleo de sardinha por lipase de *Candida cylindracea*

Os produtos da hidrólise foram quantificados por Iatroscan CCD- DIC conforme descrito no item 3.2.3.7. e analisadas quanto a composição em ácidos graxos por CG conforme descrito no item 3.2.3.5.

A tabela 12 apresenta os resultados da hidrólise do óleo sardinha por lipase de *Candida cylindracea* em diferentes tempos de reação. As porcentagens dos AGPI (EPA e DHA) nos acilgliceróis vão aumentando com o decorrer do tempo, até 16 horas da reação hidrolítica. O nível máximo obtido de EPA foi de 20,7% e o DHA foi de 22,5% em relação aos ácidos graxos totais após 16 horas de reação, o que equivale a um acréscimo de 120% em relação à quantidade presente antes da hidrólise.

A figura 23 ilustra as variações dos níveis dos principais ácidos graxos do óleo de sardinha da fração acilglicerol em função do tempo da reação hidrolítica. Verificou-se um aumento significativo nos níveis de DHA e EPA nos acilgliceróis, os quais se mostraram resistentes a hidrólise. Os ácidos 16:0, 16:1, 18:0 e 18:1 foram preferencialmente hidrolisados, resultando aumento de seus níveis nos ácidos graxos liberados após reação hidrolítica.

LIE & LAMBERTSEN (1986) estudando a hidrólise de óleos de origem marinha relataram que lipase de *Candida cylindracea* hidrolisa preferencialmente ácidos graxos C14 a C18 saturados e monoinsaturados, enquanto ácidos graxos de cadeia longa (20:1 e 22:1) e AGPI (20:5 e 22:6) são resistentes a ação hidrolítica da enzima.

A figura 24 ilustra a cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de sardinha após ação da lipase de *Candida cylindracea* em função do tempo de reação. A hidrólise deste substrato resultou em TAG, DAG (1,3 e 1,2 (2,3)) e pequenas quantidades de MAG.

Tabela 12 - Composição em ácidos graxos (%) das frações acilglicerol e ácidos graxos liberados após a hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de *Candida cylindracea*.

Tempo (h)	Componentes	%	Composição em ácidos graxos (%)										Enriquecimento	
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	20:1	22:0	22:1	20:5	22:6	EPA	DHA
0	Acilglicerol	100	9,0	20,2	13,3	4,7	15,7	3,7	3,6	4,3	15,3	10,2	1,00	1,00
2	Acilglicerol	73,6	9,9	20,5	10,0	4,4	14,0	3,8	3,1	4,0	17,9	12,3	1,17	1,20
	Ácidos graxos	26,4	9,7	18,7	17,6	6,8	17,8	3,4	3,8	4,2	10,6	7,4		
4	Acilglicerol	60,0	7,2	17,8	9,5	3,8	14,2	3,3	3,4	3,8	20,8	16,1	1,36	1,58
	Ácidos graxos	40,0	13,2	26,6	17,3	6,2	16,9	3,6	3,3	3,3	6,3	3,2		
8	Acilglicerol	53,1	6,9	18,3	7,9	3,4	13,4	3,3	3,2	3,2	19,7	20,7	1,28	2,03
	Ácidos graxos	46,9	12,8	21,2	16,8	6,7	18,3	4,3	3,8	4,4	8,6	3,0		
16	Acilglicerol	40,0	7,6	18,5	6,6	4,4	9,7	2,6	2,7	4,6	20,7	22,5	1,35	2,20
	Ácidos graxos	60,0	12,9	23,0	18,3	6,8	21,9	3,3	3,9	3,1	4,0	2,8		
24	Acilglicerol	37,2	9,2	21,3	8,6	4,1	12,2	3,6	3,0	3,8	16,9	17,2	1,10	1,68
	Ácidos graxos	62,8	10,6	21,6	16,8	7,4	18,9	2,5	3,8	4,7	7,9	5,8		

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.

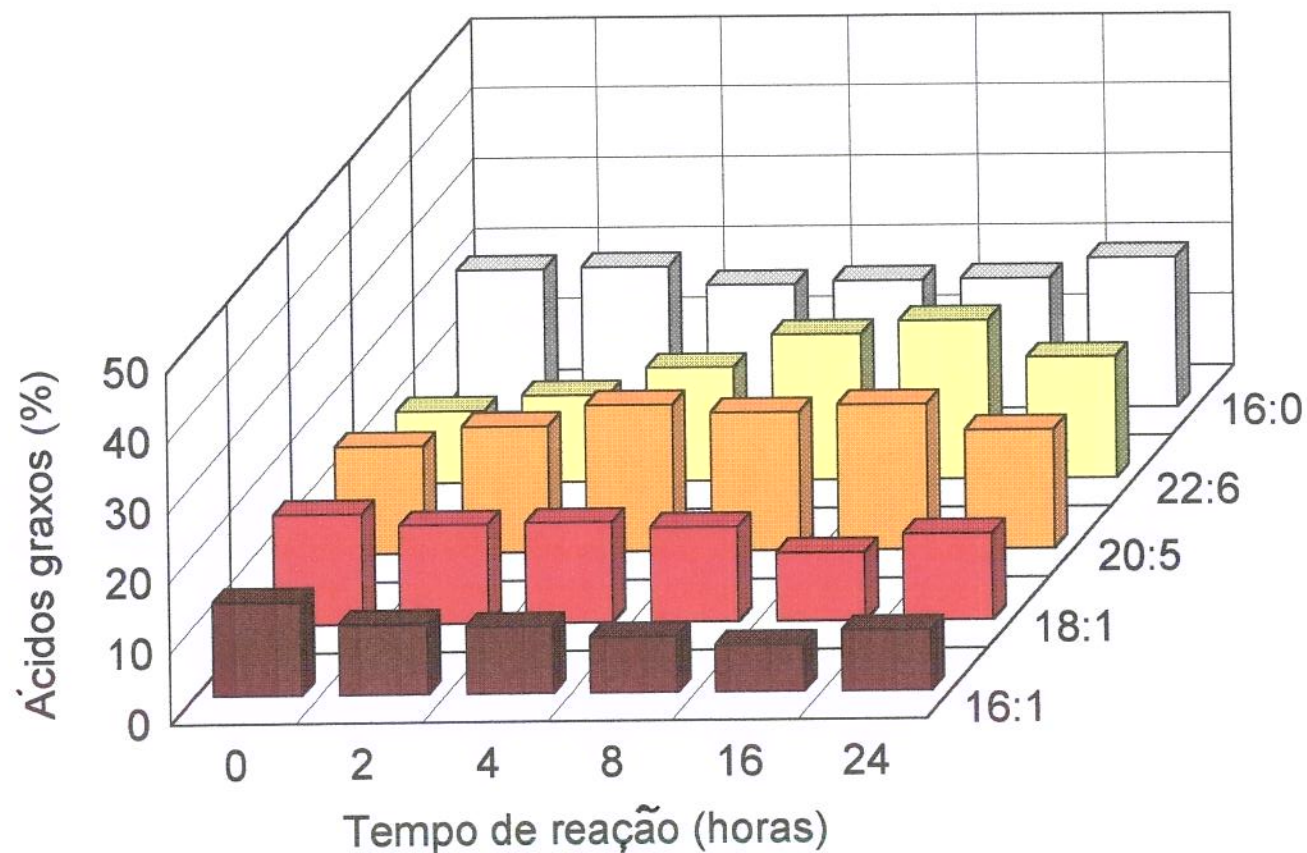
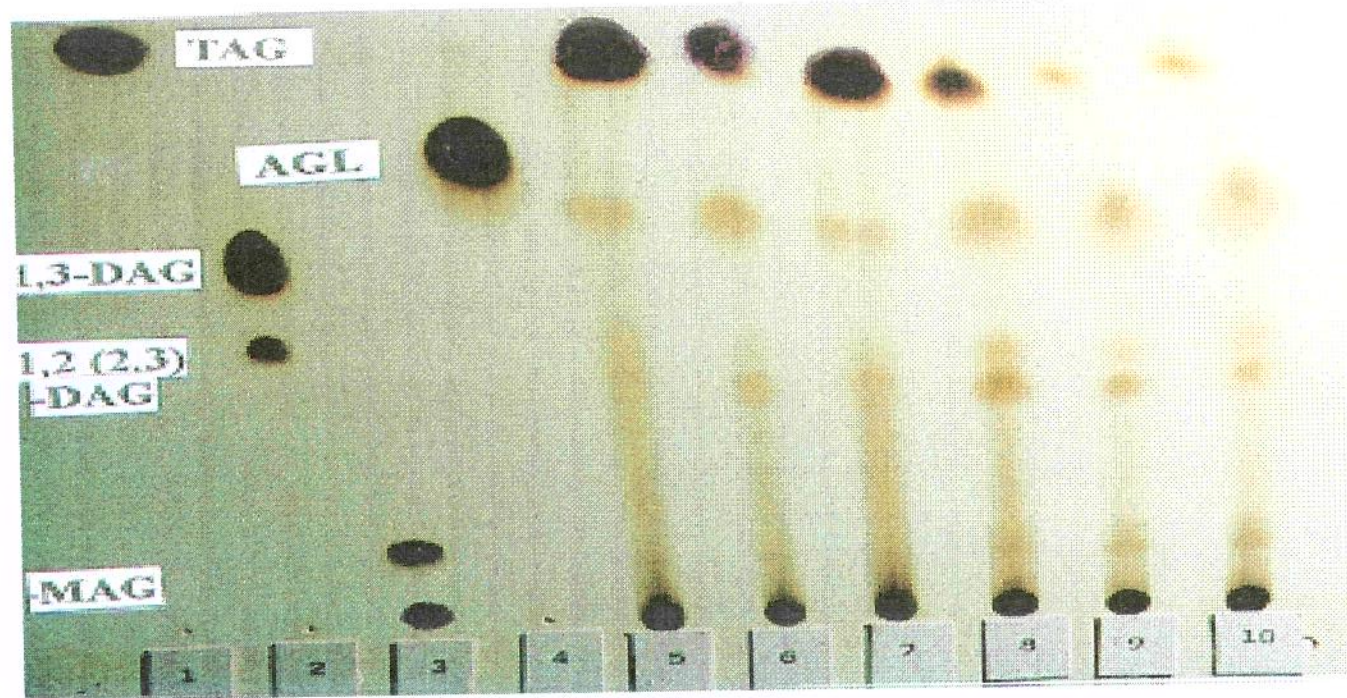


Figura 23 - Variação dos níveis dos principais ácidos graxos da fração acilglicerol do óleo de sardinha em função do tempo da reação hidrolítica catalisada por lipase de *Candida cylindracea*.
Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.



PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioleína e 1,2 (2,3) - Dioleína
- 3 - Monoleína
- 4 - Acido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - Tempo zero de reação
- 6 - 30 minutos de reação
- 7 - 2 hora de reação
- 8 - 4 horas de reação
- 9 - 8 horas de reação
- 10 - 16 horas de reação

Figura 24 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise do óleo de sardinha por ação de lipase de *Candida cylindracea*. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

A composição em ácidos graxos das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 16 horas de hidrólise do óleo de sardinha por lipase de *Candida cylindracea* estão demonstrados na tabela 13. O EPA e DHA foram os principais ácidos graxos encontrados na fração 1,2(2,3)-DAG, perfazendo 20,7 e 21,2% em relação aos ácidos graxos totais. Os ácidos graxos de cadeia longa (20:1 e 22:1) e AGPI (20:5 e 22:6) se mostraram resistentes à ação hidrolítica, permanecendo nas frações DAG e MAG após a hidrólise por lipase de *Candida cylindracea*. Os ácidos C14, C16 e C18 tiveram seus níveis diminuídos nos acilgliceróis após a hidrólise.

A figura 25 ilustra a variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos após hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de *Candida cylindracea*. Os níveis de TAG vão decrescendo, enquanto os níveis de ácidos graxos liberados vão gradativamente aumentando com o decorrer da hidrólise. Pequenas quantidade de DAG e MAG foram detectadas.

O nível de MAG obtido após 8 horas de hidrólise do substrato óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp (12,7%) foi superior ao obtido com a lipase de *Candida cylindracea* após 16 horas da reação hidrolítica no substrato óleo de sardinha (3,8%).

