



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS FUNCIONAIS POR AÇÃO DE LIPASE FÚNGICA

VIVIAN FEDDERN

Leonor Almeida de Souza Soares
ORIENTADORA

Eliana Badiale Furlong
COORIENTADORA

RIO GRANDE
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS FUNCIONAIS POR AÇÃO DE LIPASE FÚNGICA

VIVIAN FEDDERN

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande.

Leonor Almeida de Souza Soares
ORIENTADORA

Eliana Badiale Furlong
COORIENTADORA

RIO GRANDE
2010

F292p Feddern, Vivian

Produção de lipídios funcionais por ação de lipase fúngica /
Vivian Feddern. - 2010.

205 p. : il.

Orientadora: Leonor Almeida de Souza Soares

Coorientadora: Eliana Badiale Furlong

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande, RS/2010.

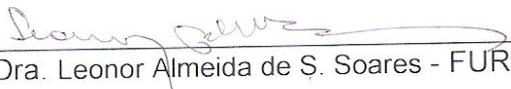
1. Alimentos. 2. Lipídios. 3. Gorduras. 4. Ácidos
graxos. I. Souza-Soares, Leonor Almeida de. II.
Badiale-Furlong, Eliana. III. Título.

CDU 577.125

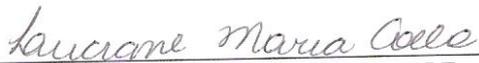
Catálogo: Bibliotecária Maria da Conceição Hohmann CRB10/745

APROVAÇÃO

Tese defendida por Vivian Feddern e aprovada em 18 de junho de 2010,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



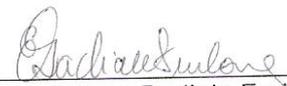
Profa. Dra. Leonor Almeida de S. Soares - FURG



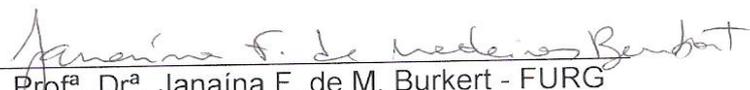
Profa. Dra. Luciane Maria Colla - UPF



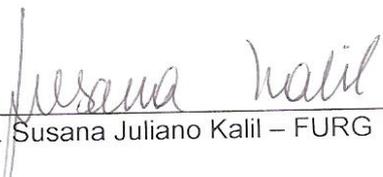
Profa. Dra. Helen Treichel – URI



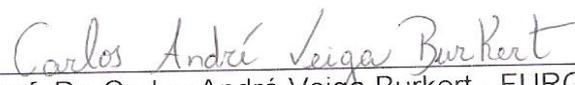
Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG



Prof^a. Dr^a. Janaina F. de M. Burkert - FURG



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG

Sem ambição nada se começa, sem esforço nada se completa.

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, e que no decorrer desta caminhada esteve comigo todos os momentos, fortalecendo-me, e por ter me permitido a conquista de mais uma etapa em minha vida. Sem Ele, nada seria possível

A CAPES e CAPES/PDEE pelo apoio financeiro no Brasil e no exterior, além da possibilidade da realização do doutorado sanduíche na Dinamarca

A Universidade Federal do Rio Grande, por me aceitar em seu Curso de Pós-graduação mais uma vez.

A Universidade de Aarhus, a todos que contribuíram para meu crescimento profissional: Prof. Xuebing Xu, Ling-Zhi Cheong, Zhiyong Yang, Derya Kahveci.

Ao povo brasileiro, que com seus impostos contribui para manutenção de tantos alunos em uma Universidade Federal.

A Pró-reitoria, nas pessoas de Luís Eduardo Maia Nery e André Costa Noble, que não mediram esforços para agilizar meu estágio no exterior, sempre disponíveis e esclarecendo dúvidas.

A Banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e sugestões.

A Leonor A. de Souza Soares, que muito mais do que uma orientadora, é uma ótima amiga desde a época do Mestrado, sempre me apoiando em todas as horas, contribuindo com meu conhecimento. És um colosso!

A Eliana Badiale Furlong, amiga de todas as horas, grande incentivadora. Tenho muito orgulho de ter trabalhado no seu laboratório esses anos, aprendendo tantas coisas de ti, nem imaginas quantas. Levarei nossa amizade com muito carinho para sempre.

A família, pelo apoio e carinho nas horas alegres e difíceis. Agradeço por compreender minha ausência em tantos momentos que tive que me dedicar ao doutorado. Amo vocês, espero poder estar mais perto a partir de agora.

Ao namorado, André, e seus pais Áureo e Ada, que sempre me deram carinho, amor, atenção. Saibam que vocês são muito importantes na minha vida, amo muito vocês.

A Gini, Nádia, Cici, Gabi, Clarice e Kelly, que se enlouqueceram bastante para me ajudar nas últimas semanas. Meninas, obrigada pelo esforço. Vocês sabem que também podem contar comigo.

A Melissa, por ter me ensinado a lidar com equipamentos, principalmente com o cromatógrafo, que passou a não ser mais um “bicho de 7 cabeças”.

Ao Egidio (Tio do Xerox) que sempre se prontificou a receber em qualquer hora pilhas de folhas para xerocar.

Aos técnicos do laboratório de Ciência de Alimentos (Maria de Jesus Pinto Lamego) e de Agrobiotecnologia (Flemming Lund Sørensen) que se preocuparam não só em solicitar reagentes (que muitas vezes precisamos da noite para o dia), como também com nosso bem estar físico, sempre incentivando com palavras de carinho.

A Gabriela L. Mendes, Gregory Giacobbo, Larine Kupsi e Eliane Cicolatti, que me auxiliaram na parte experimental do primeiro artigo e com quem troquei ideias muitas vezes. Todos se mostraram mais do que “escravinhos” dedicados e sim amigos presentes também em outros bons momentos.

A todos demais integrantes do Laboratório de Ciência de Alimentos da FURG, que por lá passaram desde 2007 ou continuam até hoje, agradeço pelo apoio e carinho. Lembro de tantas festas que organizamos e risadas que demos juntos. Com certeza levarei a amizade de vocês para sempre. Podem contar comigo, não importando onde eu estiver.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
OBJETIVOS	5
JUSTIFICATIVA	6
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA	8
REVISÃO DA LITERATURA	9
1 Óleos e gorduras	9
1.1 Aspectos nutricionais dos ácidos graxos poli-insaturados.....	11
1.2 Óleo de soja	13
1.3 Gordura de frango	15
1.4 Triacilgliceróis de cadeia média (TCM)	17
1.5 Ácidos graxos ramificados	20
2 Caracterização de óleos e gorduras	22
2.1 Rancidez hidrolítica e oxidativa.....	22
2.2 Outros métodos de caracterização lipídica	24
2.3 Perfil lipídico	25
2.4 Análise posicional dos triacilgliceróis	25
3 Lipases	27
3.1 Classificação	28
3.2 Aplicações das lipases	31
4 Compostos fenólicos	34
5 Modificação de óleos e gorduras	37
5.1 Fracionamento.....	37
5.2 Hidrogenação	37
5.3 Interesterificação	39
5.3.1 Processo químico	40
5.3.2 Processo enzimático.....	40

5.3.3	Aplicação comercial de lipídios estruturados.....	42
5.3.4	Reatores utilizados na produção de lipídios estruturados	45
	CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	50
	Artigo I: Composição físico-química, glicerídeos fracionados e perfil de ácidos graxos da gordura da pele de frango	52
	Artigo II: Produção de lipídios modificados pela acidólise da gordura de pele de frango e ácidos graxos ramificados	72
	Artigo III: Síntese do dihidrocafeato de octila e sua transesterificação com tricaprilina.....	85
	CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS	104
	CONCLUSÕES GERAIS.....	105
	SUGESTÕES.....	106
	CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108
	APÊNDICES	125
	APÊNDICE I – ESQUEMAS DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA (ARTIGO I).....	126
	APÊNDICE II – CROMATOGRAMA DA GORDURA DA PELE DE FRANGO	
	(ARTIGO II).....	134
	APÊNDICE III – CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS GRAXOS RAMIFICADOS (ARTIGO II).....	135
	APÊNDICE IV – APLICANDO MODELO LINEAR E QUADRÁTICO PARA CONSUMO DE DIHIDROCAFEATO DE OCTILA E TRICAPRILINA (CÁLCULOS ARTIGO III) ...	136
	APÊNDICE V – TRABALHOS APROVADOS EM CONGRESSOS 2010	137
	APÊNDICE VI – ARTIGO NAS NORMAS DA EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY.....	155
	ANEXOS.....	176
	ANEXO I - ARTIGO EXTRA ELABORADO COM O GRUPO DE PESQUISA NA DINAMARCA.....	177

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo de soja	14
Tabela 2. Características físico-químicas do óleo de soja.....	14

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I

Tabela 1. Composição físico-química do óleo de soja e da gordura da pele de frango	61
Tabela 2. Perfil lipídico (%) do óleo de soja e seus glicerídeos fracionados.....	63
Tabela 3. Perfil lipídico da gordura de pele de frango e seus glicerídeos fracionados.	64
Tabela 4. Porcentagem de ácidos graxos em diferentes partes do frango conforme literatura.....	65
Tabela 5. Índices de qualidade nutricional de lipídios	66

ARTIGO II

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 e respostas da porcentagem de ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico nos TAG após interesterificação	79
Tabela 2. Efeitos principais das variáveis estudadas sobre a porcentagem de ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico	80

ARTIGO III

Tabela 1. Matriz e respostas para consumo dos reagentes dihidrocafeato de octila e tricaprilina nas reações de transesterificação	94
Tabela 2. ANOVA para consumo de dihidrocafeato de octila.....	95
Tabela 3. ANOVA para consumo de tricaprilina	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Frações saponificáveis e insaponificáveis dos lipídios.....	10
Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos essenciais	13
Figura 3. Transporte, distribuição e destino metabólico dos ácidos graxos conforme tamanho da cadeia carbônica	19
Figura 4. Posições dos grupos ramificados iso e anteiso.....	20
Figura 5. Hidrólise sequencial dos grupos acil no glicerídeo, catalisada por lipases...	30
Figura 6. Produtos resultantes da reação de interesterificação química e enzimática de diferentes lipídios.	31
Figura 7. Metabolismo do ácido cafeico.....	35
Figura 8. Esterificação de DHCA e octanol.....	36
Figura 9. Representação esquemática das reações de interesterificação catalisada por lipases.....	39
Figura 10. Banho termostatizado com agitação orbital (a) e chapas magnéticas com reatores tipo tubos lisos (b)	45
Figura 11. Reator de vidro encamisado com agitação mecânica	46
Figura 12. Destilador “Short Path” para purificação de lipídios estruturados.....	47
Figura 13. Reatores de vidro encamisados (water-jacket reactors)	48
Figura 14. Configuração principal do reator de membrana	48
Figura 15. Diagrama do reator contínuo para interesterificação catalisada por lipase	49

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO II

Figura 1. Cromatografia de camada delgada da reação de acidólise entre ácidos graxos ramificados e gordura da pele de frango.....	78
Figura 2. Superfície de resposta da percentagem de linoleico no triacilglicerol modificado.....	81

ARTIGO III

Figura 1. Produção de éster a partir de DHCA e octanol durante 192 h	91
Figura 2. Reação de esterificação catalisada por lipase em terc-butanol.....	91
Figura 3. Consumo de substratos nas relações molares de DO: tricaprilina (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10).....	93
Figura 4. Condições de contorno do consumo dos reagentes dihidrocafeato de octila (a,c,e) e tricaprilina (b,d,f) nas reações de transesterificação	97
Figura 5. Espectro de massas dos produtos interesterificados	98
Figura 6. Posições dos produtos identificados a partir da reação de transesterificação entre éster fenólico (dihidrocafeato de octila) e tricaprilina	99

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1. Índices para determinar a rancidez em óleos e gorduras	23
Quadro 2. Outras caracterizações físico-químicas de óleos e gorduras	24
Quadro 3. Triacilgliceróis modificados comercialmente produzidos	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- AG** = ácido graxo
- AGCL** = ácidos graxos de cadeia longa
- AGCM** = ácidos graxos de cadeia média
- AGL** ou **FFA** = ácidos graxos livres (*free fatty acids*)
- AGMI** ou **MUFA** = ácidos graxos mono-insaturados (*monounsaturated fatty acids*)
- AGPI** ou **PUFA** = ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*)
- DAG** = diacilgliceróis
- DHCA** = ácido dihidrocafeico
- HH** = hipocolesterolêmico/ hipercolesterolêmico
- IA** ou **AI** = índice de aterogenicidade (*atherogenic index*)
- II** = índice de iodo
- IP** = índice de peróxido
- IpA** = índice de p-anisidina
- IS** = índice de saponificação
- IT** ou **TI** = índice de trombogenicidade (*thrombogenic index*)
- LE** = lipídios estruturados
- LML** = TAG contendo ácidos graxos de cadeia longa-média-longa
- LPL** = lipase lipoproteica
- MAG** = monoacilgliceróis
- MLM** = TAG contendo ácidos graxos de cadeia média-longa-média
- sn** = *stereospecific number* (número estereoespecífico, posição no TAG)
- TAG** = triacilgliceróis
- TBA** = ácido tiobarbitúrico
- TCL** = triacilgliceróis de cadeia longa
- TCM** = triacilgliceróis de cadeia média
- VLDL** = lipoproteínas de peso molecular muito baixo

RESUMO

A modificação estrutural de óleos e gorduras é uma das principais áreas de interesse de pesquisa em diferentes setores industriais. No caso da indústria de alimentos, a interesterificação é empregada para melhorar propriedades nutricionais e funcionais, em que se obtêm compostos diferentes dos que lhes deram origem. As lipases microbianas são os biocatalisadores mais utilizados industrialmente, por serem mais estáveis, específicas e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. Este trabalho objetivou, primeiramente, a caracterização da gordura da pele de frango (GPF) e sua comparação com óleo de soja, como referência, visando a utilização de GPF em reações de interesterificação. Para isto foram caracterizados quanto aos índices de rancidez hidrolítica e oxidativa, bem como de matéria insaponificável, índices de saponificação, refração e iodo. Foi realizado ainda o fracionamento e perfil de ácidos graxos destes lipídios e suas frações, com o cálculo de seus índices nutricionais. Foi verificado que a GPF apresentou qualidade satisfatória devido aos baixos índices de acidez ($0,65 \text{ g ácido oleico.100 g}^{-1}$), peróxido ($2,14 \text{ meq.kg}^{-1}$), p-anisidina ($0,70 \text{ unidades de absorvância.g}^{-1}$), além de fonte de ácidos graxos mono-insaturados (40%), sendo fonte promissora para estudos de interesterificação. Em um segundo momento o objetivo foi produzir lipídios modificados ricos em ácidos graxos essenciais a partir da gordura da pele de frango e ácidos graxos ramificados, utilizando lipase *sn*-1,3 específica e interesterificação do tipo acidólise. Foram estudados os fatores concentração de enzima, adição de água, proporção de substratos e tempo, segundo um planejamento experimental fatorial completo 2^4 . As separações analíticas foram executadas em placas de cromatografia de camada delgada, sendo as frações posteriormente extraídas, ressuspensas e injetadas no cromatógrafo a gás. Foi verificado que a adição de água ao meio reacional apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para todos ácidos graxos avaliados dos triacilgliceróis, sendo que para o ácido essencial linoleico (C18:2) o efeito do tempo de reação também foi significativo, sendo verificado que quanto maior o tempo de reação, menor a quantidade de água a ser adicionada. Em um terceiro momento, o objetivo foi produzir éster fenólico a partir do DHCA, além de realizar reações de transesterificação deste éster com tricaprilina. Para a reação de transesterificação, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) variando a quantidade de enzima, tempo de reação e temperatura sobre a resposta (%) dos reagentes consumidos. A lipase *Novozym*® 435 de *Candida antarctica* foi utilizada como catalisador de todas reações. Foi verificado que a maior produção de éster (50%) ocorreu em oito dias. Nas reações de transesterificação, as relações molares em que houve maior consumo do éster produzido foram 1:5 e 1:10, sendo obtidos 21,1% e 29,6% de residual de dihidrocafeato de octila, respectivamente em 24 h. Foi observado que em altas temperaturas e tempo superior a 26 h, houve o menor residual de dihidrocafeato de octila (18,2%). Foram identificados três diferentes compostos fenólicos, contendo em sua estrutura dihidrocafeato de octila e ácido caprílico.

Palavras-chave: lipídios funcionais, lipídios modificados, ácido dihidrocafeico, óleo de soja, pele de frango, índices de qualidade lipídica

ABSTRACT

FUNCTIONAL LIPID PRODUCTION BY FUNGAL LIPASE ACTION

The structural modification of oils and fats is one of the main areas of research interest in different industrial sections. In relation to Food Industry, interesterification is used to improve nutritional and functional properties, in which different compounds are obtained from those who gave them origin. Industrially, microbial lipases are the most widely used biocatalysts, once they are more stable, specific and they have much more diversified properties than lipases from other sources. This work aimed at characterizing oils and fats from low cost to study their use for further interesterification reactions. Therefore, the physico-chemical composition was carried out together with the fatty acid profile of chicken skin fat (CSF) and soybean oil. For that, determination of oxidative and hydrolytic rancidity was accomplished as well as other indexes such as iodine, saponification, refraction and unsaponified matter, besides the glycerides fractionation, followed by fatty acids methyl esters derivatization and identification by Gas Chromatography. The nutritional quality indexes were then calculated. GPF showed satisfactory quality due to low acidity ($0.65 \text{ g oleic acid.100 g}^{-1}$), peroxide (2.14 meq.kg^{-1}), p-anisidine ($0.70 \text{ absorbance units.g}^{-1}$) values. Besides that, CSF presented high proportion of monounsaturated fatty acids (40%), being a promising residue for different purposes, like interesterification reactions and biodiesel production. In a second moment, the goal was to produce modified lipids rich in essential fatty acids from CSF and branched fatty acids using *sn*-1,3 specific lipase and interesterification type acidolysis. The studied factors were enzyme concentration, water addition, substrate molar ratio and time, according to a 2^4 complete factorial design. The analytical separations were performed on thin layer chromatography plates, being the fractions extracted, resuspended and injected into the gas chromatograph. It was observed that water addition to the reaction medium had a significant effect ($p < 0.05$) for all fatty acids from triacylglycerol, and for the essential linoleic acid (C18:2) the effect of reaction time was also significant, that is, the longer the reaction time, the lower the amount of water that's needed. In a third moment, the goal was to produce phenolic ester from DHCA, besides carrying out transesterification reactions of this ester with tricaprilyn. For transesterification reaction, a central composite rotational design (CCRD) was accomplished, varying the amount of enzyme, reaction time and temperature on the response (%) of the reactants consumption. The *Novozym*® 435 lipase from *Candida antarctica* was used as a catalyst for all reactions. It was found that the highest yield of ester (50%) occurred in eight days. In transesterification reactions, the molar proportions of higher ester consumption were 1:5 and 1:10, obtaining 21.1% and 29.6% respectively of octyl dihydrocaffeate residual in 24 h. The contour plots showed that at higher temperatures and time longer than 26 h, octyl dihydrocaffeate residual was the lowest (18.2%). Three different phenolic compounds, containing in its structure octyl dihydrocaffeate and caprylic acid were also identified.

Key-words: functional lipids, modified lipids, dihydrocaffeic acid, soybean oil, chicken skin, lipid quality indexes

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A consciência dos efeitos nocivos da ingestão excessiva de óleos e gorduras é universal. Conseqüentemente, indivíduos que se preocupam com a saúde estão reduzindo o consumo de gordura, especialmente a saturada, a qual está associada ao aumento do risco de obesidade, altos níveis de colesterol sanguíneos, doenças coronárias, câncer e arteriosclerose (TRIVEDI e SINGH, 2005).

Nos últimos vinte anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação de óleos e gorduras, pois são obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (CASTRO *et al.*, 2004). Também vem aumentando a busca pelo consumidor, que deseja melhor qualidade de vida, de produtos naturais e saudáveis com baixo teor de gordura, motivando a tendência de encontrar métodos novos de processar óleos e gorduras (FILLETI JUNIOR, 2005).

As características dos lipídios podem ser alteradas e adequadas a uma determinada aplicação, através de métodos industriais como mistura, fracionamento, hidrogenação, interesterificação ou pela combinação destes, uma vez que os lipídios possuem aplicação limitada em suas formas inalteradas, impostas pela composição em ácidos graxos e triacilgliceróis (CHIU, GIOIELLI e GRIMALDI, 2008b; CASTRO *et al.*, 2004).

Os lipídios estruturados são moléculas de triacilgliceróis que possuem intencionalmente grupos acil graxos na estrutura do glicerol. Através de interesterificação catalisada por lipase, por exemplo, tais óleos/gorduras modificados podem ser obtidos pela troca dos grupos acil entre as ligações éster dos lipídios. Esta mudança resulta na melhora de características físico-químicas e nutricionais devido a mudança na composição e distribuição de ácidos graxos (LEE *et al.*, 2008). Além disso, a posição do ácido graxo na molécula de glicerol, o comprimento da sua cadeia e seu grau de insaturação influenciam o valor nutricional e sensorial, bem como as propriedades físicas de um triacilglicerol (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Os lipídios estruturados têm aplicação nos campos da medicina, nutrição, em fórmulas para bebês prematuros (similar ao leite materno) e em produtos para nutrição enteral e parenteral (para pacientes com necessidades especiais de nutrição).

Os lipídios estruturados também podem ser utilizados em alimentos voltados para esportistas, por fornecerem ao mesmo tempo uma fonte de energia rápida e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, os quais conferem benefícios à saúde. Absorção eficiente, estabilidade, e funcionalidade em produtos alimentícios são características desejáveis dos lipídios estruturados (SILVA *et al.*, 2009; LEE e AKOH, 1998b; WILLIS, LENCKI e MARANGONI, 1998).

Os lipídios estruturados fazem parte dos alimentos funcionais, apresentando a vantagem de não possuírem ácidos graxos trans em sua estrutura molecular, ao contrário do que ocorre com as gorduras parcialmente hidrogenadas. Eles podem ser produzidos a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, média ou longa, de gorduras vegetais ou animais, através de interesterificação química ou enzimática ou ainda engenharia genética (CHIU, GIOIELLI e GRIMALDI, 2008b).

Dentre os biocatalisadores utilizados nos processos de interesterificação enzimática, as lipases, por serem versáteis, estão recebendo cada vez mais importância em aplicações de alto valor agregado na indústria de oleoquímica, alimentícia e na produção de substâncias químicas como ésteres para diferentes aplicações funcionais. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente, pois são geralmente mais estáveis e com propriedades mais diversificadas que as de outras fontes (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Os processos que utilizam lipases são especialmente atraentes em função das diferentes aplicações desta enzima. As lipases podem catalisar reações de hidrólise, esterificação e interesterificação, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento. Estas características conferem às lipases um potencial biotecnológico comparável ao das proteases e carboidrases (enzimas industrialmente utilizadas) estimulando pesquisas para otimização da sua produção, caracterização, imobilização e aplicação industrial (GOMES *et al.*, 2006).

As lipases hidrolisam os triacilgliceróis parcial ou totalmente, fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, apresentando uma capacidade única de agir na interface óleo/água. Assim, as lipases permitem modificar as propriedades dos lipídios, alterando a localização dos ácidos graxos no glicerídeo e substituindo um ou mais ácidos graxos por outros. Desta maneira, um lipídio menos desejável ou de baixo custo pode ser modificado para se tornar um lipídio de alto valor agregado com funções nutricionais e terapêuticas (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Diversos substratos podem ser utilizados para produzir lipídios modificados, sendo que neste trabalho será focado a utilização da gordura da pele de frango, ácidos graxos ramificados, ésteres de ácidos fenólicos (dihidrocafeico) e tricaprilina (triacilglicerol de cadeia média).

Pelo fato do Brasil ser o líder mundial nas exportações de frango (3,6 milhões de toneladas) e o terceiro maior produtor (10,9 milhões de toneladas), são gerados cerca de 440.000 ton/ano de resíduos (ABEF, 2009). Dentre estes, se destaca a pele de frango, por ser um coproduto rico em lipídios, principalmente ácido oleico (SHEU e CHEN, 2002), pode ser um potencial para outras aplicações, minimizando problemas ambientais e custos de eliminação (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

De acordo com Brockerhoff, Hoyle e Wolmark (1966), a posição *sn-2* do triacilglicerol da gordura de frango é composta por 80% de ácidos graxos insaturados e 20% de saturados, o que a torna mais nutricional e fisiologicamente disponível. Comparada a outras fontes de gordura animal, a de frango possui a maior quantidade de insaturados, de 65-68%, (SHEU e CHEN, 2002; MOTTRAM, CROSSMAN e EVERSHED, 2001; LEE e FOGLIA, 2000b).

Os ácidos graxos ramificados são de interesse comercial porque a ramificação propicia boa estabilidade oxidativa e térmica, além de melhor solubilidade e uma faixa de liquidez mais ampla, tornando estes ácidos interessantes em aplicações que usam baixa temperatura, como a propriedade de espalhabilidade. (BIERMANN e METZGER, 2008; BEHR e LAUFENBERG, 1991 *apud* KNOTHE, KENAR e GUNSTONE, 2007; KINSMAN, 1979).

Ésteres aromáticos de derivados de ácidos hidroxicinâmicos (como o dihidrocafeico) são encontrados em fontes naturais como própolis e plantas, possuindo atividade antioxidante, anticancerígena, anti-HIV e antimicrobiana (STEVENSON *et al.*, 2007), além de ter sido relatado que o ácido cafeico também pode proteger células da pele quando exposta à radiação ultravioleta (GUGLIUCCI *et al.*, 2009).

Triacilgliceróis de cadeia média (TCM), como a tricaprilina, têm principalmente ácidos graxos com comprimento de cadeia entre 6 e 12 carbonos. Devido à sua saturação, são estáveis à oxidação. Eles têm viscosidade e pontos de fusão baixos, e são geralmente líquidos à temperatura ambiente. Seu menor tamanho molecular e relativamente alta solubilidade em água contribuem para melhorar a absorção, comparados aos triacilgliceróis de cadeia longa (LEE e AKOH, 1998).

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Obter lipídios estruturados modificados a partir de óleos, gorduras e ésteres fenólicos, por lipase fúngica.

Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente gordura da pele de frango e óleo de soja, bem como seu perfil em ácidos graxos;
- Preparar triacilgliceróis contendo gordura da pele de frango e ácidos graxos ramificados;
- Produzir ésteres a partir de compostos fenólicos (ácido dihidrocafeico) e octanol;
- Produzir triacilgliceróis a partir de ésteres de ácido dihidrocafeico e triacilgliceróis de cadeia média (tricaprilina).

JUSTIFICATIVA

Os lipídios estruturados são triacilgliceróis reestruturados ou modificados pela mudança na composição de ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol, por processos químicos ou enzimáticos. Um importante uso desses lipídios relaciona-se à sua aplicação para fins terapêuticos e nutricionais. Algumas vantagens têm sido relatadas, como o aumento da função imunológica, a não agressão ao tecido reticuloendotelial, a diminuição do risco de câncer, a ajuda na prevenção da trombose, a diminuição do colesterol e o aumento do balanço do nitrogênio (CASTRO *et al.*, 2004).

Os lipídios produzidos por via enzimática despertam particular interesse, devido às regiões regioseletivas, as quais permitem a síntese de produtos impraticáveis de serem obtidos por via química (MATEOS *et al.*, 2007a; CASTRO *et al.*, 2004; GIOIELLI *et al.*, 1994). A interesterificação química, além de consumir muita energia, deixa resíduos tóxicos, obtendo-se ácidos graxos 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 (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas hidrolíticas que podem catalisar a hidrólise da ligação éster carboxílica de acilgliceróis de cadeia longa na interface óleo/água. Várias espécies de microrganismos, dentre elas bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir lipases (LI, WANG e TAN, 2006; HASAN, AAMER e HAMEED, 2006). As lipases têm sido extensivamente usadas em tecnologia de triacilgliceróis, sendo aplicadas, principalmente, na biotransformação de óleos e gorduras. Estas enzimas podem catalisar reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico e, portanto, produzir ésteres por uma rota biocatalítica. O uso de lipases traz as vantagens de alta seletividade, alta especificidade e condições operacionais moderadas (FERNANDES *et al.*, 2007; MATEOS *et al.*, 2007a; OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Como os ácidos graxos essenciais ou desejáveis, como os insaturados oleico, linoleico e linolênico, são melhor utilizados na posição *sn*-2 do triacilglicerol, seria de interesse a obtenção de um lipídio estruturado com ácido graxo de cadeia

longa nesta posição. A gordura de frango contém oleico na posição *sn-2*, o que a torna viável para utilização na reação de interesterificação, catalisada por lipases. Além disso, se estaria usando uma gordura de baixo custo para produção de lipídios estruturados. Isto implica ainda na diminuição da deposição de resíduos no meio ambiente.

É benéfico incorporar ácidos graxos de cadeia longa insaturados na posição *sn-2* devido à baixa atividade da lipase pancreática com relação a estes ácidos graxos, uma vez que esta enzima atua nas posições *sn-1* e *sn-3* dos triacilgliceróis. Assim, na posição *sn-2* os ácidos graxos de cadeia longa insaturados são mais biodisponíveis, visto que são mais facilmente absorvidos como 2-monoacilgliceróis (D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002).

O ácido dihidrocafeico (DHCA) é um composto fenólico, metabólito do ácido cafeico com propriedades antioxidantes, além de ser capaz de proteger as células da pele quando exposta à radiação ultravioleta (GUGLIUCCI *et al.*, 2009). Devido às propriedades relativamente polares, esforços têm sido feitos no sentido de aumentar a hidrofobicidade e, portanto produzir moléculas anfifílicas de valor industrial. (CASSANI *et al.*, 2007). A lipofilização de ácidos fenólicos com alcoóis graxos pode ser usada como uma ferramenta para alterar a solubilidade de compostos fenólicos em fórmulas à base de óleo e emulsões. Estas novas moléculas antioxidantes anfifílicas poderiam ser utilizadas como emulsionantes multifuncionais em alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas, uma vez que devem conservar as suas outras propriedades funcionais como filtros UVA e UVB, antimicrobiana, antiviral, bacteriostático, etc (FIGUEROA-SPINOZA e VILLENEUVE, 2005).

A ideia principal do trabalho foi buscar fontes inovadoras para produção de lipídios funcionais a partir de diferentes substratos utilizando lipase fúngica, para possível aplicação nas áreas da nutrição e tecnologia de alimentos.

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 Óleos e gorduras

Segundo BRASIL (2005), óleos e gorduras vegetais são constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécie(s) vegetal (is). Podem conter pequenas quantidades de outros lipídios como fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura.

Os óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (ORDOÑEZ PEREDA, 2005; CASTRO *et al.*, 2004). A função dos lipídios no organismo, embora predominantemente energética, pois fornecem 9 kcal/g de energia, é bem mais importante e abrangente. Possuem função estrutural em todos os seres vivos, compondo as membranas e as partes estruturais do sistema nervoso central. Alguns hormônios também são lipídios, como é o caso dos sexuais (RIEGEL, 1996).

Os lipídios formam juntamente com os carboidratos e as proteínas, o grupo de compostos mais importante em alimentos e mais frequentemente encontrado na natureza, tanto em vegetais como em animais (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; BOBBIO e BOBBIO, 1992). São genericamente chamados de óleos quando são líquidos à temperatura ambiente (25 °C) e gorduras quando sólidos ou pastosos (BRASIL, 2005).

Os lipídios abrangem um número muito vasto de substâncias, razão pela qual não é possível defini-los exatamente, mas de maneira extremamente genérica podem ser considerados “compostos encontrados nos organismos vivos, geralmente insolúveis em água, porém solúveis em solventes orgânicos”. Todos os lipídios contêm carbono, hidrogênio e oxigênio na molécula; em alguns podem encontrar-se fósforo, nitrogênio e, às vezes enxofre (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Segundo BOBBIO e BOBBIO (1992), todas as gorduras comestíveis são constituídas por misturas de triacilgliceróis contendo quantidades variáveis de outras substâncias que podem fazer parte da natureza do produto, ou se formarem durante o

processamento. Uma vez que todos os óleos e gorduras são ésteres de ácidos graxos e glicerol, a diferença entre estes compostos se deve à natureza do(s) ácido(s) aos quais o glicerol está esterificado.

Os ácidos graxos são todos ácidos monocarboxílicos alifáticos de cadeia hidrocarbonada longa. Eles se distinguem pelo número de carbonos, geralmente par, e pelo número e localização das insaturações. Os óleos contêm maior quantidade de ácidos graxos insaturados do que as gorduras, as quais têm alto teor de ácidos graxos saturados, encontrados em manteiga, gorduras láuricas (coco, babaçu, palmiste), banha de porco e sebo bovino, enquanto os óleos são palma (dendê) e algodão (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; GAVA, SILVA e FRIAS, 2008; RIEGEL, 1996; BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono aparecem em pequenas quantidades em gorduras animais (C1 a C23), em óleos de pescado (C13 a C19) ou em óleos vegetais (C9 a C23), não superando em nenhum caso 1 a 2% do total da gordura (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

Quando aquecidos em soluções concentradas de álcalis, os lipídios são parcialmente hidrolisados (saponificados), sendo separados em duas frações denominadas fração saponificável e fração insaponificável, conforme pode ser observado no esquema da Figura 1.

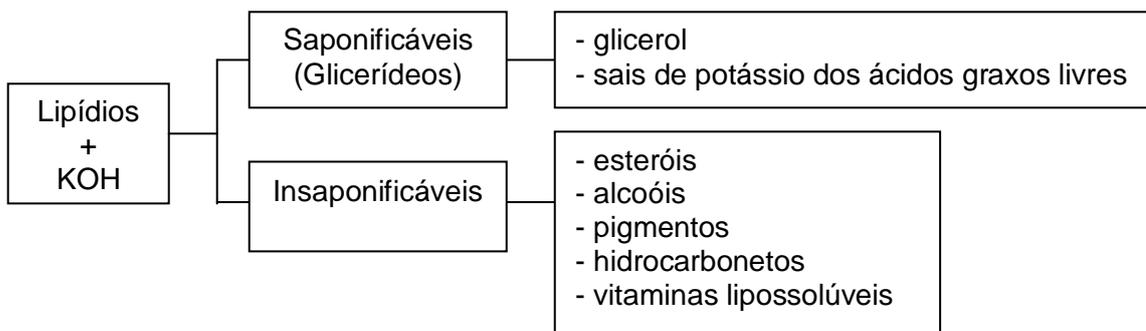


Figura 1. Frações saponificáveis e insaponificáveis dos lipídios

A fração saponificável dos lipídios é constituída pelos ésteres formados por ácidos graxos e glicerol, denominados glicerídeos. Todos os glicerídeos, por aquecimento com álcalis, são hidrolisados com formação de sais alcalinos dos ácidos graxos (sabões) e glicerol. Por acidificação dos sais, são obtidos ácidos graxos correspondentes.

O lipídio padrão é o triglicerídeo, também chamado de triacilglicerol (TAG), constituindo em média mais de 95% de toda a gordura corporal de animais (RIEGEL,

1996). Os lipídios são classificados basicamente em três grupos: simples, compostos e derivados. Os primeiros compreendem os glicerídeos (ésteres de glicerol) e ceras. Os lipídios compostos ou complexos dividem-se em fosfolipídios, cerebrosídeos e esteroides. Dentre os lipídios derivados, são encontrados produtos de hidrólise, como por exemplo, ácidos graxos, glicerol, alcoóis de peso molecular elevado, bases orgânicas nitrogenadas, ácido fosfórico, entre outros (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As gorduras e os óleos naturais são uma mistura de triacilgliceróis, sendo que em cada um há no mínimo dois ou três ácidos graxos diferentes. Sendo assim, diz-se que os óleos são uma mistura de triacilgliceróis mistos e não simples. O comprimento da cadeia e o grau de insaturação dos radicais dos ácidos graxos conferem as características físicas ao glicerídeo: quanto maior a presença de ácidos graxos insaturados, menor é o ponto de fusão (óleos) (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

1.1 Aspectos nutricionais dos ácidos graxos poli-insaturados

Há dois grupos distintos de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa: a série ômega 3 ($\omega 3$), na qual a primeira dupla ligação está localizada entre o terceiro e o quarto átomo de carbono na cadeia do ácido graxo e a série ômega 6 ($\omega 6$), na qual a primeira dupla ligação é observada entre o sexto e o sétimo átomo de carbono na cadeia do ácido graxo, iniciando a numeração dos carbonos a partir da metila terminal. Os ácidos graxos $\omega 3$ têm sido correlacionados com o aumento do HDL (bom colesterol), sendo encontrados em alguns alimentos vegetais e, principalmente, em óleos de pescado (linolênico, eicosapentaenoico e docosahexaenoico). Os ácidos linoleico e araquidônico, ambos pertencentes à família $\omega 6$, também são desejáveis (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008; LIMA *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos poli-insaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ podem influenciar em uma ampla variedade de funções biológicas porque são incorporados às membranas celulares, onde são elementos lipídicos estruturais de importância vital para as mesmas, sendo fundamentais na formação de novos tecidos, além de serem essenciais para o crescimento e manutenção das funções fisiológicas do organismo.

Os dois tipos não são interconversíveis e podem até antagonizar a ação um do outro. Por exemplo, como competem entre si por determinadas enzimas, a

presença do $\omega 6$ pode inibir a produção de alguns metabólitos do $\omega 3$, incluindo os precursores dos eicosanóides (LANDS, 1986). Desta forma, alterações nas relações desses ácidos na dieta podem levar a alterações profundas nos processos biológicos que envolvem os eicosanóides (prostaglandinas e tromboxanos), incluindo a inflamação e a coagulação do sangue. Assim, os ácidos graxos poli-insaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ influenciam nas funções biorregulatórias importantes do organismo, sendo essenciais para a saúde humana.

Os ácidos $\omega 3$ (ácido linolênico) e $\omega 6$ (ácido linoleico) são fundamentais na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares além de outras atuações importantes na hipertensão arterial, diabetes, artrites e doenças autoimunes. Esses ácidos graxos são também empregados em terapia farmacológica, potencializando o efeito de certas drogas e no crescimento e desenvolvimento de crianças (CARVALHO *et al.*, 2003).

Após a ingestão, os ácidos graxos são absorvidos pelas células e tecidos podendo ser dessaturados ou alongados a outros ácidos poli-insaturados de cadeia longa. Os processos de alongação e dessaturação do ácido linoleico e linolênico ocorrem nos animais e, vagarosamente nos homens originando diversos metabólitos, como representado na Figura 2 (CARVALHO *et al.*, 2003; ZAREVÚCKA *et al.*, 2003).

Os ácidos graxos podem ser sintetizados no organismo do ser humano, com exceção dos ácidos linolênico ($\omega 3$) e linoleico ($\omega 6$). Entretanto, estes possuem funções indispensáveis ao metabolismo. A partir destes ácidos graxos são sintetizados outros ácidos graxos (poli-insaturados) de importância fundamental para o organismo: o ácido araquidônico (formado por dessaturação e alongamento da cadeia do ácido linoleico), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) ambos formados por dessaturação e alongamento da cadeia do ácido linolênico.

Embora os ácidos graxos poli-insaturados possam ser sintetizados no corpo a partir da biotransformação dos ácidos graxos essenciais por reações de alongação e dessaturação, a ingestão direta dos metabólitos ativos tem se mostrado eficiente, principalmente para gestantes, idosos, lactantes, crianças prematuras (INNIS, 2000) e para indivíduos que apresentem insuficiência da enzima $\Delta 6$ -dessaturase, decorrente de carências nutricionais ou do próprio envelhecimento (CARVALHO *et al.*, 2003).