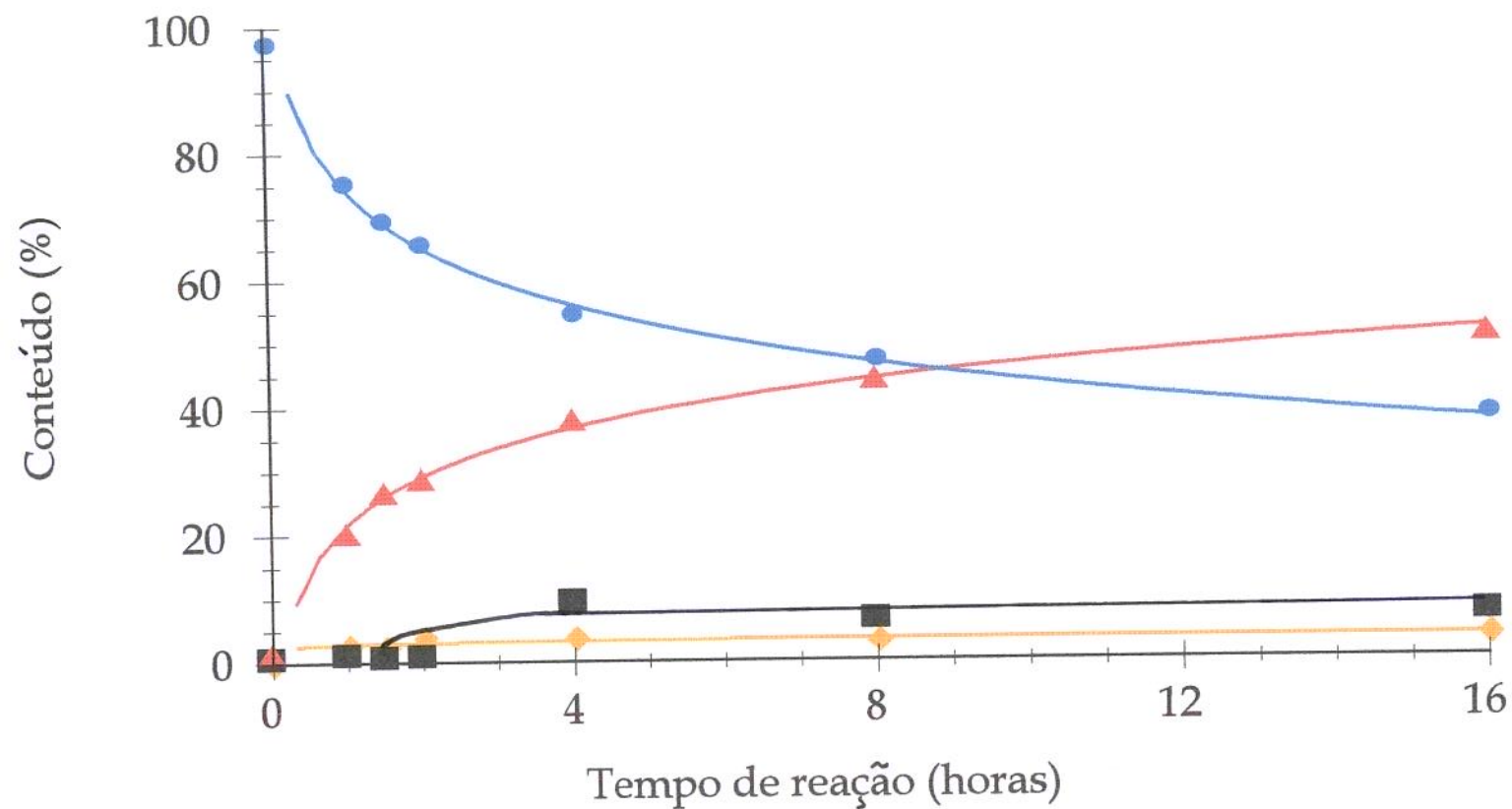
BROCKMAN *et al.* (1988) aponta que o curso da hidrólise de um óleo por lipases é dependente de vários fatores, dentre eles: a especificidade da lipase para o substrato (especificidade posicional ou de ácidos graxos); as diferenças na taxa em relação à reação reversa (esterificação) a qual pode ocorrer durante a hidrólise do óleo pela lipase e as diferenças na reatividade de cada lipase junto aos acilgliceróis constituintes do óleo.

Tabela 13 - Composição em ácidos graxos (%) das frações de acilgliceróis e ácidos graxos liberados após 16 horas de hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de *Candida cylindracea*.

Fração de acilgliceróis	(%)	Composição em ácidos graxos (%)									
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	20:1	22:0	22:1	20:5	22:6
Tempo de reação: 0h											
Triacilglicerol	97,4	9,0	20,2	13,3	4,7	15,7	3,7	3,6	4,3	15,3	10,2
Tempo de reação: 16h											
Triacilglicerol	30,6	11,2	25,3	10,2	5,2	13,5	1,3	3,3	3,1	14,5	12,1
Diacilglicerol (1,2 (2,3))	* 10,8	7,5	13,6	6,5	4,4	10,0	6,6	2,6	6,7	20,7	21,2
Diacilglicerol (1,3)		7,8	19,4	8,7	4,9	13,4	1,8	3,5	3,4	18,7	18,0
Monoacilglicerol	3,8	6,0	10,8	8,5	4,9	16,5	10,9	3,3	7,0	17,4	14,6
Ácidos graxos livres	54,8	13,8	23,7	18,5	6,9	21,8	1,7	3,8	2,6	4,3	2,9

* Corresponde à soma total dos diacilgliceróis (1,2 (2,3)) e (1,3) quantificados em CCD-DIC

Condições da reação de hidrólise descritas no texto. Condições cromatográficas descritas nos itens 3. 2. 3. 5. e 3. 2. 3. 7.



—●— Triacilglicerol —▲— Ácidos graxos livres —■— Diacilglicerol —◆— Monoacilglicerol

Figura 25 - Variação da composição percentual dos acilgliceróis e ácidos graxos do óleo de sardinha após a hidrólise catalisada por lipase de *Candida cylindracea*. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 7.

4.2.3. Estudo da esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha por lipases microbianas

Os estudos da esterificação dos ácidos graxos totais livres obtidos do óleo de *Mucor* sp e do óleo de peixe (item 3.2.3.3) com os álcoois selecionados, n-butanol e glicerol foram inicialmente testados com as lipases obtidas de *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp, *Alcaligenes* sp e a lipase comercial de *Candida cylindracea*.

4.2.3.1. Reação de esterificação com o n-butanol catalisada por lipases microbianas

O sistema para a reação de esterificação foi preparado conforme descrito no item 3.2.5.1. Os ésteres butílicos formados e ácidos graxos não-esterificados foram separados por CCD - preparativa (item 3.2.3.9.) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.)..

As figuras 26 e 27 ilustram os resultados obtidos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de peixe com n-butanol em função do tempo da esterificação.

As lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp demonstraram esterificar eficientemente os ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com o n-butanol. Os maiores níveis resultaram 70 e 60% da esterificação após 16 horas de reação com as lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp, respectivamente.

Os ácidos graxos provindos do substrato óleo de sardinha foram fracamente esterificados ao n-butanol após reação catalisada por lipases microbianas. Foram obtidos 35 e 30% da esterificação após 16 horas de reação com as lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp, respectivamente.

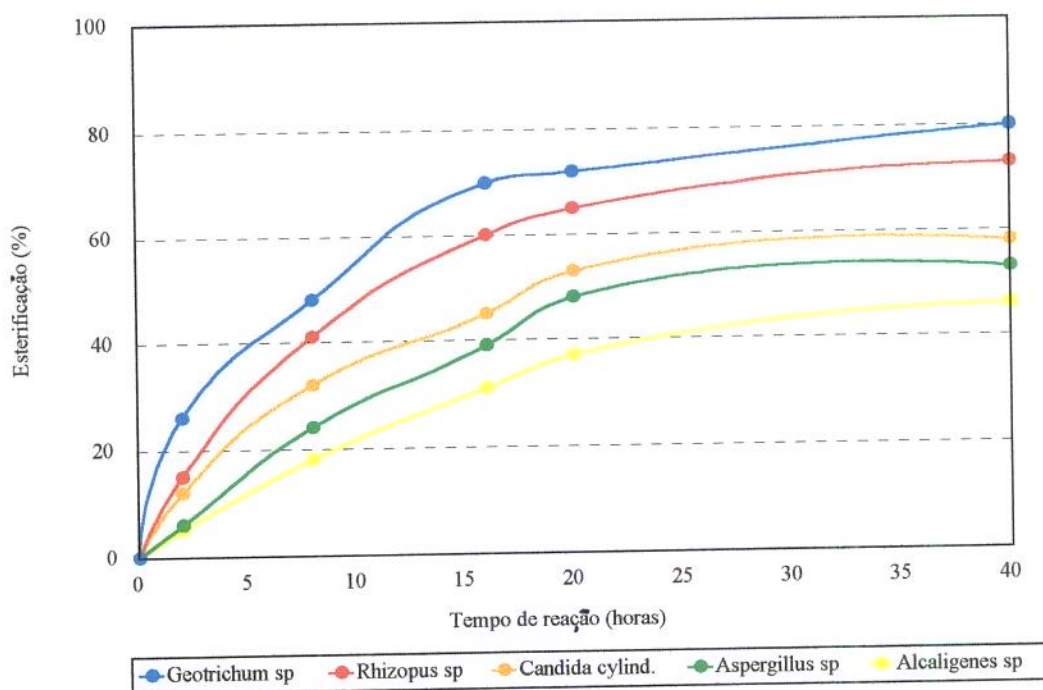


Figura 26 - Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com n-butanol catalisada por lipases microbianas.

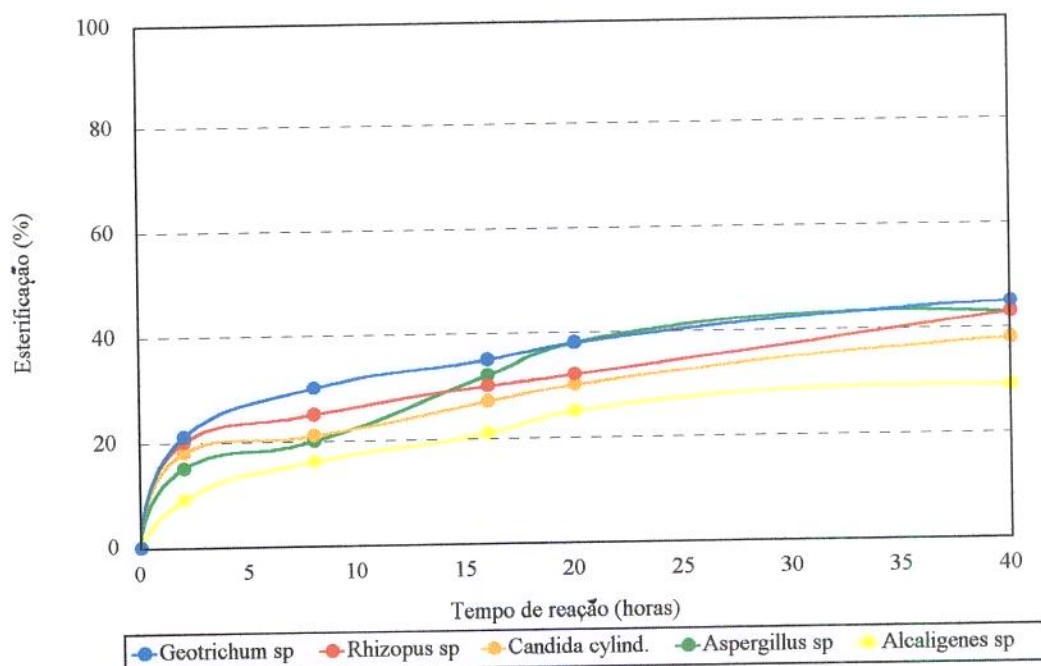


Figura 27 - Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de sardinha com n-butanol catalisada por lipases microbianas.

A tabela 14 permite a comparação dos resultados após esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com n-butanol por lipases de *Rhizopus* sp e lipase de *Geotrichum* sp após 16 horas de reação.

A reação com a lipase de *Geotrichum* sp resultou em alto conteúdo de GLA na fração de ácidos graxos não esterificados (17,3%). Os ácidos 16:1 (9), 18:1 (9) e 18:2 (9,12) foram preferencialmente esterificados com o n-butanol por esta enzima. JENSEN *et al.* (1965), postularam que a especificidade da lipase de *Geotrichum candidum* para ácidos graxos de cadeia longa com insaturação no carbono 9 se deve a presença de um sítio ativo relativamente largo entre o carbono da carbonila e a dupla ligação no C 9 da cadeia de ácido graxo.

De acordo com os resultados obtidos, lipase de *Rhizopus* sp demonstrou esterificar os principais ácidos graxos presentes no meio (16:0, 18:1 e 18:2) sem especificidade pelo tamanho da cadeia carbônica ou número de insaturações. Os níveis de GLA na fração ésteres butílicos e ácidos graxos livres sofreram variações pouco significativas para possibilitar o enriquecimento de GLA na fração de ácidos graxos não esterificadas.

A figura 28 ilustra a cromatografia em camada delgada dos ésteres butílicos e ácidos graxos livres restantes após esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp por lipase de *Rhizopus* sp e lipase de *Geotrichum* sp em diferentes tempos de reação. Pode-se verificar a diminuição gradual dos ácidos graxos livres, enquanto os “spots” correspondentes aos ésteres butílicos vão aumentando com o decorrer do tempo de reação.

O interesse no estudo da esterificação dos AGPI com n-butanol reside no conhecimento da especificidade das enzimas uma vez que os estudos fisiológicos sobre o metabolismo dos AGPI de várias fontes tem demonstrado que os acilgliceróis são mais facilmente absorvidos que os ésteres etílicos, butílicos ou de outros alcóois primários (EL BOUSTANI *et al.*, 1987).

Tabela 14 - Composição em ácidos graxos (%) das frações de ésteres butílicos e ácidos graxos não esterificados após 16 horas de reação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com n-butanol por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Lipases	Componentes	%	Composição em ácidos graxos (%)						
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 γ
Sem hidrólise	Ácidos graxos	100	0,8	20,2	0,9	6,3	37,6	22,8	10,9
<i>Geotrichum</i> sp	Ésteres butílicos	68,4	1,0	21,1	1,2	3,1	40,0	30,4	3,2
	Ácidos graxos	31,6	1,8	19,1	1,0	7,4	36,2	17,0	17,3
<i>Rhizopus</i> sp	Ésteres butílicos	60,0	0,7	22,8	1,4	5,1	38,2	21,3	10,4
	Ácidos graxos	40,0	1,8	19,2	4,2	6,2	35,7	20,8	12,1

Condições da reação de esterificação descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.



PLACA 1: Lipase de *Geotrichum* sp

PLACA 2: Lipase de *Rhizopus* sp

1 - Tempo zero de reação

3 - 8 horas de reação

5 - 20 horas de reação

2 - 2 horas de reação

4 - 16 horas de reação

6 - 40 horas de reação

Figura 28 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com n-butanol por ação de lipase de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp em diferentes tempos de reação. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

A figura 29 ilustra a variação da porcentagem de GLA presente na fração de ácidos graxos não esterificados e nos ésteres butílicos do óleo de *Mucor* sp após diferentes tempos de reação catalisada pela lipase de *Geotrichum* sp. O nível de GLA na fração não esterificada ao butanol aumentou de 10,4% no tempo zero da esterificação para 29,5% depois de 40 horas de reação. O GLA foi aumentado em 2,8 vezes em relação ao valor presente no tempo zero da esterificação.

A figura 30 ilustra o perfil dos cromatogramas da composição em ácidos graxos (% relativa/ácidos graxos totais) obtidos por CG da fração não esterificada dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp após a reação de esterificação com n-butanol em diferentes tempos de reação catalisada por lipase de *Geotrichum* sp.

Os resultados obtidos com a lipase de *Geotrichum* sp estão de acordo com os relatos da literatura. Esta enzima tem se mostrado capaz de discriminar fortemente o GLA de uma mistura de ácidos graxos, esterificando preferencialmente os outros ácidos graxos presentes. Esta propriedade tem sido usada para o enriquecimento do GLA na fração de ácidos graxos não esterificados ao n-butanol (SYED RAHMATULLAH *et al.*, 1994; FOGLIA & SONNET, 1995).

Lipase de *Geotrichum candidum* foi utilizada por FOGLIA & SONNET (1995) para o enriquecimento de GLA na fração de ácidos graxos não esterificados. A porcentagem inicial de GLA de 24,9% dos ácidos graxos totais subiu para 71,8% na fração de ácidos graxos não esterificados após 48 horas de reação dos ácidos graxos obtidos do óleo de borragem com n-butanol.

A esterificação de diferentes ácidos graxos saturados e insaturados com n-butanol catalisada por lipase de *Geotrichum candidum* demonstrou que esta lipase foi capaz de esterificar os ácidos oleico (δ -9), linoleico (δ -9,12) e linolênico (δ -9,12,15), enquanto os ácidos petroselênico (δ -6) e γ -linolênico (δ -6,9,12) mostraram uma taxa da esterificação nula. (SONNET *et al.*, 1993)..

Lipases imobilizadas *Mucor miehei* (Lipozyme) tem demonstrado ser eficiente na reação de esterificação resultando porcentagens altss de GLA na fração de ácidos graxos não esterificados. Os níveis de GLA se tornaram 4,5 vezes maior em relação ao valor presente no tempo zero da esterificação após 90 minutos de reação dos ácidos graxos do óleo de borragem com n-butanol catalisada pela lipase de Lipozyme (SYED RAHMATULLAH *et al.*, 1994). Esta propriedade de discriminar o GLA durante a esterificação de ácidos graxos com n-butanol em meio com solvente orgânico tem sido útil para obter frações enriquecidas de GLA, originado de diferentes óleos vegetais (HILLS *et al.*, 1990).

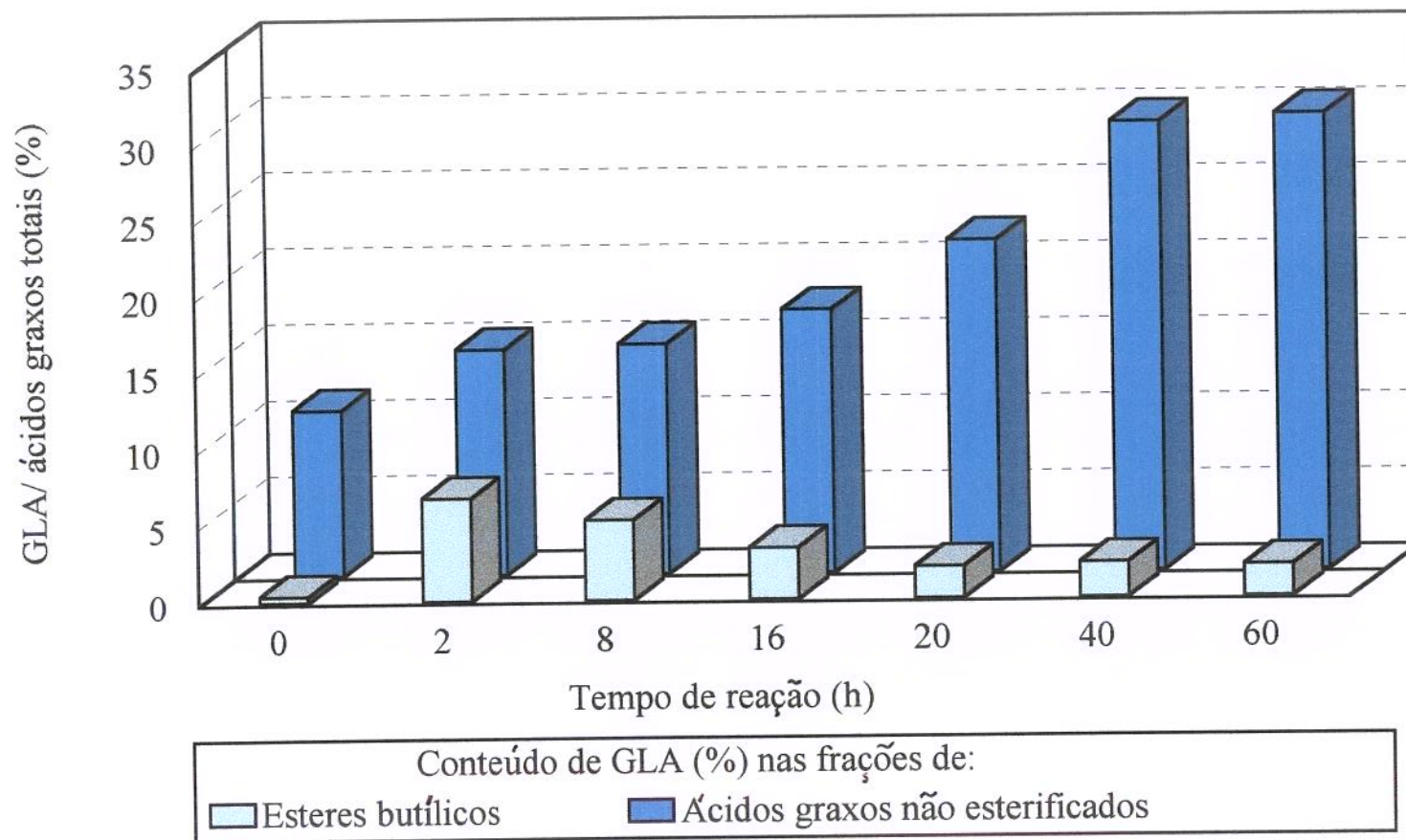


Figura 29 - Conteúdo de GLA (%) nas frações de ésteres butílicos e ácidos graxos não esterificados do óleo de *Mucor* sp catalisada pela lipase de *Geotrichum* sp em diferentes tempos de reação.
Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 5.

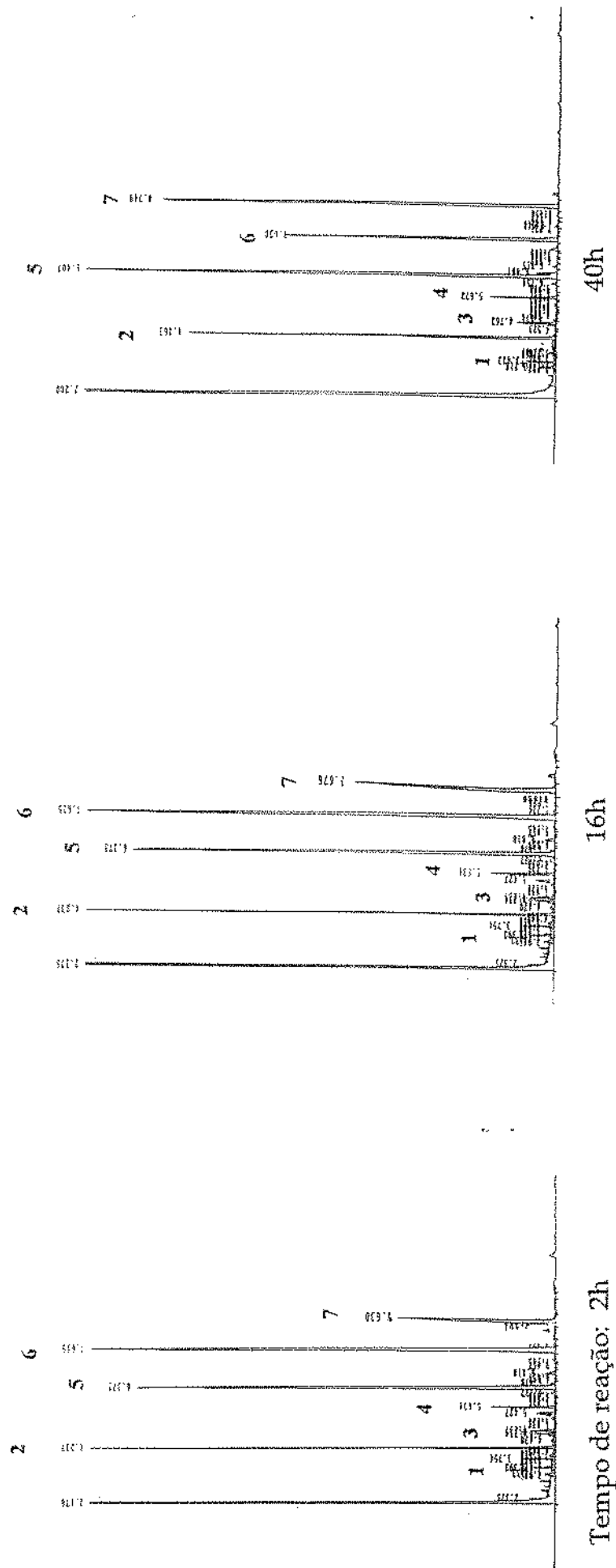


Figura 30 - Cromatograma da composição em ácidos graxos (%) da fração não esterificada dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp após a reação de esterificação com n-butanol, catalisada por lipase de *Geotrichum* sp, em diferentes tempos de reação. Onde, 1 - Ácido mirístico (14:0), 2 - Ácido palmítico (16:0), 3 - Ácido palmítico (16:1), 4 - Ácido esteárico (18:0), 5 - Ácido oleico (18:1), 6 - Ácido linoleico (18:2), 7 - Ácido γ -linolênico(18:3 γ). Condições da reação de esterificação descritas no texto. Condições cromatográficas descritas no item 3.2.3.5.