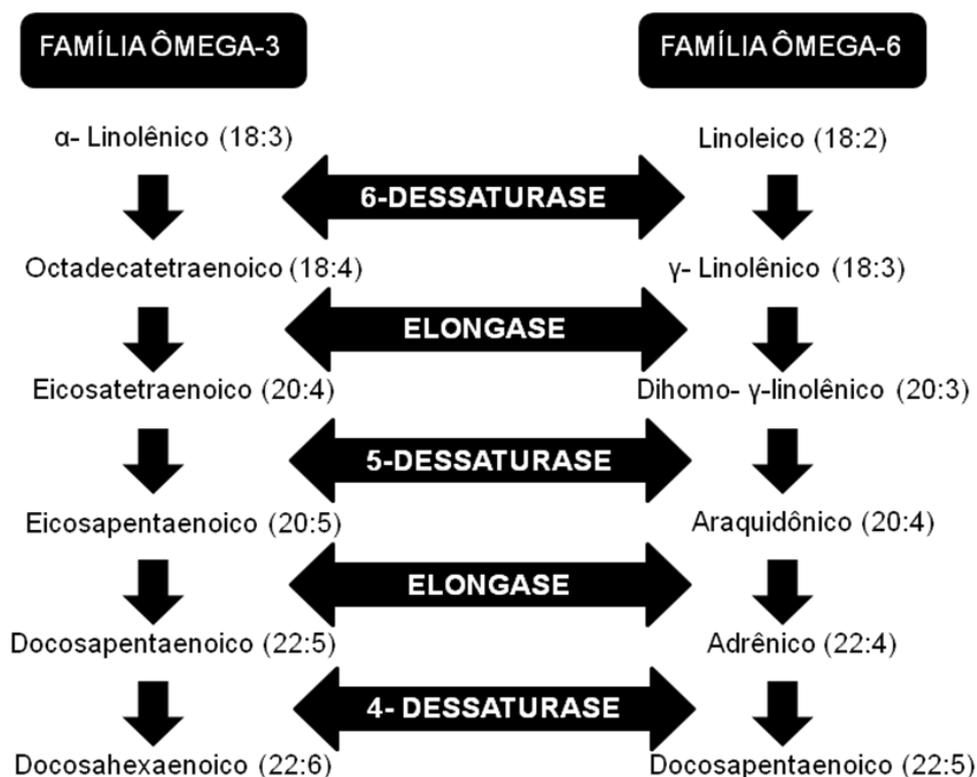


Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos essenciais

1.2 Óleo de soja

O óleo de soja é o óleo comestível obtido de sementes de *Glycine max* L. Merrill (soja) através de processos tecnológicos adequados (BRASIL, 1999). O emprego de óleo de soja apresenta muitas vantagens, tais como: alto conteúdo de ácidos graxos essenciais; formação de cristais grandes, que são facilmente filtráveis quando o óleo é hidrogenado e fracionado; alto índice de iodo, que permite a sua hidrogenação produzindo grande variedade de gorduras plásticas, e refino com baixas perdas (POUZET, 1996 *apud* SILVA e GIOIELLI, 2006).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com 28% do total produzido em 2007, sendo superado somente pelos Estados Unidos que produziu 32% da soja mundial (ATLAS, 2009). Segundo CONAB (2009), o Brasil produziu 61 milhões de toneladas de soja em grãos na safra 2008/2009, sendo estimado até 63 milhões para safra 2009/2010. Desta quantidade, a pesquisa indica uma produção entre 8,19 e 8,35 milhões de toneladas correspondentes ao estado do Rio Grande do Sul, sendo superado pelo Mato Grosso (entre 17,91 e 18,17 milhões de toneladas) e

Paraná (entre 12,78 e 13,02 milhões de toneladas). Em relação à produção de óleo de soja, o Brasil produziu 5,9 milhões de toneladas no período 2007/2008.

As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, a composição de ácidos graxos e as características físico-químicas do óleo de soja.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo de soja

Ácido graxo	Nomenclatura	Óleo de soja (g/100g)
C < 14	-	< 0,1
C 14:0	Mirístico	< 0,5
C 16:0	Palmítico	7,0 - 14,0
C 16:1	Palmitoleico	< 0,5
C 18:0	Esteárico	1,4 - 5,5
C 18:1	Oleico	19,0 - 30,0
C 18:2	Linoleico	44,0 - 62,0
C 18:3	Linolênico	4,0 - 11,0
C 20:0	Araquídico	< 1,0
C 20:1	Eicosaenóico	< 1,0
C 22:0	Behênico	< 0,5

Fonte: BRASIL, 1999.

Tabela 2. Características físico-químicas do óleo de soja

	Óleo de soja
Densidade relativa	0,919 - 0,925 (20°C/20°C)
	0,916 - 0,922 (25°C/25°C)
Índice de refração (n_D^{40})	1,466 - 1,470
Índice de saponificação	189 - 195
Índice de iodo (Wijs)	120 - 143
Matéria insaponificável (g/100g)	Máximo 1,5
Acidez (g de ácido oleico/100g)	
óleo refinado	Máximo 0,3
óleo semirrefinado	Máximo 0,5
óleo degomado e descerado	Máximo 1,0
óleo bruto	Máximo 2,0
Fósforo, g/100g	
óleo degomado e descerado	Máximo 0,02
Índice de peróxido (meq/kg)	Máximo 10

Fonte: BRASIL, 1999.

1.3 Gordura de frango

O Brasil é o líder mundial nas exportações de frango (3,6 milhões de toneladas) e o terceiro maior produtor (10,9 milhões de toneladas) (ABEF, 2009). Considerando a produção nacional, cerca de 436 mil ton/ano de resíduos estão sendo gerados. A pele de frango é um dos vários subprodutos das indústrias processadoras da carne de frango que são considerados como resíduos, pouco aproveitada ou subutilizada está numa proporção de 4% em relação ao peso vivo do animal. Devido a esta alta proporção, gera custos adicionais de eliminação e problemas ao meio ambiente, além da perda de um produto com potencial alimentício (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

Segundo Centenaro, Furlan e Souza-Soares (2008), o trato inadequado dos resíduos industriais também contribui para o agravamento dos problemas ambientais, pois os produtos, que não podem ser transformados em farinhas, por exemplo, são lançados nos rios, o que leva à poluição, cujas consequências são conhecidas. Por isso, é preciso minimizar os resíduos gerados, antes mesmos destes chegarem à graxaria das indústrias. As práticas de minimização de resíduos são vantajosas, pois oferecem uma possibilidade de economizar produtos e processos para tratá-los, tendo em vista o controle ambiental.

Os produtos avícolas apresentam um mercado crescente, uma vez que estes não são proibidos por nenhuma religião, assim a gordura de frango pode ser incorporada em produtos requintados (*delicatessen*) como carnes, apresentando substancial valor nutritivo, devido à composição diferenciada em ácidos graxos insaturados em comparação com outras gorduras de origem animal, atraindo um maior número de consumidores (ARNAUD *et al.*, 2004; MOTTRAM, CROSSMAN e EVERSLED, 2001). Segundo Chiu, Gioielli e Grimaldi (2008b), a gordura de frango apresenta-se líquida ou semilíquida à temperatura ambiente, podendo ser utilizada para diversos fins alimentícios, tais como condimentos, bolos e frituras. Além disso, também pode ser utilizada para melhorar a consistência de cremes cosméticos.

De acordo com Brockerhoff, Hoyle e Wolmark (1966), a posição *sn-2* do triacilglicerol da gordura de frango é composta por 80% de ácidos graxos insaturados e 20% de saturados, o que a torna mais nutricional e fisiologicamente disponível. Mottram, Crossman e Evershed (2001) verificaram que enquanto a gordura de carne bovina ou ovina possuem tanto isômeros cis quanto trans do ácido oleico, as gorduras

de frango e de porco, possuem apenas o isômero *cis*. Os ácidos graxos mais abundantes no triacilglicerol encontrados por estes autores para gordura de frango foram: POO, POL, LOO, OOO e PPO, sendo as letras P, O, L representadas pelos ácidos palmítico, oleico e linoleico, respectivamente.

Sheu e Chen (2002) compararam o perfil lipídico da pele, tecido adiposo e carne de frango e observaram que não houve diferença significativa para nenhum ácido graxo nos três diferentes cortes. Foi obtido uma média de 43% de ácido oleico (o ácido graxo mais abundante), 27% de palmítico e 14% de linoleico. Outros autores também encontraram uma composição similar (CHIU, GIOIELLI e GRIMALDI, 2008a; BELLAVER e ZANOTTO, 2004; FERRARI e KOLLER, 2001; LEE e FOGLIA, 2000b).

Mottram, Crossman e Evershed (2001) ao comparar a composição de ácidos graxos de origem animal, observaram que a gordura de frango apresentou uma proporção consideravelmente mais elevada (65%) de ácidos graxos insaturados do que a carne de ovelha (37%) ou de vaca (33%) e uma proporção inferior de ácido esteárico (10%), quando comparada à gordura bovina (31%), ovina (32%) ou banha de porco (14%).

Comparada a outras fontes de gordura animal, a de frango possui a maior quantidade de insaturados, de 65-68%, (SHEU e CHEN, 2002; MOTTRAM, CROSSMAN e EVERSHED, 2001; LEE e FOGLIA, 2000b), enquanto que a banha contém 52-55% (SILVA e GIOIELLI, 2006; BELLAVER e ZANOTTO, 2004; YANG *et al.*, 2003) e o sebo bovino, 44-45% (PINTO *et al.*, 2005; BELLAVER e ZANOTTO, 2004).

Chiu, Gioielli e Grimaldi (2008a) estudaram a mistura de gordura de frango e triacilgliceróis de cadeia média, constatando a obtenção de lipídios estruturados de cadeia média, mono-insaturados e essenciais, com composição equilibrada, além de haver o surgimento de novos triacilgliceróis, inexistentes nas amostras originais. De acordo com Lee e Foglia (2000b), a gordura de frango contém cerca de 60% de ácidos graxos insaturados. Dentre estes, destacam-se os mono-insaturados (AGMI), os quais são encontrados numa proporção de 45 a 50%, principalmente o oleico, o qual é associado à redução do risco de enfermidades cardiovasculares, pois reduz os níveis de colesterol sanguíneo em indivíduos não-hipertrigliceridêmicos.

Rodrigues *et al.* (2005) sugeriram o emprego da gordura abdominal de frango como matéria-prima para a produção de biodiesel. Segundo Gomes (2005), no abate de aves, são descartados sangue, penas, vísceras não comestíveis, ossos, resíduos e rejeitos, ou seja, 30% do peso da ave em resíduos e destes, 11,3% são

constituídos de gordura. O mesmo autor estudou o potencial de cinco cooperativas paranaenses em produzir óleo de vísceras e biodiesel, estimando uma produção anual aproximada de 20.400 ton de óleo e 19.500 ton de biodiesel.

1.4 Triacilgliceróis de cadeia média (TCM)

A fabricação de TCM foi iniciada a partir de 1950, pelos trabalhos de Babayan (SOUZA-SOARES, 1980). Neste trabalho, os ácidos graxos foram liberados por hidrólise do óleo de côco, e destilados, sendo que a fração volátil, contendo ácidos graxos com 8 a 10 carbonos, foi usada na reesterificação do glicerol para produzir TCM. Curi *et al.* (2002) cita a aplicação clínica de TCM desde 1952 no tratamento de disfunções na absorção de lipídios ou como fonte de energia em nutrição enteral e parenteral, substituindo as dietas baseadas em triacilgliceróis de cadeia longa (TCL).

Os TCM são compostos principalmente pelos ácidos caprílico (C8:0; 50-80%) e cáprico (C10:0; 20-50%), com uma proporção menor dos ácidos capróico (C6:0; 1-2%) e láurico (C12:0; 1-2%) (TRAUL *et al.*, 2000). Estes triacilgliceróis fornecem uma fonte rápida e concentrada de energia que é facilmente absorvida e digerida. Além disso, os TCM melhoram a absorção de outras gorduras. Quando os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são parte de um lipídio estruturado de ótima configuração, isto é com os AGCM somente em *sn*-1 e *sn*-3, a hidrólise da molécula de triacilglicerol acontece mais rapidamente assim como a absorção de ácidos graxos essenciais (FILLETI JUNIOR, 2005).

As vantagens dos TCM, particularmente para indivíduos com digestão prejudicada, derivam principalmente da sua absorção e transporte rápido ao fígado pela via portal. A hidrólise dos TCM não requer a ação da lipase pancreática e a absorção não necessita envolver o sistema linfático. Ainda, se comparada com a hidrólise dos TCL, a dos TCM é mais rápida e completa, sendo a velocidade no trânsito intestinal maior, ocorrendo absorção na porção proximal (CURI *et al.*, 2002).

Os AGCM são absorvidos no intestino tão rapidamente quanto à glicose, porém os TCM fornecem duas vezes mais calorias por grama do que os carboidratos. Uma vez no fígado, os AGCM são oxidados rapidamente. Os ácidos C8:0 e C10:0 não requerem carnitina para atravessar a membrana mitocondrial, uma vantagem para pessoas extremamente doentes, que podem apresentar uma deficiência em carnitina. O ácido caprílico (C8:0) é o melhor ácido graxo como fonte de energia rápida, uma vez

que o ácido cáprico (C10:0) seja provavelmente absorvido no sistema linfático e distribuído aos tecidos periféricos antes de se oxidar (FILLETI JUNIOR, 2005).

O comprimento da cadeia dos ácidos graxos exerce influência no seu comportamento no organismo (Figura 3). Os AGCL deixam o intestino na forma de TCL, pela via linfática, após a incorporação nos quilomícrons. A maioria dos AGCL é liberada para os tecidos extra-hepáticos devido à hidrólise intravascular sofrida por uma parcela de quilomícrons, sendo a parcela restante transportada para o fígado. Os AGCL atingem o fígado como AG ligados a albumina ou como triacilgliceróis. Por outro lado, os AGCM, que se encontram na forma livre após serem digeridos, seguem para o fígado, fracamente ligados a albumina. Cerca de 80 a 100% dos AGCM presentes em todo o fluxo portal é captado pelo fígado, a fração remanescente segue pela corrente sanguínea e torna-se disponível aos tecidos periféricos (CURI *et al.*, 2002).

A presença de atividade da lipase lipoproteica (LPL) é um fator que interfere na distribuição tecidual dos lipídios na dieta. Essa enzima localiza-se no endotélio dos vasos que irrigam os músculos, local principal de oxidação dos AG, e do tecido adiposo, local mais importante para armazenamento desses. A taxa de captação dos TG é proporcional à atividade da LPL no tecido, esta enzima direciona os ácidos graxos para oxidação (no músculo) ou armazenamento como TG (no tecido adiposo), como ilustrado na Figura 3. Esses processos estão relacionados essencialmente aos AGCL, que são transportados associados aos quilomícrons ou a lipoproteínas de peso molecular muito baixo (VLDL), e em menor proporção aos AGCM que são pouco incorporados nessas lipoproteínas (CURI *et al.*, 2002).

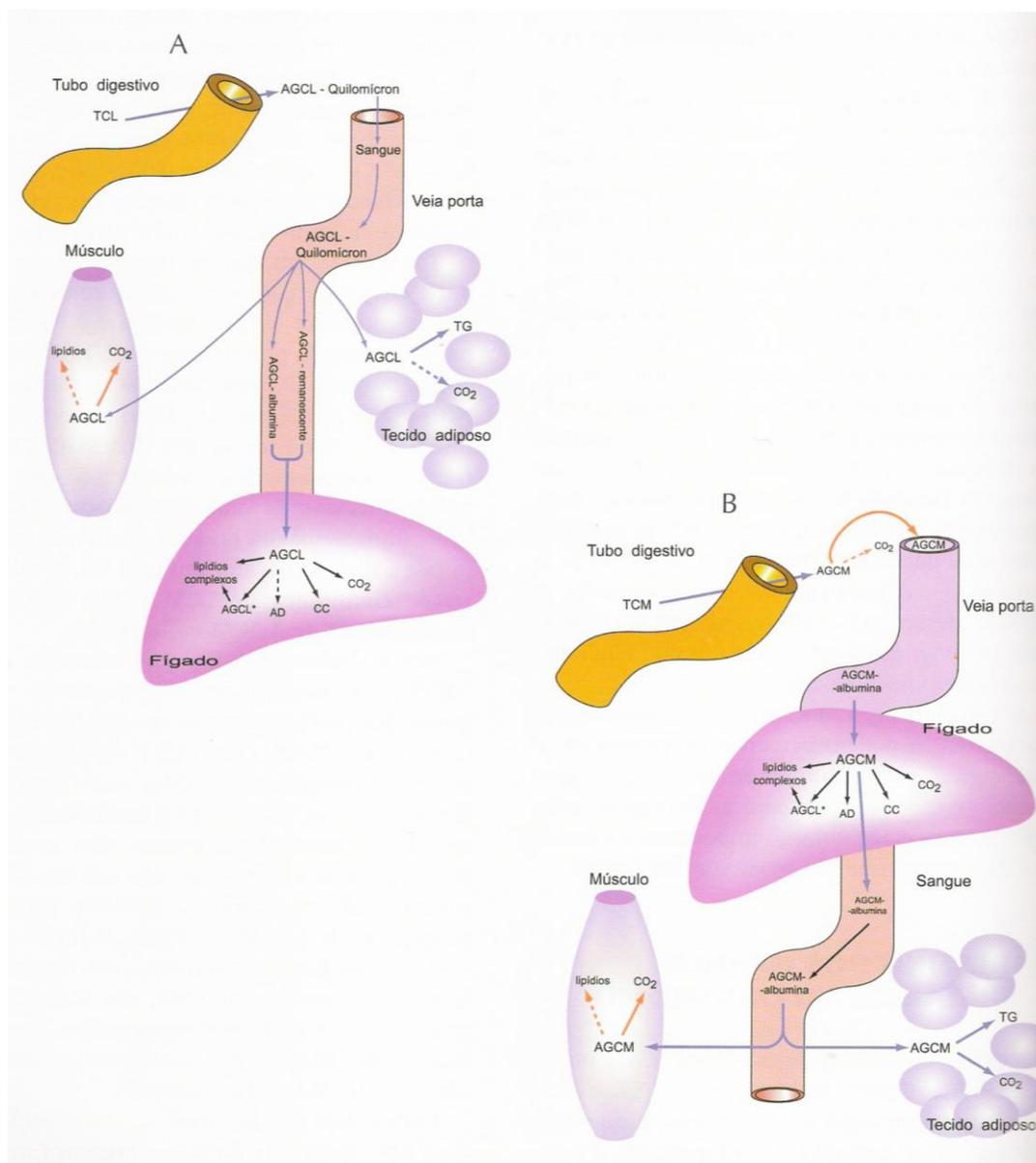


Figura 3. Transporte, distribuição e destino metabólico dos ácidos graxos conforme tamanho da cadeia carbônica

AD = ácidos dicarboxílicos; CC = corpos cetônicos, AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; AGCL* = ressíntese, alongação e/ou insaturação de ácidos graxos de cadeia longa; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; TCL = triacilgliceróis de cadeia longa; TCM = triacilgliceróis de cadeia média; TG = triacilgliceróis.

Fonte: Curi *et al.* (2002).

1.5 Ácidos graxos ramificados

Os ácidos graxos ramificados são encontrados principalmente em lipídios de fungos e bactérias. Esses lipídios foram detectados em poucos fungos numa proporção de 1% ou menos em relação aos ácidos graxos totais (TYRRELL, 1968). Ácidos graxos ramificados monometil (AGRmm) são encontrados nos lipídios de origem vegetal, animal e microbiana, mas em pequenas concentrações. Em animais, alguns exemplos clássicos destes compostos incluem ácidos graxos 2 e 4-monometilados da glândula uropigial de patos, bem como da glândula da cobaia *Harderiana*. Ácidos graxos iso e anteiso de 8-30 átomos de carbono estão presentes em altas proporções no sebo e *vernix caseosa* (biofilme que cobre o feto humano) (CYBERLIPIDS, 2010).

Uma variedade de ácidos graxos ramificados tem sido identificada. Além da nomenclatura padrão, vários termos comuns têm sido utilizados, incluindo iso e anteiso (Figura 4) com uma ramificação metil no penúltimo e antepenúltimo carbono, respectivamente. Exemplo: o ácido 14-metil pentadecanóico (isopalmítico) é da série iso e o ácido 13-metil pentadecanóico é o correspondente ácido anteiso (CYBERLIPID, 2010; O'KEEFE, 2008).

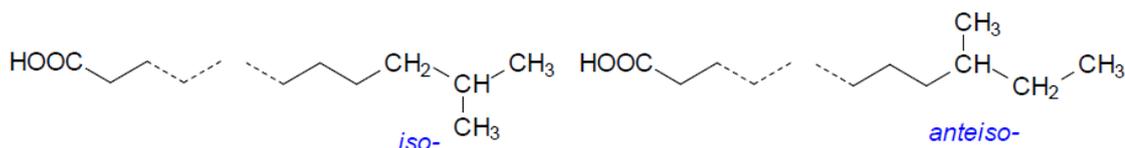


Figura 4. Posições dos grupos ramificados iso e anteiso

Fonte: LIPID LIBRARY, 2010 (lipidlibrary.aocs.org)

Kniazeva *et al.* (2004) relatam que AGRmm são comumente encontrados desde bactérias até os mamíferos. Nos seres humanos, têm sido detectados na pele, cérebro, sangue e células cancerígenas. Apesar da ampla distribuição, esses lipídios permanecem exóticos em eucariotos, onde a sua origem e funções fisiológicas não são compreendidas. Os mesmos autores constataram que *Caenorhabditis elegans* é capaz de sintetizar C15-iso e C17-iso, e que esses ácidos graxos de cadeia ramificada são essenciais para o crescimento do animal e desenvolvimento. Estes resultados sugerem que esses ácidos graxos podem desempenhar um papel potencialmente importante em outros eucariotos. Ácidos ante-iso monometil ramificados de cadeia

longa também foram identificadas em partículas assentadas e sedimentos de superfície de lagos de água doce, onde podem ser marcadores moleculares úteis para a acidez do lago.

Os ácidos graxos ramificados metil-substituídos de origem bacteriana são comumente encontrados em sedimentos marinhos ou lacustres, diminuindo rapidamente com a profundidade. Os ácidos ramificados de cadeias curtas são encontrados no tecido adiposo de animais ruminantes, no sebo animal e ceras (de lã). Uma enorme variedade de ácidos graxos (C10-C18), contendo de 1 a 4 grupos metil ramificados, foram detectados no tecido adiposo de cordeiros. Ácidos ramificados multimetílicos também são dominantes na cera uropigial da glândula de aves e na cabeça de animais marinhos com a função de auxiliar estes animais na sua localização no mar (CYBERLIPIDS, 2010).

Os compostos ácidos ramificados são de interesse comercial porque a ramificação pode causar algumas mudanças vantajosas nas propriedades físicas, enquanto retém o mesmo (ou quase) número de átomos de carbono. Por exemplo, eles possuem uma faixa de liquidez mais ampla, os tornando interessantes em aplicações que usam baixa temperatura, como a propriedade de espalhabilidade. Esses tipos de lipídios são utilizados em surfactantes, lubrificantes, cosméticos e como aditivos em polímeros, antiespumantes, e agentes protetores da madeira (BIERMANN e METZGER, 2008; BEHR e LAUFENBERG, 1991 *apud* KNOTHE, KENAR e GUNSTONE, 2007). De acordo com Kinsman (1979), ácidos graxos ramificados e seus derivados geralmente têm boa estabilidade oxidativa e térmica, além de melhor solubilidade, quando comparados aos ácidos de cadeia linear.

Várias reações produzem compostos ácidos ramificados. Em alguns casos, especialmente se a matéria-prima apresenta uma ligação dupla terminal, pode ocorrer a extensão da cadeia, ao invés da ramificação. Quando os ramificados são introduzidos, a reação pode ocorrer com retenção ou saturação da ligação dupla, geralmente com mudança na configuração. Zeólitas ácidas, especialmente aquelas com poros grandes catalisam a isomerização de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa para outros compostos contendo ramificações metil e etil com o mesmo número de carbonos, via intermediários carbocátions (KNOTHE, KENAR e GUNSTONE, 2007).

2 Caracterização de óleos e gorduras

A pureza e a qualidade de óleos e gorduras, obtidos de diferentes fontes vegetais e animais, são fatores determinantes na sua comercialização, tanto a nível industrial como de consumo. Os testes de identidade ou pureza e qualidade relacionam-se com a estrutura molecular dos óleos e gorduras (ZAMBIAZI, 2003).

Os índices usados para garantir identidade e pureza são os índices de refração e iodo. Para garantir qualidade são comumente usados os índices de acidez, peróxido, p-anisidina, TBA, valor totox e a matéria insaponificável.

2.1 Rancidez hidrolítica e oxidativa

Segundo Ordóñez-Pereda (2005) a rancidez que ocasiona a deterioração de óleos e gorduras, pode ocorrer através de duas formas diferentes:

- *Rancidez hidrolítica*: hidrólise da ligação éster dos triacilgliceróis pela ação da lipase e umidade, com formação de ácidos graxos livres que causam sabor-odor desagradáveis, principalmente quando presentes ácidos graxos de baixo peso molecular. É determinada pelo índice de acidez.

- *Rancidez oxidativa*: autooxidação dos acilgliceróis com ácidos graxos insaturados por oxigênio atmosférico. Este tipo de deterioração é o mais importante, porque todo o tipo de gordura possui triacilgliceróis insaturados. Evidências experimentais demonstram que os hidroperóxidos são os produtos primários predominantes, mas não exclusivos, da autooxidação de gorduras insaturadas. Os estágios de rancidez podem ser detectados antes que se perceba a deterioração sensorial, pelos índices de peróxido (IP), p-anisidina (IpA) e ácido tiobarbitúrico (TBA).

O Quadro 1 resume os índices mais comuns na determinação da rancidez hidrolítica e oxidativa, segundo diversos autores (RODRIGUES, ONOYAMA e MEIRELLES, 2006; KANAVOURAS, CERT e HERNANDEZ, 2005; RAVI, PRAKASH e BHAT, 2005; BESBES *et al.*, 2004; CECCHI, 2003; NIELSEN, 2003; ZAMBIAZI, 2003; BACCAN *et al.*, 2001; ZAMBIAZI, 1999; ESTEVES, GONÇALVES e BARRERA-ARELLANO, 1995; KRISHNAMURTY, 1982; COCKS e VAN REDE, 1966; MEHLENBACHER, 1960).

Quadro 1. Índices para determinar a rancidez em óleos e gorduras

Caracterização	Princípio	Determinação	Indicação
Índice de acidez	Expressa a porcentagem de ácido oleico (presente na maioria dos alimentos)	Neutralização com base; mg KOH necessários para neutralizar ácidos graxos livres em 1 g de óleo	Índice de qualidade, estado de conservação de grãos e de deterioração de óleos e gorduras
Índice de peróxido (IP)	Habilidade do peróxido em liberar o iodo do iodeto de potássio em solução de ácido acético glacial	Mede hidroperóxidos, pela titulação com tiosulfato	Determinar ou estimar o grau de oxidação (meq/kg)
Índice de p-anisidina (IpA)	Aldeídos reagem com p-anisidina formando um cromogênio, que é medido espectrofotometricamente	Determina os aldeídos (produtos de hidroperóxidos, os quais aumentam continuamente). O IpA define-se como 100 vezes o valor da absorvância, medida a 350 nm, de uma solução resultante da reação de 1 g de lipídio em 100 ml de solvente contendo p-anisidina	Estima a quantidade de α e β aldeídos insaturados (principalmente 2-alquenais, 2,4 dienais), os quais são produtos de oxidação secundários, em óleos e gorduras. Fornece indicações da possível estabilidade
Valor totox	Estimar o valor total de oxidação lipídica	Valor totox = IpA + (2 x IP)	Indica a oxidação total de uma amostra usando os valores de p-anisidina e de peróxido
Índice de TBA	A oxidação de gorduras produz compostos que reagem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) originando produtos de coloração vermelha (resultante da condensação de 2 moléculas de TBA e uma de dialdeído malônico)	Dissolução da amostra de gordura em um solvente orgânico e extração do material reativo com uma solução de ácido acético-TBA-água. O extrato aquoso, com o aquecimento, desenvolverá uma coloração vermelha se a gordura estiver oxidada	Determinar o grau de oxidação

2.2 Outros métodos de caracterização lipídica

No Quadro 2 estão mostradas algumas caracterizações físico-químicas realizadas em óleos e gorduras (BORGIO e ARAÚJO, 2005; KOBORI e JORGE, 2005; JORGE *et al.*, 2005; RAVI, PRAKASH e BHAT, 2005; GREGÓRIO e ANDRADE, 2004; LAMBELET, GRANDGIRARD e GREGOIRE, 2003; ZAMBIASI, 2003, 1999; MORETTO e FETT, 1998; TYAGI e VASISHTHA, 1996).

Quadro 2. Outras caracterizações físico-químicas de óleos e gorduras

Caracterização	Princípio	Determinação	Indicação
Matéria insaponificável (MI)	Corresponde à quantidade total de substâncias dissolvidas nos óleos e gorduras que após saponificação com álcalis são insolúveis em solução aquosa, mas solúveis em solventes comuns de lipídios	Saponificação com álcalis, seguido de titulação. Incluem-se todas as substâncias presentes em óleos e gorduras como fenóis, tocoferóis, carotenóides, clorofilas, esteróis, hidrocarbonetos e impurezas como óleo mineral, exceto os TAG	Quantifica as impurezas nos óleos, polimerização, e preparo para análise posterior da fração não saponificável
Índice de saponificação (IS)	Reação dos TAG com solução alcalina (sódio ou potássio), onde se forma sais alcalinos de ácidos graxos (sabões) e glicerol	É o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar 1 g de óleo ou gordura	Estimativa do peso molecular médio dos constituintes ácidos
Índice de Iodo (II)	Medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes em um óleo ou gordura	Representa o número de gramas de iodo absorvido por 100g de gordura ou óleo	O II é característico para determinado óleo/gordura. Quanto maior o número de duplas ligações, mais reações de adição ocorrerão, maior será o II
Índice de refração (IR)	Baseado na relação que existe entre a velocidade com que a luz atravessa o ar e a velocidade com que a luz atravessa o óleo	Realizada em refratômetro constituído de prismas termostatizados, onde se coloca a amostra, e após incide luz monocromática. O IR representa a relação entre os senos dos ângulos de incidência e de refração da luz	Este índice é característico para um determinado óleo, estando relacionado com o grau de insaturação do mesmo

2.3 Perfil lipídico

O perfil lipídico diz respeito ao somatório do percentual dos ácidos graxos presentes em uma amostra pela comparação das áreas dos picos a serem analisados com os respectivos padrões. Para tal, a cromatografia a gás é um dos procedimentos mais utilizados, devido à sua excelente sensibilidade, é capaz de separar e detectar centenas de compostos simultaneamente, sendo muito utilizada na análise de óleos e gorduras na determinação de ácidos graxos e grau de oxidação (CECCHI, 2003). Essa técnica separa gases e substâncias voláteis por migração diferencial em um sistema que compreende uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gás). Sua grande vantagem reside em seu alto poder de resolução, superior às outras técnicas cromatográficas (SOARES, 2006). O processo físico básico de separação é por adsorção, sendo que a fase móvel é sempre um gás, que deve ser inerte, pois terá a função de apenas transportar os componentes da amostra através da coluna, sem nenhum tipo de afinidade entre eles (CECCHI, 2003).

2.4 Análise posicional dos triacilgliceróis

Análises regioespecíficas das gorduras geralmente envolvem a degradação de moléculas do triacilglicerol com brometo de alil magnésio, conhecida como degradação de Grignard. Este método faz uso de placas de cromatografia em camada delgada impregnadas com solução ácido bórico. As mesmas são deixadas para secar do dia para a noite. As amostras são dissolvidas em éter etílico e parcialmente degradadas com brometo de alil magnésio (AMB). Após adição de tampão ácido para interromper a reação, a fase aquosa é removida e o extrato lavado com ácido bórico e seco com sulfato anidro transferido para um tubo de vidro pequeno. O solvente é removido sob N_2 e o resíduo re-dissolvido em éter etílico e aplicado a placa cromatográfica (ZHANG *et al.*, 2009). Posteriormente é feito um isolamento dos monoacilgliceróis da posição 2 (*sn-2*) por cromatografia de camada delgada e transmetilação dos monoacilgliceróis, sendo a determinação da composição de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) realizada pela análise por cromatografia gasosa (GC) (Xu-minireator) ou gás-líquida (NIELSEN *et al.*, 2006).

Outros autores (Alim *et al.*, 2008) realizam a hidrólise com lipase pancreática para conhecer a posição dos ácidos graxos. Se isola a posição *sn*-2 em camada delgada, estimando-se as outras posições através da Equação 1.

$$Sn_{1,3}(\%) = \frac{(3T - sn_2)}{2} \quad (1)$$

Onde

T = conteúdo de ácidos graxos totais encontrados na amostra lipídica.

É possível ainda a utilização da ressonância magnética nuclear (NMR) para análise da posição dos ácidos graxos da molécula de triacilglicerol. Lee e Foglia (2000b) registraram espectros na concentração de 8% (80 mg da amostra em 1 mL clorofórmio) em tubos de 5 mm próprios para análise por NMR.

3 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas (hidrolases) que podem catalisar a hidrólise da ligação éster carboxílica de acilgliceróis de cadeia longa na interface óleo/água. O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (CASTRO *et al.*, 2004). Elas são amplamente difundidas, existindo em plantas, animais e microrganismos. Várias espécies de microrganismos, dentre elas bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir lipase (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; HASAN, AAMER e HAMEED, 2006; LI, WANG e TAN, 2006; COSTA e AMORIM, 1999; MAIA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana (não produzem metabólitos tóxicos), sendo reconhecidas como seguras “*Generally Recognized as Safe*” – GRAS (FDA, 2007).

A diferença mais importante entre as “verdadeiras” lipases e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam atividade de Michaelis-Menten normal (a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato [S] aumenta, até um limite por saturação), as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica), porém somente em concentração acima desta, é chamada de ativação interfacial, mecanismo que está associado a mudanças conformacionais na enzima (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; COSTA e AMORIM, 1999).

As lipases têm sido extensivamente usadas em tecnologia de triacilgliceróis, sendo aplicadas, principalmente, na biotransformação de óleos e gorduras. Estas enzimas podem catalisar reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico e, portanto, produzir ésteres por uma rota biocatalítica. Além disso, o uso de lipases traz as vantagens de altas seletividade, especificidade pelo substrato, enantioseletividade e estabilidade em solventes orgânicos, além de condições

operacionais moderadas, não requerendo a presença de co-fatores, reduzindo a poluição ambiental e possuindo a habilidade de aperfeiçoamento por meio da engenharia genética, uso para produção de biomoléculas de interesse e disponibilidade a partir de várias fontes (FERNANDES *et al.*, 2007; MATEOS *et al.*, 2007b; CASTRO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004b; XU, 2000).

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO *et al.*, 2004).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40 °C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998 e VULFSON, 1994 *apud* CASTRO *et al.*, 2004).

3.1 Classificação

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade, conforme descrito por Castro *et al.* (2004) e Carvalho *et al.* (2003):

- a) Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa de TAG em qualquer posição (modo aleatório) da estrutura do grupo acil, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou a posição em que ele está esterificado no glicerol. Exemplos são as lipases de *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Corynebacterium acnes*,

Penicillium cyclopium, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus curveus*.

- b) Lipases 1,3 específicas: liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regioseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico. As lipases de *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roquefortii* e *Pseudomonas fragi* pertencem a esse grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase 1,3 específica, e algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade.
- c) Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e dentre o exemplo mais estudado está a lipase de *Geotrichum candidum* (BURKERT, MAUGERI, RODRIGUES, 2004; BURKERT, 2003)

A possibilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras. Também merece referência a estereoespecificidade, ou seja, a capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica. A especificidade estrutural ou regioseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantiômeras.

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de ésteres. Esta reação ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acil no glicerídeo, de tal forma que, num dado momento, a mistura reacional contém não somente

triacilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (Figura 5).

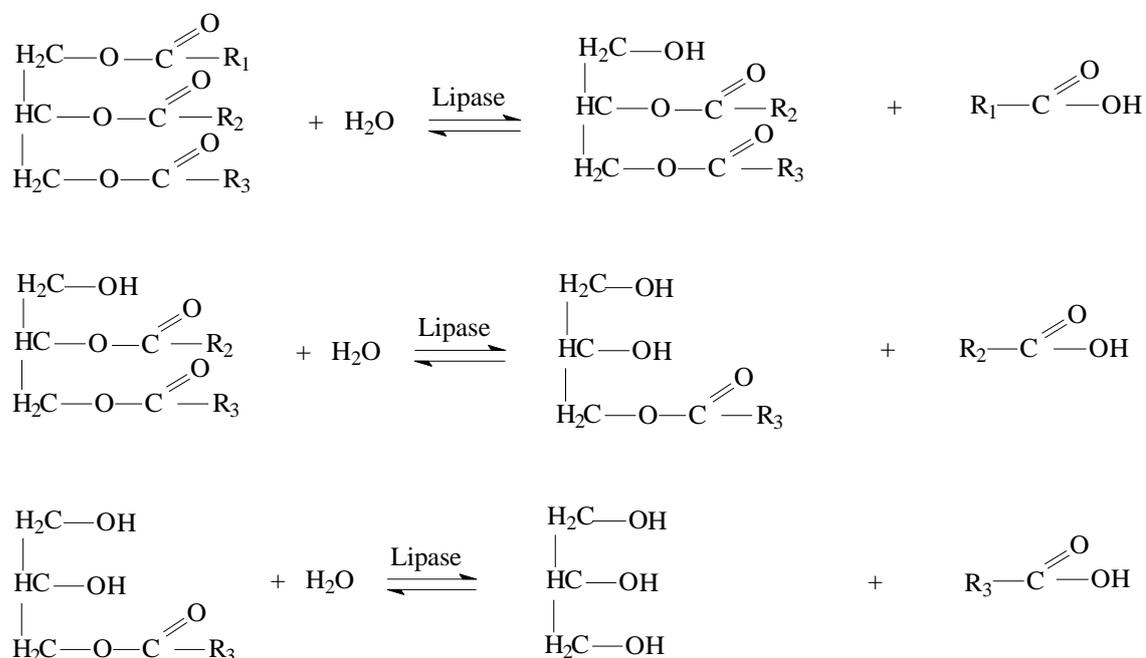


Figura 5. Hidrólise sequencial dos grupos acil no glicerídeo, catalisada por lipases

A reação enzimática de interesterificação tem algumas características em comum com as reações da química clássica correspondente, mas os princípios que governam a regioespecificidade são diferentes e justificam, em muitos casos, a utilização dos processos enzimáticos.

Conforme a ilustração esquemática da Figura 6, os produtos resultantes da reação de interesterificação de uma mistura de TAGs (6b) ou entre TAG e ácidos graxos livres (6d), catalisada por lipases regioespecíficas para as posições 1 e 3, permite que o processo seja dirigido para a formação de produtos com composição e propriedades peculiares. O mesmo pode ser constatado com o uso de lipase ácido graxo específica (6e). Em contrapartida, os produtos obtidos com o uso de lipases não regioespecíficas são similares àqueles obtidos por interesterificação química, onde ocorre uma redistribuição aleatória (randomização) dos ácidos graxos nos TAGs (6a e 6c) dificultando, em muitos casos, a obtenção de produtos com propriedades desejadas e com maior pureza.

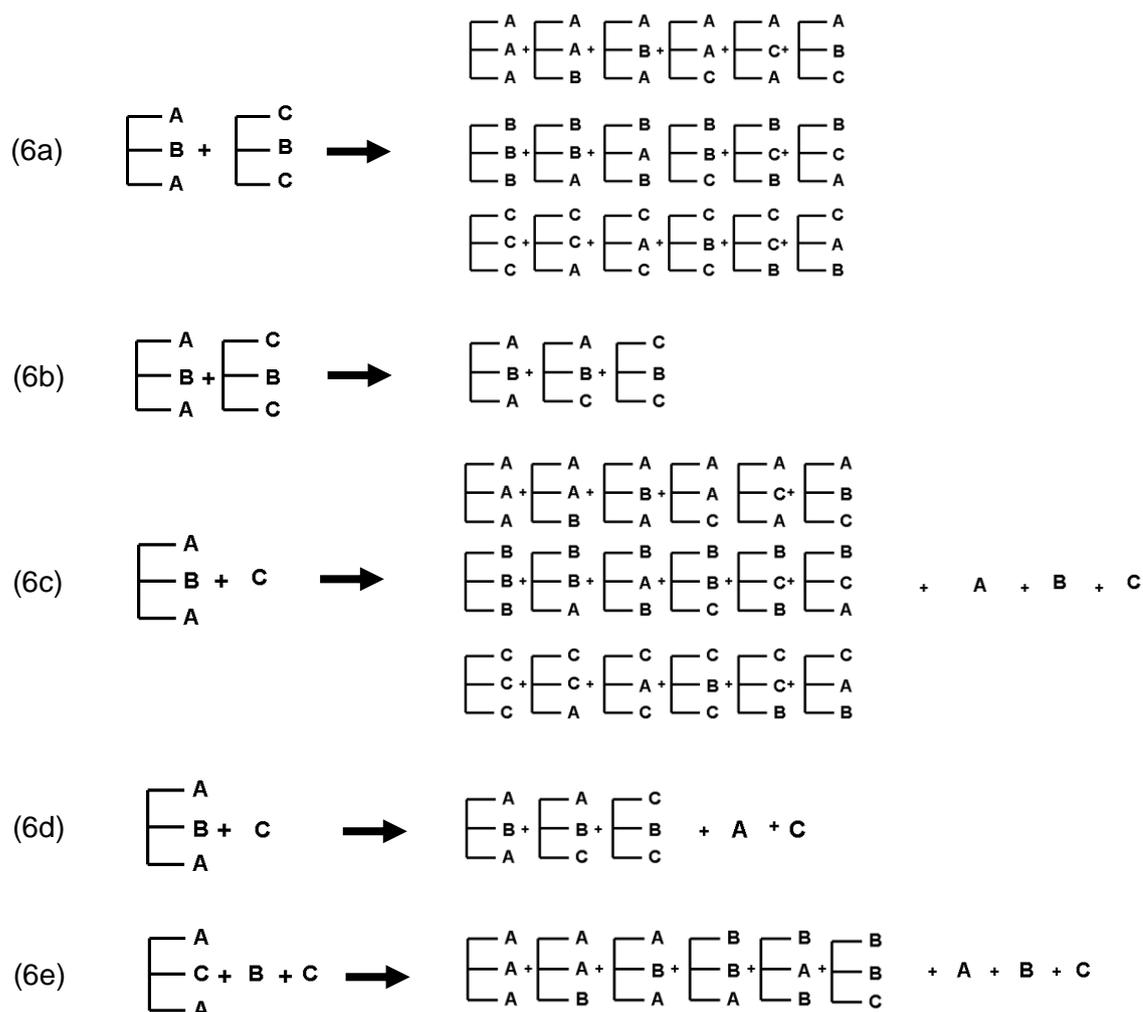


Figura 6. Produtos resultantes da reação de interesterificação química e enzimática de diferentes lipídios. 6a. Reação de diferentes glicerídeos por catálise química ou com lipase não específica; 6b. Reação de diferentes glicerídeos catalisada com lipase 1,3 específica; 6c. Reação de glicerídeos e ácidos graxos livres por catálise química ou com lipase não específica; 6d. Reação de glicerídeos e ácidos graxos livres catalisada com lipase 1,3 específica; 6e. Reação de glicerídeos e ácidos graxos livres catalisada por lipase com especificidade para ácido graxo A e B.