4.2.3.2. Reação de esterificação com o glicerol catalisada por lipases microbianas

4.2.3.2.1. Efeito do tempo de reação na atividade de esterificação

O sistema para a reação da esterificação foi preparado conforme descrito no item 3.2.5.2. As figuras 31 e 32 ilustram os resultados obtidos na esterificação dos ácidos graxos livres com glicerol em função do tempo de reação catalisada pelas lipases microbianas testadas.

As lipases testadas não se mostraram eficientes para catalisar a esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e do óleo de sardinha com o glicerol nas condições utilizadas neste trabalho.

A esterificação dos ácidos graxos livres do óleo de *Mucor* sp com glicerol catalisada pelas lipases microbianas em função do tempo de reação ocorreu conforme demonstra a Figura 35. A lipase de *Geotrichum* sp resultou o máximo de 30% da esterificação após 20 horas de reação. A esterificação decresceu na seguinte ordem: *Geotrichum* sp > *Rhizopus* sp $\approx$ *Aspergillus* sp > *Candida cylindracea* > *Alcaligenes* sp.

A esterificação dos ácidos graxos livres obtidos do óleo de sardinha com glicerol catalisadas pelas lipases microbianas em função do tempo de reação ocorreu conforme demonstra a Figura 36. As lipases microbianas testadas mostraram baixas taxas da esterificação.

As lipases de *Rhizopus* sp e *Candida cylindracea* demonstraram alta ação hidrolítica para ambos os substratos como descrito anteriormente. Este dado pode ser a razão porque estas enzimas apresentaram fraca ação da esterificação para os substratos testados.

Alguns autores tem demonstrado que o grau da esterificação catalisado por lipases 1,3-específicas é maior que o catalisado por lipases inespecíficas. OKUMURA *et al.*, (1981) relataram que a lipase de *Rhizopus delemar* demonstrou ação mais forte da esterificação durante a hidrólise de trioleína e no entanto a lipase não hidrolisa a ligação éster na posição 2 do acilglicerol. A lipase de *Geotrichum candidum* apresentou a mais fraca ação da esterificação dentre as quatro lipases estudadas, demonstrando hidrolisar a ligações éster em todas as posições do acilglicerol.

Em contrapartida, LI ZU-YI & WARD (1993b), afirmaram que não existe nenhuma relação entre especificidade da enzima e sua capacidade de catalisar reações da esterificação. Lipases de *Pseudomonas* (não específica) e *Mucor miehei* (1,3-específica) mostraram altamente capazes de incorporar ácidos graxos na molécula de glicerol em meio contendo hexano, obtendo 87,6 e 85,5% da esterificação, respectivamente.

AKOH *et al.* (1992), demonstraram que lipase de *Penicillium* sp foi capaz de esterificar glicerol com ácido graxo de cadeia longa, resultando MAG enriquecidos com AGPI. A esterificação realizada à 40°C por 24 horas resultou 86,3% e 64,3% de incorporação de 18:1 *n*-9 e 20:5 *n*-3, respectivamente quando catalisada pela lipase de *Penicillium* sp.

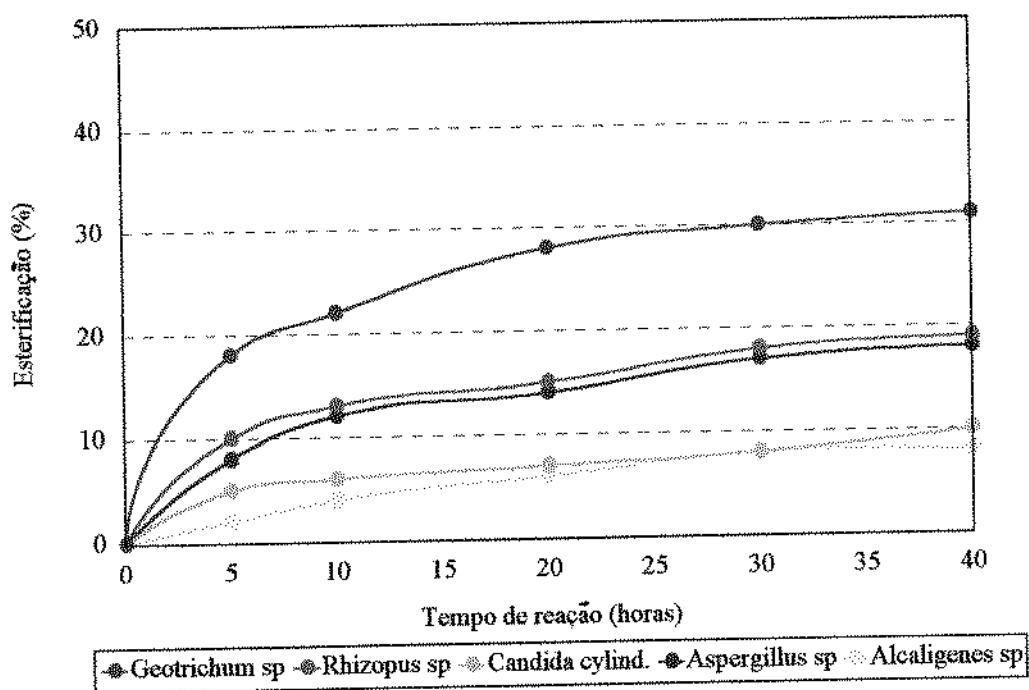


Figura 31 - Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com glicerol catalisada por lipases microbianas.

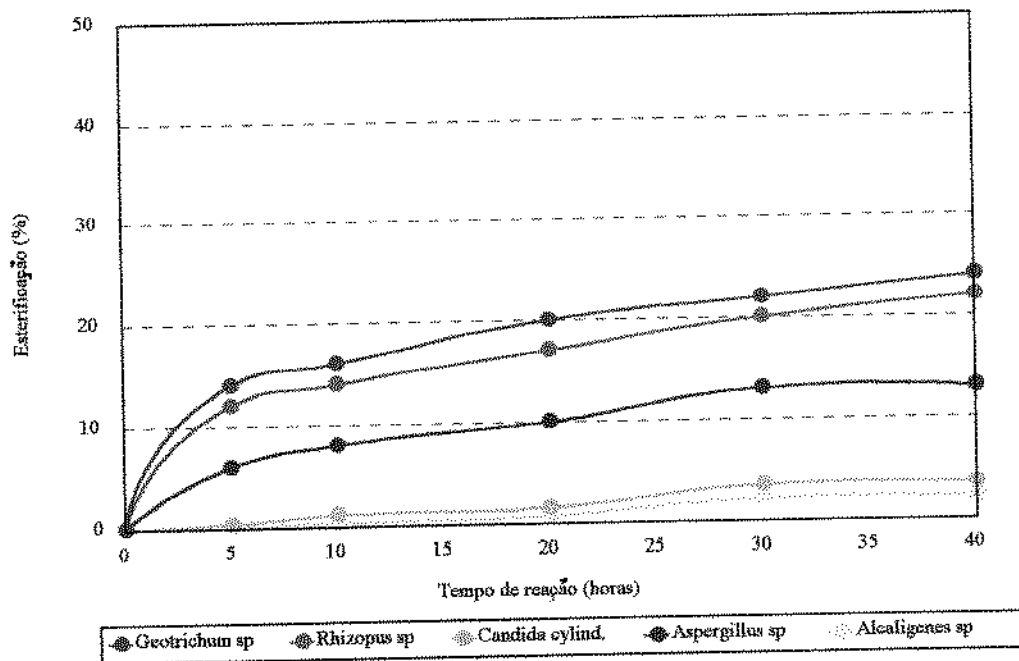


Figura 32 - Efeito do tempo de reação na esterificação (%) dos ácidos graxos do óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases microbianas.

4.2.3.2.2. Efeito do tipo de solvente na atividade de esterificação

O sistema para a reação da esterificação foi preparado conforme descrito no item 3.2.5.2. A tabela 15 permite a comparação dos resultados da esterificação dos ácidos graxos dos óleos de *Mucor* sp e óleo de sardinha com glicerol catalisado por lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp em sistema de reação contendo diferentes solventes.

A afinidade e a especificidade da enzima pelo substrato podem ser significativamente alterada em função do tipo de solvente escolhido.

Os resultados demonstram que a síntese de acilgliceróis por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp foi mais eficiente em presença dos solventes isoctano, hexano e heptano. Os solventes mais polares, tais como benzeno e acetona demonstraram interferir negativamente na síntese de ésteres. A lipase de *Rhizopus* sp mostrou maior redução de sua atividade de esterificação em presença dos solventes benzeno e acetona comparada com a lipase de *Geotrichum* sp.

As condições de reação da esterificação utilizadas por muitos autores, adotam na maioria das vezes o solvente hexano em associação com água. A presença do solvente orgânico permite a solubilização dos compostos lipofílicos do meio facilitando sua miscibilidade em água a qual deverá também estar presente para solubilizar a enzima que atuará na interface óleo/água (BROCKMAN *et al.*, 1988).

Tabela 15 - Efeito de diferentes solventes orgânicos na esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Solvente	ESTERIFICAÇÃO (%)			
	ÓLEO DE <i>Mucor</i> sp		ÓLEO DE SARDINHA	
	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp
Hexano	28,2	15,1	20,0	16,9
Heptano	27,4	16,4	20,4	16,7
Isooctano	29,5	18,7	21,3	18,1
Benzeno	12,3	10,9	12,4	8,3
Acetona	9,8	4,8	13,3	4,2

Sistema de reação preparado com 0,4g de ácidos graxos livres, 2g de glicerol, 150µl de água, 5000U de lipase e 3mL dos solventes testados. Os frascos erlenmeyer contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados à 30°C por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto.

4.2.3.2.3. Efeito da proporção molar entre ácidos graxos e glicerol na atividade de esterificação

O sistema para a reação da esterificação foi preparado conforme descrito no item 3.2.5.2. A concentração de ácidos graxos no sistema de reação foi mantida constante (0,4g), enquanto a de glicerol variou de 0,5 à 5,0g.

Os resultados expressos na tabela 16 demonstram que a síntese de acilgliceróis por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp em ambos os substratos aumentou de acordo com o aumento do conteúdo de glicerol. As lipases microbianas testadas demonstraram esterificar com o conteúdo ótimo de glicerol na faixa de 2,0 à 5,0g. Os dados indicam que quanto menor a concentração de ácidos graxos em relação a concentração de glicerol maior será o grau da esterificação enzimática.

A relação de 1,2 mmoles de ácidos graxos (0,4g) e 43 mmoles de glicerol (4,0g) resultou alto grau da esterificação (39,4%) entre os ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e glicerol catalisada pela lipase de *Geotrichum* sp, portanto esta relação será mantida nos próximos experimentos.

LI ZU-YI & WARD (1993b) analisaram o efeito do conteúdo de glicerol na esterificação de ácidos graxos do óleo de fígado de bacalhau com glicerol catalisada por lipases microbianas. As lipases obtidas de *Pseudomonas* sp e *Mucor miehei* resultaram níveis máximos de 82 e 87% da esterificação, respectivamente no sistema de reação contendo 0,4g de ácidos graxos e 1,0g de glicerol.

Tabela 16 - Efeito de diferentes proporções de glicerol : ácidos graxos na esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp

Glicerol (g)	Relação molar AG:Glicerol (mmoles)	ESTERIFICAÇÃO (%)			
		ÓLEO DE <i>Mucor</i> sp		ÓLEO DE SARDINHA	
		Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp
0,5	1,2 : 5	10,7	8,4	8,2	6,4
1,0	1,2 : 10	14,9	12,3	13,6	12,3
2,0	1,2 : 22	28,2	15,1	20,0	16,9
3,0	1,2 : 33	31,4	14,8	19,3	17,4
4,0	1,2 : 43	39,4	15,8	19,8	19,4
5,0	1,2 : 54	33,6	14,2	20,9	20,3

Sistema de reação preparado com 0,4g de ácidos graxos livres, quantidades variáveis de glicerol, 150µl de água, 5000U de lipase e 3mL hexano. Os frascos erlenmeyer contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados à 30°C por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto.

4.2.3.2.4. Efeito da temperatura de reação na atividade de esterificação

O sistema para a reação da esterificação foi preparado conforme descrito no item 3.2.5.2. A tabela 17 permite a comparação dos resultados da esterificação dos ácidos graxos dos óleos de *Mucor* sp e óleo de sardinha com glicerol catalisado por lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp em diferentes temperaturas de reação.

A temperatura ótima para a reação de síntese de acilgliceróis catalisada por lipase de *Rhizopus* sp nas condições testadas no experimento foi de 30°C. A lipase de *Geotrichum* sp demonstrou atividade máxima da esterificação na faixa de temperatura de 30-40°C. As preparações brutas das enzimas testadas perderam significativamente sua atividade em temperaturas abaixo de 30°C e acima de 40°C.

Os resultados indicam que as enzimas apresentam atividade de esterificação ótima na mesma faixa de temperatura de outras lipases fúngicas descritas por TSUJISAKA *et al.* (1977).

Tabela 17 - Efeito da temperatura de incubação na esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e óleo de sardinha com glicerol catalisada por lipases de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Temperatura (°C)	ESTERIFICAÇÃO (%)			
	ÓLEO DE <i>Mucor</i> sp		ÓLEO DE SARDINHA	
	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp
20	17,2	10,4	16,3	15,4
30	39,4	15,8	19,3	19,4
40	37,1	11,4	18,3	16,2
50	26,4	10,3	16,7	11,9
60	18,6	7,4	13,4	7,9

Sistema de reação preparado com 0,4g de ácidos graxos livres, 4,0g de glicerol, 150µl de água, 5000U de lipase e 3mL de hexano. Os frascos erlenmeyer contendo a mistura foram colocados em atmosfera de N₂ e incubados em temperaturaa variadas por 20 horas com agitação constante de 130 oscilações por minuto.

4.2.3.2.5. Análise dos produtos da reação da esterificação catalisada por lipases microbianas

As frações esterificadas e não esterificadas foram quantificadas por CCD-DIC (item 3.2.3.7.), separadas por CCD- preparativa (item 3.2.3.9.) e analisados quanto a composição em ácidos graxos por CG (item 3.2.3.5.).

A composição em ácidos graxos das frações esterificadas (acilgliceróis) e dos ácidos graxos não esterificados após 20 horas de reação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com glicerol por lipase de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp estão demonstrados na tabela 18.

A lipase de *Geotrichum* sp se mostrou mais eficiente na esterificação, resultando em quantidades significativas de DAG (8,9%) e MAG (11,2%). Entretanto, o GLA foi encontrado em baixas quantidades nestas frações, permanecendo na fração não esterificada

A lipase de *Rhizopus* sp resultou em 5,6% de DAG e 4,3% de MAG e insignificante quantidade de TAG. Níveis baixos de GLA foram encontrados nas frações de acilgliceróis para possibilitar o seu enriquecimento.

LINFIELD *et al.* (1984) estudando a esterificação enzimática de ácidos graxos com glicerol usando lipase de *Aspergillus niger* e *Candida rugosa*, verificaram que a reação era muito lenta e somente após 6 semanas de reação níveis significativos da esterificação foram obtidos (acima de 50%).

Na obtenção de acilgliceróis contendo ácidos graxos de interesse nutricional por esterificação enzimática tem merecido destaque as reações catalisadas por *Mucor miehei* imobilizada (LANGHOLZ, *et al.*, 1989; LIE & MOLIN, 1992; LI ZU-YI & WARD, 1993). A produção de 80% de monoacilgliceróis contendo 76,2% de ácidos graxos poliinsaturados do óleo de fígado de bacalhau (43,3% de EPA e 32,7% de DHA) foi obtida de uma mistura de reação contendo 6.000U de enzima. (LI ZU-YI & WARD, 1994).

Lipase de *Chromobacterium viscosum* também tem sido relatada por sua eficiência na catálise das reações da esterificação, obtendo níveis que variam de 80 à 90% de incorporação dos ácidos graxos na molécula de glicerol (OSADA *et al.*, 1990; LIE & MOLIN, 1992).

As figuras 33 e 34 ilustram os resultados da cromatografia em camada delgada demonstrando os produtos da esterificação enzimática dos ácidos graxos livres obtidos do óleo de *Mucor* sp com glicerol após ação das lipases de *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp.

Os níveis de ácidos graxos livres vão gradativamente decrescendo, enquanto os acilgliceróis aumentam com o decorrer da esterificação. Foram detectados a presença de DAG e MAG após 20 horas de reação.

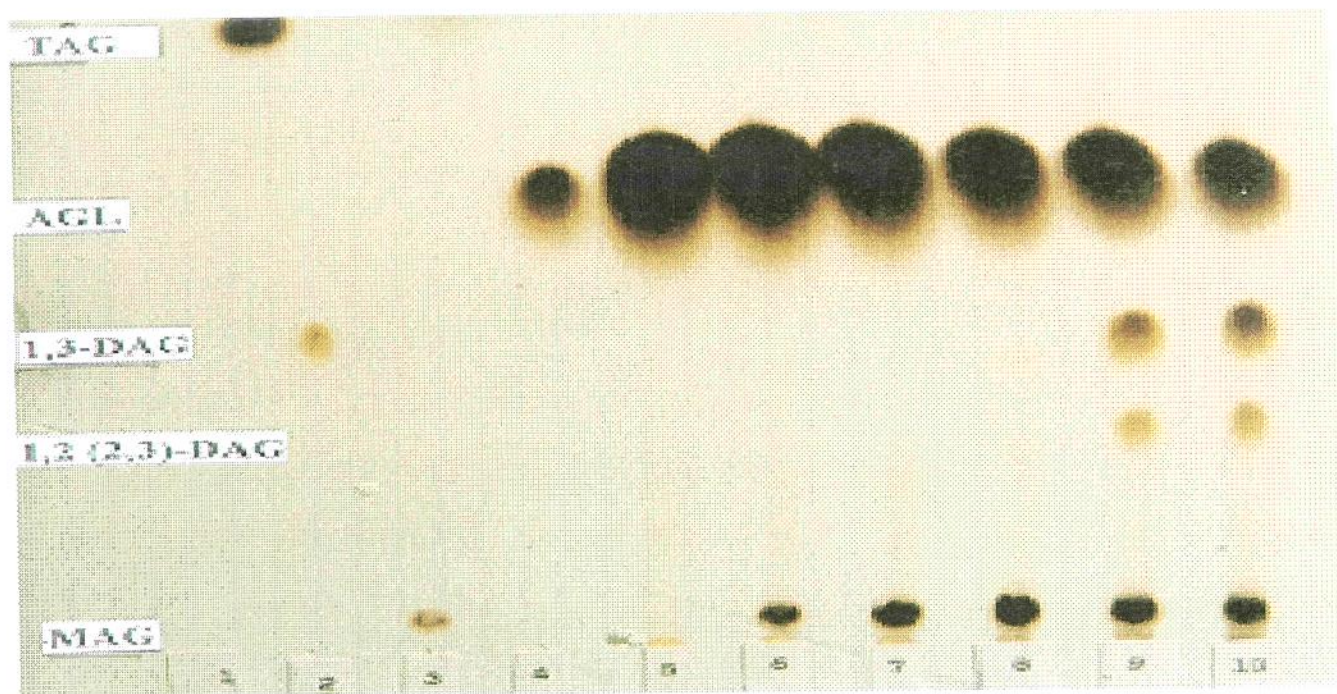
TSUJISAKA *et al.* (1977) analisaram os produtos de reação após síntese do glicerol com ácido oleico catalisadas por quatro lipases microbianas. Os produtos 1(3)-monoleína, 1,3-dioleína foram obtidos para as enzimas de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*. Por outro lado, 1(3) e 2-monoleína, 1,2(2,3) e 1,3-dioleína e trioleína foram detectados como produtos de síntese da ação de lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*.

Tabela 18 - Composição em ácidos graxos (%) das frações esterificadas e não esterificadas após 20 horas de reação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com glicerol catalisada por lipase de *Rhizopus* sp e *Geotrichum* sp.

Fração de acilgliceróis	%	Composição em ácidos graxos (%)						
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 γ
Ácidos graxos		0,8	20,2	0,9	6,3	37,6	22,8	10,9
Lipase de <i>Geotrichum</i> sp								
Triacilglicerol	3,4	1,1	21,5	0,3	5,6	32,8	33,5	5,2
Diacilglicerol (1,2 (2,3))	* 8,9	1,1	17,1	1,9	4,7	29,1	42,2	2,8
Diacilglicerol (1,3)		1,1	22,6	1,3	3,8	25,6	43,0	2,6
Monoacilglicerol	11,2	0,8	15,2	1,5	4,6	28,6	43,3	5,4
AG não esterificados	77,4	7,1	29,5	0,3	8,9	21,8	18,6	13,7
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp								
Triacilglicerol	1,5	0,6	32,7	0,3	7,6	34,0	18,0	2,7
Diacilglicerol (1,2 (2,3))	* 5,6	0,3	37,2	1,7	8,9	35,9	11,4	4,5
Diacilglicerol (1,3)		0,4	39,6	1,2	8,7	34,8	13,9	1,4
Monoacilglicerol	4,3	1,5	40,1	1,5	10,0	33,7	9,7	3,5
AG não esterificados	88,6	1,5	13,6	1,5	4,5	40,6	23,1	14,9

* Corresponde à soma total dos diacilgliceróis (1,2 (2,3)) e (1,3) quantificados em CCC-DIC. Condições cromatográficas descritas nos item 3. 2. 3. 5. e 3. 2. 3.

7.



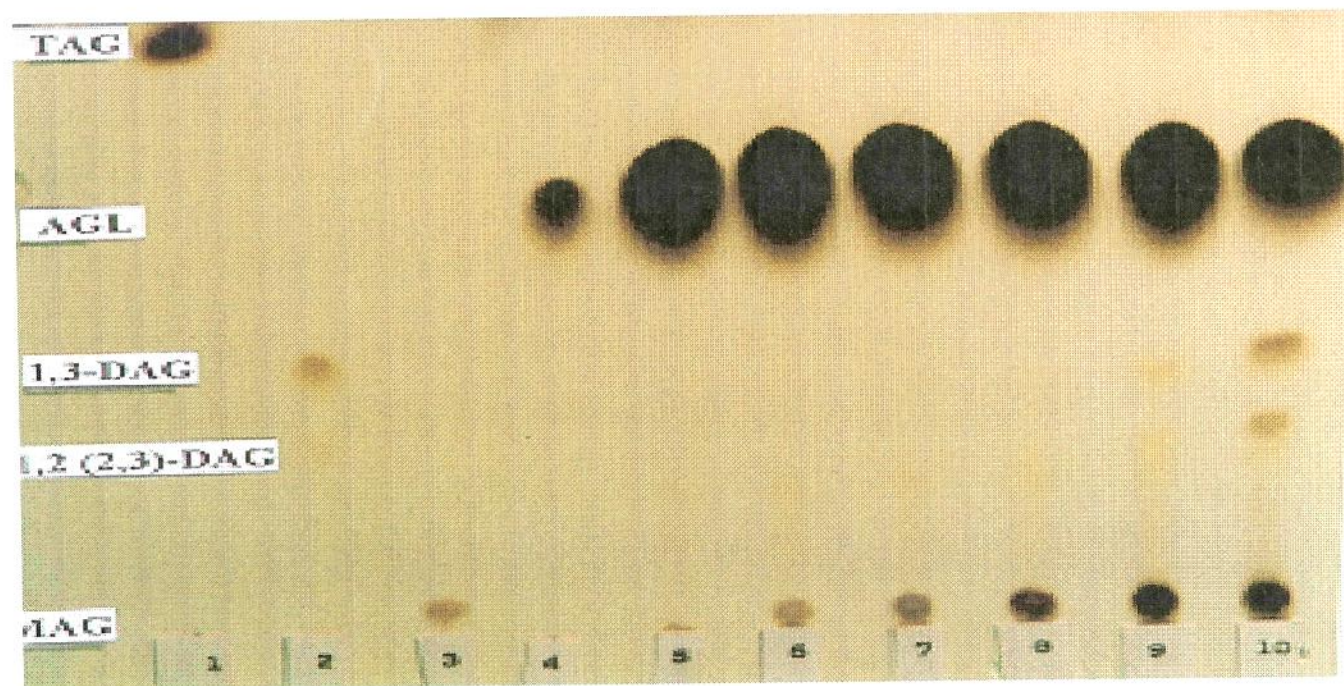
PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioleína e 1,2 (2,3) - Dioleína
- 3 - Monoleína
- 4 - Acido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - Tempo zero de reação
- 6 - 5 horas de reação
- 7 - 10 horas de reação
- 8 - 15 horas de reação
- 9 - 20 horas de reação
- 10 - 40 horas de reação

Figura 33 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com glicerol por ação de lipase de *Geotrichum* sp. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.