3.2 Aplicações das lipases

As lipases têm encontrado diversas aplicações biotecnológicas, devido às diferentes reações que catalisam e a sua região e enantioselectividade, sendo considerados os biocatalisadores mais versáteis (MATEOS *et al.*, 2007b;

RODRIGUEZ, ONOYAMA e MEIRELLES, 2006; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Lipases têm sido extensivamente usadas em tecnologia de triacilgliceróis, sendo aplicadas, principalmente, na biotransformação de óleos e gorduras. Entre os processos mais promissores para a modificação de lipídios podem ser citadas as reações de hidrólise, síntese de ésteres e a interesterificação destes materiais na presença de lipases. A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triacilglicerol na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos (FERNANDES *et al.*, 2007).

A utilização de lipases na indústria oleoquímica economiza energia e minimiza a degradação térmica durante acidólise, alcoólise, hidrólise e glicerólise. Embora as lipases tenham sido designadas para clivar a ligação éster do TAG por hidrólise, elas podem catalisar a reação reversa (esterificação) pelo controle de água no meio. Assim, a hidrólise e a esterificação podem ocorrer simultaneamente na interesterificação (XU, 2003; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; KARRA-CHAABOUNI *et al.*, 1998). Xu (2003) propôs vários métodos para retirada da água do sistema reacional, seja em experimentos laboratoriais ou em aplicações industriais.

As lipases pancreáticas hidrolisam ligações éster nas posições 1 e 3 em triacilgliceróis, e mostram atividade superior para ácidos graxos de cadeia longa (especialmente PUFA) do que para aqueles de cadeia média (8:0, 10:0) (CATENI *et al.*, 2007).

Os TAG de cadeia média são principalmente utilizados como um suplemento nutricional para pacientes que sofrem de má absorção causada por recessão intestinal. Eles são também úteis para tratar vários problemas médicos relacionados ao mau funcionamento do metabolismo de lipídios, que incluem icterícia obstrutiva, cirrose biliar, pancreatite, fibrose cística, e doença celíaca (CATENI *et al.*, 2007).

As lipases podem ser aplicadas com o objetivo de obter concentrados de PUFA de importância nutricional ou médica, sendo essa aplicação dependente, em primeira instância, da capacidade de absorção destes ácidos pelos humanos. É conhecido que os ésteres de PUFA com alcoóis primários apresentam absorção praticamente nula e podem resultar em metabólicos tóxicos. Por sua vez, os PUFA livres apresentam uma extensão de absorção significativa, mas possuem a desvantagem de sofrerem facilmente deterioração oxidativa. Em contrapartida, os PUFA esterificados ao glicerol na forma de acilgliceróis são melhor absorvidos, sendo

esta forma a mais facilmente obtida pelas reações enzimáticas catalisadas pela lipase (BUENO, 2005; CARVALHO *et al.*, 2003).

Lee *et al.* (2008) produziram misturas de triacilgliceróis estruturados com o objetivo em obter lipídios de baixa caloria a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, tributirina (*sn*-glicerol-1,2,3-ácidos tri-butírico), os quais foram interesterificados com óleo de palma. *Lipozyme* RM IM, de *Rhizomucor miehei*, uma lipase imobilizada 1,3 – regioseletiva foi utilizada como catalisador.

É estimado que 1000 toneladas de lipases sejam adicionadas à aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos cada ano. Quantidades menores de lipases são usadas em transformações oleoquímicas. Lipases podem ter um papel importante no processo de ácido γ -linolênico, um ácido graxo poliinsaturado (PUFA); astaxantina, um corante alimentício; metil cetonas, moléculas saborizadas características de queijo azul, ácido 4-hydroxidecanóico utilizado como precursor de γ -decalactona, um saborizante de fruta, ácidos dicarboxílicos para uso como prepolímeros; interesterificação de glicerídeos mais baratos para formas mais valiosas como, por exemplo, substituições de manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate (UNDURRAGA, MARKOVITS e ERAZO, 2001); modificação de óleos vegetais na posição 2 do triacilglicerol para obter gorduras semelhantes à gordura do leite humano para uso em formulações infantis; ésteres de lipídios inclusive miristato de isopropil, para uso em cosméticos; e monoglicerídeos para uso como emulsificantes em alimentos e aplicações farmacêuticas. Muitas lipases comerciais são usadas como enzimas imobilizadas (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001), pois a imobilização tem efeito benéfico na estabilidade da enzima e em sua dispersão homogênea no meio reacional (GOMES *et al.*, 2006).

4 Compostos fenólicos

Um grande número de fenóis e derivados fenólicos ocorre na natureza, particularmente no reino vegetal. Ácidos fenólicos e derivados, juntamente com flavonoides, estilbenos e lignanas constituem os polifenóis que são metabólitos secundários de plantas e fazem parte da dieta humana. Os polifenóis participam no sistema de defesa das plantas e possuem antioxidantes e propriedades biológicas diversas (FIGUEROA-SPINOZA e VILLENEUVE, 2005) como antitumor, anticâncer, antiviral, antibiótica e antioxidante (GULATI *et al.*, 2001).

Os flavonoides compõem o grupo mais comum dos polifenóis vegetais e fornecem a maior parte do sabor e cor às frutas e legumes. Mais de 5000 diferentes flavonoides têm sido descritos. As seis principais subclasses de flavonoides incluem as flavonas (apigenina, luteolina), flavonoides (quercetina, miricetina), flavanonas (naringenina, hesperidina), catequinas e flavonoides (por exemplo, epicatequina galocatequina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina) e isoflavonas (genisteína, daidzeína). A maioria dos flavonoides presentes nas plantas está ligada a açúcares (glicosídeos), embora ocasionalmente sejam encontradas em agliconas (ROSS e KASUM, 2002).

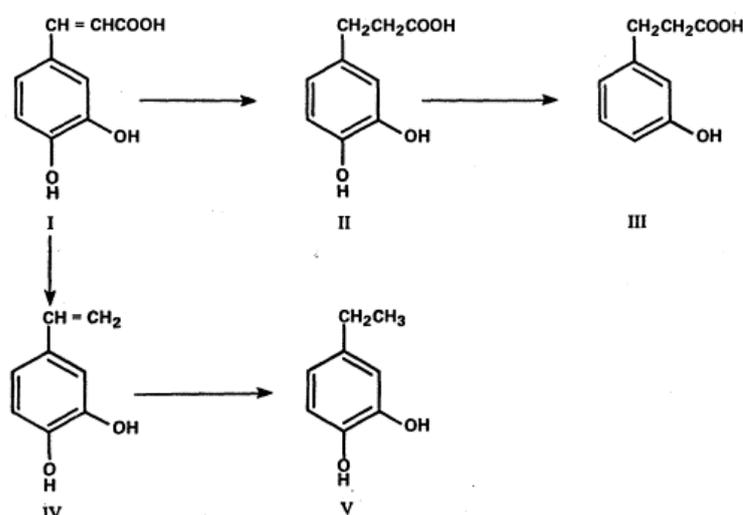
Ácidos fenólicos são derivados de ácidos cinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são o subgrupo principal de compostos fenólicos, sendo o ácido dihidrocafeico (DHCA) um metabólito do ácido cafeico com propriedades antioxidantes potentes, encontrado em muitos legumes, frutas e ervas, como por exemplo, café, alcachofra, pêra, manjeriço, tomilho, orégano e maçã. Tem sido relatado que o ácido cafeico também pode proteger células da pele quando exposta à radiação ultravioleta (GUGLIUCCI *et al.*, 2009; HUANG, PAULIS e MAY, 2004; STAMATIS, SERETI e KOLISIS, 2001).

Os ácidos fenólicos são os mais importantes fitoquímicos antioxidantes não vitamínicos naturalmente presente em quase todos os vegetais e frutas. Sua atividade biológica está relacionada à sua lipofilicidade, sendo afetado pela presença do anel de grupos hidroxila substituinte e, no caso de ésteres fenólicos polihidroxilados, pelo comprimento do éster (MORIDANI *et al.*, 2001).

O ácido cafeico foi mostrado ser um inibidor da lipoxigenase, que forma leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Esta função foi útil para elucidar o papel dos leucotrienos em diferentes respostas inflamatórias (GUGLIUCCI *et al.*, 2009).

Ratos gnotobióticos são capazes de transformar o ácido cafeico em dihidrocafeico. Esta capacidade é demonstrada pela constatação deste último e de ácido dihidroferúlico em amostras de urina de ratos alimentados com ácido cafeico. A capacidade desses ratos gnotobióticos para reduzir o ácido cafeico pode estar correlacionada com a capacidade da sua microflora intestinal realizar essa reação quando criados em meios artificiais (PEPPERCORN e GOLDMAN, 1972).

A Figura 7 mostra o metabolismo do ácido cafeico.



O ácido cafeico [ácido 3,4-dihidroxicinâmico] (I) é reduzido para ácido dihidrocafeico [3,4 – dihidroxifenilpropionico] (II), que é desidroxilada para ácido m-hidroxifenilpropionico (III). Em outra via, ácido cafeico pode ser descarboxilado para produzir 4-vinilcatecol (IV), que pode ser reduzido a 4 etilcatecol (V). As reações em que compostos I e II são misturadas para produzir, respectivamente, ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmicos) e ácido dihidroferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropionico) não são mostradas.

Figura 7. Metabolismo do ácido cafeico

Fonte: Peppercorn e Goldman (1972)

A esterificação de ácidos fenólicos (incluindo vários derivados hidroxicinâmicos) com alcoóis alifáticos catalisada por lipase tem sido relatada na literatura. Com a utilização de lipase de *Candida antarctica*, a eficiência da esterificação de ácidos fenólicos é fortemente dependente das diferentes características dos substratos aril-alifáticos, sugerindo que o acesso dos ácidos hidroxicinâmicos ao sítio ativo da enzima é impedido devido à flexibilidade reduzida do resíduo acil (CASSANI *et al.*, 2007).

Lipases foram usadas para catalisar tanto reações de esterificação (Figura 8) quanto de transesterificação de compostos bioativos com grupos acil. Apesar de lipases de diversas fontes terem sido empregadas até o momento, a lipase imobilizada *Novozym 435* da *C. antarctica* é extremamente robusta e está entre as mais eficientes e utilizadas. Com relação ao sistema de reação na síntese de compostos bioativos, essa enzima tem sido utilizada em sistemas com e sem solvente, bem como em meios inovadores (líquidos iônicos a temperatura ambiente). Em todos esses sistemas, o principal desafio reside na união de substratos (flavonoides hidrofílicos e ácidos graxos de cadeia longa, hidrofóbicos) com polaridades muito diferentes. Na maioria das vezes, um bom contato entre os substratos e a lipase requer pelo menos algum ajuste durante a seleção de solventes: terc-butanol, acetona e até mesmo sistemas empregando dois solventes, como octano/2-butanona foram mostrados promissores. Sistemas sem solvente parecem mais eficazes quando os substratos em questão são fluidos e as limitações à transferência de massa são menores (DEVI *et al.*, 2008).

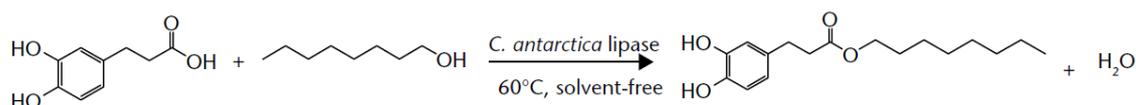


Figura 8. Esterificação de DHCA e octanol

Devido às propriedades relativamente polares, esforços têm sido feitos no sentido de aumentar a hidrofobicidade e, portanto produzir moléculas anfífilas de valor industrial. Assim, ésteres de ácidos hidrocafeicos, bem como cumaratos e ferulatos tem sido relatados como potentes antioxidantes em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (CASSANI *et al.*, 2007).

Ardhaoui *et al.* (2004) estudaram a acilação de diferentes flavonoides naturais (quercetina, a hesperidina, rutina e esculina) com ácidos graxos, utilizando lipase de *Candida antarctica* como catalisador. Foi observado que a esculina com OH primários na parte do açúcar foi o substrato mais reativo. Com o ácido palmítico como doador acil, os rendimentos de conversão foram cerca de 80, 71 e 38%, respectivamente, para esculina, rutina e hesperidina. Nenhuma reação foi observada com flavonoides agliconas (quercetina). Houve produção de apenas monoéster flavonoide.

Gulati *et al.* (2001), investigaram a capacidade de lipase de *Fusarium globulosum* em sintetizar ésteres de açúcares, alcoóis de açúcar, ácido ascórbico e ácidos graxos com alcoóis. Estes ésteres possuem aplicações como tensoativos, antioxidantes, oleoquímicos, detergentes e produtos farmacêuticos.

5 Modificação de óleos e gorduras

Óleos e gorduras modificados são os produtos obtidos a partir de óleos ou gorduras submetidos a processos físicos ou químicos tais como fracionamento, hidrogenação ou interesterificação (BRASIL, 2005; ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

5.1 Fracionamento

O fracionamento permite separar uma gordura em frações de propriedades físicas diferentes, denominadas oleínas quando líquidas e estearinas quando sólidas. Com esse tratamento, modifica-se a relação sólido/líquido da gordura; assim, pode-se conseguir determinada plasticidade. O fracionamento consiste em cristalizar a gordura a baixa temperatura e eliminar, posteriormente, por filtração ou centrifugação, os triacilgliceróis com ponto de fusão relativamente elevado, que poderiam, por exemplo, alterar os óleos durante seu armazenamento. A velocidade de resfriamento é importante porque condiciona o tamanho dos cristais, dos quais depende a relação sólido/líquido da gordura.

Pode-se acelerar o fracionamento mediante a utilização de detergentes ou solventes orgânicos. Esse processo não tem nenhum efeito sobre a qualidade nutricional das gorduras desde que se elimine corretamente o solvente do produto final.

Com essa técnica, tratam-se os óleos comestíveis (girassol, milho), sobretudo aqueles utilizados na elaboração de maioneses, nos quais a cristalização poderia romper a emulsão (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

5.2 Hidrogenação

A hidrogenação das gorduras é de grande importância na indústria porque permite a conversão de óleos em gorduras plásticas utilizáveis na indústria de elaboração de margarinas e gorduras emulsificantes (shortenings). Após a hidrogenação, as gorduras melhoram a cor e são menos suscetíveis à oxidação, sendo, por isso, mais estáveis (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

O mecanismo envolvido na hidrogenação de uma gordura consiste na reação de um ácido graxo insaturado com o hidrogênio atômico adsorvido no catalisador metálico. Os compostos intermediários são instáveis, de vida curta, sendo muito difícil seu isolamento. O rendimento da reação depende da natureza da substância submetida ao tratamento, da natureza e das concentrações do catalisador e de hidrogênio, além da temperatura, pressão e grau de agitação. Em geral a gordura não se hidrogena por completo, apenas parcialmente e a reação é controlada medindo-se o índice de refração relacionado com o grau de saturação.

Na hidrogenação, além da saturação das ligações duplas, ocorre isomerização, isto é, uma reorganização da estrutura molecular dos ácidos graxos iniciais, nos quais se modifica a configuração *cis* (instável) para *trans*. Essa mudança tem repercussão nutricional, uma vez que, entre outras coisas, ocorre perda de ácidos graxos essenciais e, portanto, será necessário repô-los para que o valor nutritivo seja adequado. Atualmente, tende-se a limitar o conteúdo desses isômeros em alguns produtos, como nos alimentos infantis, óleos de consumo e chocolates.

Existem dois tipos de hidrogenações, dependendo do destino da gordura resultante:

- a) Hidrogenação seletiva: o hidrogênio incorpora-se primeiro aos ácidos graxos mais insaturados. O processo é tanto mais seletivo quanto maior for a temperatura e menores forem a pressão aplicada e a agitação do sistema. Os óleos hidrogenados são mais resistentes à oxidação pelo fato de hidrogenar-se preferencialmente o ácido linolênico. Portanto, esse processo é realizado principalmente para reduzir o conteúdo desse ácido graxo e assim, aumentar a estabilidade da gordura. Os catalisadores existentes não permitem a transformação apenas do ácido linolênico em linoleico e, por isso, sempre aparecem certas quantidades de oleico. Um importante fator que deve ser levado em conta nesse tipo de hidrogenação é a presença de isômeros *trans*, que aparecem em alta concentração, uma vez que possuem configuração mais estável.
- b) Hidrogenação parcial ou total: tem como finalidade a obtenção de gorduras sólidas, base de fabricação de margarinas, minarinas e gorduras emulsificantes; busca-se, portanto, aumentar o ponto de fusão a fim de obter lipídios de determinada consistência em temperatura ambiente. Quando a hidrogenação não é seletiva, os ácidos poli-insaturados

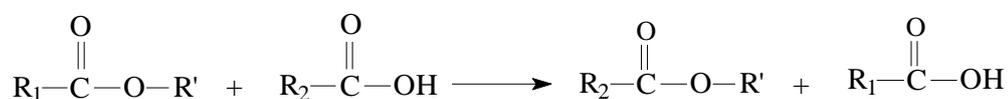
reduzem-se rapidamente, e os níveis de isômeros *trans* aumentam até 40%, no caso das margarinas mais comuns.

5.3 Interesterificação

Há dois tipos de interesterificação, a química e a enzimática. A primeira faz uso de sais como catalisadores, enquanto que a última se baseia no uso de lipases regioespecíficas (*sn*-1,3 ou *sn*-2), ácido graxo específicas ou aleatórias (MARANGONI e ROUSSEAU, 1995).

A interesterificação (Figura 9) se refere à troca dos radicais acil entre um triacilglicerol com um ácido graxo (acidólise), um TAG e um álcool (alcoólise) ou dois TAG (transesterificação), resultando em rearranjo na distribuição dos ácidos graxos do triacilglicerol, formando um outro triacilglicerol com propriedades químicas e físicas diversas (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; LIU, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004b; CARVALHO *et al.*, 2003; XU, 2003).

Acidólise (reação de éster com ácido)



Alcoólise (reação de éster com álcool)



Transesterificação (reação de éster com éster)

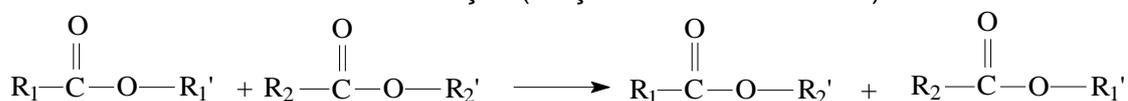


Figura 9. Representação esquemática das reações de interesterificação catalisada por lipases

O interesse pela interesterificação tem aumentado nos últimos anos no Brasil em virtude da Resolução-RDC N° 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Esta resolução estabeleceu que os teores de isômeros *trans* nos produtos alimentícios fossem declarados, sendo que as

empresas tinham o prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem às exigências. Conforme List (2004), a interesterificação é uma maneira de reduzir não somente o teor de isômeros trans, como também dos ácidos graxos saturados em alimentos.

A transesterificação não forma isômeros trans; logo, apresenta-se como bom substituto ao tratamento de hidrogenação. Contudo, a mudança de posição dos ácidos graxos sobre o glicerol pode alterar a digestibilidade do triacilglicerol e, portanto, a absorção de cada um dos ácidos graxos (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

5.3.1 Processo químico

No processo industrial, a interesterificação pode ocorrer por aquecimento do óleo a temperaturas relativamente altas (200 °C) durante um longo período de tempo. No entanto, geralmente se utilizam catalisadores para que a reação transcorra em menor período de tempo (por exemplo, 30 minutos) a temperaturas inferiores (50 °C). Os metais alcalinos e os alquilatos dos metais alcalinos são catalisadores eficazes a baixas temperaturas, sendo o metóxido de sódio o mais usado. É necessário aproximadamente 0,1% de catalisador, pois concentrações mais elevadas ocasionam perdas excessivas de óleo com formação de sabões e ésteres metílicos (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; LIU, 2004). Outros catalisadores utilizados no processo de transesterificação são: estanho, chumbo, zinco, cádmio ou ainda metais alcalinos os alcalino-terrosos, sendo muito efetivos os alcoolatos, amidas e hidretos em concentração de 0,1 a 0,3% (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

O óleo a ser esterificado deve estar extremamente seco e seu conteúdo de ácidos graxos livres, peróxidos e outras substâncias que podem reagir com o metóxido de sódio, deve ser baixo. Logo após a adição do catalisador, o óleo adquire uma cor marrom-avermelhada devido à formação de um complexo entre o sódio e os glicerídeos, complexo que se acredita ser o verdadeiro catalisador. Após a esterificação, o catalisador é inativado pela adição de água ou ácido e eliminado (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

5.3.2 Processo enzimático

A modificação de óleos e gorduras por meio de interesterificação catalisada por lipases tem sido estudada desde a década de 1980. Esse tipo de reação propicia a transformação de óleos e gorduras de baixo custo em substitutos ou equivalentes da manteiga de cacau. Neste caso, um substituto é um tipo de gordura

que não possui composição química similar, mas apresenta um perfil de fusão similar à manteiga de cacau (UNDURRAGA, MARKOVITS e ERAZO, 2001).

A interesterificação de 1,3-dipalmitoil e 2-monoleína, presente em grande quantidade no óleo de dendê, com ácido esteárico ou triestearina, utilizando lipases específicas, pode originar produtos enriquecidos como 1(3)-palmitoil-3(1)-estearil-2-monoleína. Esses triacilgliceróis são os principais componentes da manteiga de cacau (FACIOLI e GONÇALVES, 1998). O equivalente da manteiga de cacau é denominado de *Salatrim*, patenteado pela *Cultur Food Science, Inc.*, Ardsley, NY, constituindo-se de uma gordura sintética, aleatória, contendo ácidos graxos de cadeia curta e longa (NARINE e MARANGONI, 1999).

Entre outras aplicações a esterificação é importante na produção de aromas e flavours, caracterizados por serem ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, enquanto que a transesterificação é empregada na produção de biocombustíveis – ésteres de biodiesel, caracterizados por ácidos graxos de cadeia longa (FERNANDES *et al.*, 2007; KARRA-CHAABOUNI *et al.*, 1998; GHOSH e BHATTACHARYYA, 1995).

A literatura científica vem apresentando diversas possibilidades para a obtenção de lipídios estruturados por via enzimática, envolvendo grande variedade de lipases, substratos, ácidos graxos e solventes, reportados por Willis, Lencki e Marangoni (1998), Xu (2000) e Hu *et al.* (2009):

- a) Lipases: Lipozyme IM (de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina de troca aniônica), de *Candida cylindraceae*, de *Candida antarctica*, de *Candida sp.*, de *Chromobacterium viscosum*, pancreática de porco, de *Rhizopus arrhizus*, de *Rhizopus delemar*, de *Rhizopus javanicus*, de *Rhizopus sp.*, de *Mucor miehei*, de *Pseudomonas sp.* As lipases microbianas têm se mostrado mais eficientes, visto serem termoestáveis e não exigirem co-fatores;
- b) Substratos (óleos e gorduras): canola, triacilgliceróis de cadeia média, peixe, colza, açafreão, linhaça, girassol alto oleico, amendoim, palma, sebo, palma fracionado, fígado de bacalhau, sardinha, milho, primula, savelha, atum, manteiga, trilinoleína, trioleína, tricaprilina, tricaprina, trilaurina, trioleína, tripalmitina, triestearina;
- c) Ácidos graxos: caprílico, cáprico, DHA, EPA, totalmente hidrogenados de óleo de soja, linoleico, oleico, palmítico, poli-insaturados, esteárico;

- d) Solventes: hexano, tolueno, acetona, propanol, t-butanol, trietilamina, éter metil-butílico CO₂ supercrítico; entretanto, muitos sistemas não utilizam solvente.

A interesterificação enzimática tem a vantagem de permitir grande controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. Contudo, as dificuldades associadas com o controle e com o aumento de escala, bem como o alto custo das lipases (US\$ 300-1000/kg), têm diminuído seu largo uso industrial como catalisador de modificação de alimentos lipídicos (WILLIS e MARANGONI, 1999). Além disso, os processos disponíveis apresentam baixa eficiência (XU *et al.*, 1998a). A imobilização e reutilização de enzimas imobilizadas devem tornar os processos viáveis sob os pontos de vista comercial e econômico. Em processos descontínuos, as lipases imobilizadas podem ser reutilizadas por dez vezes (GIOIELLI *et al.*, 1994). A especificidade posicional de lipases normalmente se mantém quando são usadas em solventes orgânicos. As lipases também apresentam características novas em solventes orgânicos, como alteração na estereoseletividade e quimioseletividade, maior estabilidade e maior rigidez (FOMUSO e AKOH, 1998).

Na formulação de produtos gordurosos, é comum a mistura de óleos e gorduras, para se alcançar as especificações do produto final. As interações que ocorrem entre os triacilgliceróis nas misturas promovem alterações nas propriedades físicas das gorduras. Comparado às técnicas tradicionais, os experimentos planejados poupam tempo e recursos, identificam pontos ótimos verdadeiros, e permitem que os efeitos das variáveis individuais ou interações entre elas sejam determinados (SIMÕES *et al.*, 1997).

5.3.3 Aplicação comercial de lipídios estruturados

Existem vários produtos comerciais disponíveis no mercado como *Betapol* para formulações infantis, diacilgliceróis *Econa* para fritura, equivalentes de manteiga de cacau para produtos de confeitaria, entre outros (DEVI *et al.*, 2008). Outros lipídios estruturados produzidos comercialmente se encontram no Quadro 3.

Xu (2003) desenvolveu óleos contendo ácidos graxos de cadeia média-longa-média (MLM) ou longa-média-longa (LML) em planta piloto para propósitos

funcionais, a partir da acidólise catalisada por *Lipozyme* RM IM de óleos de pescado ou vegetal com ácido caprílico ou cáprico; ácido oleico com TCM.

A NESTLE vem desenvolvendo vários produtos como Crucial®, Peptamen Junior®, Peptamen®, e mais recentemente, os dois últimos acrescidos de prebióticos (para auxiliar na manutenção da microbiota intestinal saudável). Todos os produtos dessa linha são indicados para indivíduos com má absorção (geral ou de lipídios), desordens gastrointestinais, inflamações no intestino, diarreia, pancreatite, intolerâncias ao glúten e à lactose, fibrose cística, HIV, atraso no desenvolvimento, pré e pós-cirurgia, função intestinal limitada, doença de Crohn, paralisia cerebral, necessidades nutricionais especiais tanto para crianças quanto para adultos (NESTLE NUTRITION, 2010).

Quadro 3. Triacilgliceróis modificados comercialmente produzidos

Marca	Companhia	Método de obtenção	Aplicação	Tipo
Caprenin	Procter & Gamble	Uma gordura sintética formulada a partir de glicerol e ácidos behênico, cáprico e caprílico, desenvolvido para diminuir o conteúdo calórico de alimentos	Gomas de mascar; substitutos de manteiga de cacau	TCM
Betapol	Lipid Nutrition, Loders Croklaan	Produtos interesterificados enzimaticamente. 66-76% ácido palmítico na posição <i>sn-2</i>	Fórmulas infantis	P na posição <i>sn-2</i> e UFA na <i>sn-1,3</i>
Salatrim	Danisco A/S	<i>Salatrim</i> é preparado pela interesterificação de triacetina, tripropionina, ou tributirina, ou suas misturas com óleos de girassol, canola, algodão hidrogenados. TAG com três ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são removidos no processo. 30-67 mol% de AGCC e 33-70 mol% de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), ácido esteárico é o AGCL predominante	Produtos lácteos e de panificação	SLS SSL LLS LSL
Captex e Neobee	Abitec Crop. Stepan company	São TCM, fabricados por esterificação do óleo de coco fracionado ou ácidos graxos do óleo de dendê (principalmente cáprico e caprílico) e glicerina	Clínica	TCM
Impact	Navartis Nutrition	Proteína (22%), carboidratos: (53%), gordura (25%) sendo óleo de palmiste, óleo de girassol e óleo savelha	Clínica	n-6/n-3 1,4:1, EPA/DHA 1,7 g/L
Crucial®	Nestlé Nutrition	50% fonte de gordura como TCM + óleo marinho + óleo de soja	Clínica	TCM:TCL 50:50 n6/n3 1,5/1 EPA/DHA 4,3 g/L
Peptamen Junior®		60% fonte de gordura como TCM	Para crianças de 1-10 anos	n6/n3 4,8/1
Peptamen®		33% lipídios, dos quais 70% TCM, 20% óleo de soja, 5% gordura láctea e 5% lecitina de soja	Para adultos	n6/n3 7,4/1

TCM = triacilgliceróis de cadeia média; TCL = triacilgliceróis de cadeia longa; S, M e L = ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, respectivamente; UFA = ácidos graxos insaturados, EPA / DHA = ácido eicosapentaenóico / ácido docosahexaenóico; P = ácido palmítico, O = ácido oleico.

5.3.4 Reatores utilizados na produção de lipídios estruturados

A literatura relata diferentes tipos de reatores utilizados na produção de lipídios estruturados: de leito fixo (XU *et al.*, 1998a), leito contínuo em escala laboratorial (MU, XU e HØY, 1998, XU *et al.*, 1998b), leito empacotado (HAMA *et al.*, 2007; MU *et al.*, 2001; XU, 2000b; MU *et al.*, 1999), tanque com agitação (ZHANG *et al.*, 2000), membrana ultrafiltrante (XU *et al.*, 2000).

Mais frequentemente, frascos tipo erlenmeyer ou tubos lisos com tampa de rosca têm sido colocados em banhos termostatizados com agitação orbital (SABALLY *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2006; SERIBURI e AKOH, 1998) ou agitação magnética com uso de chapas magnéticas e ímãs dentro dos tubos de fundo liso (ALIM *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2000) conforme Figura 10.

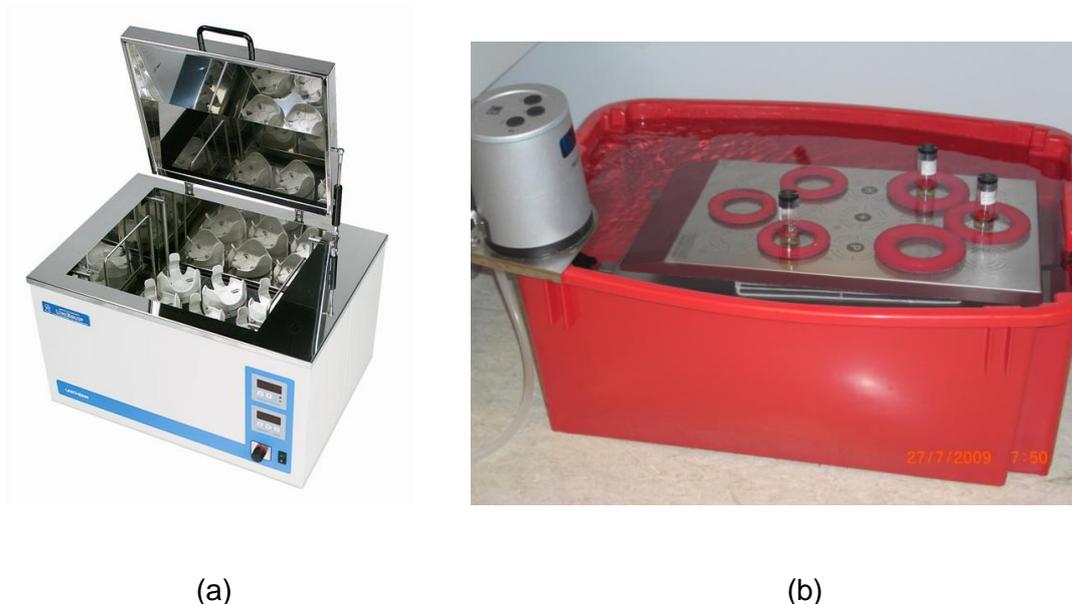


Figura 10. Banho termostatizado com agitação orbital (a) e chapas magnéticas com reatores tipo tubos lisos (b)
Fonte: Elaboração própria.

Mu, Xu e Høy (1998) citam que o reator contínuo enzimático é mais vantajoso sobre o de batelada, pois reduz a migração acil em escala piloto, sendo que o processo contínuo permite a reutilização da enzima imobilizada e redução de custos.

A maioria dos trabalhos em aplicações de lipase na produção de lipídios estruturados específicos foi conduzida utilizando-se reatores em batelada, de tubos lisos ou frascos com tampas de rosca com agitador magnético e/ou sistemas com solventes em níveis de miligrama/grama. Também foram executados ensaios nestes tipos de reatores em planta piloto em escala de 1 a 30 kg com sistemas sem solvente.

Muitos estudos de processos na produção enzimática de lipídios estruturados específicos foram realizados em reatores de leito empacotado (XU, 2000).

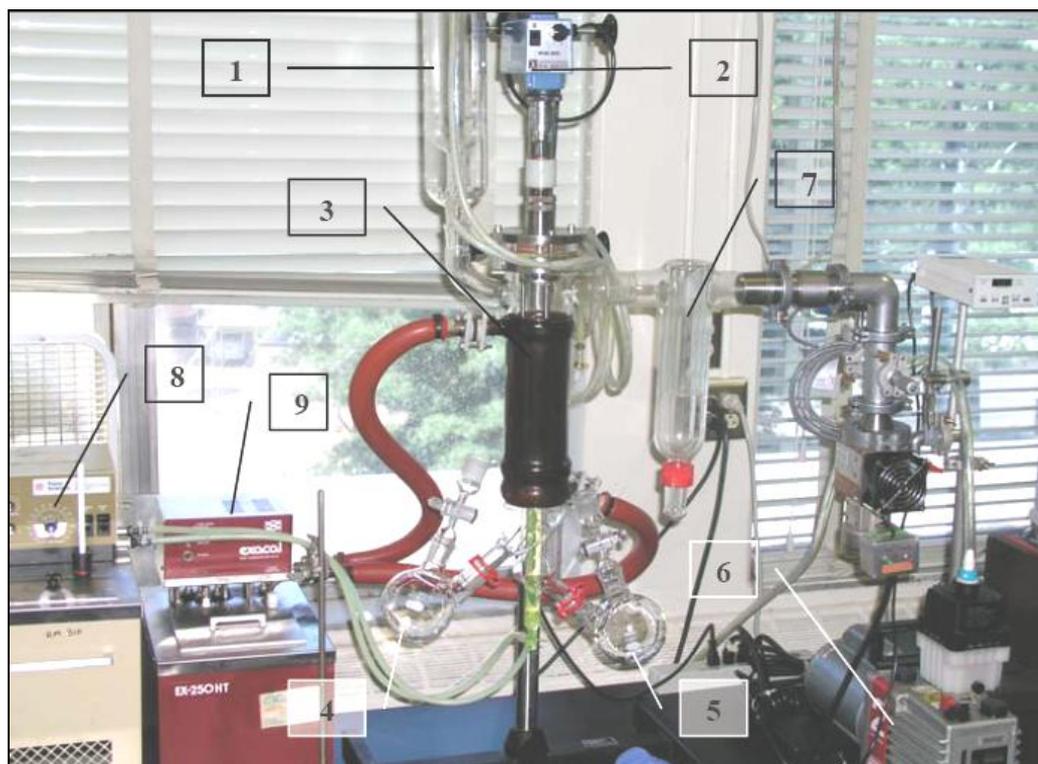
Segundo Gamboa e Gioielli (2006), para a realização da transesterificação enzimática, a amostra fundida é colocada em balão de três bocas com água destilada e então com enzima. A reação é realizada em banho de água à temperatura de 65 °C por período de 6 h, sob agitação proporcionada por barra magnética e mantendo o sistema em atmosfera de nitrogênio. Após a reação, as partículas do catalisador são removidas por filtração, podendo ser efetuada uma secagem posterior seguida da caracterização da amostra transesterificada.

Filleti-Junior (2005) otimizou a síntese de lipídios estruturados a partir da gordura de ucuúba (*Virola sebifera*) rica em ácido mirístico e ésteres etílicos de óleo de canola (com alto teor de ácido oleico) e de óleo de algas (com alto teor de ácido docosahexaenóico – DHA), utilizando as lipases *sn*-1,3-específica do *Rhizomucor miehei* (IM 60) e a não específica SP435 (*Candida antarctica*). Para isto, utilizou reator de vidro encamisado, com agitador mecânico, acoplado a um banho de aquecimento/resfriamento, conforme Figura 11. No final da reação, purificou os LEs com sistema de destilação molecular (Figura 12).



Diâmetro interno = 10,5 cm e altura de 16 cm, com capacidade de 950 mL. Tampa com duas tomadas, haste de agitação tipo hélice, vedação com selo mecânico. Agitador StedFast modelo SL 2400 e aquecedor / resfriador Polystat modelo 12101-00.

Figura 11. Reator de vidro encamisado com agitação mecânica
Fonte: Filleti-Junior (2005).



1: Reservatório da amostra; 2: Agitador de superfície raspada; 3: Evaporador encamisado; 4: Coletor do destilado; 5: Coletor do resíduo; 6: Bomba de vácuo; 7: Trap; 8: Banho de resfriamento; 9 Banho de aquecimento.

Figura 12. Destilador “Short Path” para purificação de lipídios estruturados
Fonte: Filleti-Junior (2005).

Xu (2000a,b; 2003) tem publicado vários artigos com síntese de lipídios usando reatores de vidro encamisados (Figura 13), que permitem uma distribuição uniforme do calor, pela circulação da água em torno do recipiente que contém a amostra, evitando qualquer contato da água com os substratos. Isto é feito pelo uso de um banho termostaticado, que garante um maior controle da temperatura da reação.



Figura 13. Reatores de vidro encamisados (water-jacket reactors)
Fonte: Elaboração própria.

O esquema do reator de membrana está mostrado na Figura 14, a célula interna possui 13,5 cm de diâmetro e a membrana apresenta um tamanho efetivo de 143 cm² estando instalada no fundo da célula. Líquidos pré-aquecidos, de 200-500g podem ser carregados na célula. A pressão é regulada pelo nitrogênio. A retirada de amostra é feita durante o experimento no permeado e na mistura reacional. O permeado é pesado em intervalos de tempo (Xu *et al.*, 2000).

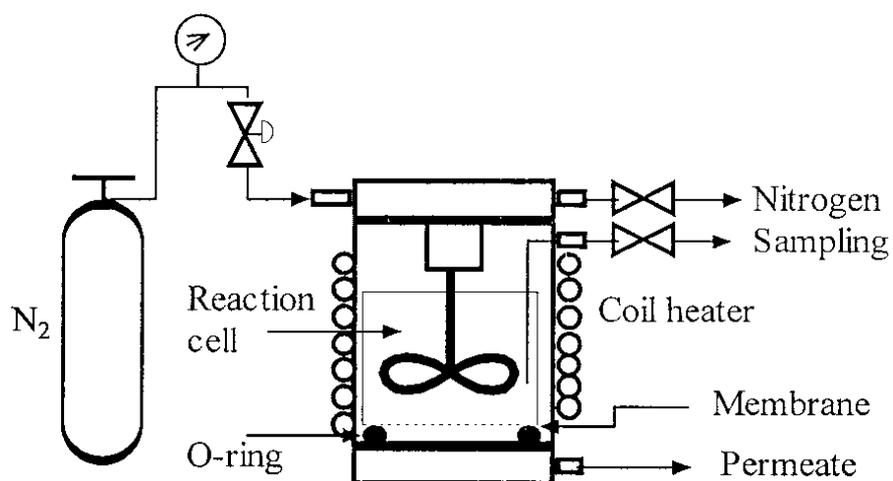


Figura 14. Configuração principal do reator de membrana
Fonte: Xu *et al.* (2000).