PADRÕES:

- 1 - Trioleína
- 2 - 1,3 - Dioleína e 1,2 (2,3) - Dioleína
- 3 - Monoleína
- 4 - Acido oleico livre

AMOSTRAS:

- 5 - Tempo zero de reação
- 6 - 5 horas de reação
- 7 - 10 horas de reação
- 8 - 15 horas de reação
- 9 - 20 horas de reação
- 10 - 40 horas de reação

Figura 34 - Cromatografia em camada delgada dos produtos da esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com glicerol por ação de lipase de *Rhizopus* sp. Condições cromatográficas descritas no item 3. 2. 3. 9.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos com este trabalho pode-se concluir que:

1. As reações de hidrólise e de esterificação catalisadas por lipases microbianas, foram capazes de produzir modificações favoráveis na composição em ácidos graxos dos substratos analisados, mostrando-se promissoras no enriquecimentos de AGPI, fato de grande interesse quanto ao valor nutricional.
2. As enzimas apresentaram características peculiares, não demonstrando o mesmo padrão de comportamento frente a cada substrato analisado. Foi comprovado pela análise dos produtos das reações que as lipases selecionadas para o estudo, obtidas de *Rhizopus* sp e a lipase comercial de *Candida cylindracea* foram eficientes em catalisar as reações hidrolíticas, em contrapartida, a lipase de *Geotrichum* sp foi eficiente na reação de esterificação.
3. Depois de estabelecidas as melhores condições para as reações de hidrólise, a lipase de *Rhizopus* sp, lipase específica para as posições sn 1,3, mostrou a mais eficiente no enriquecimento de GLA na fração acilglicerol do óleo de *Mucor* sp (55%), enquanto a lipase comercial de *Candida cylindracea*, inespecífica posicionalmente mostrou-se a mais eficiente no enriquecimento de DHA na fração acilglicerol do óleo de sardinha (120%).
4. As reações de hidrólise catalisadas por lipases obtidas de *Rhizopus* sp e *Candida cylindracea* originaram acilgliceróis com altos níveis de AGPI, os quais foram encontrados como principais componentes da fração 1,2(2,3)-DAG. Os ácidos saturados e monoinsaturados foram preferencialmente hidrolisados, resultando aumento de seus níveis na fração de ácidos graxos liberados após a reação hidrolítica.

5. A lipase de *Geotrichum candidum* demonstrou claramente a sua preferência na hidrólise dos ácidos palmitoleico, oléico e linoléico independente de sua posição no TAG. Entretanto, não mostrou eficiente em enriquecer os AGPI na fração acilglicerol após reação de hidrólise dos substratos analisados.
6. A reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp com o butanol catalisada por lipase de *Geotrichum* sp resultou em alto conteúdo de GLA na fração de ácidos graxos não esterificados. Este fato ocorreu devido a esterificação preferencial dos ácidos graxos de cadeia longa contendo a primeira dupla ligação cis na posição 9 (16:1 Δ^9 , 18:1 Δ^9 e 18:2 $\Delta^{9,12}$) e a discriminação em relação ao GLA (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) após atuação desta enzima.
7. Não foram obtidos resultados significativas na reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo de *Mucor* sp e sardinha com o glicerol frente às diferentes condições de reação analisadas. A esterificação resultou níveis altos de DAG (8,9%) e MAG (11,2%) com a lipase de *Geotrichum* sp entretanto pequenas quantidades de GLA foram encontradas nestas frações.
8. Os resultados apresentados neste trabalho indicam diferentes reatividades de cada lipase frente aos substratos analisados, demonstrando que a reação de hidrólise, melhor que a esterificação, poderia ser o método enzimático de escolha para enriquecimento de AGPI nos acilgliceróis resultantes.
9. Os fatores como especificidade da lipase para o substrato (especificidade posicional ou de ácidos graxos), estabilidade da ligação éster que envolve os AGPI e capacidade de hidrólise e taxa em relação à reação reversa (esterificação) determinaram a resistência à hidrólise, resultando acilgliceróis em que os níveis de AGPI foram aumentados.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBEY, M.; CLIFTON, P. M.; McMURCHIE, E. J.; NESTEL, P. J. Effect of high fat/cholesterol diet with or without eicosapentaenoic acid on plasma lipids, lipoproteins and lipid transfer protein activity in the marmoset. *Atherosclerosis*, v.81, p.163-174, 1990.
2. ABU-NASR, A. M.; POTTS, W. M. ; HOLMAN, R. T. Highly unsaturated fatty acids. II Fractionation by urea inclusion compounds. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.31, n.1, p.16-20, 1954.
3. ACKMAN, R. G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.22, p.907-922, 1967.
4. ACKMAN, R. G.; RATNAYAKE, W. M. N.; OLSSON, B. The "basic" fatty acid composition of Atlantic fish oils: Potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.65, n.1, p.136-138, 1988.
5. ADACHI, S.; OKUMURA, K.; OTA, Y. ; MANKURA, M. Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides. *Journal of fermentation and Bioengineering*, v.75, n.4, p.259-263, 1993.
6. AKOH, C. C.; JENNINGS, B. H.; LILLARD, D. A. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.73, n.8, p.1059-1062, 1996.
7. ALFORD, J. A. ; PIERCE, D. A. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *Journal of Food Science*, v.26, p.512-523, 1961.
8. ANDO, S.; YOSHIDA, A.; HATANO, M. Occurrence of marine bacterial lipase hydrolyzing fish oil. *Agriculture and Biological Chemistry*, v.55, n.10, p.2657-2659, 1991.

9. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4ed. Champaign, 1993, v2.
10. ANONIMOUS. World fats, oils disappearance should continue to rise. *Inform*, v.8, p.902-906, 1993.
11. ARAI, M; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. Selective separation of γ -linolenic acid ethyl ester using Y-zeolite. *Journal of Fermentation Technology*, v.65, n.5, p.569-574, 1987.
12. ASAHARA, T.; MATORI, M.; IKEMOTO, M.; OTA, Y. Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum* sp FO401B. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.57, n.3, p 390-394, 1993.
13. BADOLATO, E. S. G.; CARVALHO, J. B.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.51, n.1/2, p.75-81, 1991.
14. BAGGA, D.; CAPONE, S.; WANG, H. J.; HEBER, D.; LILL, M.; CHAP, L; GLASPY, J. A. Dietary modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acid ratios in patients with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v.89, n.15, p.1123-1131, 1997.
15. BAILEY, M. J. Eicosanoids and aspirin in immune cell function. *Bioessays*, v.6, n.3, p.60-68, 1985.
16. BANG, H. O.; DYEBERG, J. Letter to the editor. *The New England Journal of Medicine*, v.313, p.822-823, 1985.
17. BARLOW, S. Beneficial medical effects of fish oils. *Infofish Mark. Dig.* v.1, p.38 - 40, 1987.
18. BENZONANA, G. Some properties of exocellular lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Lipids*, v.9, n.3, p.166-172, 1974.

19. BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
20. BORDET, J. C.; GUICHARDANT, M.; LAGARDE, M. Arachidonic acid strongly stimulates prostglandin I₃ (PGI₃) production from eicosapentaenoic acid in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v.135, p.403-410, 1986.
21. BOTTINO, N. R.; VANDENBURG, G. A. ; REISER, R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. **Lipids**, v.2, n.6, p.489-493, 1967.
22. BORGSTON. B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. 4^a ed. Amsterdam, Holland:Elsevier, 1984.
23. BROCKERHOFF, H.; HOYLE, H. J. ; WANG, P. C. ; LITCHFIELD, C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. **Lipids**, v.3, n.1, p.24-29, 1969.
24. BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. The biology, biochemistry and technology of lipases. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.65, n.6, p.891-896, 1988.
25. BRONTE-STEWART, B.; ANTONIS, A.; EALES, L.; BROCK, J. F. Effects of feeding different fats on serum-cholesterol level. **Lancet**, v.1, p.521-527, 1956.
26. BURR, G.O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **Journal of Biological Chemistry**, v.82, p.345-367, 1929.
27. CARTER, J.P. Gamma-linolenic acid as a nutrient. Nutritional supplements containing gamma-linolenic acid may safely ameliorate certain health problems. **Food Technology**, v.6, p.72-83, 1988.

28. CARVALHO, P. O. Produção de Ácido Gama Linolênico por nova linhagem de *Mucor* sp e estudo das condições de fermentação. Campinas, 1994. 129p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
29. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
30. CAVE, W. T. Jr. Dietary omega-3 polyunsaturated fats and breast cancer. *Nutrition*, v.12, n.1 Suppl, p.39S-42S, 1996.
31. COREY, E. J.; WRIGHT, S. W. Convenient method for the recovery of eicosapentaenoic acid from cod liver oil. *Journal of Organic Chemistry*, v.53, n.25, p.5980-5981, 1987.
32. COSTA, C. M. Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus* sp. Campinas, 1996. 108p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
33. COSTA, V. S. R. Produção, purificação e caracterização bioquímica de lipase de uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. Campinas, 1997. 90p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
34. CURB, J. D.; REED, D. M. Letter to editor. *The New England Journal of Medicine*, v.313, n.12, p.821, 1985.
35. DREVON, A.C. Marine oils and their effects. *Nutritional Review*, v.50, n.4, p.38-45, 1992.
36. DYEBOERG, J. Linolenato - derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutritional Review*, v.44, n.4, p.125-135, 1986.
37. DYEBOERG, J.; BANG, H. O. Hemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, v.1, p.433-435, 1979.

38. DYEBERG, J.; BANG, H. O; STOFFERSEN, E; MONCADA, S.; VANE, J. R.
Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis.
Lancet, v.2, p.117-119, 1978.
39. DYEBERG, J.; JORGENSEN, K. A. Marine oils and thrombogenesis. **Progress in Lipid Research**, v.21, p.225-269, 1982.
40. EL BOUSTANI, S.; DESCOMPS, B.; MONNIER, L.; WARNANT, J.; MENDY, F.;
PAULET, A.C. In vivo conversion of dihomogamma linolenic acid into
arachidonic acid in man. **Progress in Lipid Research**, v.25, p.67-71, 1986.
41. FISCHER, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in
humans. **Advance of Lipids Research**, v.23, p.169-96, 1989.
42. FITZGERALD, G. A.; PEDERSEN, A. K.; PATRONO, C. Analysis of prostacyclin
and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 67,
p. 1174-1177, 1983.
43. FOGLIA, T. A.; SONNET, P. E. Fatty acid selectivity of lipases: γ -Linolenic acid
from borage oil. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.72, n.4, p.417-
420, 1995.
44. GOLDBERG, M.;THOMAS, D.;LEGOY, M-D. The control of lipase-catalysed
transesterification and esterification reaction rates. **European Journal of
Biochemistry**, v.190, p.603-609, 1990.
45. GUNNLAUGSDOTTIR, H. and BJÖRN, S. Lipase-catalysed alcoholysis of cod
liver oil in supercritical carbon dioxide. **Journal American Oil Chemistry
Society**, v.72, n.4, p.399-405, 1995.
46. GUNSTONE, F.D. Gamma linolenic acid - occurrence and physical chemical
properties. **Progress in Lipid Research**, v.31, n.2, p.145-161, 1992.
47. GURR, M.I. **Role of Fats in Food and Nutrition**. 1^o ed. London: Elsevier applied
Science Publishers Ltd., 1984, 170p.

48. HAAGSMA, N.; GENT, C. M.; LUTEN, J. B.; JONG, R. W.; DOORN, E.
Preparation of an ω 3 fatty acid concentrate from cod liver oil. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.59, n.3, p.117-118, 1982.
49. HAMBERG, M. Transformations of 5,8,11,17-eicosapentaenoic acid in human platelets. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.618, p.389-398, 1980.
50. HARALDSSON, G. G.; HÖSKULDSSON, P. A. The preparation of triglycerides highly enriched with ω -3 polyunsaturated fatty acids via lipase catalyzed interesterification. **Tetrahedron Letters**, v.30, n.13, p.1671-1674, 1989.
51. HAREL, Z.; BIRO, F. M.; KOTTENHAHN, R. K. and ROSENTHAL, S. L.
Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of dysmenorrhea in adolescents. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.174, n.4, p.1335-1338, 1996.
52. HARRIS, W. S. Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: critical review. **Journal of Lipid Research**, v.30, p.785-807, 1989.
53. HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E.; ALAM, N.; ILLINGWORTH, D. R. Reductions of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v.29, p.1451-1460, 1988.
54. HARVEI, S.; BJERVE, K. S.; TRETLLI, S.; JELLUM, E.; ROBSAHM, T. E. ; VATTEN, L. Prediagnostic level of fatty acids in serum phospholipids: omega-3 and omega-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v.71, n.4, p.545-551, 1997.
55. HASSANIEN, F. R.; MUKHERJEE, K. D. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.63, n.7, p.893-897, 1986.
56. HIDAJAT, K.; CHING, C. B.; RAO, M. S. Preparative-scale liquid chromatographic separation of ω -3 fatty acids from fish oil sources. **Journal of Chromatography A**, v.702, p.215-221, 1995.

57. HILLS, M. J. Dietary fat and human cancer. *Proceedings of Nutrition Society*, v.40, p.15-19, 1981.
58. HILLS, M. J., KIEWITT, I.; MURHERJEE, K. D. Enzymatic fractionation of evening primrose oil by rape lipase: enrichment of gamma-linolenic acid. *Biotechnology Letters*, II v.9, p.629-632, 1989.
59. HILLS, M. J., KIEWITT, I.; MURHERJEE, K. D. Enzymatic fractionation of fatty acids: enrichment of γ -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.67, n.9, p.561-564, 1990.
60. HORROBIN, D.F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, v.31, n.2, p.163-194, 1992.
61. HORROBIN, D.F.; HUANG, Y. S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*, v.17, p.241-255, 1987.
62. HORROBIN, D.F.; MANKU, M. S. How do polyunsaturated fatty acids lower plasma cholesterol levels ? *Lipids*, v.18, n.8, p.558-562, 1983.
63. HOSHINO, T., YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids. *Agriculture Biological and Chemistry*, v.54, n.6, p.1459-1467, 1990.
64. HOSHINO, T.; SASAKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, T.; YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.56, n.4, p.660-664, 1992.
65. HUANG, A. H. C.; LIN, Y-H. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in mayze and other plant species. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.65, n.6, p.897-899, 1988.

66. HUANG, K-H.; AKOH, C. C. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acid into vegetable oils. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.71, n.11, p.1277-1280, 1994.
67. HUANG, Y. S.; MANKU, M. S.; HORROBIN, D. F. The effects of dietary cholesterol on blood and liver polyunsaturated fatty acid and on plasma cholesterol in rats fed various types fatty acid diet. **Lipid**, v.19, n.9, p.664-672, 1984.
68. HWANG, D. H.; CHANMUGAM, P. S.; RYAN, D. H.; BOUDREAU, M. D.; WINDHAUSER, M. M.; TULLEY, R. T.; BROOKS, E. R.; BRAY, G. A. Does vegetable oil attenuate the beneficial effects of fish oil in reducing risk factors for cardiovascular disease? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, n.1, p.89-96, 1997.
69. ILLINGWORTH, D. R.; HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E. Inhibition of low density lipoprotein synthesis by dietary n-3 fatty acids in man. **Atherosclerosis**, v.4, p.270-275, 1984
70. JENSEN, R. G.; SAMPUGNA, J.; QUINN, J. G.; CARPENTER, D. L.; MARKS, T. A. Specificity of a lipase from *Geotrichum candidum* for cis-octadecenoic acid. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.42, n.2, p.1029-1032, 1965.
71. JENSEN, R. G. Symposium: Microbial lipolytic enzymes. Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*: a review. **Lipids**, v.9, n.3, p.149-157, 1974.
72. KANG, J. X.; LEAF, A. The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, v.31, Suppl, p.41S-44S, 1996.
73. KANG, H. S.; SHIN, H. D. Influence of medium composition on the production of γ -linolenic acid by *Mucor* sp KCTC 8405P. **Korean Journal Applied Microbiology and Bioengineering**, v.17, n.6, p.568-573, 1989.
74. KATES, M. General analytical procedures. Work, T. S. ; Work, E. **Techniques in Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids**. London: North Holland Publishing Company, 1972. 363p.

75. KEEN, H.; PAYAN, J.; ALLAWI, J.; WALKER, J.; JAMAL, G.A.; WEIR, A.I.; HENDERSON, L.M.; BISSESSAR, E.A.; WATKINS, P.J.; SAMPSON, M.; GALE, E.A.M.; SCARPELLO, J.; BODDIE, H.G.; HARDY, K.J.; THOMAS, P.K.; MISRA, P.; HALONEN, J.P. Treatment of diabetic neuropathy with γ -Linolenic acid. **Diabetes Care** v.16, n.1, p.8-15, 1993.
76. KEYS, A.; ANDRESON, J. T.; GRANDE, F. "Essencial" fatty acids, degree of unsaturation, and effect of corn (maize) oil on the serum-cholesterol level in man. **Lancet**, v.1, p.66-68, 1957
77. KINSELLA, J.E. α -Linolenic acid: Function and effects on linoleic acid metabolism and eicosanoid - mediated reactions. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.35, p.1-184, 1991.
78. KLOR, H. U.; HAUENSCHILD, A.; HOLBACH, I.; SCHNELL-KRETSCHMER, H.; STROH, S. Nutritional and cardiovascular disease. **European Journal of Medical Research**, v.2, n.6, p.243-257, 1997.
79. KNAPP, H. R.; FITZGERALD, G. A. Dietary polyunsaturated, blood pressure and vasodilator prostanoid. **Clinical Research**, v.36, p.357-358, 1988.
80. KOSUGI, Y.; AZUMA, N. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.71, n.12, p.1397-1403, 1994.
81. KREMER, J. M.; JUBIZ, W.; MICHAŁEK, A. Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. **Annals of Internal Medicine**, v.106, p.497-503, 1987.
82. KRIS-ETHERTON, P.M.; KRUMMEL, D.; RUSSEL, M. E.; DREON, D.; MACKEY, S.; BORCHERS, J.; WOOD, P. D. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins, and coronary heart disease. **Journal of American Dietetic Association**, v.88, p.1373-1385, 1988.
83. KROMANN, N. ; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v.208, p.401-406, 1980.

84. KROMHOUT, D. n-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. **Journal of Internal Medicine**, v.225, n.1 Suppl., p.47-52, 1989.
85. KROMHOUT, D.; BOSSCHIETER, E. B.; COULANDER, C. L. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v.312, n.5, p.1205-1209, 1985.
86. LANDS, W. E. W. Renewed questions about polyunsaturated fatty acids. **Nutritional Review**, v.44, p.189-95, 1986.
87. LANGHOLZ, P.; ANDERSEN, P.; FORSKOY, T. ; SCHMIDISDORFF, W. Application of a specificity of *Mucor miehei* lipase to concentrate docosahexaenoic acid (DHA). **Journal American Oil Chemistry Society**, v.66, n.8, p.1120-1123, 1989.
88. LASSERRE, M.; MENDY, F.; SPIELMANN, D.; JACOTOT, B. Effect of different dietary intakes of essential fatty acids on 20:3 n-6 and 20:4 n-6 serum levels of human adults. **Lipids**, v.20, n.4, p.227-233, 1985.
89. LAWSON, L. D.; HUGHES, B. H. Triacylglycerol structure of plant and fungal oils containing γ -Linolenic acid. **Lipids**, v.23, n.4, p.313-317, 1988.
90. LEAF, A ; WEBER, P. C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. **The New England Journal of Medicine**, v.318, n.9, p.549-557, 1988.
91. LEE, K.-T.; AKOH, C. C. Immobilized lipase-catalysed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.73, n.5, p.611-615, 1996.
92. LI ZU YI ; WARD, O. P. Enzyme catalysed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Letters** , v.15, n.2, p.185-188, 1993a.

93. LI ZU YI ; WARD, O. P. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acids concentrate in organic solvent. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.70, n.8, p.745-748, 1993b.
94. LI ZU YI ; WARD, O. P. Stability of microbial lipase in alcoholysis of fish oil during repeated enzyme use. **Biotechnology Letters**, v.15, n.4, p.393-398, 1993c.
95. LI ZU YI ; WARD, O. P. Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acids by microbial lipase in organic solvent. **Journal of Industrial Microbiology**, v.13, p.49-52, 1994.
96. LIE, O.; LAMBERTSEN, G. Fatty acid Specificity of *Candida cylindracea*. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.9, p 365-367, 1986.
97. LIE, E.; MOLIN, G. Esterification of polyunsaturated fatty acids with lipases from different sources. **International Journal of Food Science and Technology**, v.27, p.73-76, 1992.
98. LIN, Y-H, W. L. T., HUANG, A. H. C. Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. **Plant Physiology**, v.73, p.460-463, 1983.
99. LITCHFIELD, C.; GREENBERG, A. J.; ACKMAN, R. G. ; EATON, G. A. Lipids of the Pacific beaked whale. **Lipids**, v.13, n.12, p.860-866, 1978.
100. LÖSEL, D.M. **Fungal lipids**. RATELEDGE, C.; WILKINSON, S. G. ed. Londres: Academic Press, 1988. p.699-806.
101. LOTTENBERG, A.M.P. Effects of dietary fish oil on the rate of very low density lipoprotein triacylglycerol formation and on the metabolism of chylomicrons. **Lipids**, v.27, n.5, p.326-330, 1992.
102. MACEDO, G. A. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum* sp.** Campinas, 1995. 121p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

103. MACRAE, A. R. Lipase-catalysed interesterification of oils and fats. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.60, n.2, p.243A-246A, 1983.
104. MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and Future Applications of Lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.3, p.193-217, 1985.
105. MAERH, H.; ZENCHOFF, G.; COFFEN, D. L. Enzymic enhancement of n-3 fatty acid content in fish oils. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.71, n.5, p.463-467, 1994.
106. MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, Jr. C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.67, n.12, p.890-910, 1990.
107. MANKU, M. S.; HORROBIN, D. F.; MORSE, N. L.; WRIGHT, S.; BURTON, J. L. Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. *British Journal of Dermatology*, v.110, p.643-648, 1984.
108. MANKU, M. S.; MORSE-FISHER, N.; HORROBIN, D. F. Changes in human plasma essential fatty acid levels as a result of administration of linoleic acid and gamma-linolenic acid. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.42, p.55-62, 1988.
109. MARSHALL, L. A. ; JOHNSTON, P. V. The effect of dietary alpha-linolenic acid in the rat on fatty acid profiles of immunocompetent cell populations. *Lipids*, v.18, p.737-742, 1983.
110. MASUEV, K. A. The effect of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 class on the late phase of the allergic reaction in bronchial asthma patients. *Terapevticheskii Arkhiv.*, v.69, n.3, p.31-33, 1997.
111. MATTSON, F. H.; BECK, L. W. The digestion in vitro of triglycerides by pancreatic lipase. *Journal of Biological Chemistry*, v.214, p.115-125, 1955.

112. MATTSON, F. H.; VOLPENHEIN, R. A. Enzymatic hydrolysis at an oil/water interface. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.43, n.2, p.286-289, 1966
113. McNEILL, G. P.; ACKMAN, R. G.; MOORE, S. R. Lipase-catalysed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.73, n.11, p.1403-1407, 1996.
114. MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G.; CAMACHO, F. G.; PÉREZ, J. A. S.; GRIMA, E. M.; GÓMEZ, A. C. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Journal American Oil Chemistry Society*, v. 72, n.5, p.575-583, 1995.
115. MILLER, C. C.; MCCREEDY, C. A.; JONES, A. D.; ZIBOH, V. A. Oxidative metabolism of dihomogammalinolenic acid by guinea pig epidermis: evidence of generation of antiinflammatory products. *Prostaglandins*, v. 35 n.6, p.917-938, 1988.
116. MOFFAT, C. F.; MCGILL, A. S.; HARDY, R. ;ANDERSON, R. S. The production of fish oils enriched in polyunsaturated fatty acid-containing triglycerides. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.70, n.2, p.133-138, 1993.
117. MUKHERJEE, K. D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, v.3, p.277-278, 1990.
118. MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I. Enrichment of γ -linolenic acid from fungal oil by lipase-catalysed reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.579-584, 1991.
119. NAIR, S. S.; LEITCH, J. W.; FALCONER, J.; GARG, M. L. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v.127, n.3, p.383-393, 1997.
120. NESTEL, P. J. Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). *American Journal of Clinical Nutrition*, v.45, p.1161-1167, 1987.