Mu, Xu e Høy (1998) construíram um pequeno reator contínuo (Figura 15) para produzir TAG estruturados específicos, contendo ácidos graxos essenciais na posição *sn*-2 e de cadeia média nas posições *sn*-1,3. O bioreator era constituído de coluna de vidro ($l = 38$ cm, diâmetros externo e interno de 5 e 2,6 cm) empacotada com 58 g de enzima Lipozyme IM ($l = 28$ cm), envolto em papel alumínio para prevenir fotoxidação. Os substratos reacionais mantidos em banho de água são bombeados para o reator enzimático com auxílio de uma bomba peristáltica. O substrato é alimentado dentro da coluna e a temperatura é mantida constante pelo banho termostatizado com agitação mecânica. Os produtos interesterificados são coletados sob nitrogênio e o meio reacional não utiliza solvente.

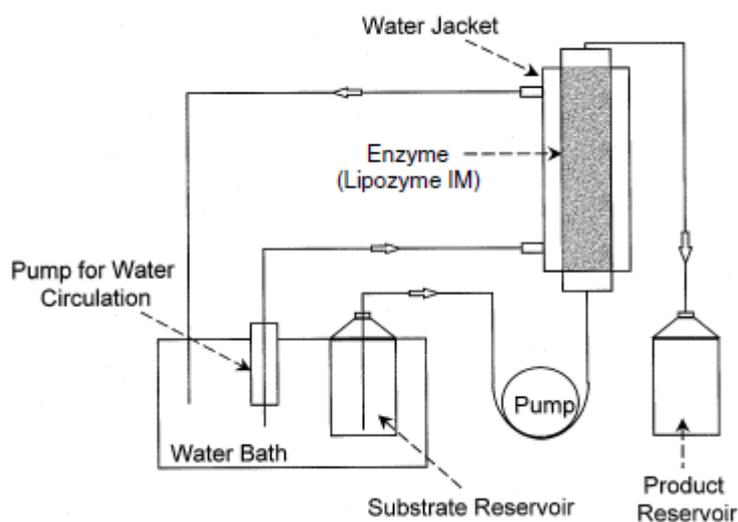


Figura 15. Diagrama do reator contínuo para interesterificação catalisada por lipase
Fonte: Mu, Xu e Høy (1998).

Xu, Fomuso e Akoh (2000) otimizaram a incorporação de ácido caprílico em óleo de peixe (savelha), em um reator de leito empacotado com a enzima Lipozyme IM, utilizando a metodologia de superfície de resposta. As condições ótimas encontradas foram temperatura = 65 °C, razão molar = 4 a 5 e tempo de residência de 180 a 220 min, para incorporação de ácido caprílico de 39,8%.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para dar início aos trabalhos relacionados ao tema de Lipídios e Enzimas, foram elaborados ensaios com hidrólise enzimática (pancreatina) de azeite de oliva para produção de mono e diacilgliceróis. Este estudo originou um trabalho completo, o qual foi aceito pela Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras (SBOG) para ser apresentado no V Simpósio Internacional – Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, de 27-29 setembro de 2010 (APÊNDICE V, pg. 137).

A continuação do trabalho está dividida e apresentada conforme segue:

Artigo I: Caracterização físico-química, glicerídeos fracionados e perfil de ácidos graxos da gordura de pele de frango.....52

Este trabalho foi realizado no laboratório de Ciência de Alimentos (FURG) a fim de descobrir fontes potenciais e econômicas para uso em reações de interesterificação.

A versão em inglês, nas normas da revista *European Journal of Lipid Science and Technology*, conforme reenviado com sugestões dos revisores e banca examinadora está no APÊNDICE VI (pg.155).

Os demais artigos foram desenvolvidos no Laboratório de Agrobiotecnologia da Universidade de Aarhus, na Dinamarca, durante o doutorado sanduíche de julho a outubro de 2009, apoiado pela bolsa CAPES/PDEE.

Artigo II: Produção de lipídios modificados pela acidólise da gordura de pele de frango e ácidos graxos ramificados.....72

Parte deste artigo foi vertido para o inglês e submetido como trabalho completo ao 4º Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos (ICBF). No APÊNDICE V (pg.144) se encontra o trabalho completo aprovado pela comissão científica em 05/08/2010.

Artigo III: Síntese de dihidrocafeato de octila e sua transesterificação com tricaprilina.....85

O resumo deste artigo foi submetido ao Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA), aprovado em 30/07/2010. O resumo e o aceite constam no APÊNDICE V (pg.153). Este trabalho foi iniciado em agosto 2009 durante o estágio realizado na Dinamarca e concluído pelo grupo em agosto de 2010, originando o artigo do ANEXO I (pg.177).

Artigo I: Composição físico-química, glicerídeos fracionados e perfil de ácidos graxos da gordura da pele de frango

COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, GLICERÍDEOS FRACIONADOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA GORDURA DA PELE DE FRANGO

RESUMO

A pele de frango é um coproduto das indústrias processadoras da carne de frango, considerada como resíduo, sendo pouco aproveitada ou subutilizada. O Brasil é o líder mundial nas exportações de frango (3,6 milhões de toneladas) e o terceiro maior produtor com 10,9 milhões de toneladas, dos quais cerca de 440 mil ton/ano são resíduos. Portanto este trabalho objetivou caracterizar a gordura da pele de frango (GPF), comparando-a ao óleo de soja, por ser bastante conhecido e estudado, avaliando a composição físico-química, glicerídeos fracionados e perfil de ácidos graxos, visando à utilização da GPF em reações de interesterificação. Para isso, foram realizadas determinações dos índices de peróxidos, ácido tiobarbitúrico (TBA), p-anisidina, iodo, saponificação, acidez, refração e matéria insaponificável, além do fracionamento de glicerídeos, seguido de derivatização dos ésteres metílicos dos ácidos graxos e identificação dos mesmos por cromatografia gasosa. Os índices de qualidade nutricional foram calculados a partir do perfil lipídico. A GPF apresentou qualidade satisfatória devido aos baixos índices de acidez ($0,65 \text{ g ácido oleico.100 g}^{-1}$), peróxido ($2,14 \text{ meq.kg}^{-1}$), p-anisidina ($0,70 \text{ unidades de absorvância.g}^{-1}$), além de elevada fonte de ácidos graxos mono-insaturados (40%). Entretanto, a GPF apresentou baixo índice hipocolesterolêmico/hipercolesterolêmico ($\text{HH}=2,72$), o que pode dificultar seu uso nutricional da maneira em que se apresenta, uma vez que tende a aumentar o colesterol. Assim, a GPF é promissora em outras aplicações como em reações de interesterificação ou produção de biodiesel.

Palavras-chave: cromatografia gasosa / gordura da pele de frango / AGMI / p-anisidina / TBA

ABSTRACT

Skin is one of the several co-products of chicken meat industries, considered as waste, being rarely utilized or underutilized. Brazil is the world leader in chicken exports (3.6 million tons) and the third largest producer with 10.9 million tons, from which 440000 ton/year are residues. Therefore, this work aimed at characterizing chicken skin fat (CSF), comparing it with soybean oil, a well-known and abundant compound, evaluating the physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile, searching for CSF use in interesterification reactions. For that, determination of peroxide, thiobarbituric acid, p-anisidine, iodine, saponification, acidity, unsaponified matter and refraction indexes were accomplished, besides the glycerides fractionation, followed by FAME derivatization and identification by GC. The nutritional quality indexes were calculated from the lipid profile. GPF showed satisfactory quality due to low acidity ($0.65 \text{ g oleic acid.100 g}^{-1}$), peroxide (2.14 meq.kg^{-1}), p-anisidine ($0.70 \text{ absorbance units.g}^{-1}$) values, besides presenting high proportion of MUFA (40%). However, due to CSF low hypocholesterolemic/hypercholesterolemic value ($\text{HH}=2.72$),

it may be difficult to use it for nutritional purposes the way it's found, once it increases cholesterol. Thus it's a promising residue for different purposes like interesterification reactions and biofuel production.

Keywords: Gaseous chromatography / Chicken skin fat / MUFA / p-anisidine / TBA

1 Introdução

O Brasil é o líder mundial nas exportações de frango (3,6 milhões de toneladas) e o terceiro maior produtor (10,9 milhões de toneladas), sendo superado pelos Estados Unidos (16,6 milhões de toneladas) e China (11,9 milhões de toneladas), ocupando 15% do mercado mundial na produção de carne de frango [1]. Estima-se que do total nacional produzido, são gerados cerca de 440.000 ton/ano de resíduos, por isto torna-se necessário um reaproveitamento destes, que ainda são ricos em lipídios e proteínas.

A pele de frango é um dos vários coprodutos das indústrias processadoras da carne de frango que são considerados como resíduos, pouco aproveitada ou subutilizada. A pele representa 4% em relação ao peso vivo do animal e devido a esta alta proporção, gera custos adicionais de eliminação e problemas ao meio ambiente, além da perda de um produto com potencial alimentício [2].

Os produtos avícolas apresentam um mercado crescente, uma vez que estes não são proibidos por nenhuma religião, assim a gordura de frango pode ser incorporada em produtos requintados (*delicatessen*) [3] apresentando substancial valor nutritivo, devido à composição diferenciada em ácidos graxos insaturados em comparação com outras gorduras de origem animal [4], atraindo um maior número de consumidores. Segundo Chiu, Gioielli e Grimaldi [5], pelo fato da gordura de frango se apresentar líquida ou semilíquida à temperatura ambiente, ela pode ser utilizada para diversos fins alimentícios, tais como em condimentos, bolos e frituras. Além disso, também pode ser utilizada para melhorar a consistência de cremes cosméticos.

Rodrigues *et al.* [6] sugeriram o emprego da gordura abdominal de frango como matéria-prima para a produção de biodiesel. Gomes [7] estudou o potencial de produção de óleo a partir de rejeitos avícolas e estimou que aproximadamente 20.400 ton de óleo e 19.500 ton de biodiesel podem ser produzidos anualmente por cinco cooperativas do estado do Paraná, Brasil.

Sheu e Chen [8] compararam o perfil lipídico da pele, tecido adiposo e carne de frango e observaram que não houve diferença significativa para nenhum ácido graxo nos três diferentes cortes. Foi obtido uma média de 43% de ácido oleico (o ácido graxo mais abundante), 27% de palmítico e 14% de linoleico. Outros autores também encontraram uma composição similar [5,9-11]. O ácido graxo oleico é associado à redução do risco de enfermidades cardiovasculares, pois reduz os níveis de colesterol sanguíneo em indivíduos não-hipertrigliceridêmicos [12].

Comparada a outras fontes de gordura animal, a de frango possui a maior quantidade de insaturados (65-68%) [4, 8, 11]. Mottram, Crossman e Evershed [4] verificaram que a distribuição de ácidos graxos na posição *sn-2* da molécula de TAG da gordura de frango indica que esta possui o menor conteúdo de C16:0 (9,4%) quando comparada à gordura da carne bovina (11,6%), ovina (20,8%) e porcina (54,8%). Além disso, a gordura de frango apresenta conteúdos elevados de C18:1 (40,5%), C18:2 (29,4%) e C18:3 (4,1%) nesta mesma posição (*sn-2*) em relação às demais gorduras de origem animal. Segundo Brockerhoff, Hoyle e Wolmark [13], a presença de 80% de ácidos graxos insaturados e 20% de saturados na posição *sn-2* do TAG da gordura de frango, a torna mais nutricional e fisiologicamente disponível.

Chiu, Gioielli e Grimaldi [5] estudaram a mistura de gordura de frango e TAG de cadeia média, constatando a obtenção de lipídios estruturados de cadeia média, mono-insaturados e essenciais, com composição equilibrada, além de haver o surgimento de novos TAG, inexistentes nas amostras originais. Lee e Foglia [11] interesterificaram gordura de frango e ácidos graxos de cadeia média (caprílico) com lipase 1,3 específica de látex de mamão para produção de lipídios estruturados funcionais contendo ácidos graxos mono-insaturados e de cadeia média com diferentes propriedades físicas (ponto de fusão) e químicas da gordura de frango usada como substrato.

A alta produção de resíduos gerados pela indústria avícola e o potencial da gordura da pele de frango (GPF) em diferentes aplicações, considerando a ausência da caracterização completa desta gordura motivaram a elaboração deste estudo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição físico-química, o perfil lipídico e glicerídeos fracionados da gordura da pele de frango, comparando-a com um óleo amplamente estudado (óleo de soja), visando o possível emprego da GPF em reações de interesterificação.

2 Material e Métodos

2.1 Amostra

A amostra de óleo de soja foi adquirida no comércio local e as peles de frango foram cedidas pelo Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), oriundas de indústrias avícolas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ciência de Alimentos da mesma universidade.

2.2 Extração de lipídios

A gordura das amostras de pele de frango foi extraída por dois diferentes métodos para verificar o rendimento na extração, sendo um deles pelo método oficial, número 965.33 [14] e outro por Bligh e Dyer [15], com modificações [16,17].

2.3 Caracterização físico-química da amostra

2.3.1 Índice de peróxido

De acordo com o método número 965.33 [14], foram pesados 5 g de óleo em erlenmeyer de 250 mL, adicionados 30 mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. O frasco foi mantido em repouso por 1 min, foram adicionados 30 mL de água destilada e 1 mL de solução indicadora de amido. A mistura foi titulada com tiosulfato de sódio 0,01 N padronizado com dicromato de potássio até completo desaparecimento da cor azul. Uma amostra em branco foi conduzida e o resultado expresso em meq.kg^{-1} .

2.3.2 Índice de iodo

Foram pesados 0,2 g de óleo, adicionados 20 mL clorofórmio e 25 mL de solução de Wijs. A mistura foi agitada e deixada ao abrigo da luz 30 min a 25 °C. Em seguida, foram adicionadas uma solução de KI 15%, 100 mL de água destilada e 1 mL da solução indicadora de amido 1%. A mistura foi titulada com tiosulfato 0,1 N padronizado de acordo com método oficial, número 993.20 [14].

2.3.3 Índice de saponificação

Foram pesados 2,5 g de amostra em balão de fundo chato aos quais foram adicionados 25 mL de solução alcoólica de KOH 0,5 N. A mistura foi refluxada por 1 h.

Após este tempo, foi adicionado 1 mL de indicador fenolftaleína 1% e titulado com HCl 0,5 N padronizado, seguindo recomendações do método número 920.160 [14].

2.3.4 Índice de acidez

Os ácidos graxos livres, presentes na amostra, dissolvidos em álcool: éter (1:2) foram titulados com uma solução padronizada de NaOH 0,01 N. Os resultados foram expressos em gramas de ácido oleico por 100 g de amostra, de acordo com o método 940.28 [14].

2.3.5 Índice de refração

O índice de refração foi determinado em refratômetro de ABBE a 20 °C, segundo método oficial 921.08 [14]. O valor lido foi posteriormente corrigido para a temperatura de 40 °C através de cálculo, conforme a Equação (1), onde IR = Índice de refração; IR' = índice de refração na temperatura em que a leitura foi realizada; T = Temperatura padrão (°C); T' = Temperatura na qual a leitura do índice foi realizada (°C); K = constante (0,000385).

$$IR = IR' + K(T' - T) \quad (1)$$

2.3.6 Matéria insaponificável

A amostra (1:10_{m/v}) foi saponificada com solução aquosa de KOH 50% (m/v). A matéria insaponificável foi extraída desta solução aquosa, que contém sais de ácidos graxos, com éter etílico, três vezes. O resíduo foi determinado após evaporação do éter etílico em estufa a 75 °C, até peso constante, segundo método Ca 6a-40 [18].

2.3.7 Índice do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Para determinação do índice do ácido tiobarbitúrico foi utilizado o procedimento descrito pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz [19]. Foram pesados 5 g de amostra e adicionados 30 mL de TCA 7,5%. A solução foi filtrada e alíquotas de 5 mL do filtrado foram transferidas para tubos de ensaio juntamente com 5 mL de TBA (0,02 M). Foi feito um branco com 5 mL de TBA e 5 mL de TCA 7,5%. Todos os tubos foram levados ao banho a 100 °C por 40 min. Após, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-Visível (Varian Cary 100 conc, Palo Alto, CA,

USA) a 538 nm. Para determinação do malonaldeído formado através da reação com o TBA, uma curva analítica foi utilizada com padrão de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP) numa concentração de 1.10^{-9} a 7.10^{-9} mol.mL⁻¹ ($y=1.10^8 x$; $R^2=0,9995$).

2.3.8 Determinação do valor de p-anisidina

O valor de p-anisidina da amostra de óleo foi determinado de acordo com a AOCS [18]. Um grama de amostra foi dissolvido em iso-octano e elevado a 25 mL, sendo a absorvância medida em uma célula de 1 cm, a 350 nm usando espectrofotômetro UV-Visível (Varian Cary 100 conc, Palo Alto, CA, E.U.A.). Uma alíquota de 5 mL desta solução foi misturada com 1 mL de p-anisidina 0,25% (m/v) em ácido acético, por 10 min. A absorvância foi lida a 350 nm. O valor de p-anisidina foi calculado de acordo com a equação 2, onde A_1 = absorvância antes de adicionar p-anisidina, A_2 = absorvância após a adição de p-anisidina e W = peso da amostra (g).

$$\text{p - anisidine value} = 25 \times \left(\frac{1.2 \times A_2 \times A_1}{W} \right) \quad (2)$$

2.3.9 Fracionamento dos glicerídeos

O método utilizado foi adaptado da AOAC [14], número 965.35, em que 2 g de óleo foram dissolvidos em 15 mL de clorofórmio e eluídos em coluna (60 cm altura x 2,5 cm de diâmetro) contendo 15 g de sílica gel 60 (Vetec) dissolvidos em 30 mL de clorofórmio. Os solventes foram utilizados na ordem a seguir descrita e as amostras recolhidas em balões:

- triacilgliceróis foram eluídos com 100 mL de benzeno;
- diacilgliceróis foram eluídos com 100 mL da mistura benzeno e éter etílico (9:1);
- monoacilgliceróis foram eluídos com 100 mL de éter etílico.

Os solventes foram evaporados em banho utilizando rotaevaporador na temperatura de ebulição de cada solvente. Após, os solventes residuais foram evaporados em estufa a 90 °C, por 30 min.

2.3.10 Esterificação de lipídios e perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram eluídos da coluna e 1 g de óleo de soja ou GPF foi derivatizado para a obtenção de ésteres metílicos, conforme adaptação do método de Metcalfe *et al.* [20], pela adição de 5 mL de uma solução metanólica de KOH 0,5 N, seguido de ebulição sob refluxo durante 15 min. Após o resfriamento foram adicionados 7,5 mL de solução de trifluoreto de boro em metanol (20%) e 7,5 mL de metanol seguido de novo refluxo por 7 min. A mistura foi transferida para funil de separação, adicionando-se 10 mL de éter de petróleo e 15 mL de solução salina saturada. A fração superior foi separada e a inferior extraída mais duas vezes apenas com éter de petróleo. Em seguida as três combinações da fase superior (éter) foram lavadas com 15 mL de água destilada. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica filtrada, em seringas de vidro contendo lã de vidro e sulfato de sódio anidro, foi evaporada em rotaevaporador e submetida à secagem a 70 °C. A fração esterificada foi transferida para frascos âmbar. O solvente residual foi evaporado sob corrente de nitrogênio por 5 min.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa, em que 1 µL do resíduo esterificado foi ressuspense em 1 mL de hexano P.A., sendo injetado no cromatógrafo (Varian Star Chromatograph 3400CX, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com injetor split/splitless e detector de ionização de chama. A separação ocorreu em coluna capilar de polietilenoglicol (ZB-WAX 30 x 0,32 mm) e espessura de filme de 0,25 µm (Zebron, E.U.A.). A temperatura da coluna foi programada para variar entre 40 e 230 °C a 6 °C/min em cada um dos três passos programados. O primeiro consistiu em elevar a temperatura de 40 para 100 °C (permanecendo 1 min), o segundo de 100 para 160 °C (durante 5 min) e o último, de 160 para 230 °C, por 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram programadas para 250 °C e 300 °C, respectivamente, sendo utilizado hidrogênio como gás de arraste a um fluxo de 0,5 mL/min.

A identificação dos picos cromatográficos foi determinada por comparação dos tempos de retenção das amostras com os dos padrões de ácidos graxos (SIGMA-SUPELCO 18919) e a quantificação foi feita pela normalização das áreas dos picos. Os resultados foram apresentados como porcentagem de cada ácido graxo identificado na fração lipídica.

2.3.10.1 Índices de qualidade nutricional dos lipídios

A qualidade nutricional da fração lipídica foi avaliada por três índices (Equações 3-5) a partir dos dados de composição em ácidos graxos, através dos cálculos propostos por Ulbricht e Southgate [21], que são Índice de Aterogenicidade (IA) e Índice de Trombogenicidade (IT). A razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) foi calculada segundo Santos-Silva, Bessa, Santos-Silva [22].

$$AI = \frac{C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0}{\sum MUFA + \sum \omega 6 + \sum \omega 3} \quad (3)$$

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{(0.5 \times \sum MUFA) + (0.5 \times \sum \omega 6) + (3 \times \sum \omega 3) + (\sum \omega 3 / \sum \omega 6)} \quad (4)$$

$$HH = \frac{C18:1cis9 + C18:2\omega 6 + C20:4\omega 6 + C18:3\omega 3 + C20:5\omega 3 + C22:5\omega 3 + C22:6\omega 3}{C14:0 + 16:0} \quad (5)$$

3 Resultados e Discussão

O rendimento encontrado para a extração dos lipídios presentes na pele de frango através do método oficial de Soxhlet [14] foi de apenas 14%, comparados aos 30%, extraídos por Bligh e Dyer [15] com modificações [16, 17]. Segundo Brum, Arruda e Regitano-D'Arce [23], os baixos rendimentos do método de Soxhlet podem ser atribuídos ao refluxo com solvente por muitas horas, que favorece as reações de peroxidação e de hidrólise, comprometendo o rendimento e avaliações analíticas posteriores. Além disso, o solvente apolar empregado não interage eficientemente na interface água/óleo da pele animal. Para as análises subseqüentes foi utilizado o método de Bligh e Dyer com as modificações citadas anteriormente, pois além de extrair aproximadamente o dobro dos lipídios presentes na pele, minimiza as alterações ocasionadas por tratamento térmico previstos nos métodos hidrolíticos ou extração térmica pelo sistema de Soxhlet.

Brum, Arruda e Regitano-D'Arce [23], estudaram vários métodos de extração lipídica de gordura de peito de frango (umidade=73,8%) e relataram que o melhor método foi o de Bligh e Dyer [15], modificado por Christie [16] e Smedes e Thomasen [17]. Segundo os mesmos autores, o uso de um único solvente não é recomendável para a extração dos lipídios de tecidos animais e sim a mistura de solventes, a qual deve ser suficientemente polar para extrair a matéria graxa dos tecidos das associações com as membranas celulares ou com lipoproteínas, sem que ocorra reação química. Souza *et al* [24] encontraram 26,5% de lipídios para pele de

frango extraída pelo método de Bligh e Dyer [15], semelhante ao valor encontrado no presente estudo.

A Tabela 1 mostra os resultados da composição físico-química do óleo de soja (usado como referência neste trabalho) e da gordura da pele de frango (GPF), bem como as faixas dos valores estipulados pela legislação e literatura.

Tabela 1. Composição físico-química do óleo de soja e da gordura da pele de frango

Determinações*	Amostra Óleo de soja	Óleo de soja ¹	Amostra GPF	Óleo frango ²	Sebo bovino ²	Banha suína ²
Índice de saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	188,43±0,87	189-195	216,5±2,12	190-196	190- 202	190-194
Índice de acidez (g ácido oleico.100g ⁻¹)	0,00±0,00	Máx. 0,3	0,65±0,13	Máx. 2	Máx. 2	Máx. 1
Índice de iodo (g I ₂ .100g ⁻¹)	101,80±1,05	120-143	81±1,48	73-85	35-48	55-68
Índice de peróxido (meq.kg ⁻¹)	2,61±0,19	Máx. 10	2,14±0,60	Máx. 5	Máx. 5	Máx. 5
Índice de refração (40°C)	1,458±0,00	1,466- 1,470	1,47±0,00	-	1,46	-
TBA (µmoles.g ⁻¹)	ND	-	ND	-	-	-
p-anisidina (unidades de absorvância.g ⁻¹)	0,18±0,01	-	0,70±0,14	-	-	-
Matéria insaponificável (g.100g ⁻¹)	0,6±0,17	Máx. 1,5	1,9±0,30	Máx. 0,3	Máx. 0,90	Máx. 1

* triplicatas±DP; ¹ BRASIL (1999). ² Bellaver e Zanotto (2004).
GPF = gordura da pele de frango; ND = não detectado; Máx = máximo.

Todas as determinações realizadas, com exceção do índice de iodo (II) do óleo de soja, mostraram que os valores encontrados foram semelhantes aos estabelecidos pela literatura [9, 25]. O baixo II pode ser atribuído ao fato de que o óleo comercial utilizado neste trabalho possa ser proveniente de soja geneticamente modificada e os padrões atuais de legislação não levam isto em consideração. Alguns óleos possuem baixo conteúdo de ácido graxo linolênico, visando diminuir a oxidação lipídica, conferindo maior estabilidade aos mesmos [26, 27]. Baixos II, de 82 e 98,8 foram encontrados para óleos com alto teor de oleico e esteárico, respectivamente [26]. Como o II reflete o grau de insaturação da fração lipídica, este foi inferior para

óleo de soja, ou seja, quanto menor o número de insaturações, menor o *II*. Isto pode ter se refletido no valor do índice de refração, o qual foi ligeiramente inferior para este óleo.

Na GPF o *II* foi aproximadamente duas vezes maior ($81 \text{ g I}_2.100 \text{ g}^{-1}$) do que na gordura de mamíferos (Tabela 1), estando próximo aos valores de 78,5 e $76 \text{ g I}_2.100 \text{ g}^{-1}$ encontrados respectivamente por Luddy [28] e Chiu, Gioielli e Grimaldi [5], para tecido adiposo de frango. Tavares *et al.* [29] encontraram *II* e refração a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ para óleo de soja de $129,2 \text{ g I}_2.100 \text{ g}^{-1}$ e 1,467 respectivamente. O índice de refração de óleos e gorduras pode ser utilizado como um dado de identidade e tende a aumentar com o aumento da cadeia carbônica e grau de insaturação dos ácidos graxos.

Os valores de peróxidos, TBA e p-anisidina indicam a boa qualidade das amostras, sugerindo armazenamento correto e a ausência de oxidação lipídica. Conforme Jorge e Janieri [30], vários fatores podem afetar a reação do ácido tiobarbitúrico, tais como o tipo de óleo vegetal, forma de envase e armazenamento das amostras, além da técnica aplicada e a presença de substâncias que diminuem a oxidação.

Quanto ao índice de acidez, como o óleo de soja foi refinado, era esperado que houvesse quantidade mínima de ácidos graxos livres, uma vez que no processo de refino, os mesmos devem ser removidos [31]. Para gordura da pele de frango (GPF), a acidez também foi baixa e dentro da faixa relatada na literatura (Tabela 1). Os índices de acidez e peróxido indicam a rancidez hidrolítica e oxidativa respectivamente, estando estes valores na amostra analisada dentro do estipulado na literatura para óleo de frango, sebo e banha suína quanto ao aspecto de degradação, conforme Bellaver e Zanotto [9]. O índice de peróxido está abaixo do encontrado por Ferrari e Koller [10] para gordura de frango, $2,8 \text{ meq.kg}^{-1}$. Estes autores citam que valores de até 5 meq.kg^{-1} deste índice indicam que as características sensoriais da gordura já são perceptíveis ao paladar, no entanto quando o índice atinge valores de 10 meq.kg^{-1} de amostra, o produto já se encontra completamente rancificado, sendo impróprio para o consumo.

Na fração insaponificável estão os pigmentos e esteróis e na GPF, esta fração foi até 6 vezes maior que o permitido para o óleo de frango [9], sugerindo a necessidade de explorar os seus componentes.

Os óleos são constituídos em média de 96% de triacilgliceróis, 2% de fosfolípidios, 1,6% de insaponificáveis e 0,5% de ácidos graxos livres [31]. O

fracionamento do óleo de soja e da GPF na coluna cromatográfica apresentou respectivamente 0,8% e 1,5% de MAG, 4,6% e 1,0% de DAG, 94,6% e 97,4% de TAG. Estas percentagens foram levadas em consideração para o cálculo destas frações no perfil lipídico, apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os ácidos graxos predominantes no óleo de soja e suas frações foram linoleico (C18:2), oleico (C18:1), palmítico (C16:0) e linolênico (C18:3), respectivamente. Nas frações MAG e DAG os mesmos ácidos graxos predominaram, porém em menores proporções, uma vez que a quantidade destes lipídios foi muito baixa.

Tabela 2. Perfil lipídico (%) do óleo de soja e seus glicerídeos fracionados

Ácido Graxo	Nome comum	Óleo soja ¹⁻³	Óleo soja	TAG	DAG	MAG
C14:0	Ácido mirístico	0-0,1	0,10	0,08	0,01	0,003
C16:0	Ácido palmítico	7,0-14,0	7,67	7,03	0,63	0,139
C16:1	Ácido palmitoleico	0-0,2	0,10	0,10	0,00	0,009
C18:0	Ácido esteárico	1,4-5,5	2,39	2,27	0,18	0,052
C18:1 ω 9	Ácido oleico	17,7-30,0	29,76	27,93	1,16	0,196
C18:2 ω 6 c	Ácido linoleico cis	44,0-62,0	54,27	50,97	2,31	0,341
C18:2 ω 6 t	Ácido linoleico trans	-	0,37	0,45	0,02	0,004
C18:3 ω 3	Ácido linolênico	4,0-11,0	5,18	4,81	0,20	0,038
C20:0	Ácido araquídico	0,1-0,7	0,26	0,22	0,02	0,004
C20:1	Ácido eicosamonoenoico	0-0,3	0,51	0,45	0,04	0,008
C20:2	Ácido eicosadienoico	-	tr	tr	tr	tr
C20:3	Ácido eicosatrienoico	-	tr	tr	tr	tr
C20:5 ω 3	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	-	tr	tr	tr	tr
C22:0	Ácido behênico	-	tr	tr	tr	tr
Σ AGS		13,7-16,2	10,7	9,9	0,9	0,2
Σ AGMI		22,0-24,2	30,4	28,5	1,2	0,2
Σ AGPI		59,9-62,8	59,8	56,2	2,5	0,4
Σ ω 6		52,1-60,8	54,6	51,4	2,3	0,3
Σ ω 3		7,1-8,7	5,2	4,8	0,2	0,0
Razão ω 6/ ω 3		6,1-7,7	10,6	10,7	11,6	9,0

Média de triplicatas (DV<3%); tr = traços (<0,1%); TAG = triacilgliceróis; DAG = diacilgliceróis; MAG = monoacilgliceróis; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos mono-insaturados; AGPI = ácidos graxos poli-insaturados

¹Dubois *et al.*, 2007; ²Brasil (1999); ³Tavares *et al.* (1989).

O perfil obtido está de acordo com as faixas estipuladas pela literatura [25, 29, 32], de acordo com a Tabela 2, confirmando o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, em torno de 60%, principalmente do tipo ω 6 (54%), seguido de mono-insaturados e por último, saturados.

A proporção ω 6/ ω 3 é calculada devido a necessidade de um equilíbrio entre as duas famílias que originam metabolicamente eicosanoides, para evitar um

status proinflamatório por um lado e um status deficiente por outro. As recomendações variam de acordo com o país, enquanto que Alemanha e Suécia têm estabelecido proporção de ω_6/ω_3 de 5:1, a Inglaterra exige no máximo 4, sendo o Japão mais rigoroso, estabelecendo uma relação de 2:1. A FAO é menos exigente estabelecendo uma ingestão de ω_6/ω_3 na razão de 5-10:1 [32], valor este próximo ao do presente trabalho (10,7).

A Tabela 3 apresenta o perfil lipídico da GPF e suas frações. Os principais ácidos graxos encontrados na GPF foram oleico, linoleico e palmítico, sendo que houve predominância de ácidos graxos mono-insaturados (AGMI), em torno de 40%. O total de insaturados foi aproximadamente 70%, o que está de acordo com vários autores que estudaram gordura de frango [5,8,11].

Tabela 3. Perfil lipídico da gordura de pele de frango e seus glicerídeos fracionados.

Ácido Graxo	Nome comum	GPF	TAG	DAG	MAG
C14:0	Ácido mirístico	0,53	0,41	0,00	0,01
C16:0	Ácido palmítico	23,52	21,17	0,18	0,30
C16:1	Ácido palmitoleico	4,18	3,70	0,04	0,08
C18:0	Ácido esteárico	6,11	6,38	0,08	0,12
C18:1 ω_9	Ácido oleico	34,78	34,88	0,37	0,44
C18:2 ω_6	Ácido linoleico	28,23	28,18	0,29	0,45
C18:3 ω_3	Ácido linolênico	2,37	2,44	0,02	0,05
Σ Saturados		30,2	28,0	0,3	0,4
Σ Mono-insaturados		39,0	38,6	0,4	0,5
Σ Poli-insaturados		30,6	30,6	0,3	0,5
Σ ω_6		28,2	28,2	0,3	0,4
Σ ω_3		2,4	2,4	0,0	0,0
Razão ω_6/ω_3		11,9	11,6	11,9	9,7

Média de triplicatas (DV<3%); GPF = gordura da pele de frango

Comparada a outras fontes de gordura animal, a de frango possui a maior quantidade de insaturados, de 65-68% sendo 45-50% de mono-insaturados [4, 8, 11], enquanto que a banha contém 52-55% de insaturados [9, 33, 34] e o sebo bovino, 44-45% [9, 35], dos quais 30-40% são AGMI.

Mottram, Crossman e Evershed [4] ao comparar a composição de ácidos graxos de origem animal, observaram que a gordura de frango apresentou uma proporção consideravelmente mais elevada de ácidos graxos insaturados (65%) do que a carne de ovelha (37%) ou de vaca (33%) e uma proporção inferior de ácido esteárico (10%), quando comparada à gordura bovina (31%), ovina (32%) ou banha de porco (14%).

Sheu e Chen [8] observaram que não houve diferença significativa entre o perfil lipídico da pele, tecido adiposo e carne de frangos (Tabela 4). Isto pode ser um indicativo de que a pele é um resíduo valioso que está sendo perdido ou subutilizado; seu uso se tornaria interessante em reações de interesterificação, bem como produção de biodiesel, entre outros, minimizando deposição destes resíduos no meio ambiente.

Tabela 4. Porcentagem de ácidos graxos em diferentes partes do frango conforme literatura

Ácido Graxo	Pele ^a	Tecido adiposo ^a	Carne ^a	Óleo de frango ^b	Gordura ^c	Tecido adiposo ^d
C14:0	0,8	0,9	0,7	0,5	0,7	0,7
C14:1	-	-	-	-	0,3	-
C16	27,1	26,7	27,0	26,5	25,2	23,8
C16:1	8,0	7,5	6,6		7,8	7,3
C18:0	6,3	6,3	5,5	5,5	5,9	5,6
C18:1	42,5	43,7	44,4	43,5	40,5	40,5
C18:2	14,1	14,0	15,2	14,5	18,4	20,9
C18:3	0,5	0,4	0,4	0,8	0,7	1,0
C20:1	-	-	-	-	0,5	-

^a Sheu & Chen (2002) para pele, tecido adiposo e carne de frango, respectivamente; ^b Bellaver e Zanotto (2004), óleo obtido de partes não-comestíveis de frangos abatidos, seguido de prensagem, decantação ou filtração; ^c Lee & Foglia (2000) para gordura obtida da Tyson Foods (Springdale, AR); ^d Ferrari & Koller (2001).

De acordo com Brockerhoff *et al.* [13], a posição *sn*-2 do triacilglicerol da gordura de frango é composta por 80% de ácidos graxos insaturados e 20% de saturados. Geralmente os grupos acil localizados na posição 2 do TAG são considerados como sendo mais nutricionalmente e fisiologicamente disponíveis do que se os mesmos grupos estivessem na posição *sn*-1,3 do TAG. Assim, reações de interesterificação enzimática com lipases 1,3 específicas seriam viáveis, uma vez que preservariam a posição 2, e alterariam os ácidos graxos das demais posições.

A Tabela 5 mostra os índices de qualidade nutricional dos lipídios. Ulbricht e Southgate [21] sugeriram que os ácidos graxos saturados aterogênicos ou hiperlipidêmicos são o láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), enquanto os ácidos graxos trombogênicos são o mirístico, palmítico e esteárico (C18:0). Os ácidos graxos insaturados de cadeia longa ω 3 (linolênico) e ω 6 (linoleico) são considerados como anti-aterogênicos e anti-trombogênicos. Por conseguinte, estes índices podem indicar se um alimento é adequado para a prevenção de doenças cardiovasculares em humanos e devem ser baixos na dieta. Por outro lado, o índice HH é relacionado mais especificamente com o metabolismo do colesterol, assim, pelo

ponto de vista nutricional, quanto maior o valor, melhor, conforme valor encontrado para óleo de soja.

Tabela 5. Índices de qualidade nutricional de lipídios

Ácido graxo	HH	IT	IA
Óleo de soja	11,53	0,17	0,09
Gordura da pele de frango	2,72	0,74	0,37

HH, \sum hipocolesterolêmicos / \sum hipercolesterolêmicos;
IT, índice trombogênico, IA, índice aterogênico

Foi observada que a gordura da pele de frango apresentou índice HH cerca de quatro vezes inferior e índices IT e IA, cerca de quatro vezes superior, quando comparada ao óleo de soja. Isto indica que, do ponto de vista nutricional, a gordura da pele de frango (HH = 2,72) é mais propensa a elevar o colesterol do que óleo de soja, uma vez que possui alta quantidade de ácidos graxos saturados, principalmente palmítico (23,5%), o que eleva o índice HH. Além disso, essa gordura possui mais ácidos graxos pró-trombogênicos e aterogênicos (ácidos graxos saturados C16 e C18) do que o óleo de soja. Assim, dificilmente a gordura da pele encontraria aplicação nutricional na forma em que se apresenta, sendo necessário modificá-la para adequá-la a outra aplicação.

No entanto, quando o índice HH encontrado no presente trabalho para GPF é comparado com lipídios de outra fonte animal, como pescado, o último apresentou valores inferiores (<1,8) [36, 37]. Bentes *et al.* [36] avaliaram três diferentes espécies de pescado, sendo que os índices estudados não diferiram entre estas espécies. Os baixos valores obtidos foram devido ao alto conteúdo de C16:0 encontrado nestes pescados (28,5%), que foi o ácido graxo predominante. Ramos-Filho *et al.* [37] encontraram valores ligeiramente maiores (1,6-1,8) de HH para quatro diferentes espécies de pescado, sendo que em algumas prevaleceram o ácido oleico e outras o palmítico.

Os ácidos graxos saturados (AGS) mais hipercolesterolêmicos ou aterogênicos em ordem de potência englobam os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e láurico (C12:0). O ácido palmítico é o AGS hipercolesterolêmico mais frequentemente encontrado. Contudo, a substituição de AGS por AGMI diminui o nível de colesterol sérico e LDL, e os índices de triacilgliceróis assemelham-se aos dos AGPI. O ácido oleico, componente da dieta do Mediterrâneo evidenciou efeitos anti-inflamatórios [38].

Ramos Filho *et al.* [37] determinaram os índices IA e IT para 4 espécies de pescado, obtendo respectivamente valores de 0,54 e 0,59 para o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*); 0,49 e 0,33 para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*); 0,86 e 1,16 para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e 0,70 e 0,35 para o dourado (*Salminus maxillosus*). Bentes *et al.* [36] encontraram média de 0,69 para IA e 0,33 para IT. Os valores reportados por ambos autores se encontram próximos aos verificados no presente trabalho.

Tendo em vista o exposto anteriormente, a utilização da GPF se torna viável para outras aplicações, como por exemplo, a interesterificação desta com outros ácidos graxos de interesse para produção de lipídios funcionais [39]. Outra aplicação potencial é a utilização de resíduos para produção de biodiesel. Segundo Gomes [7], no abate de aves, são descartados sangue, penas, vísceras não comestíveis, ossos, resíduos e rejeitos, ou seja, 30% do peso da ave em resíduos e destes, 11,3% são constituídos de gordura. O mesmo autor estudou o potencial de cinco cooperativas do estado do Paraná, Brasil, em produzir óleo de vísceras e biodiesel, estimando uma produção anual aproximada de 20.400 ton de óleo e 19.500 ton de biodiesel. Segundo Arnaud *et al.* [3], a gordura de frango pode ser incorporada em produtos requintados (*delicatessen*) com substancial valor nutritivo, além de existir um mercado crescente para os produtos avícolas, uma vez que estes não são proibidos por nenhuma religião.

Lipídios estruturados obtidos a partir de gorduras animais pouco utilizadas têm sido obtidos através de reações de interesterificação entre banha de porco e óleo de soja [33, 34, 40] como alternativa para obtenção de substitutos de leite humano. Também tem sido relatada acidólise entre gordura de frango e ácidos graxos de cadeia média (caprílico) para produção de lipídios estruturados funcionais contendo ácidos graxos mono-insaturados e de cadeia média com diferentes propriedades físicas (ponto de fusão) e químicas da gordura de frango usada como substrato [11].

4 Conclusões

A utilização da gordura da pele de frango mostrou índices baixos para oxidação lipídica ($IP = 2,14 \text{ meq.kg}^{-1}$, $IpA = 0,70$ unidades de absorvância) e riqueza em ácidos graxos insaturados oleico (34,8%) e linoleico (28,3%). Os ácidos graxos saturados de cadeia longa de maior abundância como palmítico (23,5%) podem ser substituídos por outro tipo de ácido graxo para adequar esta gordura para diferentes aplicações como produção de lipídios funcionais por interesterificação ou produção de

biodiesel. Além disso, o uso da gordura da pele de frango pode minimizar a deposição de resíduos no meio ambiente.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo auxílio financeiro

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referencias

- [1] ABEF: Brazilian Association of Chicken Producers and Exporters. *Statistics*. Available online at: <<http://www.abef.com.br/>>. Last accessed: Nov. 2009.
- [2] H. W. Ockerman, C. L. Hansen: *Industrialization of animal by-products*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, (Espanña) 1994.
- [3] E. Arnaud, P. Relkin, M. Pina, A. Collignan: Characterization of chicken fat dry fractionation at the pilot scale. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2004, **106** (9), 591-598.
- [4] H. R. Mottram, Z. M. Crossman, R. P. Evershed: Regiospecific characterisation of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2001, 126, 1018-1024.
- [5] M. C. Chiu, L. A. Gioielli, R. Grimaldi: Structured lipids from chicken fat, its stearin and medium chain triacylglycerol blends. I - Fatty acid and triacylglycerol compositions. *Quim Nova*. 2008, **31** (2), 232-237.
- [6] K. F. Rodrigues, A.C. Fraga, P. C. Neto, J. A. S. Maciel, O. C. Lopes: Capability of chicken fat to produce biodiesel. Biodiesel: the new fuel of Brazil. In: *Congress of the Brazilian Biodiesel Technology*. ABIPTI, Brasília. 2005, pp.129-132.
- [7] L. F. S. Gomes: M. D. Dissertation, State University of West Paraná, Cascavel (Brazil) 2005.
- [8] K. S. Sheu, T. C. Chen: Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained from five rendering methods. *J Food Eng*. 2002, **55** (3), 263-269.

- [9] C. Bellaver, D. L. Zanotto: *Quality parameters in fat and protein products of animal origin*. Apinco Conference, Santos, SP. In: *Apinco Conference of Poultry Science and Technology*. FACTA, Campinas, SP (Brazil) 2004, pp. 79-102. v. 1.
- [10] R. A. Ferrari, F. R. Koller: The fractioning of chicken fat. *Publ UEPG Exact Earth Sci Agr Sci Eng*. 2001, **7** (1), 43-51.
- [11] K.-T. Lee, T. A. Foglia: Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc*. 2000, **77** (10), 1027-1034.
- [12] E. Lopez-Huertas: Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res*. 2010, **61** (3), 200-207.
- [13] H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, N. Wolmark: Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. *Biochim Biophys Acta*. 1966, **116** (1), 67-72.
- [14] AOAC: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Arlington, VA (USA) 1995. 16th ed.
- [15] E. G. Bligh, W. J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem and Physiol*. 1959, **37** (8), 911-917.
- [16] W. W. Christie: *Lipid analysis*. Oxford: Pergamon Press, 1982. ch.3, p. 25-49. Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles.
- [17] F. Smedes, T. K. Thomasen: Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Mar Pollut Bull*. 1996, **32** (8/9), 681-688.
- [18] AOCS: *Official Methods and Recommended Practices of AOCS*. AOCS Press, Champaign, IL (USA) 1997. 5th ed.
- [19] Adolfo Lutz: *Analytical Standards of the Adolfo Lutz Institute. Chemical and Physical Methods for Food Analysis*. 3rd Edn. São Paulo (Brazil) 1985.
- [20] L. D. Metcalfe, A. A. Schmitz, J. R. Pelka: Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem*. 1966, **38**, 514-515.
- [21] T. L. V. Ulbricht, D. A. T. Southgate: Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*. 1991, **338** (8773), 985-992.
- [22] J. Santos-Silva, R. J. B. Bessa, F. Santos-Silva: Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Prod Sci*. 2002, **77** (2/3), 187-194.
- [23] A. A. S. Brum, L. F. Arruda, M. A. B. Regitano-D'Arce: Extraction methods and quality of the lipid fraction of vegetable and animal samples. *Quím Nova*. 2009, **32** (4), 849-854.

- [24] S. A. B. de Souza, M. Matsushita, N. E. de Souza: Protein, lipids and cholesterol in roasted chicken. *Rev Unimar*. 1997, **19** (4), 1069-1073.
- [25] ANVISA: Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance. *Technical Regulation for Identity and Quality Fixation of Vegetable Oils and Fats*. RDC 482, from Sep, 23th. 1999.
- [26] J. S. B. Costa: M. D. Dissertation, University of Porto (Portugal) 2008. Available online at: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/20791/2/DISSERTAO.pdf>. Last accessed: july 2010.
- [27] E. A. A. Sanibal, J. Mancini Filho. Physical, chemical and nutritional changes in oils submitted to frying process. Available online at: <http://hygeia.fsp.usp.br/~eatorres/gradu/frituras.pdf>. Last accessed: July 2010.
- [28] F. E. Luddy, G. R. Fertsch, R. W. Riemenschneider: Glyceride composition of fats and oils determined by oxidation and crystallization methods. *J Am Oil Chem Soc*. 1954, **31**, 266-268.
- [29] M. Tavares, J. C. Barbério, E. S. G. Badolato, F. D. Maio, J. B. Carvalho: Gas-chromatographic identification and quantification of palm oil adulterants. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1989, **49** (2), 145-150.
- [30] N. Jorge, C. Janieri: Evaluation of soybean oil submitted to the frying process of varied food. *Cienc Agrotec*. 2005, **29** (5), 1001-1007.
- [31] FAO Agricultural Services Bulletins no. 97: *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans*. Available online at: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e02.htm>. Last accessed: July 2010.
- [32] V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier: Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2007, **109** (7), 710-732.
- [33] R. C. da Silva, L. A. Gioielli: Physical properties of structured lipids from lard and soybean oil. *Rev Bras Cienc Farm*. 2006, **42** (2), 223-235.
- [34] T. Yang, X. Xu, C. He, L. Li.: Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chem*. 2003, **80**, 473-481.
- [35] A. C. Pinto, L. L. N. Guarieiro, M. J. C. Rezende, N. M. Ribeiro, E. A. Torres, W. A. Lopes, P. A. P. Pereira, J. B. Andrade: Biodiesel: an overview. *J Braz Chem Soc*. 2005, **16** (6b), 1313-1330.

- [36] A. S. Bentes, H. A. L. Souza, X. M. F. D. Mendonça, M. G. Simões: Physical and chemical characterization and lipid profile of three amazon fish species. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial*. 2009, **3** (2), 97-108.
- [37] M. M. Ramos Filho, M. I. L. Ramos, P. A. Hiane, E. M. T. Souza: Lipid profile of four species of fish from the pantanal region of Mato Grosso do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2008, **28** (2), 361-365.
- [38] L. K. Mahan, S. Escott-Stump: *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. 12th Edn. WB Saunders Company, Philadelphia (USA) 2007.
- [39] V. Feddern: Ph. D. Thesis, Federal University of Rio Grande, Rio Grande (Brazil) 2010.
- [40] N.S. Nielsen, T. Yang, X. Xu, C. Jacobsen: Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chem*. 2006, **94**, 53-60.

**Artigo II: Produção de lipídios modificados pela
acidólise da gordura de pele de frango e ácidos graxos
ramificados**

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MODIFICADOS PELA ACIDÓLISE DA GORDURA DE PELE DE FRANGO E ÁCIDOS GRAXOS RAMIFICADOS

RESUMO

A pele é um dos vários coprodutos das indústrias processadoras da carne de frango que é considerada como resíduo, sendo pouco aproveitada ou subutilizada, gerando uma perda valiosa, pois é rica em ácido oleico. Ácidos graxos ramificados além de serem mais estáveis, possuem aplicações em surfactantes, lubrificantes, cosméticos, antiespumantes, entre outras. Visto que os ácidos graxos essenciais ou desejáveis são melhor utilizados na posição *sn*-2 do triacilglicerol, é possível mantê-la, obtendo lipídios modificados de interesse. O objetivo deste trabalho foi a produção de lipídios modificados ricos em ácidos graxos essenciais a partir da gordura da pele de frango e ácidos graxos ramificados, utilizando lipase *sn*-1,3 específica (*Lipozyme* RM IM) como biocatalisador. Para isso foram realizadas reações de interesterificação do tipo acidólise, variando concentração de enzima (5 a 15%), adição de água (0 a 10%), relação molar dos substratos (2:1 a 6:1) e tempo (8 a 24 h) por meio de um planejamento experimental completo 2^4 com três pontos centrais. Ao final do experimento, as amostras interesterificadas foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada, sendo posteriormente extraídas, metiladas e injetadas em cromatógrafo a gás. Nos triacilgliceróis modificados, máximos de 44,8%, 35,2% e 18,1% de oleico, linoleico e linolênico foram obtidos, os quais podem ser utilizados para fins nutricionais ou tecnológicos.

Palavras-chave: ácidos graxos ramificados, gordura da pele de frango; *Lipozyme* RM IM; acidólise, interesterificação.

ABSTRACT

Skin is one of the several co-products of chicken meat industries, considered as waste, being rarely utilized or underutilized, resulting in a valuable loss because it is rich in oleic acid. Branched fatty acids are more stable than the straight ones, having applications in surfactants, lubricants, cosmetics, antifoaming, among others. Since the desirable or essential fatty acids are better used in the *sn*-2 position of triacylglycerol, it's possible to maintain this position, obtaining modified lipids of interest. The aim of this work was producing modified lipids rich in unsaturated fatty acids, through lipase-catalyzed acidolysis reaction from chicken skin fat and branched fatty acids using *Lipozyme* RM IM as biocatalyst. Interesterification reactions were carried out varying enzyme concentration, water addition, substrate molar ratio and time using a 2^4 complete factorial design with three central points. The interesterified samples were applied on thin layer chromatography plates, extracted, methylated and injected into gas chromatograph. In modified triacylglycerol, a maximum of 44.8%, 35.2% and 18.1%, respectively of oleic, linoleic and linolenic acids were obtained, which can be used for nutritional as well as technological purposes.

Key-words: branched chained fatty acid, chicken skin fat, Lipozyme RM IM, acidolysis, interesterification

1 Introdução

O Brasil é o líder mundial nas exportações de frango (3,6 milhões de toneladas) e o terceiro maior produtor (10,9 milhões de toneladas). Estima-se que do total nacional produzido, são gerados cerca de 436.000 ton/ano de resíduos, por isto torna-se necessário um reaproveitamento destes, por serem ainda ricos em lipídios e proteínas (ABEF, 2009).

A pele é um dos vários coprodutos das indústrias processadoras da carne de frango que é considerada como resíduo, sendo pouco aproveitada ou subutilizada e está numa proporção de 4% em relação ao peso vivo do animal. Devido a esta alta proporção, gera custos adicionais de eliminação e problemas ao meio ambiente, além da perda de um produto com potencial alimentício (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

De acordo com Lee e Foglia (2000b), a gordura de frango contém cerca de 60% de ácidos graxos insaturados. Dentre estes, destacam-se os mono-insaturados (AGMI), os quais são encontrados numa proporção de 45 a 50%, enquanto que o sebo bovino apresenta somente 30 a 40% destes ácidos graxos. Portanto, a gordura de frango é considerada uma fonte de AGMI, principalmente o oleico, o qual é associado à redução do risco de enfermidades cardiovasculares, pois reduz os níveis de colesterol sanguíneo em indivíduos não-hipertrigliceridêmicos.

Ácidos graxos ramificados (AGR) estão presentes principalmente em lipídios de fungos e bactérias. Esses lipídios foram detectados em poucos fungos numa proporção de 1% ou menos em relação aos ácidos graxos totais (TYRRELL, 1968). Kniazeva *et al.* (2004) relataram que AGR monometil são comumente encontrados desde bactérias até os mamíferos. Nos seres humanos, têm sido detectados na pele, cérebro, sangue e células cancerígenas. Apesar da ampla distribuição, esses lipídios permanecem exóticos em eucariotos, onde a sua origem e funções fisiológicas não são compreendidas. Ácidos ramificados de cadeias curtas são encontrados no tecido adiposo de animais ruminantes, no sebo animal e ceras de lã (CYBERLIPIDS, 2010).

Compostos contendo ácidos ramificados são de interesse comercial porque a ramificação pode causar algumas mudanças vantajosas nas propriedades físicas, enquanto retém o mesmo (ou quase) número de átomos de carbono. Por exemplo, eles possuem uma faixa de liquidez mais ampla, os tornando interessantes em aplicações que usam baixa temperatura, como a propriedade de espalhabilidade. Esses tipos de lipídios são utilizados em surfactantes, lubrificantes, cosméticos e como aditivos em polímeros, antiespumantes, e agentes protetores da madeira (BIERMANN e METZGER, 2008; BEHR e LAUFENBERG, 1991 *apud* KNOTHE, KENAR e GUNSTONE, 2007). De acordo com Kinsman (1979), ácidos graxos ramificados e seus derivados geralmente têm boa estabilidade oxidativa e térmica, além de melhor solubilidade, quando comparados aos ácidos graxos de cadeia linear.

Várias reações produzem compostos ácidos ramificados. Em alguns casos, especialmente se a matéria-prima apresenta uma ligação dupla terminal, pode ocorrer a extensão da cadeia, ao invés da ramificação. Quando os ramificados são introduzidos, a reação pode ocorrer com retenção ou saturação da ligação dupla, geralmente com mudança na configuração (KNOTHE, KENAR e GUNSTONE, 2007).

As lipases permitem modificar as propriedades dos lipídios, alterando a localização dos ácidos graxos no glicerídeo e substituindo um ou mais ácidos graxos por outros, o que possibilita a alteração estrutural de um lipídio menos desejável ou de baixo custo, por outro com funções nutricionais e terapêuticas (SHARMA *et al.*, 2001). Xu *et al.* (1999) e Yang *et al.* (2003) relataram que na acidólise catalisada por lipase, as reações ocorrem normalmente em duas etapas, a hidrólise e a esterificação. A hidrólise é geralmente considerada o passo limitante, pois nesta etapa, a água age como reagente, enquanto que na etapa de esterificação age como produto, portanto, desempenhando um papel importante na acidólise catalisada por lipase.

Os ácidos graxos essenciais ou desejáveis são melhor utilizados na posição *sn*-2 do triacilglicerol. Assim, seria interessante substituir os demais ácidos graxos saturados da gordura da pele de frango por ácidos graxos insaturados, utilizando lipase *sn*-1,3 específica. Desta forma, além de se estar aproveitando um resíduo, se estaria encontrando nova aplicação para o mesmo, em reações de interesterificação.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que utilizassem a gordura da pele de frango (GPF), nem AGR em reações de interesterificação. Considerando a riqueza em AGMI presentes na GPF, principalmente oleico, além das propriedades físico-químicas e tecnológicas dos AGR, o objetivo deste trabalho foi a produção de

lipídios modificados ricos em ácidos graxos essenciais a partir da GPF e AGR, utilizando lipase *sn*-1,3 específica.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Foram utilizados gordura da pele de frango, cedido por uma indústria de processamento de frangos, da região sul do RS e uma mistura de ácidos graxos ramificados, denominado 18-MEA (18-Methyl Eicosanoic Acid - ácido metil eicosanoico), um derivado da lanolina, produzido pela Croda, Malmo, Suécia. *Lipozyme*® RM IM, uma lipase 1,3 específica de *Rhizomucor miehei* foi doada pela Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). Padrões de ácidos graxos, bem como de mono, di e triacilgliceróis foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos solventes químicos empregados foram de grau analítico. A mistura de ácidos graxos ramificados possuía o seguinte perfil lipídico: 1,8% de C14; 6,7% C16; 3,8% C18; 0,9% C18:1; 11,9% C18:2; 15,9% C18:3; 2% C20; 12% C20:2; 0,8% C24. A gordura da pele de frango possuía o seguinte perfil lipídico: 0,53% C14; 23,5% C16; 6,1% C18; 34,8% C18:1; 28,3% C18:2; 2,3% C18:3.

2.2 Interesterificação

A reação de interesterificação foi do tipo acidólise, realizada em reatores de vidro encamisados com agitação magnética, empregando 0,5 mL de hexano como solvente em cada reator, sendo a temperatura mantida constante a 60 °C. O planejamento experimental realizado foi do tipo fatorial completo 2⁴ com 3 pontos centrais, totalizando 19 experimentos. Foram estudados os fatores concentração de enzima (5 a 15%) baseada na massa total de substratos, adição de água (0 a 10%), baseada no conteúdo de enzima, relação molar de substratos (2:1 a 6:1 ácido graxo ramificado: gordura da pele de frango) e tempo (8 a 24 h).

2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As separações analíticas foram executadas em placa de sílica gel 60 (20 cmx20 cm, Merck, Darmstadt, Alemanha). Depois da eluição por cerca de 90 min em

mistura de solventes constituída por hexano, éter dietílico e ácido acético (70:30:1, v/v), a placa foi borrifada com 1% da solução etanólica (96%) de 2,7-diclorofluoresceína, tornando as bandas visíveis sob luz UV. As diferentes frações foram raspadas das placas. A fração de triacilgliceróis foi extraída com clorofórmio: metanol na proporção 2:1, evaporadas sob nitrogênio e submetidas à metilação.

2.4 Metilação dos triacilgliceróis

O resíduo da amostra evaporada no nitrogênio foi acrescentada de 1 mL de NaOH 0,5M em metanol e colocada para refluxar a 80 °C por 10 min (Figura 1). Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de solução metanólica de BF₃ 20% e 0,2 mL de hidroquinona 0,1% em metanol, para prevenir a oxidação. Esta mistura foi refluxada por 5 min a 80 °C. Após resfriamento, 1 mL de heptano foi adicionado, sendo a mistura centrifugada por 5 min a 805 G. A fase superior foi passada para outro tubo. Foi adicionada 1 mL de solução saturada de NaCl, seguido de agitação do tubo. Após a decantação do sal, a fase superior foi transferida para novo frasco, o qual foi evaporado sob nitrogênio, sendo após ressuspensão com 50 µL de heptano e levado para injeção no cromatógrafo a gás.

2.5 Cromatografia gasosa (GC)

Um cromatógrafo a gás (Thermo Scientific DSQ II - TRACE GC ULTRA, USA) com sistema de injeção automático de amostras (Thermo Scientific TriPlus™ Autosampler) foi empregado para separar os ácidos graxos contidos nas frações dos triacilgliceróis. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo de 1 mL/min e detector FID. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente, 250 °C e 270 °C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura da coluna foi inicialmente 40 °C por 3 min, e então programada para subir até 88 °C a uma taxa de 6 °C/min. Então, a temperatura foi aumentada para 166 °C a 20 °C/min e finalmente para 250 °C, numa taxa de 2 °C/min, sendo mantida nesta rampa por 3 min. O tempo total da corrida foi de 59 min. Os picos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção das amostras com os dos padrões, com o auxílio do software Xcalibur (versão 2.0.7) da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA).

2.6 Análise estatística

Os resultados foram tratados no software *Statistica*. Foi realizada análise de variância, sendo o nível de significância para análise dos efeitos de 5%.

3 Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra as diferentes frações obtidas na separação: monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), ácidos graxos livres (AGL) e triacilgliceróis (TAG). Cada fração foi comparada com padrões, sendo que após a confirmação, as frações dos TAG foram raspadas, metiladas e injetadas no cromatógrafo e os efeitos principais na posição dos ácidos graxos foram verificados.

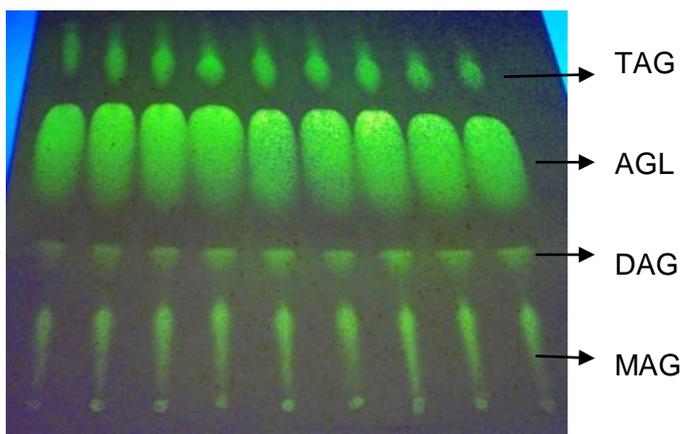


Figura 1. Cromatografia de camada delgada da reação de acidólise entre ácidos graxos ramificados e gordura da pele de frango

A Tabela 1 contém, além da matriz de planejamento, os resultados de percentagem de oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) para os triacilgliceróis obtidos após interesterificação entre ácidos graxos ramificados e gordura da pele de frango nas diferentes condições do planejamento.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 e respostas da porcentagem de ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico nos TAG após interesterificação

Experimentos	X_1	X_2	X_3	X_4	%	%	%
					C18:1	C18:2	C18:3
1	5 (-1)	0 (-1)	2:1 (-1)	8 (-1)	41,5	23,0	0,0
2	15 (+1)	0 (-1)	2:1 (-1)	8 (-1)	44,8	29,3	1,4
3	5 (-1)	10 (+1)	2:1 (-1)	8 (-1)	33,3	22,2	0,0
4	15 (+1)	10 (+1)	2:1 (-1)	8 (-1)	31,6	28,4	3,3
5	5 (-1)	0 (-1)	6:1 (+1)	8 (-1)	34,4	30,0	0,3
6	15 (+1)	0 (-1)	6:1 (+1)	8 (-1)	35,9	18,1	5,4
7	5 (-1)	10 (+1)	6:1 (+1)	8 (-1)	0,1	13,3	18,1
8	15 (+1)	10 (+1)	6:1 (+1)	8 (-1)	22,1	15,4	8,3
9	5 (-1)	0 (-1)	2:1 (-1)	24 (+1)	43,4	35,2	0,5
10	15 (+1)	0 (-1)	2:1 (-1)	24 (+1)	35,0	30,8	3,0
11	5 (-1)	10 (+1)	2:1 (-1)	24 (+1)	9,8	16,4	7,6
12	15 (+1)	10 (+1)	2:1 (-1)	24 (+1)	27,6	26,2	7,9
13	5 (-1)	0 (-1)	6:1 (+1)	24 (+1)	41,1	32,2	0,4
14	15 (+1)	0 (-1)	6:1 (+1)	24 (+1)	32,5	28,2	4,8
15	5 (-1)	10 (+1)	6:1 (+1)	24 (+1)	43,9	29,1	0,6
16	15 (+1)	10 (+1)	6:1 (+1)	24 (+1)	26,7	27,9	8,4
17	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	20,7	18,4	5,8
18	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	33,0	27,6	4,4
19	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	37,1	25,6	2,9

X_1 = concentração de enzima (%), baseado no total de substrato; X_2 = adição de água (%), baseada no conteúdo de enzima; X_3 = razão molar de ácido graxo ramificado: gordura da pele de frango; X_4 = tempo (h); C18:1 = oleico; C18:2 = linoleico; C18:3 = linolênico.

Para o ácido oleico (C18:1), o maior conteúdo (44,8%) foi obtido nos níveis inferiores de adição de água, relação molar e tempo, mas com maior conteúdo enzimático, conforme experimento 2. O experimento 9, seguido do 13, ambos com o menor nível de adição de água e enzima foram os melhores para % de ácido linoleico no triacilglicerol modificado, sendo possível a obtenção de 35,2% e 32,2%, respectivamente, para este ácido graxo. Quanto ao ácido linolênico, níveis inferiores de enzima e tempo, além de superiores de relação molar e adição de água, foram as melhores condições para obtenção de 18,1% deste ácido graxo.

A Tabela 2 apresenta os efeitos das variáveis concentração de enzima, adição de água, relação molar dos substratos e tempo sobre as respostas percentagem de ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico, bem como a probabilidade e t calculado.

Tabela 2. Efeitos principais das variáveis estudadas sobre a percentagem de ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico

Efeitos	C18:1 (%)	p*	Valor t	C18:2 (%)	p*	Valor t	C18:3 (%)	p*	Valor t
Média	31,3	0,000	13,27	25,1	0,000	22,38	4,4	0,001	4,82
X₁	1,1	0,838	0,21	0,3	0,891	0,14	1,9	0,366	0,96
X₂	-14,2	0,025	-2,76	-6,0	0,040	-2,45	4,8	0,041	2,44
X₃	-3,8	0,483	-0,73	-2,2	0,402	-0,88	2,8	0,192	1,42
X₄	2,0	0,703	0,39	5,8	0,046	2,36	-0,5	0,817	-0,24

X₁ = concentração de enzima (%); X₂ = adição de água (%); X₃ = razão molar de ácido graxo ramificado: gordura da pele de frango; X₄ = tempo (h); * quando p<0,05 o efeito foi considerado significativo; erro padrão = 5,14; 2,45; 1,97 respectivamente para oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3).

Foi verificado, conforme Tabela 2, que a adição de água ao meio reacional apresentou efeito significativo para todos ácidos graxos insaturados avaliados. A porcentagem de ácido oleico diminuiu em média 14,2% ao se adicionar 10% de água. Para o ácido graxo essencial linoleico (C18:2), o efeito do tempo de reação também foi significativo. Neste caso, foi constatado que de 8 para 24 h houve um incremento na porcentagem de ácido linoleico, em média 5,8%. No entanto, a adição de até 10% de água diminuiu a concentração de linoleico em 6%. Para o ácido graxo essencial linolênico o efeito da adição de água foi positivo, uma vez que com adição de 10% de água, aumentou em média 4,8% deste ácido. Isto pode ser explicado pelo baixo ponto de fusão deste ácido, que é menor que os demais, o que lhe confere maior solubilidade no meio reacional.

Devido ao fato do linoleico (C18:2) ter sido o único ácido graxo que apresentou dois fatores significativos, foram calculados os coeficientes de regressão para este ácido em relação às variáveis adição de água (X₃) de 0 a 10% e tempo (X₄), de 8 a 24 h, sendo possível a obtenção da curva do modelo, codificado pela equação 1.

$$\% \text{ ácido linoleico} = 22,3430 - 0,5998X_3 + 0,3608X_4 \quad (1)$$

Através da ANOVA, o $F_{\text{calculado}}$ (5,31) foi maior que o F_{tabelado} (3,63) $_{(2,16)}$ a 5% de significância, constatando-se que o modelo é significativo e preditivo, sendo possível a construção da superfície de resposta para o ácido graxo em questão. A Figura 2 mostra a superfície de resposta das variáveis significativas para percentagem de ácido linoleico presente no triacilglicerol modificado.

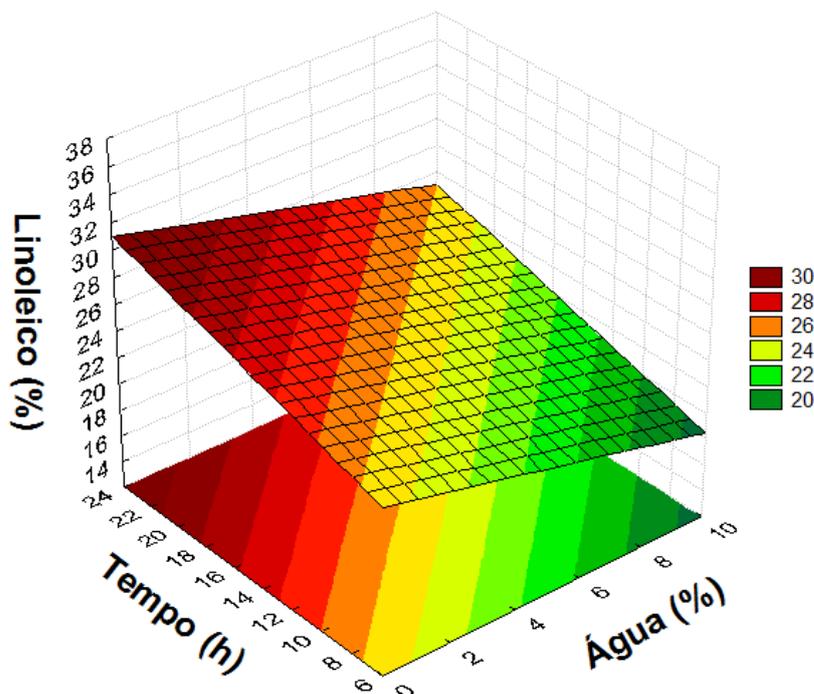


Figura 2. Superfície de resposta da percentagem de linoleico no triacilglicerol modificado

De acordo com a Figura 2, quando nenhuma água foi adicionada, houve tendência de maior concentração de ácido graxo linoleico, que é um dos ácidos graxos essenciais. Assim, quanto menor a quantidade de água a ser adicionada e maior o tempo de reação, maior o conteúdo de ácido linoleico obtido (35,2%).

Yang *et al.* (2003) estudou acidólise de banha com ácidos graxos livres de óleo de soja, verificando incorporação de 32% de linoleico no TAG modificado na relação molar 1:6, sendo que este valor se manteve constante a partir das 3 h até 8 h (tempo final estudado). Os autores utilizaram a mesma temperatura (60 °C) e mesma enzima (10% lipozyme RM IM) do presente estudo, obtendo composição similar.

Xu (2000a,b) relatou que em determinados intervalos, o aumento do conteúdo de água aumenta a atividade inicial de lipases. Muita água, porém, não melhora a reação total ou rendimento do produto final; em vez disso, leva a uma

diminuição na atividade da lipase e um aumento na formação de subprodutos. Portanto, o conteúdo de água ideal deve ser determinado para cada reação.

As lipases precisam de certa quantidade de água para manter uma ótima atividade catalítica, mas um excesso de água contribui para a hidrólise de triacilgliceróis e facilita a migração acil. A quantidade ideal ou ótima de água no meio reacional depende do tipo de solvente utilizado e da lipase. Existem vários trabalhos que descrevem a influência da água e do solvente em reações catalisadas por lipase em meio orgânico. Em geral, o teor ótimo é encontrado entre 0 e 10% (p/p água/lipase) e em muitos casos, esses valores coincidem com as quantidades de água que são retidos no suporte da matriz durante a imobilização da enzima, geralmente 1-5% (PAEZ *et al.*, 2003).

Um solvente orgânico apropriado deve dissolver o suficiente os substratos nas reações catalisadas por lipase, além de não afetar a atividade e estabilidade da enzima (SU *et al.*, 2007). O log de P fornece medida da natureza lipofílica e hidrofílica de um composto, tendendo a ser maior para compostos com estruturas não polares e menor ou negativo para compostos com grupos altamente polares (DAMSTRUP *et al.*, 2005). O solvente hexano usado no presente trabalho possui log P = 3,5, sendo altamente apolar, não retirando água da enzima, portanto adequado para reações de interesterificação.

4 Conclusões

Foi possível a produção de lipídios modificados contendo triacilgliceróis ricos em oleico, linoleico e linolênico, sendo a máxima porcentagem obtida para estes ácidos graxos 44,8%, 35,2% e 18,1%, respectivamente. Sem adição de água e com maior tempo de interesterificação (24 h), foi observada maior porcentagem de ácido linoleico (35,2%) no triacilglicerol modificado por interesterificação enzimática. Lipídios modificados com tal composição podem ser utilizados tanto para fins nutricionais, como tecnológicos.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório de Agrobiotecnologia, Universidade de Aarhus, Dinamarca, onde o trabalho foi desenvolvido. Este trabalho teve financiamento da bolsa CAPES/PDEE (processo número 1104-09-8), concedida ao primeiro autor.

Referencias

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. *Estatísticas*. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/>>. Acesso em: 18 Nov. 2009.

BIERMANN, U.; METZGER, J. Synthesis of alkyl-branched fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.805-811, 2008.

CYBERLIPIDS, 2010. Mono- and multibranching fatty acids. Disponível em: <<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0001.htm#6>>. Acesso em: 05 Jun. 2010.

DAMSTRUP, M.L.; JENSEN, T.; KILL, S.; JENSEN, A.; SPARSØ, F.V.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, p.559-564, 2005.

KINSMAN, D.V. Isostearic and other branched acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p. 823A-827A, 1979.

KNIAZEVA M.; CRAWFORD, Q.T.; SEIBER, M.; WANG, C.Y.; HAN, M. t branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. **Public Library of Science Biology**, v.2, n.9, p.1446-1459, 2004.

KNOTHE, G., KENAR, J.A., GUNSTONE, F.D. Chemical properties. In: GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L., DIJKSTRA, A. J. (3rd. ed.). **The Lipid Handbook with CD-ROM**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.535-590.

LEE, K.-T.; FOGLIA, T.A. Fractionation of chicken fat triacylglycerols: synthesis of structured lipids with immobilized lipases. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p.826-831, 2000.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A.: 1994, p. 387.

PAEZ, B.C.; MEDINA, A.R.; RUBIO, F. C. ;CERDÁN, L.E.; GRIMA, E.M. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p.461-470, 2003.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SU, E.Z.; ZHANG, M.J.; ZHANG, J.G.; GAO, J.F.; WEI, D.Z. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.167-173, 2007.

TYRRELL, D. The fatty acid composition of some *Entomophthoraceae*. II. The occurrence of branched-chain fatty acids in *Conidiobolus denoesporus* drechsl. **Lipids**, v.3, n.4, p.368-372, 1968.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.6, p.289-304, 2003.

XU, X. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. **INFORM (International News of Fats, Oils and Related Materials)**, v.11, p.1121-1129, 2000a.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 287-303, 2000b.

XU, X.; MU, H.; SKANDS, A.R.H.; HØY, C-E.; ADLER-NISSEN, J. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.2, p.175-181, 1999.

YANG T.; XU, X.; HE, C.; LI, L.. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, **Food Chemistry**, v.80, p.473-481, 2003.

Artigo III: Síntese do dihidrocafeato de octila e sua transesterificação com tricaprilina

SÍNTESE DO DIHIDROCAFEATO DE OCTILA E SUA TRANSESTERIFICAÇÃO COM TRICAPRILINA

RESUMO

O ácido dihidrocafeico (DHCA) é um metabólito do ácido cafeico com propriedades antioxidantes, além de ser capaz de proteger as células da pele quando exposta à radiação ultravioleta. Baseado nisso, o objetivo do presente trabalho foi produzir éster fenólico a partir do DHCA, além de realizar reações de transesterificação deste éster com tricaprilina, um triacilglicerol de cadeia média. A reação de esterificação foi realizada em duas relações molares com base nos reagentes DHCA e octanol (1:1 e 1:3), enquanto que as reações de transesterificação foram realizadas em quatro relações (1:1, 1:2, 1:5 e 1:10) entre o éster produzido e a tricaprilina. Para estudar a reação de transesterificação, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) variando a quantidade de enzima (1,6% a 18,4%), tempo de reação (9,9 a 35,1 h) e temperatura (43 a 77 °C), utilizando-se três fatores e cinco níveis sobre a resposta (%) dos reagentes consumidos. A lipase Novozym® 435 de *Candida antarctica* foi utilizada como catalisador em todas as reações. Foi verificado que a maior produção de éster (50%) ocorreu em oito dias. Nas reações de transesterificação, as relações molares em que houve maior consumo do éster produzido foram 1:5 e 1:10, sendo obtidos 21,1% e 29,6% de residual de dihidrocafeato de octila, respectivamente em 24 h. Foi verificado que em altas temperaturas e tempo superior a 26 h, houve menor residual de dihidrocafeato de octila (18,2%). Foram identificados três diferentes compostos fenólicos, contendo em sua estrutura dihidrocafeato de octila e ácido caprílico.

Palavras-chave: ácido cafeico, DHCA, dihidrocafeato de octila, lipase, tricaprilina, transesterificação

ABSTRACT

Dihydrocaffeic acid (DHCA) is a metabolite of caffeic acid with potent antioxidant properties, besides being able to protect skin cells when exposed to ultraviolet radiation. Based on that, the aim of the present work was to produce phenolic ester from DHCA, besides carrying out transesterification reactions of this produced ester with tricapyrylin, a medium-chain triacylglycerol. The esterification reaction was performed in two molar ratios based on reagents DHCA and octanol (1:1 and 1:3), while transesterification reactions were performed in four ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10) between the produced ester and tricapyrylin. To study the transesterification reaction, a central composite rotatable design (CCRD) was employed, varying enzyme load (1.6% to 18.4%), reaction time (9.8 to 35.1 h) and temperature (43 to 77 °C) using three factors and five levels on the response (%) of the consumed reagents. Novozym® 435 from *Candida antarctica* was used as catalyst for all reactions. It was found that the highest ester yield (50%) occurred in eight days. In transesterification reactions, the molar ratios in which there was greater consumption of the ester produced were 1:5 and 1:10, obtaining 21.1% and 29.6% of residual octyl dihydrocaffeate, respectively in

24 h. It was found that at higher temperatures and longer than 26 h, the residual of octyl dihydrocaffeate was lower (18.2%). Three different phenolic compounds were identified, containing in its structure octyl dihydrocaffeate and caprylic acid.

Key-words: caffeic acid, DHCA, octyl dihydrocaffeate, lipase, tricaprylin, transesterification

1 Introdução

Ésteres aromáticos de derivados de ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em fontes naturais como própolis e plantas, possuindo atividade antioxidante, anticancerígena, anti-HIV e antimicrobiana (STEVENSON *et al.*, 2007). Ácidos fenólicos são derivados de ácidos cinâmicos, sendo os hidroxicinâmicos o subgrupo principal de compostos fenólicos e o ácido dihidrocafeico (DHCA) um metabólito do ácido cafeico, encontrado em muitos legumes, frutas e ervas, como por exemplo, café, alcachofra, pêra, manjeriço, tomilho, orégano e maçã. Tem sido relatado que o ácido cafeico também pode proteger células da pele quando exposta à radiação ultravioleta (GUGLIUCCI *et al.*, 2009; FIGUEROA-SPINOZA e VILLENEUVE, 2005; HUANG, PAULIS e MAY, 2004; STAMATIS, SERETI e KOLISIS, 2001; SILVA *et al.*, 2000).

Até o momento, compostos bioativos já foram sintetizados com sucesso, através da modificação enzimática, utilizando uma série de estruturas bioativas e grupos acil de diferentes comprimentos de cadeia e insaturação (SABALLY *et al.*, 2006, 2007). Lipases de várias fontes foram usadas para catalisar tanto reações de esterificação como de transesterificação destes compostos, sendo que dentre as mais eficazes e utilizadas, está a Novozym 435 (*C. antarctica*), mostrando-se extremamente robusta. Com relação ao sistema de reação, a síntese de compostos bioativos tem sido realizada em sistemas com e sem solvente, bem como em meios inovadores, como líquidos iônicos a temperatura ambiente (KAHVECI *et al.*, 2009). Em todos esses sistemas, o principal desafio reside na união de substratos (por exemplo, flavonoides hidrofílicos e ácidos graxos de cadeia longa, hidrofóbicos) com polaridades muito diferentes. Na maioria das vezes, um bom contato entre os substratos e a lipase requer pelo menos algum cuidado na seleção de solventes: terc-butanol, acetona e até mesmo sistemas de solvente, como octano/2-butanona também funcionam. Sistemas sem solvente parecem mais eficazes quando os substratos em questão são fluidos e limitações à transferência de massa são reduzidas (DEVI *et al.*, 2008).