121. NETO, S.R. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes* sp. Campinas, 1996. 130p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
122. NILSSON, W. B.; GAUGLITZ, Jr. E. J.; HUDSON, J. K. Solubilities of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerols and oleyl glycerol mixtures in supercritical carbon dioxide. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.68, n.2, p.87-91, 1991.
123. NORDOY, A. Fish oil in clinical medicine. *Journal of Internal Medicine*, v.225, p.145-146, 1989.
124. NORUM, R.K. Dietary fat and blood lipids. *Nutritional Review*, v.50, n.4, p.30-34, 1992.
125. NOSSEN, J.O.; RUSTAN, A. C.; GLOPPESTAD, S. H.; MALBAKKEN, S.; DREVON, C. A. Eicosapentaenoic acid inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.879, p.56-65, 1986.
126. OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agricultural Biological Chemistry*, v.40, n.4, p.655-660, 1976.
127. OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipases. *Agricultural Biological Chemistry*, v.45, n.1, p.185-189, 1981.
128. OSADA, K.; TAKAHASHI, K.; HATANO, M. Polyunsaturated fatty glyceride syntheses by microbial lipases. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.67, n.12, p.921-922, 1990.
129. OTA, D. M.; COPELAND, E. M.; CORRIERE, J. N. Jr.; DUDRICK, S. J. Effects of cancer therapy and nutrition and treatment of cancer on host immunocompetence. *Surgery Gynecology and Obstetrics*, v.148, p.104-111, 1979.

130. PIAZZA, G.; BILYK, A.; SCHWARTZ, D.; HAAS, M. Lipolysis of olive oil and tallow in an emulsifier-free two-phase system by the lipase from oat seeds (*Avena sativa* L.). **Biotechnonology Letters**, v.11, n.7, p.487-492, 1989.
131. POCKLINGTON, W. D. Determination of the iodine value of oil and fats: results of a collaborative study. **Pure & Applied Chemistry**., v.62, n.12, p.2339-2343, 1990.
132. PUOLAKKA, J.; MAKARAINEN, L.; VIINIKKA, L.; YLIKORKALA, O. Biochemical and clinical effects of treating the premenstrual syndrome with prostaglandin synthesis precursors. **The Journal Reproductive Medicine**, v.30, n.3, p. 149-153, 1985.
133. QUINLAN, P.; MOORE, S. Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. **Inform**, v.4, n.5, p.580-585, 1993.
134. RAMBJOR, G. S.; WALLEN, A. I.; WINDSOR, S. L.; HARRIS, W. S. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. **Lipids**, v.31, Suppl, p.45S-50S, 1996.
135. RATLEDGE, C. Lipid Biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.64, n.12, p.1647-1655, 1987.
136. RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potencial. **Progress in Industrial Microbiology**, v.64, p.119-207, 1982.
137. REICHWALD, V. I. Chemie der fischlipids. **Fette Seif Anstr.**, v. 77, n.8, p. 328-334, 1976.
138. ROSSEL, J. B.; KING, B.; DOWNES, M. J. Composition of oils. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.62, n.2, p.221-229, 1967.

139. RUSTAN, A. C.; NOSSEN, J. O.; CHRISTIANSEN, E. N.; DREVON, C. A.
Eicosapentaenoic acid inhibits cholesterol esterification in cultured parenchymal cells and isolated microsomes from rat liver. **Journal Biological Chemistry**, v.263, p.8126-8132, 1988.
140. SANDERS, T. A. B.; SULLIVAN, D. R.; REEVE, J.; THOMPSON, G. R.
Triglyceride-lowering effects of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridaemia. **Atherosclerosis**, v.5, p.459-462, 1985.
141. SCHALIN-KARRILA, M.; MATTILA, L.; JANSEN, C. T.; UOTILA, P. Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema : effect on clinical status, plasma phospholipid fatty acid and circulating blood prostaglandins. **British Journal of Dermatology**, v.117, p.11-19, 1987.
142. SEYBERTH, H. W.; OELZ, O.; KENNEDY, T. Increased arachidonate in lipids after administration to man: effects on prostaglandin synthesis. **Clinical Pharmacology and Therapy**, v.18, p.521-529, 1975
143. SHIMADA, Y.; MARUYAMA, K.; NAKAMURA, M.; NAKAYAMA, S.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acids-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.72, n.12, p.1577-1581, 1995a.
144. SHIMADA, Y.; MARUYAMA, K.; OKAZAKI, S.; NAKAMURA, M.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.71, n.9, p.951-954, 1994.
145. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; MARUYAMA, K.; NAGAO, T.; NAKAMURA, M.; NAKANO, H.; TOMINAGA, Y. Enrichment of arachidonic acids: selective hydrolysis of a single-cell oil from *Mortierella* with *Candida cylindracea* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.72, n.11, p.1323-1327, 1995b.

146. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAKANO, H.; KURAMOTO, T.; NAGAO, T.; GEMBA, M.; TOMINAGA, Y. Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.74, n.2, p.97-101, 1997.
147. SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; AKIMOTO, K.; SHINMEN, Y.; YAMADA, H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.65, n.9, p.1455-1459, 1988.
148. SHIN, Y. C.; SHIN, H. K. Screening of γ -linolenic acid-producing fungi. **Korean Journal Food Science and Technology**, v.20, n.5, p.724-731, 1988.
149. SIMONS, L. A.; HICKIE, J. B.; BALASUBRAMANIAM, S. On the effects of n-3 fatty acids (MaxEpa) on plasma lipids and lipoprotein in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.45, p.75-88, 1985.
150. SINGER, P. WIRTH M., BERGER, I. A. A possible contribution of decrease in free fatty acids to low serum triglycerid level after diets supplemented with n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. **Atherosclerosis**, v.83, p.167-175, 1990.
151. SONNET, P. E; FOGLIA, T. A.; BAILLARGEON, W. Fatty acid selectivity: The selectivity of lipases of *Geotrichum candidum*. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.70, n.10, p.1043-1045, 1993.
152. SUGANO, M.; ISHIDA, T.; IDE, T. Effect of various polyunsaturated fatty acids on blood cholesterol and eicosanoids in rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.50, n.9, p.2335-2340, 1986a.
153. SUGANO, M.; ISHIDA, T.; YOSHIDA, K.; TANAKA, K.; NIWA, M.; ARIMA, M.; MORITA, A. Effects of mold oil containing γ -linolenic acid on the blood cholesterol and eicosanoid levels in rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.50, n.10, p.2483-2491, 1986b.
154. SUGIHARA, A; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. **Journal of Biochemistry**, v. 107, p.426-430, 1990.

155. SRIDHAR, R.; LAKSHMINARAYANA, G.; KAIMAL, T. N. B. Modification of selected edible vegetable oils to high oleic oils by lipase-catalyzed ester interchange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.2069-2071, 1991.
156. STEINBERG, D.; PARTHASARTHY, S.; CAREW, T. E. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine*, v.320, p.915-924, 1989.
157. SYED RAHMATULLAH, M. S. K.; SHUKLA, V. K. S.; MUKHERJEE, K. D. Enrichment of γ -linolenic acid from evening primrose oil and borage oil via lipase-catalyzed hydrolysis. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.71, n.6, p.569-573, 1994a.
158. SYED RAHMATULLAH, M. S. K.; SHUKLA, V. K. S.; MUKHERJEE, K. D. γ -linolenic acid concentrates from borage and evening primrose oil fatty acids via lipase-catalyzed esterification. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.71, n.6, p.563-567, 1994b.
159. TAHIN, Q. S.; CAVALCANTI, T. C.; PISANI, R.; BRENELI, H. B.; TEIXEIRA, L. C.; PINOTTI, J. A. Fatty acid composition of human breast cell carcinoma. In: *Lipids in Cancer*. J. SABINE ed. Perth, Australia, p. 83-86, 1982.
160. TANAKA, Y., FUNADA T., HIRANO, J.; HASHIZUME, R. Triglyceride specificity of *Candida cylindracea*: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.70, n.10, p.1031-1034, 1993.
161. TANAKA, Y., HIRANO, J.; FUNADA T. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.69, n.12, p.1210-1214, 1992.
162. TANAKA, Y., HIRANO, J.; FUNADA T. Synthesis of docosahexaenoic acid-rich triglyceride with immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.71, n.3, p.331-334, 1994.

163. TIMMS, R. E. Physical properties of oil and mixtures of oils. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.62, n.2, p.241-248, 1985.
164. TIRTIAUX, F. Le fracionnement industriel des corps gras par cristallisation dirigée - procédé Tirtiaux. **Oleagineux** v.31, p.279-285, 1976.
165. TOTANI, Y.; HARA, S. Preparation of polyunsaturated phospholipids by lipase-catalyzed transesterification. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.68, n.11, p.848-851, 1991.
166. TRAITLER, H. WILLE, H. J.; STUDER, A. Fractionation of black current seed oil. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.65, n.5, p.755-760, 1988.
167. TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Gliceride synthesis by four kinds of microbial lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.489, p.415-422, 1977.
168. URQUHART, A. A.; BRUMELL, C. A.; ALTOSAAR, I.; MATLASHEWSKI, G. J.; SAHASRABUDHE, R. Lipase activity in oats during maturation and germination. **Cereal Chemistry**, v.61, n.2, p.105-108, 1984.
169. VALENZUELLA, A.; NIETO, S. Biotechnology of lipids: the use of lipases for the structural modification of fats and oils. **Grasas y Aceites**, v.45, n.5, p.337 - 343, 1994.
170. WHELAN, J. Antagonistic effects of dietary arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Nutrition**, v.126, n.4 Suppl, p.1086S-1091S, 1997.
171. WEBB, D. R. ; WEIDER, K.J.; NOWOWIEJSKI, I. Prostaglandins in lymphocyte suppressor mechanisms. **Advances in Immunopharmacology**, v.2, p.383-394, 1980.
172. WHITWORTH, D. A.; RATLEDGE, C. Microorganisms as a potential source of oils and fats. **Process Biochemistry** , v.1, p.14- 22, 1974
173. WOOD, J. N. Essential fatty acids and their metabolites in signal transduction. **Trends in Biochemical Sciences** , v.18, p.785-786, 1990.

174. WORNE, H. E.; SMITH, L. W. Effects of certain pure long chain polyunsaturated fatty acid esters on the blood lipids of man. **American Journal of Medical Science**, v.237, n.3, p.710-721, 1959
175. WRIGHT, S. W, KUO, E. Y.; COREY, E. J. An effective process for the isolation of docosahexaenoic acid in quantity from cod liver oil. **Journal of Organic Chemistry**, v.52, n.19, p.4399-4401, 1987.
176. WRIGHT, S.; BURTON, J.L. Oral evening-primrose seed oil improve atopic eczema. **Lancet**, v.20, p.1120-1122, 1982.
177. YAMANE, T. Enzyme Technology for the lipids industry: An engineering overview. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.64, n.12, p.1657-1662, 1987.
178. YAMANE, T.; SUZUKI, T.; SAHASHI, Y.; VIKERSVEEN, L.; HOSHINO, T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis without solvent. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.69, n.11, p.1104-1107, 1992.
179. YANG, M. H.; CHANG, S. C.; CHEN, R. W. Effect of solvent polarity and fractionation temperature on the physicochemical properties of squid viscera stearin. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.69, n.12, p.1192-1194, 1992.
180. YOKOCHI, T.; USITA, M. T.; KAMISAKA, Y. NAKAHARA, T.; SUKUKI, O. Increase in the γ -Linolenic Acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* genus. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.67, n.11, p.846-851, 1990.
181. YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Ω -3 fatty acids: alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v.24, p.117-125, 1989.
182. ZOLLNER, N. Dietary linolenic acid in man: an overview. **Progress in Lipid Research**, v.25, p.177-80, 1986.