A esterificação de ácidos fenólicos (incluindo vários derivados hidroxicinâmicos) com alcoóis alifáticos catalisada por lipase tem sido relatada na literatura. Com a utilização de lipase de *Candida antarctica*, a eficiência da esterificação de ácidos fenólicos é fortemente dependente das diferentes características dos substratos aril-alifáticos, sugerindo que o acesso dos ácidos hidroxicinâmicos ao sítio ativo da enzima é impedido devido à flexibilidade reduzida do resíduo acil (OTTO et al., 2000). Devido às propriedades relativamente polares, esforços têm sido feitos no sentido de aumentar a hidrofobicidade e, portanto produzir moléculas anfífilas de valor industrial. Assim, ésteres de ácidos hidrocafeicos, bem como cumaratos e ferulatos tem sido relatados como potentes antioxidantes em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (CASSANI et al., 2007; SABALLY et al., 2006).

A lipofilização de ácidos fenólicos com alcoóis graxos pode ser usada como uma ferramenta para alterar a solubilidade de compostos fenólicos em fórmulas à base de óleo e emulsões. Estas novas moléculas antioxidantes anfífilas poderiam ser utilizadas como emulsionantes multifuncionais em alimentos, cosméticos e indústrias farmacêuticas, uma vez que devem conservar as suas outras propriedades funcionais como filtros UVA e UVB, antimicrobiana, antiviral, bacteriostático, etc (FIGUEROA-SPINOZA e VILLENEUVE, 2005).

Triacilgliceróis de cadeia média (TCM), como a tricaprilina, têm principalmente ácidos graxos com comprimento de cadeia entre 6 e 12 carbonos. Devido à sua saturação, são estáveis à oxidação. Eles têm viscosidade e pontos de fusão baixos, e são geralmente líquidos à temperatura ambiente. Seu menor tamanho molecular e relativamente alta solubilidade em água contribuem para melhorar a absorção, comparados aos triacilgliceróis de cadeia longa (LEE e AKOH, 1998).

O objetivo deste trabalho foi sintetizar éster fenólico a partir do ácido dihidrocafeico e octanol, a partir do pressuposto de que o éster fenólico tenha uma compatibilidade melhor com os glicerídeos do que o ácido dihidrocafeico, além de melhor solubilidade. Objetivou-se ainda estudar a reação de transesterificação catalisada por lipase fúngica, do éster produzido com a tricaprilina.

2 Material e métodos

2.1 *Material*

O ácido dihidrocafeico (DHCA) ou ácido 3,4 dihidroxihidrocinâmico e 1-octanol (Fluka) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.) e o ácido caprílico foi adquirido da Riedel-de Haën (Hannover, Alemanha). Novozym® 435, uma lipase imobilizada de *Candida antarctica* foi doada pela Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). A tricaprilina foi produzida no Laboratório de Agrobiotecnologia da Universidade de Århus a partir de ácido caprílico e glicerol. Todos os produtos químicos e solventes foram de grau analítico.

2.2 *Produção de éster*

Primeiramente foram estudadas duas relações molares para a produção do éster a partir do ácido dihidrocafeico (DHCA) e octanol, 1:1 e 1:3, utilizando 10% de enzima (Novozym® 435, uma lipase da *Candida antarctica*), 10% de peneiras moleculares (3 Å de diâmetro dos poros, adquiridas da Sigma-Aldrich, Broendby, Dinamarca), ambos calculados em relação aos substratos (DHCA e octanol). A temperatura foi mantida constante a 60 °C. Terc-butanol (500 mL para 2 g DHCA e 4,33 g de octanol) foi utilizado como solvente por ser particularmente efetivo para substratos relativamente hidrofílicos (STEVENSON *et al.*, 2007). Para avaliar o grau de esterificação, 10 µL da solução da amostra esterificada foi retirada periodicamente e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em seguida, o solvente foi removido por filtração, seguido de evaporação do solvente em rotaevaporador a 80 °C.

2.3 *Purificação do éster*

O éster purificado foi obtido após extração com hexano e solução de NaCl (1%) por várias vezes, até o DHCA não reagido ser removido. Depois disso, o éster foi lavado várias vezes com água Milli-Q até que o excesso de octanol fosse totalmente removido. Desta forma, o éster (dihidrocafeato de octila) foi obtido e utilizado nas reações de transesterificação.

2.4 *Reações de transesterificação*

As reações de transesterificação foram realizadas sem solvente, em reatores de vidro encamisados com agitação magnética, a 60 °C e 10% da enzima (% em peso, baseado no total dos reagentes), em diferentes relações molares dos reagentes (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10). O substrato dihidrocafeato de octila (DO) foi mantido

constante enquanto que o substrato tricaprilina foi variado. A partir da mistura reacional, 10 μL foram retirados periodicamente e dissolvidos em 90 μL de acetona e, em seguida diluídos 10 vezes com metanol e submetidas à análise por HPLC, após a centrifugação.

2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O DHCA e os produtos esterificados foram analisados por um sistema de HPLC equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) e coluna RP de C18 (250x4.6 mm, 5 μm) da Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) na faixa de 210 a 280 nm. Tricaprilina foi identificada por um detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD; SEDEX MODEL 80, França) usando temperatura de evaporação de 30 °C. Injeção de 10 μL da amostra foi eluída da coluna a uma taxa de 1 mL/min, como fase móvel um sistema de solvente binário composto de 90% solvente A (metanol) e 10% solvente B (0,75% ácido acético em água Milli-Q). A corrida foi de 16 min.

2.6 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ionização por electrospray acoplado ao espectrômetro de massas (HPLC-ESI-MS)

As amostras preparadas foram analisadas em HPLC-ESI-MS. As condições de eluição foram idênticas às descritas no item 2.5, incluindo os solventes da fase móvel e a coluna. Produtos da reação foram analisados por suas massas espectrais, utilizando ionização por electrospray (ESI) acoplado a uma fonte de quadrupolo-tempo de vôo espectrômetro de massa (Bruker micrOTOF-Q, Bremen, Alemanha). A ionização foi realizada no modo negativo, com um fluxo de nitrogênio de 8 L/min, 0,8 bar de pressão de nebulização e uma temperatura de 190 °C. Intervalo de scan foi de 50-1,200 m/z.

2.7 Planejamento experimental e análises estatísticas

Para modelar a reação de transesterificação, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) variando a quantidade de enzima (1,6% a 18,4%), tempo de reação (9,9 a 35,1 h) e temperatura (43 a 77 °C). A resposta avaliada foi a porcentagem de reagentes consumidos, a qual foi verificada pelas áreas obtida no HPLC. As faixas escolhidas foram baseadas em diferentes trabalhos com a mesma

enzima (BRUSAMARELO, *et al.*, 2010; KAHVECI *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA e ALVES, 2000).

O software Modde 6.0 (Umetri, Umeå, Suécia) foi usado para ajustar o modelo de segunda ordem para as variáveis independentes.

3 Resultados e Discussão

3.1 Produção de éster

A produção de éster (dihidrocafeato de octila) em duas diferentes relações molares de ácido dihidrocafeico e octanol está apresentada na Figura 1 e a reação de esterificação está esquematizada na Figura 2, adaptada de Devi *et al.* (2008).

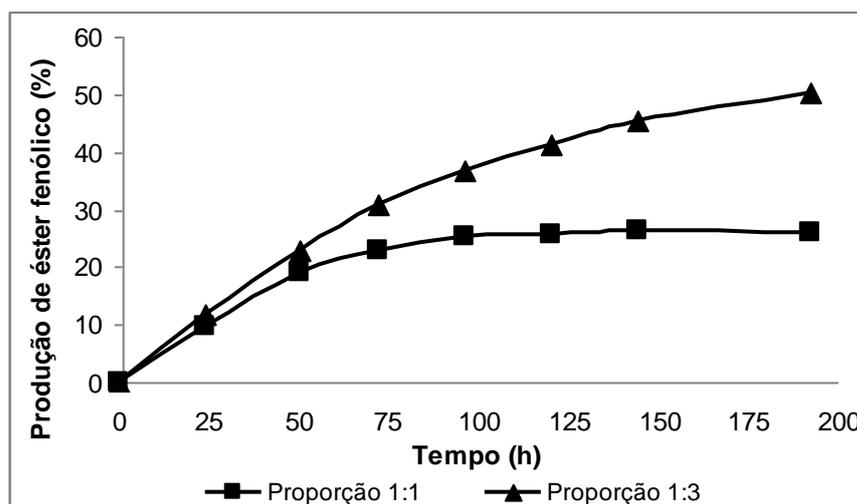


Figura 1. Produção de éster a partir de DHCA e octanol durante 192 h

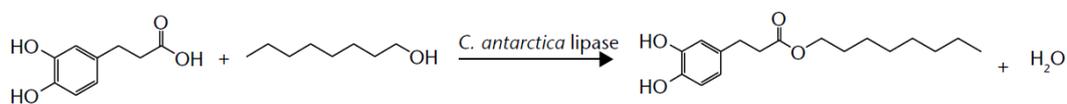


Figura 2. Reação de esterificação catalisada por lipase em terc-butanol

A proporção de substratos 1:3 foi melhor para a produção de ésteres atingindo 50% em 192 h, ou seja, oito dias de reação, enquanto a proporção 1:1 mostrou-se constante após 96 h, não ultrapassando 26%, atingindo o equilíbrio da reação. Isto foi devido a maior concentração de reagentes, no caso do álcool, ter

deslocado o equilíbrio no sentido da formação de mais produto (éster), aumentando a velocidade da reação.

Cassani *et al.* (2007) verificaram que o número e a natureza dos substituintes têm uma forte influência sobre o tempo necessário para atingir o equilíbrio e a conversão final da esterificação de ácidos fenilpropanoídeos, que é o caso do cafeico. Karboune *et al.* (2005) e Lue *et al.* (2005) relataram a esterificação catalisada por lipase de ácido cinâmico com álcool oleil e mono e diacetil gliceróis em várias misturas de solventes. Em ambos os casos, o equilíbrio foi alcançado após longos períodos de reação, mais de cinco dias. Sabally *et al.* (2006) observaram uma melhora significativa no tempo de reação (tempo de equilíbrio < 3 dias) quando ácido dihidrocafeico foi usado como substrato em condições de reação semelhantes.

Macedo, Lozano e Pastore (2003) produziram ésteres de citronelila (butirato) em apenas 24 h, usando lipase de *Rhizopus* sp, obtendo rendimento de 95 a 100% com ou sem n-hexano. Acetato de citronelila foi sintetizado pela transesterificação com acetato de etila e citronelol, com rendimento de 58% após 48 horas e 48% de conversão para a reação de acetato e citronelol. Os resultados sugerem que a dimensão da cadeia alifática do doador acil foi importante para a taxa de conversão. No presente estudo, o octanol (doador acil) possui 8 carbonos, o que pode ter influenciado a baixa conversão obtida, de 50%, em um período de tempo maior quando comparados aos autores anteriormente citados que utilizaram álcool com 4 carbonos, obtendo conversão com maior rendimento em menos tempo.

Foi relatado que, em lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), a eficiência da esterificação de ácidos fenólicos é fortemente dependente das diferentes características dos substratos aril alifáticos, sugerindo que o ácido hidroxicinâmico tem acesso dificultado ao sítio ativo da enzima, devido à flexibilidade reduzida do resíduo acil (OTTO *et al.* 2000).

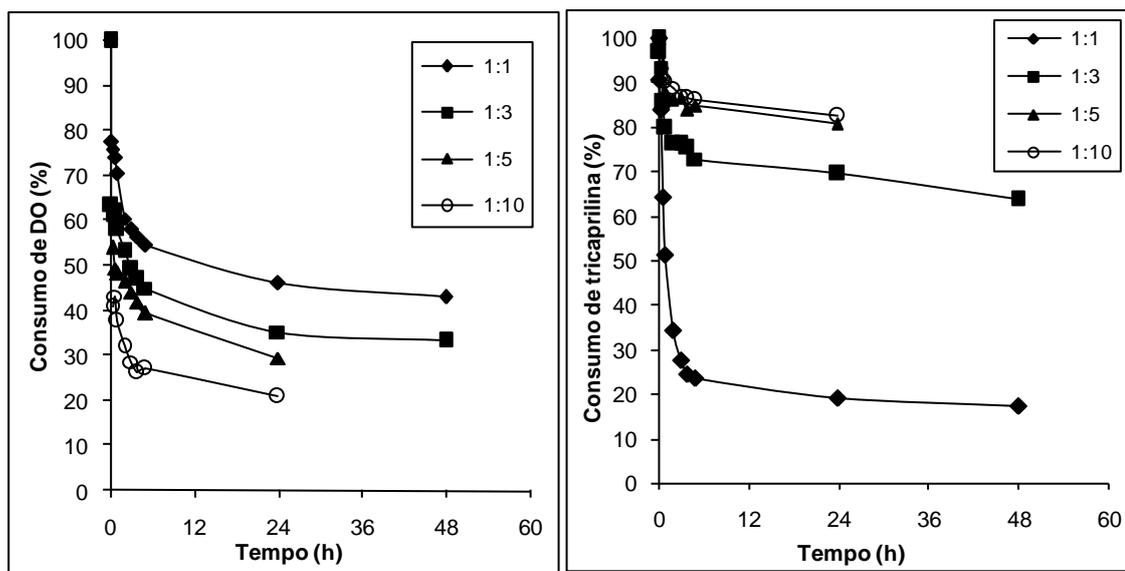
Yang *et al.* (2005) reportaram que em reações de óleo de girassol com glicerol catalisado por lipase *Novozym* 435, o solvente tert-butanol foi muito útil em reatores de batelada, uma vez que favoreceu a síntese de monoésteres, com a produção de 70% de monoacilgliceróis sendo o equilíbrio alcançado em 2 h. Reações com óleo rico em ácido linoleico conjugado e glicerol em reatores de leite empacotado, também obtiveram o mesmo rendimento de monoacilgliceróis, mas em um menor tempo, 30 min.

Tert-butanol, além de ser particularmente efetivo para substratos relativamente hidrofílicos (STEVENSON *et al.*, 2007), é um bom solvente para

esterificação de flavonides devido alta solubilidade dos compostos fenólicos (HU *et al.*, 2009). Alcoóis terciários, como t-butanol e t-pentanol não reagem com ácidos graxos em reações de glicerólise, uma vez que exercem forte impedimento estérico à enzima no sistema devido à estrutura terciária que possuem. Os alcoóis primários não poderiam ser utilizados, pois competem naturalmente com glicerol (PAWONGRAT, XU e KITTIKUN, 2008).

3.2 Transesterificação

A Figura 3 mostra a curva de consumo dos reagentes dihidrocafeato de octila e tricaprilina em quatro diferentes relações molares ao longo do tempo de reação. As percentagens foram calculadas através das áreas dos picos visualizados no HPLC, as quais foram monitoradas nos intervalos de tempo, mostrados na Figura 3. A tricaprilina foi o triacilglicerol utilizado para doação do grupo acil para produção de lipídios fenólicos e o dihidrocafeato de octila foi o substrato limitante, sendo que a Figura 3 foi discutida baseada neste éster.



DO: dihidrocafeato de octila; Condições: 10% enzima, 60 °C.

Figura 3. Consumo de substratos nas relações molares de DO: tricaprilina (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10)

No estudo da melhor relação molar entre os substratos (dihidrocafeato de octila e tricaprilina) foi observada máxima conversão de 78,9% e 70,4%, respectivamente, para as relações 1:10 e 1:5 de DO durante 24 h, isto é, 21,1% e 29,6% de residual de dihidrocafeato de octila estavam ainda presentes. Na relação 1:1

e 1:3, a conversão foi menor, 53,9 e 64,6% em 24 h e 56,9 e 66,6% em 48 h, respectivamente.

A Tabela 1 mostra a matriz dos experimentos e as respostas do consumo (%) dos substratos dihidrocafeato de octila e tricaprilina, na relação molar 1:5, que foi escolhida para economia de reagente, visto não haver uma diferença muito acentuada para ambas relações (1:5 e 1:10). A Tabela mostra ainda os valores previstos pelo modelo e os desvios. As menores respostas indicam o maior consumo de substrato.

Tabela 1. Matriz e respostas para consumo dos reagentes dihidrocafeato de octila e tricaprilina nas reações de transesterificação

Experi- mento	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ (%)	VP Y ₁ (%)	Y ₂ (%)	VP Y ₂ (%)
1	5 (-1)	50 (-1)	15,0 (-1)	33,85	37,45	71,14	71,93
2	15 (+1)	50 (-1)	15,0 (-1)	24,92	23,93	68,51	68,60
3	5 (-1)	70 (+1)	15,0 (-1)	21,89	26,60	74,06	72,66
4	15 (+1)	70 (+1)	15,0 (-1)	19,25	19,30	73,20	73,50
5	5 (-1)	50 (-1)	30,0 (+1)	29,22	33,14	70,19	69,82
6	15 (+1)	50 (-1)	30,0(+1)	23,2	22,46	63,24	64,57
7	5 (-1)	70 (+1)	30,0(+1)	18,19	23,15	72,92	72,76
8	15 (+1)	70 (+1)	30,0(+1)	18,33	18,70	72,54	71,68
9	1,6 (-α)	60 (0)	22,5 (0)	50,87	42,56	73,87	74,51
10	18,4 (+α)	60 (0)	22,5 (0)	24,75	27,44	71,35	70,80
11	10 (0)	43,2 (-α)	22,5 (0)	29,08	25,08	67,13	65,23
12	10 (0)	76,8 (+α)	22,5 (0)	19,34	15,26	71,39	72,61
13	10 (0)	60 (0)	9,9 (-α)	24,63	22,17	70,86	70,94
14	10 (0)	60 (0)	35,1 (+α)	21,19	18,05	67,64	67,64
15	10 (0)	60 (0)	22,5 (0)	21,35	24,05	67,02	65,98
16	10 (0)	60 (0)	22,5 (0)	25,25	24,05	65,47	65,98
17	10 (0)	60 (0)	22,5 (0)	24,59	24,05	65,46	65,98

X₁ = concentração de enzima (%), baseada nos substratos totais; X₂ = temperatura (°C); X₃ = tempo (h); Y₁: dihidrocafeato de octila; Y₂: tricaprilina; VP: valor previsto pelo modelo

3.3 Análise estatística

As Tabelas 2 e 3 mostram a análise de variância (ANOVA) para consumo dos substratos (dihidrocafeato de octila e tricaprilina). Os dados de consumo de

dihidrocafeato de octila foram normalizados pela transformação logarítmica dos dados de consumo para se ajustarem ao modelo.

Tabela 2. ANOVA para consumo de dihidrocafeato de octila

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F (significância do modelo)
Regressão	0,1658	9	0,0184	4,18
Residual	0,0307	7	0,0044	-
Falta de ajuste	0,0277	5	0,0055	-
Erro puro	0,0030	2	0,0015	-
Total	0,1966	16	-	-

$R^2 = 0,844$; $r = 0,918$; $F_{\text{tabelado}} = 3,68$

Tabela 3. ANOVA para consumo de tricaprilina

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F (significância do modelo)
Regressão	162,91	9	18,10	12,2
Residual	10,41	7	1,48	-
Falta de ajuste	8,80	5	1,76	-
Erro puro	1,61	2	0,80	-
Total	173,32	16	-	-

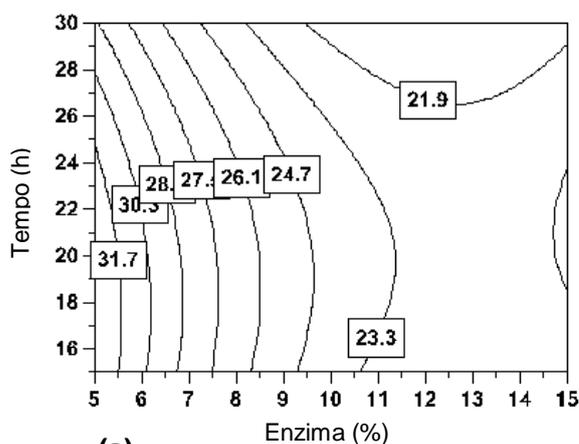
$R^2 = 0,937$; $r = 0,968$; $F_{\text{tabelado}} = 3,68$

Com base na análise de variância (ANOVA), conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3, modelos de segunda ordem foram estabelecidos, os quais estão expressos nas Equações 1 e 2, onde X_1 = concentração enzimática (%), X_2 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e X_3 = tempo (h).

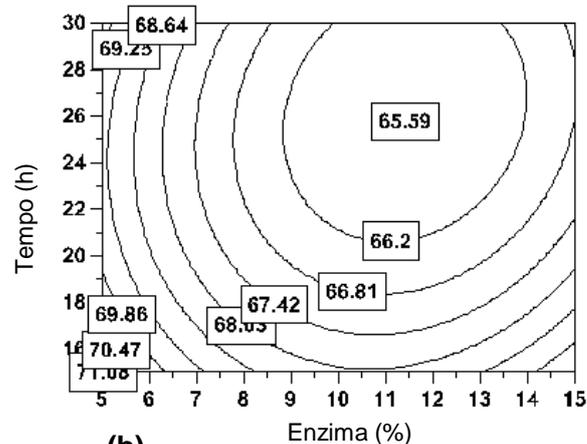
$$\text{Dihidrocafeato de octila} = 54,7403 - 6,2905 x_1 + 0,3808 x_2 + 0,5896 x_3 + 0,1548 x_1^2 - 9,35 \times 10^{-3} x_2^2 - 2,48 \times 10^{-2} x_3^2 + 0,0311 x_1 x_2 + 0,0190 x_1 x_3 + 2,88 \times 10^{-3} x_2 x_3 \quad (1)$$

$$\text{Tricaprilina} = 141,3302 - 3,0727 x_1 - 1,5909 x_2 - 1,3842 x_3 + 0,0945 x_1^2 + 0,0118 x_2^2 + 0,0209 x_3^2 + 0,0208 x_1x_2 - 0,0128 x_1x_3 + 0,0074 x_2x_3 \quad (2)$$

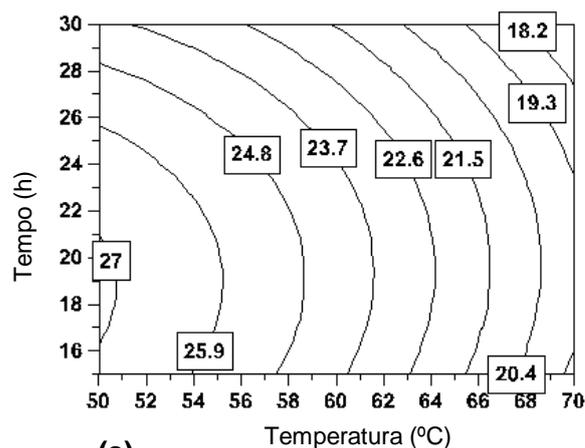
O erro puro foi baixo, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Com base no teste F, o modelo é preditivo, pois o valor F calculado é superior ao valor de F crítico e o coeficiente de regressão é próximo à unidade. O modelo codificado foi utilizado para gerar curvas de contorno (Figura 4) para a análise dos efeitos das variáveis sobre o consumo de ésteres. Eles são úteis para explicar a interação das variáveis e para determinar seu nível ótimo para a resposta máxima. Cada gráfico demonstra o efeito de dois fatores, enquanto os demais foram fixados no nível zero.



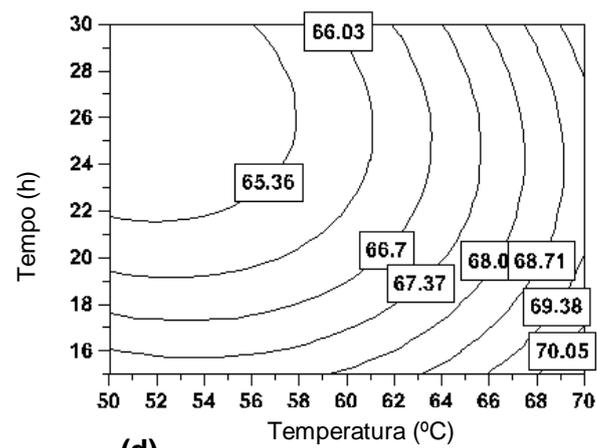
(a)



(b)



(c)



(d)

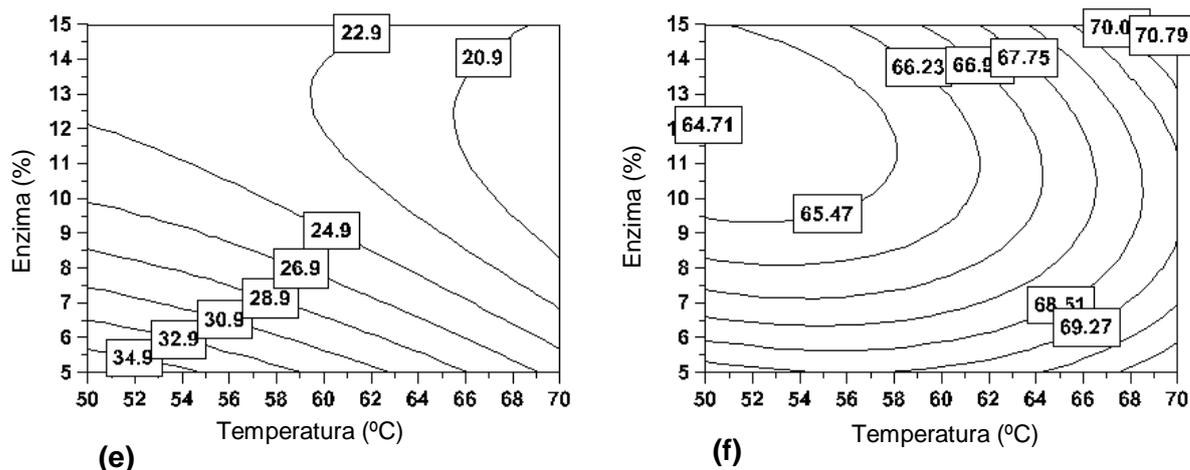


Figura 4. Condições de contorno do consumo dos reagentes dihidrocafeato de octila (a,c,e) e tricaprilina (b,d,f) nas reações de transesterificação

Maiores concentrações de enzima catalisarão os substratos levando a uma maior formação de produtos. A Figura 4a mostra que foram necessárias mais de 26 h e 10% enzima para o menor residual de dihidrocafeato de octila (21,9%), ou seja, a conversão obtida foi cerca de 80%. De acordo com a Figura 4c as temperaturas mais elevadas (67,5 a 70 °C) propiciaram o menor residual de dihidrocafeato de octila (18,2%). A Figura 4e confirma as observações anteriores. De acordo com Devi, Guo e Xu (2009), a lipase comercial *Novozym 435* apresenta um ótimo de 70 °C, corroborando com o presente trabalho. Os mesmos autores enfatizaram a importância do controle da temperatura, a qual afeta tanto a taxa reacional quanto a solubilidade dos diferentes substratos.

Para o substrato tricaprilina, o menor residual deste reagente foi obtido com cerca de 9-13% enzima (Figura 4b e 4f) no mínimo em 22 h (Figuras 4b e 4d), no entanto em temperaturas inferiores a 58 °C (Figuras 4d e 4f). Neste caso, o oposto da temperatura requerida para o substrato fenólico.

3.4 Produtos identificados no HPLC-ESI-MS

Os produtos interesterificados a partir do dihidrocafeato de octila e tricaprilina estão apresentados na Figura 5.

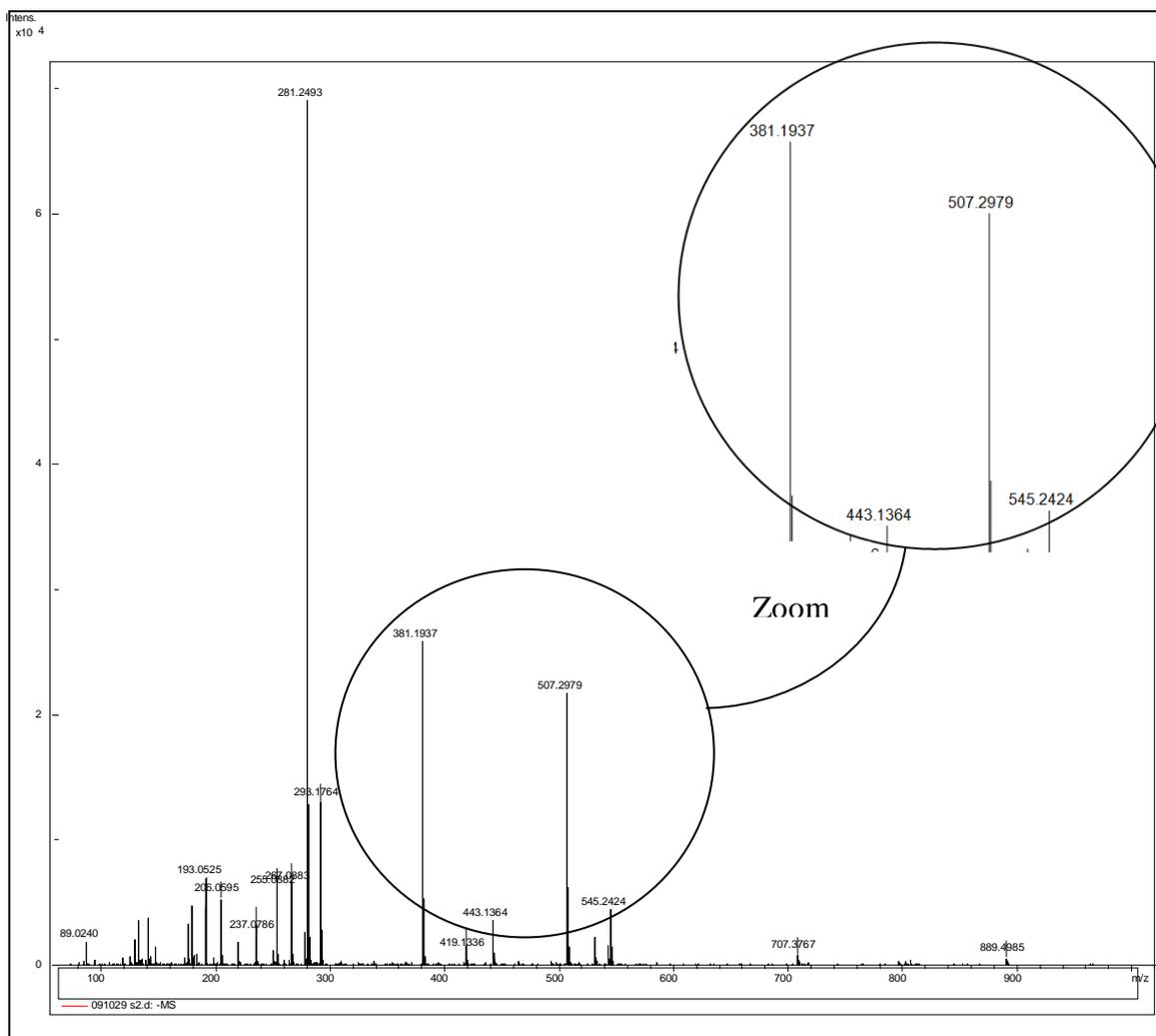


Figura 5. Espectro de massas dos produtos interesterificados

A Figura 6 mostra a probabilidade das posições dos grupos substituintes na molécula do glicerol da reação de transesterificação entre o éster fenólico (dihidrocafeato de octila) e a tricaprilina. Os nomes dos novos triacilgliceróis modificados obtidos, bem como os respectivos pesos moleculares estão também representados.

1(3) dihidrocafeato de octila-2 monocaprilina-3(1) hidroxil	2,3 (1,2) dicaprilina - 1 (3) dihidrocafeato de octila	1 (3) monocaprilina - 1,2 (2,3) dihidrocafeato de octila
MM = 382 g/mol	MM = 508 g/mol	MM = 546 g/mol

DO = dihidrocafeato de octila; MM = massa molar

Figura 6. Posições dos produtos identificados a partir da reação de transesterificação entre éster fenólico (dihidrocafeato de octila) e tricaprilina

Os produtos identificados na ordem de maior ocorrência foram: 1(3)-dihidrocafeato de octila-2-monocaprilina-3(1)-hidroxil > 2,3 (1,2) dicaprilina - 1 (3) dihidrocafeato de octila > 1(3) monocaprilina-1,2(2,3)-dihidrocafeato de octila.

Relembrando a reação de esterificação (ver Figura 2), o DO provavelmente entre na molécula do triacilglicerol na posição para (oposta a cadeia acil), pois na posição adjacente onde se encontra o outro grupo hidroxila pode ter havido efeito estérico, reduzindo a flexibilidade do resíduo acil em impedir o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase, reduzindo sua reatividade, conforme mencionado por Cassani *et al.* (2007) e Otto *et al.* (2000).

Além disso, como foi utilizada lipase não específica (Novozym 435), portanto a regioseletividade é desconhecida, ou seja, a probabilidade da formação de diversas possibilidades de produtos era esperada, uma vez que esta enzima catalisa a hidrólise de triacilgliceróis em qualquer posição.

4 Conclusões

Foi verificado que a lipase fúngica (*Novozym 435*) catalisou a maior produção de éster a partir do DHCA e octanol (1:3) em até 50% durante oito dias. Nas reações de transesterificação, as relações molares em que houve maior consumo de dihidrocafeato de octila foram 1:5 e 1:10, sendo obtidos, respectivamente, 21,1% e 29,6% de residual deste éster em 24 h. As condições de contorno mostraram que em

altas temperaturas e tempo superior a 26 h, houve o menor residual de dihidrocafeato de octila (18,2%). Assim, é sugerido adição de 10% de enzima, 26 h de reação e temperatura de cerca de 70°C para máxima produção de compostos fenólicos. Foram identificados três novos compostos fenólicos, contendo em sua estrutura dihidrocafeato de octila e ácido caprílico.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório de Agrobiotecnologia, Universidade de Aarhus, Dinamarca, onde o trabalho foi desenvolvido. Este trabalho teve financiamento da bolsa CAPES/PDEE (processo número 1104-09-8), concedida ao primeiro autor.

Referências

BRUSAMARELO, C.Z.; ROSSET, E.; CÉSARO, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; Di LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. Kinetics of lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane. **Journal of Biotechnology** (2010). doi:10.1016/j.jbiotec.2010.03.014

CASSANI, J.; LUNA, H.; NAVARRO, A.; CASTILLO, E. Comparative esterification of phenylpropanoids versus hydrophenylpropanoids acids catalyzed by lipase in organic solvent media. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10 n.4, p.508-513, 2007.

DEVI, B.L.A.P.; GUO, Z.; XU, X. Characterization of cross-linked lipase aggregates, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86, n.7, p.637-642, 2009.

DEVI, B.L.A.P.; ZHANG, H.; DAMSTRUP, M.L.; GUO, Z.; ZHANG, L.; LUE, B.-M.; XU, X. Enzymatic synthesis of designer lipids. **Oléagineux Corps Gras Lipides**, v.15, n.3, p.189-195, 2008.

FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; VILLENEUVE, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2779-2787, 2005.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80, p.339-344, 2009.

GUNAWAN, E.R.; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.A. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.7, p.739-744, 2005.

HU, Y.; GUO, Z.; LUE, B.-M.; XU, X. Enzymatic synthesis of lipophilic flavonoid derivatives in ionic liquids buffered with organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3845-3852, 2009.

HUANG, J.; PAULIS, T.; MAY, J.M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p.722-729, 2004.

KAHVECI, D.; GUO, Z.; ÖZÇELİK, B.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis. **Process Biochemistry**, v.44, n.12, p.1358-1365, 2009.

KARBOUNE, S.; SAFARI, M.; LUE, B.-M.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed biosynthesis of cinnamoylated lipids in a selected organic solvent medium. **Journal of Biotechnology**, v.119, n.3, p.281-290, 2005.

LEE, K.T.; AKOH, C.C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.4, p.495-499, 1998.

LUE, B.-M.; KARBOUNE, S.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 462-468, 2005.

MACEDO, G. A.; LOZANO, M. M. S.; PASTORE, G.M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.72-75, 2003.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T.L.M. A kinetic study of lipase catalyzed alcoholysis of palm kernel oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v.84-86, p.59-68, 2000.

OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. Di ; FACCIO, C.; ROSA, C.D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v.115, n.1, p. 771-780, 2004.

OTTO, R.T.; SCHEIB, H.; BORNSCHEUER, U.T.; PLEISS, J.; SYLDATK, C.; SCHMID, R.D. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.8, n.4, p.201-211, 2000.

PAWONGRAT, R.; XU, X.; KITTIKUN, A.H. Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.256-262, 2008.

SABALLY, K.; KARBOUNE, S.; ST-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.167-176, 2006.

SABALLY, K.; KARBOUNE, S.; ST-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed synthesis of phenolic lipids from fish liver oil and dihydrocaffeic acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.25, n.2-4, p.211-218, 2007.

SELLAPAN, S.; AKOH, C.C. Enzymatic acidolysis of tristearin with lauric and oleic acids to produce coating lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.77, n.11, p.1127-1134, 2000.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SILVA, F.A.M.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J.L.F.C.; MATOS, C.; REIS, S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.6, p.2122-2126, 2000.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F.N. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.323-328, 2001.

STEVENSON, D.E.; PARKAR, S.G.; ZHANG, J.; STANLEY, R.A.; JENSEN, D.J.; COONEY, J.M. Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1078-1086, 2007.

SUN, S.; SHAN, L.; LIU, Y.; JIN, Q.; SONG, Y.; WANG, X. Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, n.1-4, p.104-108, 2009.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.287-303, 2000.

XU, X.; MU, H.; SKANDS, A.R.H.; HØY, C.-E.; ADLER-NISSEN, J. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.2, p.175-181, 1999.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis in an efficient reaction system. **Journal of Food Lipids**, v.12, p.299-312, 2005.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

A utilização da gordura da pele de frango mostrou baixos índices para oxidação lipídica ($IP = 2,14 \text{ meq.kg}^{-1}$, $IpA = 0,70$ unidades de absorvância) e riqueza em ácidos graxos insaturados oleico (34,8%) e linoleico (28,3%). Os ácidos graxos saturados de cadeia longa de maior abundância como palmítico (23,5%) podem ser substituídos por outro tipo de ácido graxo para adequar esta gordura para diferentes aplicações como produção de lipídios funcionais por interesterificação ou produção de biodiesel. Além disso, o uso da gordura da pele de frango pode minimizar a deposição de resíduos no meio ambiente.

Foi possível a produção de lipídios modificados, a partir de gordura da pele de frango e ácidos graxos ramificados, contendo triacilgliceróis ricos em ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico, sendo a máxima porcentagem obtida para estes ácidos graxos 44,8%, 35,2% e 18,1%, respectivamente. Sem adição de água e com maior tempo de interesterificação (24 h), foi observada maior porcentagem de ácido linoleico (35,2%) no triacilglicerol modificado por interesterificação enzimática. Lipídios modificados com tal composição podem ser utilizados tanto para fins nutricionais, como tecnológicos.

Em relação à síntese de éster fenólico, foi verificado que a lipase fúngica (*Novozym 435*) catalisou a produção de até 50% de éster a partir do DHCA e octanol (1:3) em oito dias. Nas reações de transesterificação do dihidrocafeato de octila e tricaprilina, houve maior conversão do reagente dihidrocafeato de octila em 24 h, sendo seu residual de 21,1% e 29,6% para as relações molares 1:5 e 1:10, respectivamente. As condições de contorno mostraram que em altas temperaturas e tempo superior a 26 h, houve o menor residual de dihidrocafeato de octila (18,2%). Foram identificados três novos compostos fenólicos, contendo em sua estrutura dihidrocafeato de octila e ácido caprílico.

O trabalho mostrou diferentes possibilidades de produção de lipídios modificados, em que se destacam reações inéditas como interesterificação da gordura da pele de frango, um resíduo que ganhou potencial para aplicação tecnológica. Além disso, novos compostos fenólicos com potencial antioxidante foram obtidos por transesterificação de tricaprilina com éster do ácido dihidrocafeico.

SUGESTÕES

- Realizar reações de interesterificação, identificando a posição dos ácidos graxos essenciais e/ou de cadeia média e curta nos triacilgliceróis modificados;
- Montar uma biblioteca no HPLC-ESI-MS dos produtos resultantes da reação do dihidrocafeato de octila e tricaprilina;
- Estudar a posição dos ácidos graxos ramificados na gordura modificada por acidólise enzimática;
- Estudar a possibilidade de reação da gordura da pele de frango com composto fenólico.

CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/>>. Acesso em: 18 nov. 2009.

ADOLFO LUTZ - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1.

ALIM, M.A., LEE J.-H., AKOH C.C., CHOI M.-S., JEON M.-S., SHIN J.-A., LEE K.-T. Enzymatic transesterification of fractionated rice bran oil with conjugated linoleic acid: optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.5, p.764-770, 2008.

AOAC – **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis of AOAC International, Arlington, VA (USA) 1995. 16th ed.

AOCS - American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of AOCS (5th ed.). AOCS Press, Champaign, IL (USA), 1997.

ARDHAOUI, M.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J.-M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, p.63-67, 2004.

ARNAUD, E.; RELKIN, P.; PINA, M.; COLLIGNAN, A. Characterization of chicken fat dry fractionation at the pilot scale. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.106, n.9, p.591-598, 2004.

ATLAS Socioeconômico do Rio Grande do Sul. Disponível em: <www.scp.rs.gov.br/atlas>. Acesso em: Jan. 2009.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. **Química analítica quantitativa elementar**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 8, p.191-270: Práticas de laboratório.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L. **Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal**. Conferência Apinco, 2004, Santos, SP. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, Campinas, SP: FACTA, v. 1, pp. 79-102, 2004.

BENTES, A.S.; SOUZA, H.A.L.; MENDONÇA, X.M.F.D.; SIMÕES, M.G. Caracterização física e química e perfil lipídico de três espécies de peixes amazônicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.3, n.2, p.97-108, 2009.

BESBES, S.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; LOGNAY, G.; ATTIA, H. Quality characteristics and oxidative stability of date seed oil during storage. **Food Science and Technology International**, v.10, n.5, p.333-338, 2004.

BIERMANN, U.; METZGER, J. Synthesis of alkyl-branched fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.805-811, 2008.

BLIGH E.G.; DYER W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química de Alimentos**. (2. ed.). São Paulo: Livraria Varela. 1992. 223p.

BORGO, L.A.; ARAÚJO, W.M.C. Mecanismos dos processos de oxidação lipídica. **Higiene Alimentar**, v.19, n.130, p.50-58, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RDC Nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal**. Brasília, 2005.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RDC Nº 482, de 23 de setembro de 1999. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**. Brasília, 1999.

BROCKERHOFF, H., HOYLE, R.J., WOLMARK, N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.116, n.1, p.67-72, 1966.

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v.32, n.4, p.849-854. 2009.

BRUSAMARELO, C.Z.; ROSSET, E.; CÉSARO, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; Di LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. Kinetics of lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane. **Journal of Biotechnology** (2010). doi:10.1016/j.jbiotec.2010.03.014

BUENO, T. Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química). 2005. 102p. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, São Paulo, 2005.

BURKERT, J.F.M. Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. 2003. 172p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

_____; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, n.1, p.77-84, 2004.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; D'ADDIO-NOFFS, M.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CASSANI, J.; LUNA, H.; NAVARRO, A.; CASTILLO, E. Comparative esterification of phenylpropanoids versus hydrophenylpropanoids acids catalyzed by lipase in organic solvent media. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.4, p.508-513, 2007.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CATENI, F.; BONIVENTO, P.; PROCIDA, G.; ZACCHIGNA, M.; SCIALINO, G.; BANFI, E. Chemoenzymatic synthesis and *in vitro* studies on the hydrolysis of antimicrobial monoglycosyl diglycerides by pancreatic lipase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p.1971-1978, 2007.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. (2.ed. rev.). Campinas, SP: Ed. da Unicamp, 2003. 208 p.

CENTENARO, G.S.; FURLAN, V.J.M.; SOUZA-SOARES, L.A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.3, p.619-630, 2008.

CHIU, M.C.; GIOIELLI, L.A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média: I- Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.2, p.232-237, 2008a.

_____; _____. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média: II - Pontos de amolecimento e fusão. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.2, p.238-243, 2008b.

COCKS, L.V.; VAN REDE, C. **Laboratory handbook for oil and fat analysis**. London: Academic Press, 1966. 419p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra 2009/2010 - Segunda pesquisa - nov 2009**. Disponível em: <www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2graos_09.10.pdf>. Acesso em: Nov. 2009.

COSTA, J.S.B. Óleos de soja geneticamente modificada: caracterização nutricional e detecção de ADN. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade), Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (Portugal), 2008. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/20791/2/DISSERTAO.pdf>>. Acessado em: jul 2010.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v.22, n.6, p.863-873, 1999.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura dos ácidos graxos**. (1. ed.). Barueri: Manole, 2002. 580 p.

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**. Oxford: Pergamon Press, 1982. ch.3, p. 25-49. Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles.

CYBERLIPIDS, 2010. Mono- and multibranched fatty acids. Disponível em: <<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0001.htm#6>>. Acesso em: 05 Jun. 2010.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L.A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.3, p.345-354, 2002.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. (4. ed.). Tradução Adriano Brandelli *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAMSTRUP, M.L.; JENSEN, T.; KILL, S.; JENSEN, A.; SPARSØ, F.V.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, p.559-564, 2005.

DEVI, B.L.A.P.; ZHANG, H.; DAMSTRUP, M.L.; GUO, Z.; ZHANG, L.; LUE, B.-M.; XU, X. Enzymatic synthesis of designer lipids. **Oléagineux Corps Gras Lipides**, v.15, n.3, p.189-195, 2008.

_____; GUO, Z.; XU, X. Characterization of cross-linked lipase aggregates, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86, n.7, p.637-642, 2009.

DUBOIS, V.; BRETON, S.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, n.7, p.710-732, 2007.

ESTEVEZ, W.; GONÇALVES, L.A.G.; BARRERA-ARELLANO, D. **Metodologia padrão alemã para análise de gorduras e outros lipídios**. (Tradução de: *Deutsche Einheitsmethodem zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen Abteilung A, B, C, F*). Campinas. 1995. Campinas: UNICAMP/FEA/Laboratório de Óleos e Gorduras, 1995. v.1 (não paginado).

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L.A.G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v.21, n.1, p.16-19, 1998.

FAO (1992). FAO Agricultural Services Bulletins -97 Food and Agriculture Organization. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e02.htm>>. Acessado em: Jan. 2009.

FDA. Food and Drug Administration. **Food Additive Status List**. 88p. Disponível em: <www.fda.org>. Acessado em: Dez. 2007

FEDDERN, V.; GIACOBBO, G.; MENDES, G.L.; CIPOLATTI, E.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Lipídios - alguns métodos clássicos para avaliações quantitativas. p.207-221. In: SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE FURLONG; E.; FEDDERN, V. (Ed.). **Bioquímica experimental: uma introdução**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, v.1, 2010. 272 p.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.44, n.1, p.8-13, 2007.

FERRARI, R.A.; KOLLER, F.R. Fracionamento de gordura de frango. **Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v.7, n.1, p.43-51, 2001.

FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; VILLENEUVE, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2779-2787, 2005.

FILLETI JUNIOR, W. Síntese enzimática de triacilgliceróis estruturados de gordura de ucuúba. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). 103p. 2005. UNICAMP, 2005.

FOMUSO, L.B.; AKOH, C.C. Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, p.405-410, 1998.

GAMBOA, O.W.D.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**, v.29, n.4, p.646-653, 2006.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.12, p.1541-1544, 1995.

GIOIELLI, L.A.; PITOMBO, R.N.M.; VITOLO, M.; BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N.; AUGUSTO, M.S. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.71, n.6, p.579-582, 1994.

_____; _____; _____; _____; _____; MORENO, P.C. Enzymatic hydrolysis of oils and fats. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v.72, n.3, p.115-117, 1995.

GOMES, F.M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v.29, n.4, p.710-718, 2006.

GOMES, L.F.S. Potencial da produção de biodiesel a partir do óleo de frango nas cooperativas do oeste do Paraná. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2005. 64 p.

GREGÓRIO, B.M.; ANDRADE, E.C.B. Influência do aquecimento sobre as propriedades físico-químicas de óleos comestíveis. **Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p.78-84, 2004.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80, p.339-344, 2009.

GULATI, R.; BHATTACHARYA, A.; PRASAD, A.K.; GUPTA R.; PARMAR V.S.; SAXENA, R.K. Biocatalytic potential of *Fusarium globulosum* lipase in selective acetylation/deacetylation reactions and in ester synthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.609-613, 2001.

GUNAWAN, E.R.; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.A. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.7, p.739-744, 2005.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.273-278, 2007.

HASAN, F.; AAMER, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2 p.235-251, 2006.

HU, Y.; GUO, Z.; LUE, B.-M.; XU, X. Enzymatic synthesis of lipophilic flavonoid derivatives in ionic liquids buffered with organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3845-3852, 2009.

HUANG, J.; PAULIS, T.; MAY, J.M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p.722-729, 2004.

INNIS, S.M. Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.1, p.238s-244s.

JORGE, N; JANIERI, C. Avaliação do óleo de soja submetido ao processo de fritura de alimentos diversos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.5, p.1001-1007, 2005.

JORGE, N.; SOARES, B.B.P.; LUNARDI, V.M.; MALACRIDA, C.R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, v.28, n.6, p.947-951, 2005.

KAHVECI, D.; GUO, Z.; ÖZÇELİK, B.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis. **Process Biochemistry**, v.44, n.12, p.1358-1365, 2009.

KANAVOURAS, A.; CERT, A.; HERNANDEZ, R. J. Oxidation of olive oil under still air. **Food Science and Technology International**, v.11, n.3, p. 183-189, 2005.

KARBOUNE, S.; SAFARI, M.; LUE, B.-M.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed biosynthesis of cinnamoylated lipids in a selected organic solvent medium. **Journal of Biotechnology**, v.119, n.3, p.281-290, 2005.

KARRA-CHAABOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D. Parameters affecting the synthesis of geranyl butyrate by esterase 30,000 from *Mucor miehei*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.9, p.1201-1206, 1998.

KINSMAN, D.V. Isostearic and other branched acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.823A-827A, 1979.

KNIAZEVA M.; CRAWFORD, Q.T.; SEIBER, M.; WANG, C.Y.; HAN, M. t branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. **Public Library of Science Biology**, v.2, n.9, p.1446-1459, 2004.

KNOTHE, G.; KENAR, J.A.; GUNSTONE, F.D. Chemical properties. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. (3rd. ed.). **The Lipid Handbook with CD-ROM**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.535-590

KOBORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.5, p.1008-1014, 2005.

KRISHNAMURTY, R.G. Cooking oils, salad oils and salad dressings. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. (4th.ed). New York: Wiley-Interscience, 1982, v.2, p.320-326.

LANDS, W.E.M. Fish and human health. Orlando, FL: Academic Press, 1986.

LAMBELET, P.; GRANDGIRARD, A.; GREGOIRE, S. Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucid acid rapeseed oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.5, n.15, p.4284-4290, 2003.

LEE, J.H.; JONES, K.C.; FOGLIA, T.A.; LEE, C.-R.; AKOH, C.C.; LEE, K.-T. High performance liquid chromatographic separation of interesterified palm oil with tributyrin. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1446-1451, 2008.

LEE, K.T.; AKOH, C.C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.4, p.495-499, 1998a.

LEE, K.T.; AKOH, C.C. Structured lipids: Synthesis and applications. **Food Reviews International**, v.14, p.17-34, 1998b.

LEE, K.-T.; FOGLIA, T.A. Fractionation of chicken fat triacylglycerols: synthesis of structured lipids with immobilized lipases. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p.826-831, 2000a.

LEE, K.T.; FOGLIA, T.A. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.77, n.10, p.1027-1034, 2000b.

LI, D.; WANG, B.; TAN, T. Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, n.1-4, p.40-43, 2006.

LIMA M.F.; HENRIQUES, C.A.; SANTOS, F.D; ANDRADE P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. **Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.28, p.65-77, 2004.

LIST, G.R. Decreasing trans and saturated fatty acid content in food oils. **Food Technology**, v.58, n.1, p.23-31, 2004.

LIU, L. S. How is chemical interesterification initiated: nucleophilic substitution or α -proton abstraction? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.81, n.4, p.331-337, 2004.

LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v.61, n.3, p.200-207, 2010.

LUDDY, F.E.; FERTSCH, G.R.; Riemenschneider, R.W. Glyceride composition of fats and oils determined by oxidation and crystallization methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.31, p.266-268, 1954.

LUE, B.-M.; KARBOUNE, S.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 462-468, 2005.

MACEDO, G.A.; LOZANO, M.M.S.; PASTORE, G.M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.72-75, 2003.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy**. (12th Edn.). WB Saunders Company, Philadelphia (USA) 2007.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FSI. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.304-309, 1999.

MARANGONI, A.G.; ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.329-336, 1995.

MATEOS, J.C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J.; Abousalham, J. A.; Carriere, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1042-1050, 2007a.

_____; RUIZ, K.; RODRIGUEZ, J.A.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.49, p.104-112, 2007b.

MEHLENBACHER, V.C. **The analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard Press, 1960, ch.4, p.188-235.

METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A.; PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v.38, p.514-515, 1966.

MORETTO, E; FETT, R. **Tecnologia de óleos vegetais e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

MORIDANI, M.J.; SCONBIE, H.; JAMSHIDZADEH, A.; SALEHI, P.; O'BRIEN, P.J. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. **Drug Metabolism and Disposition**, v.29, p.1432-1439, 2001.

MOTTRAM, H.R.; CROSSMAN, Z.M.; EVERSLED, R.P. Regiospecific characterisation of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.126, p.1018-1024, 2001.

MU, H.; XU, X.; HØY, C.-E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.9, p.1187-1193, 1998.

_____; _____; _____ ADLER-NISSEN, J. Production of specific structured lipids by lipase-catalyzed interesterification - effect of reaction parameters on the level of diacylglycerols produced in continuous process. **Fett/Lipid**, v.101, p.158-164, 1999.

_____; KURVINEN, J.-P.; KALLIO, H.; XU, X.; HØY, C.-E. Quantification of acyl migration during lipase-catalyzed acidolysis and regio-isomers of structured triacylglycerols formed, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, p.959-964, 2001.

NARINE, S.S.; MARANGONI, A.G. The difference between cocoa butter and Salatrim lies in the microstructure of the fat crystal network. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.1, p.7-13, 1999.

NESTLE NUTRITION. Disponível em: <<http://www.nestle-nutrition.com/Products/>>. Acesso em: 26 mai 2010.

NIELSEN, N.S.; YANG, T.; XU, X.; JACOBSEN, C. Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. **Food Chemistry** v. 94, p. 53–60, 2006.

NIELSEN, S.S. **Food analysis**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. (3rd ed.). 2003. 547 p.

O'KEEFE, S.F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (3rd ed.). **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. 2008. p.3-38.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A, 1994, p. 387.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T.L.M. A kinetic study of lipase catalyzed alcoholysis of palm kernel oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v.84-86, p.59-68, 2000.

_____; LUCCIO, M. Di ; FACCIO, C.; ROSA, C.D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v.115, n.1, p. 771-780, 2004a.

_____; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p.178-182, 2004b.

OLIVEIRA, A.L.A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.270-276, 1999.

ORDÓÑEZ PEREDA, J.A. **Tecnologia de Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p. v.1.

OTTO, R.T.; SCHEIB, H.; BORNSCHEUER, U.T.; PLEISS, J.; SYLDATK, C.; SCHMID, R.D. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.8, n.4, p.201-211, 2000.

PAEZ, B.C.; MEDINA, A.R.; RUBIO, F.C.; CERDÁN, L.E.; GRIMA, E.M. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p.461-470, 2003.

PAWONGRAT, R.; XU, X.; KITTIKUN, A.H. Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.256-262, 2008.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. Biodiesel: an overview **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6b, p.1313-1330, 2005.

PEPPERCORN, M.A.; GOLDMAN, P. Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.69, n.6, p.1413-1415, 1972.

RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS, M. I. L.; HIANE, P. A.; SOUZA, E. M. T. Perfil de quatro espécies da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2. p.361-365, 2008.

RAVI, R.; PRAKASH, M.; BHAT, K.K. Sensory odour profiling and physical characteristics of edible oil blends during frying. **Food Research International**, v.38, p.39-68, 2005.

RIEGEL, R.E. **Bioquímica**. São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), 1996.

RODRIGUES, C.E.C.; ONOYAMA M.M.; MEIRELLES, A.J.A. Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction. **Journal of Food Engineering**, v.73, n.4, p.370-378, 2006

RODRIGUES, K.F.; FRAGA, A.C.; NETO, P.C.; MACIEL, J.A.S.; LOPES, O.C. Potencialidade da gordura de frango para a produção de biodiesel. Biodiesel: o novo combustível do Brasil. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 1., 2005, Brasília. *Anais...* Brasília: ABIPTI, 2005. p. 129-132.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZALEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.41, p.2264-2269, 2006.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p.19–34, 2002.

SABALLY, K.; KARBOUNE, S.; ST-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.167-176, 2006.

_____;_____;_____;_____. Lipase-catalyzed synthesis of phenolic lipids from fish liver oil and dihydrocaffeic acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.25, n.2-4, p.211-218, 2007.

SANIBAL, E.A.A.; MANCINI FILHO, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas**, p.48-54. Disponível em: <
<http://hygeia.fsp.usp.br/~eatorres/gradu/frituras.pdf>> Acesso em: jul 2010.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R. J. B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**, v.77, n.2/3, p.187-194, 2002.

SELLAPAN, S.; AKOH, C.C. Enzymatic acidolysis of tristearin with lauric and oleic acids to produce coating lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.77, n.11, p.1127-1134, 2000.

SERIBURI, V.; AKOH, C.C. Enzymatic interesterification of triolein and tristearin: chemical structure and differential scanning calorimetric analysis of the products, **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.75, n.6, p.711-716, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.

SHEU, K.S.; CHEN, T.C. Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained from five rendering methods. **Journal of Food Engineering**, v.55, n.3, p.263-269, 2002.

SILVA, F.A.M.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J.L.F.C.; MATOS, C.; REIS, S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.6, p.2122-2126, 2000.

SILVA, R.C.; COTTING, L.N.; POLTRONIERI T.P.; BALCÃO, V.M.; GIOIELLI, L.A. Propriedades físicas das misturas e dos lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja por interesterificação enzimática. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.3, p.652-660, 2009.

_____; GIOIELLI, L.A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.223-235, 2006.

SIMÕES, I.S.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Misturas binárias e ternárias de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.330-336, 1997.

SMEDES, F.; THOMASEN, T.K. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, n.8/9, p.681-688, 1996.

SOARES, L.V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri, SP: Manole. 2006. 338 p.

SOUZA, S.A.B.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Proteína, lipídios e colesterol em carne de frango assado. **Revista UNIMAR**, v.19, n.4, p.1069-1073, 1997.

SOUZA-SOARES, L.A. **Preparo de triacilgliceróis de cadeia media (TCM) e estudo de sua aplicação**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1980. 147 f.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F.N. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.323-328, 2001.

STEVENSON, D.E.; PARKAR, S.G. ; ZHANG, J.; STANLEY, R.A.; JENSEN, D.J.; COONEY, J.M. Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1078-1086, 2007.

SU, E.Z.; ZHANG, M.J.; ZHANG, J.G.; GAO, J.F.; WEI, D.Z. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.167-173, 2007.

SUN, S.; SHAN, L.; LIU, Y.; JIN, Q.; SONG, Y.; WANG, X. Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, n.1-4, p.104–108, 2009.

TAVARES, M.; BARBÉRIO, J.C.; BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D.; CARVALHO, J.B. Identificação e quantificação de adulterantes do óleo de dendê por meio de cromatografia em fase gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, n.2, p.145-150, 1989.

TRAUL K.A.; DRIEDGER, A.; INGLE D.L.; NAKHASI, D. Review of toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v 38, n.1, p.79-98, 2000.

TRIVEDI, R.; SINGH, R.P. Modification of oils and fats to produce structured lipids. **Journal of Oleo Science**, Japan, v.54, n.8, p.423-430, 2005.

TYAGI, V.K.; VASISHTHA, A.K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, n.4, p.499-506, 1996.

TYRRELL, D. The fatty acid composition of some *Entomophthoraceae*. II. The occurrence of branched-chain fatty acids in *Conidiobolus denoesporus* drechsl. **Lipids**, v.3, n.4, p.368-372, 1968.

ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **Lancet**, v.338, n.8773, p.985-992, 1991.

UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. **Process Biochemistry**, v.36, p.933-939, 2001.

WILLIS, W.M.; LENCKI, R.W.; MARANGONI, A.G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v.38, n.8, p. 639-674, 1998.

_____; MARANGONI, A.G. Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.4, p.443-450, 1999.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.6, p.289-304, 2003.

_____. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. **INFORM (International News of Fats, Oils and Related Materials)**, v.11, p.1121-1129, 2000a.

_____. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.287-303, 2000b.

_____; BALCHEN, S.; HØY, C.E.; ADLER-NISSEN, J. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p.1573-9, 1998a.

_____; _____. Pilot batch production of specific structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, p.301-308, 1998b.

_____; FOMUSO, L.B.; AKOH, C.C. Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a

packed bed reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.77, p.171-176, 2000.

_____; MU, H.; SKANDS, A.R.H.; HØY, C-E.; ADLER-NISSEN, J. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.2, p.175-181, 1999.

_____; SKANDS, A.; JONSSON, G.; ADLER-NISSEN, J. Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in an ultrafiltration membrane reactor **Biotechnology Letters**, v.22, n.21, p.1667-1671, 2000.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis in an efficient reaction system. **Journal of Food Lipids**, v.12, p.299-312, 2005.

_____; XU, X.; HE, C.; LI, L. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. **Food Chemistry**, v.80, p.473-481, 2003.

ZHANG, H.; XU, X.; MU, H.; NILSSON, J.; HOEY, C.-E.; ADLER-NISSEN, J. Production of margarine fats by Lipozyme IM-catalyzed interesterification in a 1-kg batch reactor. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.102, p.411-418, 2000.

ZAMBIAZI, R.Z. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, n.1, p.1-7, 1999.

_____. Apostila: **Tecnologia de Óleos e gorduras**. Universidade Federal de Pelotas, p.122, 2003.

ZAREVÚCKA, M.; VACEK, M.; WIMMER, Z.; STRÁNSKÝ, K.; DEMNEROVÁ, K. Enzymic transformations of blackcurrant oil: enrichment with gamma linolenic acid and alpha linolenic acid, **Chemické Listy**, v.97, n.4, p.206-213, 2003.

ZHAO, H.; LU, Z.; LU, F.; BIE, X.; LIU, Z.; ZENG, X. Lipase-catalysed acidolysis of lard with caprylic acid to produce structured lipids **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p.1027-1032, 2006.

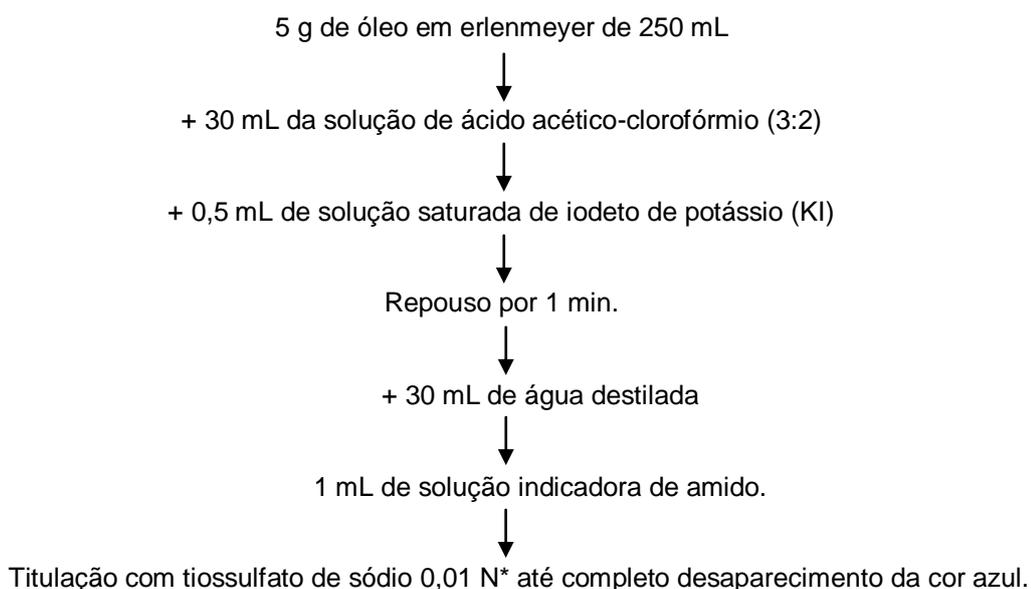
ZHOU D.; XU, X.; MU, H.; HØY, C.-E.; ADLER-NISSEN, J. Lipase-catalyzed production of structured lipids by acidolysis of fish oil with caprylic acid, **Journal of Food Lipids**, v.7, p.263-274, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE I – ESQUEMAS DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA (ARTIGO I).

Outros métodos podem ser encontrados esquematicamente em Feddern et al. (2010).

1) Índice de Peróxido



* padronizado com dicromato de potássio (0,4 g) previamente seco em estufa 105 °C/2 h. O dicromato é dissolvido em água fervida e fria, sendo a solução transferida para balão volumétrico de 200 mL. Pipetar 10 mL da solução de dicromato e transferir para erlenmeyer de 250 mL, acrescentar 70 mL de água + 2 g KI + 20 mL HCl 1 N, estocar ao abrigo da luz por 10 min. Acrescentar 1 mL de solução de amido 1% e titular com tiosulfato 0,01 N. Uma amostra em branco deve ser conduzida (conforme método número 965.33, da AOAC, 1995).

Cálculo da padronização: $E_{\text{dicromato}} (49,036)$

1 N -----49,036 g -----1000 mL

x ----- 200 mL x = 9,8072 g no balão

1 N -----9,8072 g

x ----- 0,4062 g (massa dicromato) x = 0,041 N

$$IP = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times Fc \times 1000}{m_{\text{amostra}}}$$

V_2 = Volume gasto titulação amostra (mL)

V_1 = Volume gasto titulação branco (mL)

Fc = fator de correção

N = normalidade tiosulfato

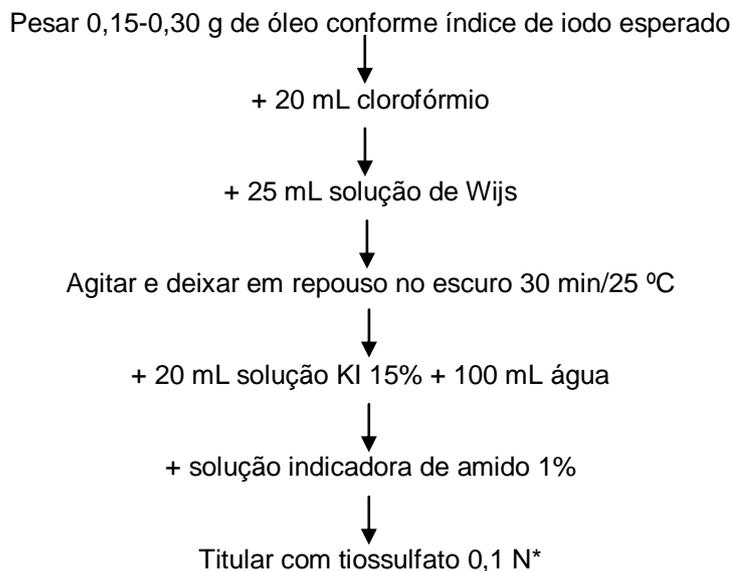
$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$0,041 \cdot 10 = N_2 \cdot 43,05 \quad N_2 = 0,0095$$

Volume gasto titulação

Alíquota titulada

2) Índice de Iodo



*padronizado com 0,2 g de dicromato de potássio. Demais quantidades, seguir o que foi determinado para Índice de Peróxido.

$$II = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,1269 \times N \times Fc \times 100}{m_{\text{amostra}}}$$

0,1269 = meq grama de iodo

V_2 = Volume gasto titulação amostra (mL)

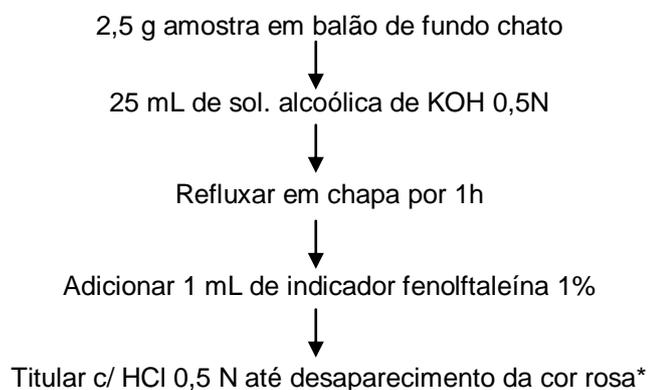
V_1 = Volume gasto titulação branco (mL)

Fc = fator de correção

N = normalidade tiosulfato

Fonte: AOAC, 1995 (método 993.20)

3) Índice de saponificação



* Para padronizar HCl, usar carbonato de sódio P.A. previamente seco a 100 °C/1 h. Pesar 26,4975 g de carbonato e dissolver em água destilada, transferindo para balão volumétrico de 1000 mL. Pipetar 20 mL da solução de carbonato e transferir para erlenmeyer de 250 mL, adicionando 3 gotas de solução de vermelho de metila 0,1%. Titular até viragem para coloração rósea. Aquecer a ebulição para eliminar gás carbônico. Esfriar e prosseguir titulação. Repetir essa operação até coloração rósea permanente.

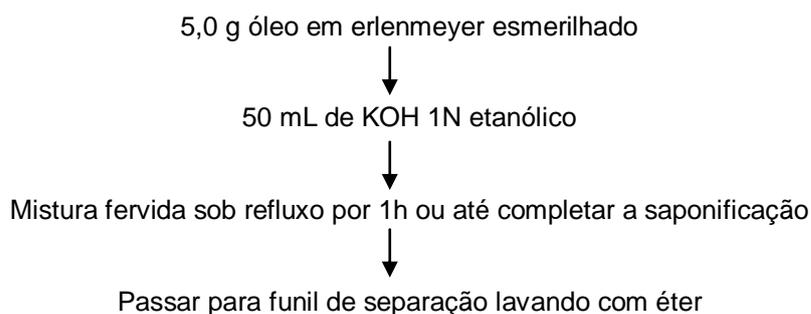
$$\begin{array}{l} 26,49 \text{ g} \text{ -----} 1000 \text{ mL} \\ x \quad \text{-----} 20 \text{ mL (alíquota)} \end{array} \quad x = 0,5299 \text{ g de massa}$$

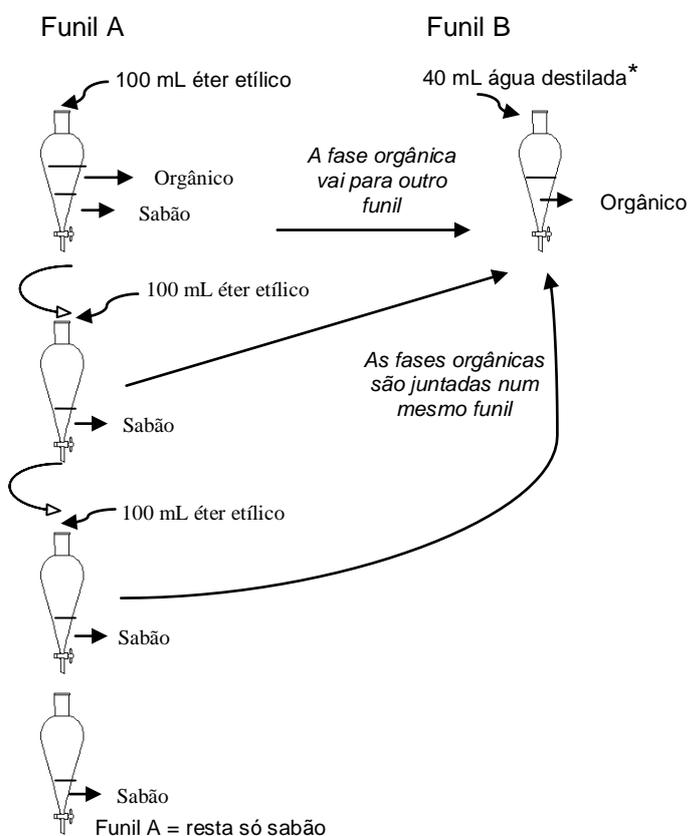
$$IS = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 53}{m_{\text{amostra}}}$$

53 = eq grama do carbonato de sódio
 V_2 = mL gasto titulação amostra
 V_1 = mL gasto titulação branco
 Fc = fator de correção
 N = normalidade HCl

Fonte: AOAC, 1995 (método 920.160)

4) Matéria Insaponificável





* Depois destas 3 lavagens com éter, a fase orgânica (Funil B) deverá ser lavada com 40 mL KOH 0,5N + 40 mL H₂O (2x)

Água de lavagem vai para o funil B; lavar c/ 40 mL H₂O até q a água de lavagem fique neutra ao papel indicador universal.

- Passar para balão previamente tarado
- Evaporar as frações combinadas de éter etílico em rotaevaporador
- Secar em estufa 30 min a 105 °C, até peso constante (normalmente 1 h 30 a 2 h)
- Cálculo:

$$W = \frac{(P_1 - P_2) \times 100}{m_{amostra}}$$

P₁ = peso resíduo

P₂ = tara

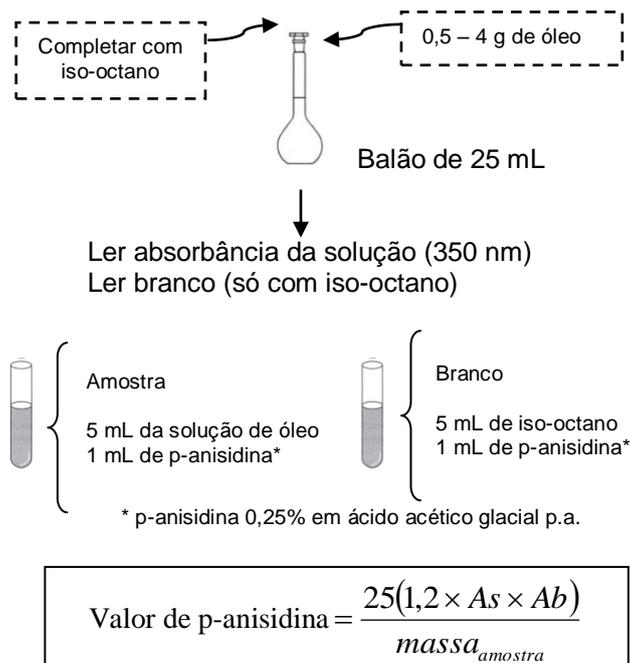
W = % de matéria insaponificável

Bibliografia: AOCS American Oil Chemists' Society, Ca 6a-40, 1997, retirada de Esteves et al. (1995) Metodologia Padrão Alemã para Análises de Gorduras e Outros Lipídios.

5) Valor de p-Anisidina

Princípio do método:

Determinar a soma de aldeídos principalmente 2-alquenal e 2,4-dienal (α , β -insaturado aldeído) contidos em óleos e gorduras. O índice de p-anisidina está definido como 100 vezes a densidade ótica, medida a 350 nm numa cubeta de 1 cm, de uma solução resultante da reação de 1g de gordura (ou óleo) em uma mistura de solvente e reagente de acordo com o fluxograma a seguir (AOCS, 1997, método Cd 18-90).



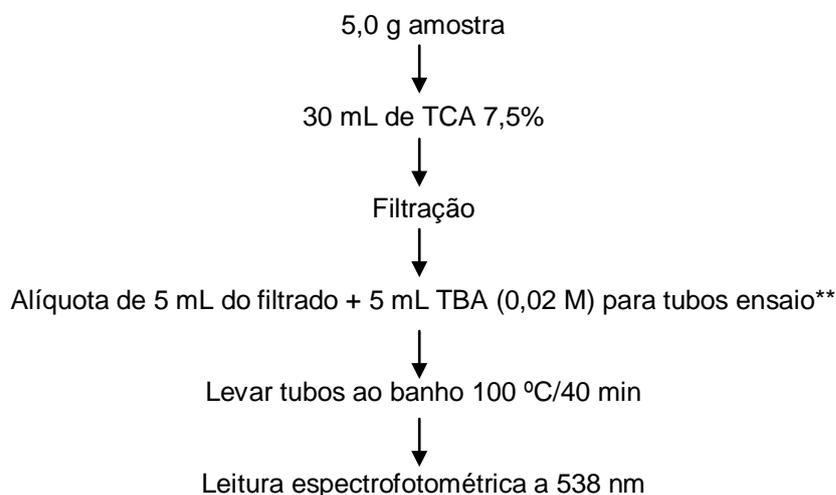
Onde:

A_s = absorbância da amostra – absorbância do branco após a reação

A_b = absorbância da solução inicial – absorbância iso-octano

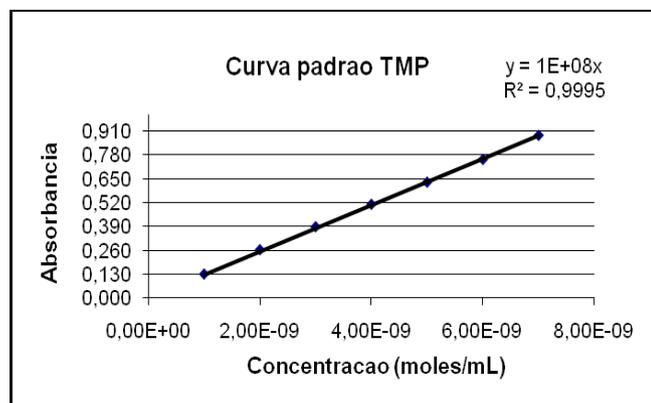
6) Índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

(Adaptado das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985).



** Fazer branco com 5 mL de TBA e 5 mL de TCA.

OBS: Fazer curva padrão de tetrametoxipropil (TMP) na concentração de $1 \cdot 10^{-9}$ a $7 \cdot 10^{-9}$ moles/mL



Exemplo de Curva padrão

7) Índice de Acidez

5,0 g óleo em balão de fundo chato
 ↓
 50 mL de solução álcool:éter 1:2
 ↓
 Adicionar 5 gotas fenolftaleína 1%
 ↓
 Titular c/ NaOH 0,1 N até aparecimento da cor rosa estável por 30''

Cálculo da quantidade de ácidos graxos livres, baseado no PM ácido oleico (282 g/mol):

$$IA = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 28,2}{m_{amostra}}$$

Ou:

1 mL NaOH → 0,1 N → 0,1 meq

N encontrada → x =

V titulado → N encontrada → y =

5 g → y meq

100 g → z =

8) Índice de Refração

O índice de refração pode ser determinado em refratômetro de ABBE.

- Pinga-se uma gota dentro do prisma
- O valor lido é corrigido para a temperatura de 40 °C através de cálculo, conforme a Equação:

$$IR = IR' + K(T' - T)$$

Onde: IR= Índice de refração; T= Temperatura padrão (°C); T'= Temperatura (°C) na qual a leitura do índice foi realizada; K= constante (0,000385).

Fonte: AOAC, 1995 (método número 921.08)

9) Fracionamento de glicerídeos em coluna cromatográfica

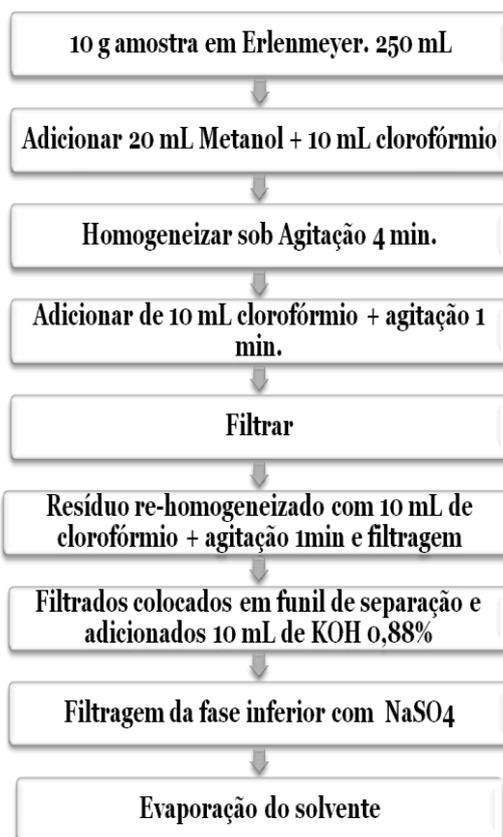
- Dissolver 2 g de óleo em 15 mL de clorofórmio
- Eluir em coluna cromatográfica (60 cm altura x 2,5 cm de diâmetro):*
 - 1º) 100 mL de benzeno para separação de triacilgliceróis
 - 2º) 100 mL da mistura benzeno: éter etílico (9:1) para separação dos diacilgliceróis
 - 3º) 100 mL de éter etílico para separação dos monoacilgliceróis
- Diferentes frações recolhidas em balão de fundo chato
- Evaporação em rotaevaporador na temperatura de ebulição de cada solvente
- Evaporação estufa (30 min a 90 °C)

* Coluna foi preenchida com 15 g (sílica gel 60) dissolvidos em 30 mL de clorofórmio.

Fonte: Adaptado da AOAC (métodos número 28.133 a 28.138)

10) Extração de Lipídios pelo Método de Bligh & Dyer (1959) modificado por Christie (1982) e Smedes & Thomasen (1996)

Ao contrário do método de Soxhlet, neste método se usa uma mistura de solventes a frio (metanol, clorofórmio e água) que permite a extração de lipídios mais polares e não só de triacilgliceróis.



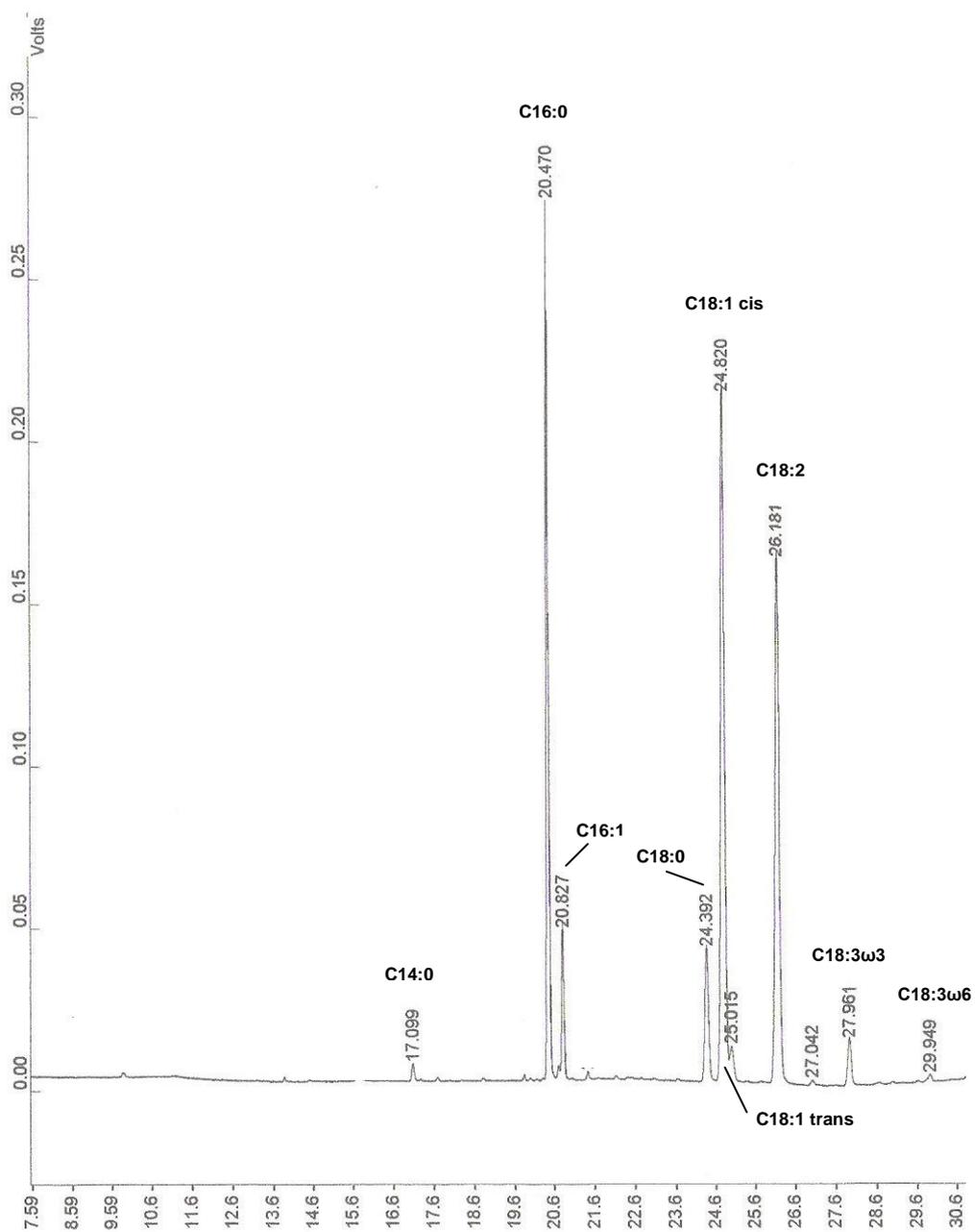
Fonte: Bligh & Dyer, 1959

11) Esterificação dos Lipídios

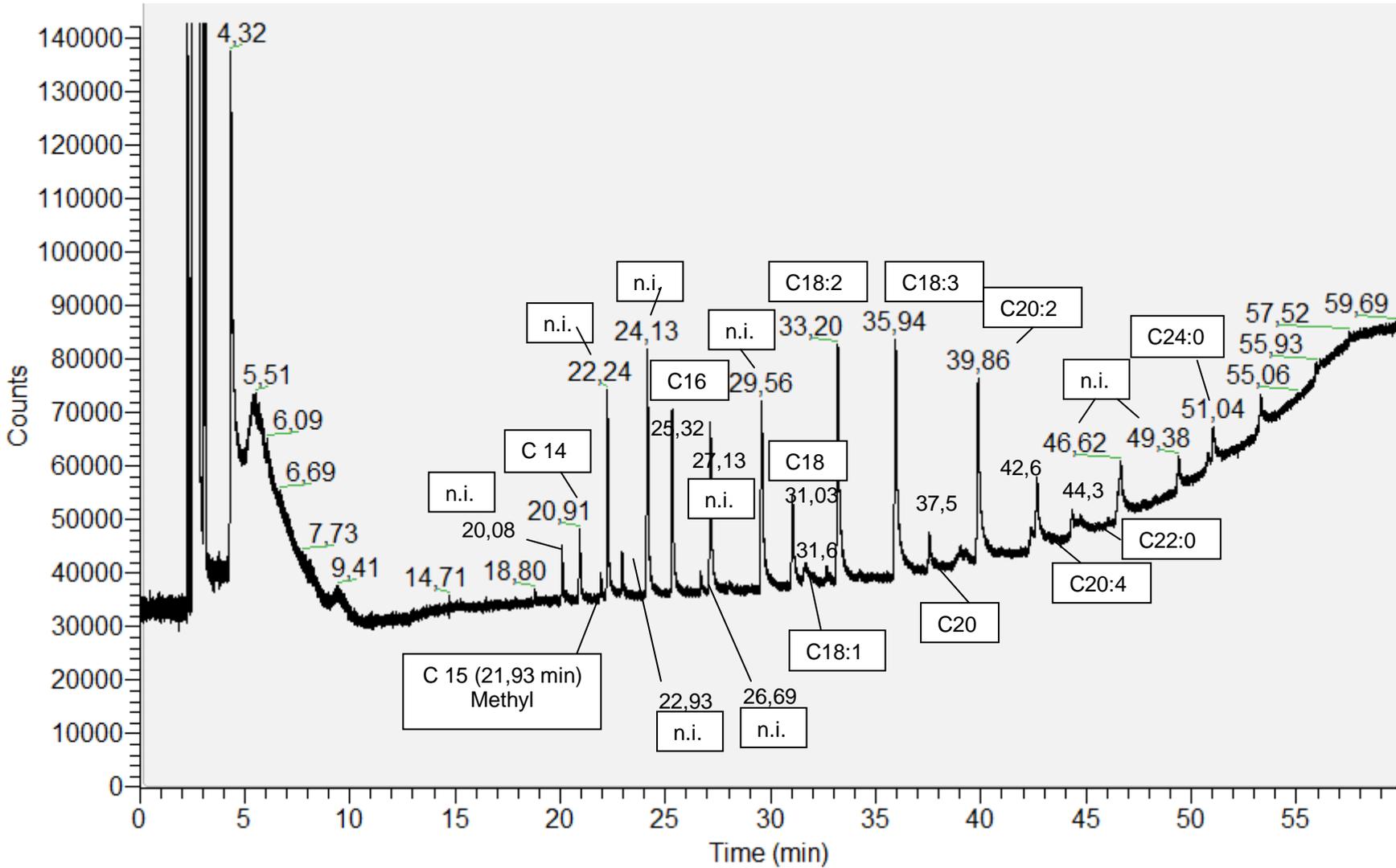
(Adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelke, 1966)

1. Ao resíduo obtido na determinação de lipídios, adicionar 5 mL de KOH/Metanol 0,5N.
2. Levar a ebulição durante 15 min sob refluxo, esfriar.
3. Adicionar 7,5 mL BF₃ e 7,5 mL Metanol
4. Ebulir sob refluxo durante 7min.
5. Em funil de separação, adicionar 10 mL de éter de petróleo + 15 mL de NaCl saturado. Guardar a fração éter (superior).
6. Na outra fração, extrair mais 2x com 10 mL de éter de petróleo.
7. Lavar a fração éter obtida das 3 extrações com 15 mL de água destilada.
8. Filtrar a fração éter (combinação das 3 fases superiores) em funis contendo aproximadamente 5 g de sulfato de sódio anidro para balões de fundo chato.
9. Evaporar quase todo o solvente contido nos balões em rotaevaporador a 70 °C.
10. Lavar 3x com éter de petróleo com micropipeta de 1 mL e passar para frascos âmbar.
11. Evaporar o residual sob nitrogênio (5 minutos).
12. Enrolar os frascos com papel filme e guardar congelado por no máximo 2 meses.
13. Solubilizar o resíduo com 1000 µL de hexano na hora de injetar no cromatógrafo.

APÊNDICE II – CROMATOGRAMA DA GORDURA DA PELE DE FRANGO
(ARTIGO II)



APÊNDICE III – CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS GRAXOS RAMIFICADOS (ARTIGO II)



n.i.= não identificado

APÊNDICE IV – APLICANDO MODELO LINEAR E QUADRÁTICO PARA CONSUMO DE DIHIDROCAFEATO DE OCTILA E TRICAPRILINA (CÁLCULOS ARTIGO III)

Dihidrocafeato de octila

54,74035	Constante	Exp15-17 (PC)	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10	Exp 11	Exp 12	Exp 13	Exp 14
-6,29053	x1	10	5	15	5	15	5	15	5	15	1,59	18,41	10	10	10	10
0,15487	x1 ²	100	25	225	25	225	25	225	25	225	2,53	338,93	100	100	100	100
0,38087	x2	60	50	50	70	70	50	50	70	70	60	60	43,18	76,82	60	60
-0,00935	x2 ²	3600	2500	2500	4900	4900	2500	2500	4900	4900	3600	3600	1864,51	5901,31	3600	3600
0,58965	x3	22,5	15	15	15	15	30	30	30	30	22,5	22,5	29,08	22,5	9,9	35,1
-0,02480	x3 ²	506,25	225	225	225	225	900	900	900	900	506	506,25	845,65	506,25	98,01	1232
0,03112	x1.x2	600	250	750	350	1050	250	750	350	1050	95,4	1104,6	431,8	768,2	600	600
0,01897	x1.x3	225	75	225	75	225	150	450	150	450	35,78	414,23	290,8	225	99	351
0,00288	x2.x3	1350	750	750	1050	1050	1500	1500	2100	2100	1350	1350	1255,67	1728,45	594	2106
Modelo		24,05	37,45	23,93	26,60	19,30	33,14	22,46	23,15	18,70	42,56	27,44	25,08	15,26	22,17	18,05

Tricaprilina

141,3302	Constante	Exp15-17 (PC)	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10	Exp 11	Exp 12	Exp 13	Exp 14
-3,0727	x1	10	5	15	5	15	5	15	5	15	1,59	18,41	10	10	10	10
0,0945	x1 ²	100	25	225	25	225	25	225	25	225	2,53	338,93	100	100	100	100
-1,5909	x2	60	50	50	70	70	50	50	70	70	60	60	43,18	76,82	60	60
0,0118	x2 ²	3600	2500	2500	4900	4900	2500	2500	4900	4900	3600	3600	1864,51	5901,31	3600	3600
0,0209	x3 ²	506,25	225	225	225	225	900	900	900	900	506,25	506,25	845,65	506,25	98,01	1232,01
-1,3842	x3	22,5	15	15	15	15	30	30	30	30	22,5	22,5	29,08	22,5	9,9	35,1
0,0208	x1.x2	600	250	750	350	1050	250	750	350	1050	95,4	1104,6	431,8	768,2	600	600
-0,0128	x1.x3	225	75	225	75	225	150	450	150	450	35,78	414,23	290,8	225	99	351
0,0074	x2.x3	1350	750	750	1050	1050	1500	1500	2100	2100	1350	1350	1255,67	1728,45	594	2106
Modelo		65,98	71,93	68,60	72,66	73,50	69,82	64,57	72,76	71,68	74,51	70,80	65,23	72,61	70,94	67,64

PC = ponto central

APÊNDICE V – TRABALHOS APROVADOS EM CONGRESSOS 2010

Campinas, 16 de Agosto de 2010.

Prezado(s) Autor(es):

Temos a honra de informar-lhe(s) que seu trabalho PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AZEITE DE OLIVA de Vivian Feddern; Gabriela R. L. Mendes; Eliana Badiale-Furlong; Leonor Almeida de Souza-Soares, foi ACEITO para ser Apresentado na Sessão de POSTERS do V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras.

Em anexo enviamos as INSTRUÇÕES PARA PREPARO E APRESENTAÇÃO DE POSTER.

Agradecemos sua participação.

Atenciosamente,

Daniel Barrera-Arellano
Comissão Organizadora

V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras

PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AZEITE DE OLIVA

Vivian Feddern¹; Gabriela R. L. Mendes¹; Eliana Badiale-Furlong¹; Leonor Almeida de Souza-Soares¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Rua Alfredo Huch, 475 – Campus Cidade – CEP 96201-900 – Rio Grande, RS, Brasil. Tel. +55-53-32338663. E-mail: leonor.souzasoares@gmail.com

RESUMO

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras vem sendo estudada para modificá-los estruturalmente e produzir ácidos graxos, visando a obtenção de compostos mais adequados, seja para indivíduos sadios, ou para aqueles com síndromes de má absorção lipídica, valorizando aspectos nutricionais e funcionais dos mesmos. O trabalho buscou através de uma metodologia simples e barata (uso da pancreatina) a produção de mono (MAG) e diacilgliceróis (DAG) ricos em ácidos graxos poli-insaturados pela hidrólise do azeite de oliva. A reação enzimática foi realizada em um sistema emulsionante contendo cola comercial, cloreto de cálcio e tampão NH₄Cl-NH₄OH pH 8. Foram retiradas alíquotas periódicas até 54 h de hidrólise, sendo os ácidos graxos livres titulados até a neutralização para cálculo da acidez e atividade específica. No final da reação, a solução remanescente foi separada e fracionada em coluna cromatográfica para obtenção de mono, di e triacilgliceróis, os quais tiveram seu perfil lipídico analisado. Foi possível a obtenção de até 69% de MAG e 31% de DAG ao longo de 54 h de hidrólise. Da fração MAG, 26,3% e 31% foram oleico e linoleico, respectivamente e na fração DAG, 14,4 e 10% dos mesmos ácidos graxos foram identificados.

Palavras-chave: fracionamento, pancreatina, MAG, DAG, cromatografia, cola comercial

INTRODUÇÃO

A hidrólise de óleos e gorduras tem a finalidade de produzir ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais e glicerol, além de modificar as gorduras por esterificação, transesterificação e interesterificação. Os processos encontrados industrialmente são físico-químicos e normalmente o rendimento da hidrólise é acima de 97% (1,2).

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva (*Olea europaea sativa*) é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente usado nos países ao longo do Mediterrâneo. É raro existir, dentre os óleos vegetais não refinados, um “flavour” mais apreciado do que o do azeite de oliva virgem. Apesar de baixa produção mundial (~ 2% do total de óleos produzidos), contribui com cerca de 15% do valor monetário da produção dos óleos e por ser de valor comercial elevado, apresenta alta incidência de adulterações (3,4).

Monoacilgliceróis (MAG) são surfatantes não iônicos, amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias (produtos de panificação e confeitaria) e de cosméticos, por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (5,6). Diacilgliceróis (DAG) surgiram no final dos anos 1990 como uma forma saudável de óleo. Com apenas dois ácidos graxos ligados à estrutura do glicerol, os DAG são metabolizados de forma a reduzir os níveis de lipídios pós-prandial e evitam ganho de peso. DAG foram produzidos a partir de vários óleos vegetais, incluindo colza, palma e misturas de soja e canola (7,8).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi produzir MAG e DAG através da hidrólise de azeite de oliva com enzima pancreática de forma simples e econômica, visando diminuir o aporte de calorias, pois mesmo seu interessante perfil lipídico possui calorias que podem se tornar prejudiciais.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Material

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado azeite de oliva extra virgem (Sparta Gold) como substrato e pancreatina de pâncreas porcino (Sigma). Todos reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A.

Sistema reacional

Para acompanhamento do processo de hidrólise foi determinada a atividade enzimática em triplicata em 3 frascos erlenmeyers e um controle. Nos três primeiros foram adicionados 50 mL de solução de cloreto de cálcio (0,1 M), 25 mL de solução aquosa de ácido cólico 3,3%, 10 g de cola comercial, 5 g de água, 50 mL de solução tampão $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ (0,05 M) pH 8 e 5 g do substrato. Esta mistura foi previamente homogeneizada por 180 rpm/15 min e em seguida foram adicionados 10 mL da solução de pancreatina (40 mg/mL). No frasco controle, os mesmos reagentes foram adicionados, com exceção da solução enzimática. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de ácido graxo livre por minuto.

As amostras foram submetidas à agitação horizontal a 180 rpm, em diferentes tempos de hidrólise (0 h, 24 h, 31 h, 44 h, 48 h e 54 h) a 38 °C. Nestes intervalos, foram coletadas alíquotas de 5 mL e então 5 mL de etanol foram adicionados a fim de parar a reação. No final (54 h de hidrólise), restaram ainda 120 mL da solução em cada frasco. Este volume foi lavado com 20 mL de hexano por 3 vezes para separar a porção não hidrolisada (insaponificável). Em seguida, foi realizada centrifugação (5000 rpm/10 min) sendo as amostras transferidas para funis de separação. A parte saponificável foi transformada em ésteres metílicos para posterior injeção no cromatógrafo a gás. A parte não hidrolisada (hexano) foi primeiramente eluída em coluna cromatográfica para separar mono, di e triacilgliceróis (MAG, DAG, TAG) eventualmente presentes após tempo de hidrólise. Depois desta separação, as frações obtidas foram esterificadas e injetadas no cromatógrafo a gás (Varian Star Chromatograph 3400CX, Palo Alto, CA, E.U.A.).

Fracionamento dos glicerídeos

O método utilizado foi adaptado da AOAC (9), número 965.35, em que foi utilizado um solvente menos tóxico do que o benzeno, mas de polaridade similar, para eluição de MAG, DAG e TAG, além de menor coluna cromatográfica e menor massa a ser eluída. As condições foram as seguintes: 0,3-0,4 g de azeite foram dissolvidos em 15 mL de clorofórmio e eluídos em coluna (30 cm altura x 2,5 cm de diâmetro) contendo 15 g de sílica gel 60 (Vetec) dissolvidos em 30 mL de clorofórmio. Os solventes foram eluídos na coluna na ordem a seguir descrita e as amostras recolhidas em balões: triacilgliceróis foram eluídos com 100 mL de ciclohexano; diacilgliceróis com 100 mL da mistura ciclohexano: éter etílico (9:1) e monoacilgliceróis com 100 mL de éter etílico. Os solventes foram evaporados em banho utilizando

rotaevaporador na temperatura de ebulição de cada um. Os solventes residuais foram evaporados em estufa a 90 °C, por 30 min.

Esterificação de lipídios e perfil de ácidos graxos

Os MAG, DAG e TAG obtidos após eluição do azeite de oliva hidrolisado na coluna cromatográfica foram derivatizados para a obtenção de ésteres metílicos, conforme adaptação do método de Metcalfe *et al.* (10), segundo Feddern *et al.* (11). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia dos mesmos autores, sendo os resultados expressos em porcentagem de cada ácido graxo sobre ácidos graxos totais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para a atividade enzimática do azeite de oliva por ação da pancreatina ao longo do tempo de hidrólise estão dispostos na Figura 1.

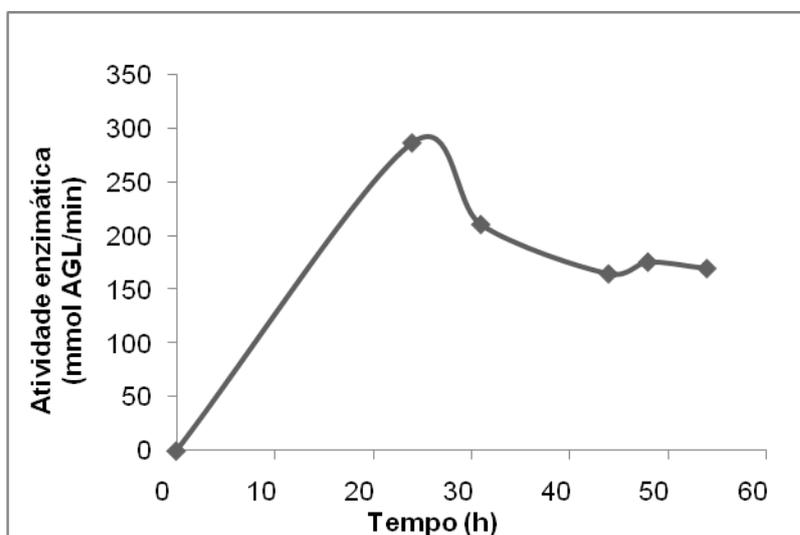


Figura 1. Atividade enzimática do azeite de oliva hidrolisado.

Foi verificado que até 24 h de reação houve maior ação da enzima (287 mmol ácido graxo livre liberado por minuto) e após este período houve um decréscimo na atividade. A velocidade da reação catalisada por enzima aumentou com o tempo de reação, atingindo a velocidade máxima. Após houve um decréscimo da atividade devido à queda na concentração de substrato. As condições reacionais, após o tempo

ótimo de reação para pancreatina (24h), podem ter propiciado hidrólise gradativa da mesma, pois se trata de uma mistura de enzimas e as proteases podem ter atuado.

O Quadro 1 mostra o perfil de ácidos graxos das diferentes frações do azeite de oliva submetido à hidrólise pancreática no final do tempo reacional.

Quadro 1. Perfil dos ácidos graxos presentes nos glicerídeos fracionados obtidos do azeite de oliva, após ação da pancreatina e dos ácidos graxos liberados.

Ácidos graxos	MAG	DAG	TAG	Ácidos graxos liberados (Saponificáveis) *
C14:0	tr	tr	ND	0,1
C16:0	5,0	3,3	ND	10,2
C16:1	0,2	ND	ND	0,3
C18:0	1,7	1,5	ND	3,5
C18:1 ω9 cis	26,3	14,4	ND	37,5
C18:1 ω9 trans	0,4	0,4	ND	0,7
C18:2 ω6 cis	31,0	10,0	ND	41,3
C18:2 ω6 trans	0,3	ND	ND	0,5
C18:3 ω3	3,4	0,7	ND	4,7
C20:0	0,3	0,3	ND	0,4
C20:1	0,2	0,2	ND	0,4
C20:2	ND	ND	ND	0,1
C22:0	0,2	0,2	ND	0,3
Total	69%	31%	0%	

* O perfil está calculado sobre 100%

MAG = monoacilgliceróis; DAG = diacilgliceróis; TAG = triacilgliceróis;
ND = não detectado; tr = traço

Os MAG e DAG separados em coluna cromatográfica totalizaram 69% e 31%, respectivamente, dos quais se destacam os conteúdos de C18:1 ω 9 (26,3% e 14,4%) e C18:2 ω 6 (31% e 10%) na fração MAG e DAG, respectivamente. Isto indica que a hidrólise do azeite de oliva com a pancreatina foi completa, ou seja, houve total degradação dos triacilgliceróis na amostra. Na fração saponificável, houve predominância dos mesmos ácidos graxos, 37,5% para oleico e 41,3% para linoleico. Isto mostra que é possível controlar, através do tempo de hidrólise, as proporções de MAG e DAG, conforme interesse da aplicação.

AGRADECIMENTOS

À FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira, A.L.A., L.A. Gioielli, and M.N. Oliveira, Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 19:270-276 (1999).
2. Padilha, M.E.S., and W. Augusto-Ruiz, Hidrólise enzimática do óleo de pescado, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27:285-290 (2007).
3. Peixoto, E.R.M., D.M.N. Santana, and S. Abrantes, Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva- Proposta para atualização da legislação brasileira, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18:444-452 (1998).
4. Aued-Pimentel, S., E. Takemoto, E.E. Kumagai, and C.B. Cano, Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil, *Quím Nova* 31:31-34 (2008).
5. Valerio, A., K.G. Fiametti, S. Rovani, E. Franceschi, M.L. Corazza; H. Treichel, D. Oliveira, and J.V. Oliveira, Enzymatic production of mono- and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant. *J. Supercritical Fluids* 49:216–220 (2009).
6. Freitas, L., T. Bueno, V.H. Perez, and H.F. Castro, Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações, *Quím. Nova*, 31:1514-1521 (2008).
7. Cheong, L-Z; H. Zhang, Y. Xu, and X., Xu, Physical characterization of lard partial acylglycerols and their effects on melting and crystallization properties of blends with rapeseed oil, *J. Agric. Food Chem.* 57:5020–5027 (2009).
8. Yang, T., H. Zhang, H. Mu, A.J. Sinclair, and X, Xu, Diacylglycerols from butterfat: production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81:979-987 (2004).
9. AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Arlington, VA, USA, 1995. 16th ed.
10. Metcalfe, L.D., A.A. Schmitz, and J.R. Pelka, Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis, *Anal Chem.* 38:514-515 (1966).
11. Feddern, V., L. Kupski, E.P. Cipolatti, G. Giacobbo, G.L. Mendes, E. Badiale-Furlong, and L.A. Souza-Soares, Physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile of chicken skin fat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (in press).



4º Congresso Internacional de
Biotecnologia e Alimentos
X Encontro Regional Sul de Genética
e Tecnologia de Alimentos

Prezado(a) Sr(a).
VIVIAN FEDDERN

Temos a satisfação de comunicar a APROVAÇÃO de seu Trabalho Científico para o 4º Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos, a se realizar no período de 5 a 8 de outubro de 2010 no CIETEP, em Curitiba-PR.

Título do Trabalho:	MODIFIED TRIACYLGLYCEROL PRODUCTION THROUGH ACIDOLYSIS FROM CHICKEN SKIN FAT AND BRANCHED CHAIN FATTY ACIDS
Autores:	VIVIAN FEDDERN (FURG) ; XUEBING XU (UNIVERSITY OF AARHUS) ; ELIANA BADIALE-FURLONG (FURG) ; LEONOR A. DE SOUZA-SOARES (FURG)

Aprovado para: **Apresentação em Pôster**

Código: **P-BEF-050**

Data: **06 de Outubro – Quarta-Feira**

Horário: **08h30 - 18h30**

Local: **Hall de Exposição de Pôsteres**

- A apresentação dos trabalhos na forma de pôster , tamanho 90x120cm e a criação do pôster fica a critério de cada autor.
- A apresentação dos trabalhos na forma de pôster será nos dias 06 e 07 de outubro.

Atenciosamente,

Comissão Organizadora / Comissão Científica
4º Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos

[Imprimir]

MODIFIED TRIACYLGLYCEROL PRODUCTION THROUGH ACIDOLYSIS FROM CHICKEN SKIN FAT AND BRANCHED CHAIN FATTY ACIDS

ABSTRACT

The skin is one of the several by-products of chicken meat industries, considered as waste, being rarely utilized or underutilized, resulting in a valuable loss because it is rich in oleic acid. Branched fatty acids are more stable than the straight ones, having applications in surfactants, lubricants, cosmetics, among others. Since the desirable or essential fatty acids are better used in the sn-2 position of triacylglycerol, it's possible to maintain this position, obtaining modified lipids of interest. The aim of this work was producing modified lipids rich in unsaturated fatty acids, through lipase catalyzed acidolysis reaction from chicken skin fat and branched fatty acids using Lipozyme RM IM as biocatalyst. Interesterification reactions were carried out varying enzyme concentration, water addition, substrate molar ratio and time using a 24 complete factorial design with three central points. The interesterified samples were applied on thin layer chromatography plates, extracted, methylated and injected into gas chromatograph. In modified triacylglycerol, a maximum of 44.8%, 35.2% and 18.1%, respectively of oleic, linoleic and linolenic acids were obtained, which can be used for nutritional as well as technological purposes.

Keywords: interesterification; lipase; polyunsaturated fatty acids

1 INTRODUCTION

Brazil is the world leader in chicken exports (3.6 million tons) and the third largest producer (10.9 million tons). It is estimated that from the national total production, about 436,000 tons/year of waste are being generated. Therefore, it becomes necessary to use residues for other purposes, once they are rich in lipids, mainly oleic acid and proteins (ABEF, 2009).

The skin is one of several by-products of chicken meat industries, considered as waste, not utilized or being underutilized for feed, representing 4% related to the animal weight. Thus, it generates additional costs for disposal and environmental problems, besides the loss of a potential product (Ockerman & Hansen, 1994). Sheu and Shen (2002) reported that different cuts of chicken (adipose tissue, skin and flesh) present the same fatty acid profile, being rich in monounsaturated fatty acids (45-50%).

Branched-chain fatty acids are mainly present in fungi and bacteria. This kind of lipids are found in few fungi in small proportions (1% or less) related to total fatty acids (Tyrrell, 1968). Monomethyl branched-chain fatty acids (mmBCFAs) are commonly found in many organisms from bacteria to mammals. In humans, they have been detected in skin, brain, blood, and

cancer cells. Despite a broad distribution, mmBCFAs remain exotic in eukaryotes, where their origin and physiological roles are not understood (Kniazeva et al, 2004).

Commercial branched chain fatty acids are not naturally occurring materials. They are products of specific synthetic routes or else arise as by-products of manufacturing processes. They have properties distinctly different from normal chain acids, and they extend the range of materials available for formulating end products with desirable characteristics in a diverse group of applications areas (Kinsman, 1979). Branched fatty compounds are of commercial significance because the branching can cause some advantageous changes in physical properties while retaining the same or nearly the same number of carbon atoms. For example, they have a broader liquidity range, making them of interest for low-temperature applications and their low surface tension causes good spreadability. They are used in surfactants, lubricants, cosmetics, and as polymers additives, defoamers and wood protecting agents (Knothe, Kenar & Gunstone, 2007).

Fats and oils are important constituents of foods. The nutritional and sensory value and the physical properties of a triglyceride are greatly influenced by factors such as the position of the fatty acid in the glycerol backbone, the chain length of the fatty acid, and its degree of unsaturation. Lipases allow us to modify the properties of lipids by altering the location of fatty acid chains in the glyceride and replacing one or more of the fatty acids with new ones. This way, a relatively inexpensive and less desirable lipid can be modified to a higher value fat (Lee & Akoh, 1998; Xu et al, 1999; Xu 2000a,b; Sharma, Chisti & Banerjee, 2001; Yang et al, 2003).

Enzymatic interesterification is different from the chemical, mainly because the latter is a random reaction, while the first one is sn-1,3 specific. These positions will be exchanged and the sn-2 position will be maintained. In chemical interesterification, all positions will be randomized even though 8 triacylglycerols (TAG) are still formed, but the contents of each TAG will be different, depending on how the fatty acids are located in sn-1,3 positions and sn-2 position (Xu, 2003).

When structured lipids are synthesized from animal fats for food uses, it is often desirable to reduce the saturated long chain fatty acids (LCFA) content of the starting fat and increase the mono and polyunsaturated fatty acids content to improve the nutritional quality of the targeted structured lipid. This is done because LCFA, especially palmitic acid, are regarded as one risk factor in the development of coronary artery disease (Lee & Foglia, 2000). Naturally occurring fatty substrates have characteristic physical properties, e.g. high melting points due to their linear and unbranched carbon chains. However, products with lower melting points and lower viscosity are desirable for certain applications, e.g. lubricants. The catalytic conversions with petrochemicals, e.g. with short-chain alkenes, is a gorgeous method to obtain branched unsaturated fatty compounds (Behr & Gomes, 2010).

Since there are no literature reports about interesterification reactions involving chicken skin fat and branched fatty acids, the objective of this work was to modify these lipids, evaluating some unsaturated fatty acids of the interesterified products using commercial immobilized lipase.

2 MATERIAL AND METHODS

Chicken skin was donated by a chicken-processing industry of the south region of Rio Grande do Sul state, Brazil, and a mixture of branched fatty acids, called 18-MEA (18-Methyl Eicosanoic Acid), a derivative of lanolin was produced by Croda, Malmo, Sweden. *Lipozyme® RM IM*, a 1,3 specific lipase from *Rhizomucor miehei* was donated by Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark). Standards of fatty acids, as well as mono, di and triacylglycerols were purchased from Sigma-Aldrich. All chemical solvents used were of analytical grade. Fat was extracted from chicken skin according to Bligh & Dyer (1959) method, following some modifications (Christie, 1982; Smedes & Thomassen, 1996). The mixture of branched fatty acids had the following lipid profile: C14 1.8%, C16 6.7%, C18 3.8%, C18:1 0.9%, C18:2 11.9%, C18:3 15.9%, C20 2%, C20:2 12%, C24 0.8%. Chicken skin fat lipid profile: C14 0.53%, C16 23.5%, C18 6.1%, C18:1 34.8%, C18:2 28.3%, C18:3, 2.3%.

Interesterification reactions type acidolysis were carried out in water-jacket reactors (Figure 1) using hexane as solvent and *Lipozyme RM IM* as biocatalyst. Four variables at three levels were studied: enzyme concentration (5-15%), water addition (0-10%), substrate molar ratio (2:1-6:1 branched fatty acids: chicken skin fat) and time (8-24 h), according to a 24 complete factorial design with 19 experimental runs, which included 16 factorial and 3 central points. The temperature was kept constant at 60 °C.

FIGURE 1 – Water-jacket reactors for interesterification reactions



Interesterified samples were isolated and applied on Silica gel 60 thin-layer chromatography plates (20x20 cm, Merck, Darmstadt, Germany) with hexane/diethyl ether/acetic acid 70/30/1(v/v/v) as developing solvents in a closed chamber for 90 min. Following spraying with 1% ethanolic solution of 2,7-dichlorofluorescein, the bands were visualized under ultraviolet light (Figure 2). The band containing triacylglycerols (TAGs) was scraped off and extracted with chloroform: methanol (2:1), evaporated under nitrogen and subjected to methylation.

The fatty acid methyl esters (FAME) were prepared as follows: the residue of the evaporated sample was added by 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol and refluxed at 80 °C for 10 min. After cooling at room temperature, 1 mL of 20% methanolic BF_3 and 0.2 mL of 0.1% methanolic hydroquinone were added. This mixture was refluxed for 5 min at 80 °C. After

cooling, 1 mL of heptane was added and then the mixture was centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The upper layer was transferred to another tube and then one milliliter of saturated NaCl was added and the mixture shaken. After salt decantation, the upper layer was transferred to new tube, which was evaporated under nitrogen, being resuspended with 50 mL of heptane and injected into the gas chromatograph.

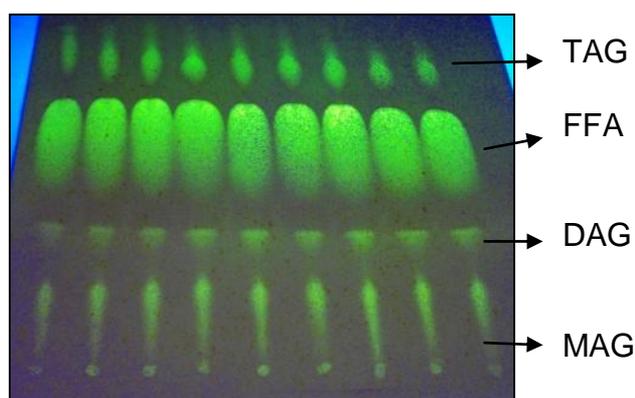
A gas chromatograph (Thermo Scientific DSQ II - TRACE GC ULTRA, USA) with an auto sampler injection system (Thermo Scientific triplus™ Autosampler) was used to separate triacylglycerol fraction. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min and a flame ionization detector (FID) was used. The injector and detector temperatures were set respectively at 250 °C and 270 °C. A fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was used. The column temperature was initially 40 °C for 3 min followed by a second rate of 6 °C/min until 88 °C. Then, the temperature was increased to 166 °C at 20 °C/min and finally to 250 °C at a rate of 2 °C/min, maintained at this ramp for 3 min. The total run time was 59 min. The peaks were identified by comparing the samples retention times with the standards, using Xcalibur software (version 2.0.7) of Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA).

The results were analyzed in Statistica software. Analysis of variance was accomplished, and differences were considered significant when $p < 0.05$ for effects' analysis.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the different fractions obtained in TLC: monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG), free fatty acids (FFA) and triacylglycerol (TAG), in organic solvent media.

FIGURE 2 – TLC of the acidolysis reaction between branched-chain fatty acids and chicken skin fat



The higher amount of FFA is due to the excess of branched fatty acids added to the reactional medium. The use of solvents can dramatically reduce viscosity of the substrates and as a consequence increase the reaction rate by increasing the mass transfer of substrates. The most commonly used solvents for modification of lipids by acidolysis have been toluene and hexane. In the production of foodstuffs and food ingredients few extraction solvents are allowed; however, hexane is generally accepted in the fat and oil industry, where it is used during extraction and fractionation (Vikbjerg, Mu & Xu, 2005).

The independent variables and their levels are presented in Table 1, as well as oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) percentage in modified TAG after interesterification reactions between branched fatty acids and chicken skin fat.

TABLE 1 – Coded levels and real values for oleic, linoleic and linolenic percentage in modified TAG

Experiments	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	%	%	%
					C18:1	C18:2	C18:3
1	5 (-1)	0 (-1)	2:1 (-1)	8 (-1)	41.5	23.0	0.0
2	15 (+1)	0 (-1)	2:1 (-1)	8 (-1)	44.8	29.3	1.4
3	5 (-1)	10 (+1)	2:1 (-1)	8 (-1)	33.3	22.2	0.0
4	15 (+1)	10 (+1)	2:1 (-1)	8 (-1)	31.6	28.4	3.3
5	5 (-1)	0 (-1)	6:1 (+1)	8 (-1)	34.4	30.0	0.3
6	15 (+1)	0 (-1)	6:1 (+1)	8 (-1)	35.9	18.1	5.4
7	5 (-1)	10 (+1)	6:1 (+1)	8 (-1)	0.1	13.3	18.1
8	15 (+1)	10 (+1)	6:1 (+1)	8 (-1)	22.1	15.4	8.3
9	5 (-1)	0 (-1)	2:1 (-1)	24 (+1)	43.4	35.2	0.5
10	15 (+1)	0 (-1)	2:1 (-1)	24 (+1)	35.0	30.8	3.0
11	5 (-1)	10 (+1)	2:1 (-1)	24 (+1)	9.8	16.4	7.6
12	15 (+1)	10 (+1)	2:1 (-1)	24 (+1)	27.6	26.2	7.9
13	5 (-1)	0 (-1)	6:1 (+1)	24 (+1)	41.1	32.2	0.4
14	15 (+1)	0 (-1)	6:1 (+1)	24 (+1)	32.5	28.2	4.8
15	5 (-1)	10 (+1)	6:1 (+1)	24 (+1)	43.9	29.1	0.6
16	15 (+1)	10 (+1)	6:1 (+1)	24 (+1)	26.7	27.9	8.4
17	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	20.7	18.4	5.8
18	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	33.0	27.6	4.4
19	10 (0)	5 (0)	4:1 (0)	16 (0)	37.1	25.6	2.9

X₁ = enzyme concentration (%) based on total substrate; X₂ = addition of water (%) based on enzyme content; X₃ = molar ratio of branched fatty acid: chicken skin fat; X₄ = time (h), C18:1 = oleic, C18:2 = linoleic, C18:3 = linolenic acid.

In experiment 2, highest oleic (C18:1) content (44.8%) was achieved at the lowest levels of water addition, molar ratio and time, but higher enzyme content. For linoleic (C18:2), 35.2% was obtained (experiment 9), at the lowest levels, with exception of time (highest level). In relation to linolenic acid (C18:3), lowest levels for enzyme and time, while higher levels of molar ratio and water addition were the better conditions for obtaining 18.1% of this fatty acid.

Table 2 presents the main effects ($p < 0.05$) of the evaluated unsaturated fatty acids, including the significance of each variable on oleic, linoleic and linolenic percentage.

TABLE 2 – Main effects of unsaturated fatty acids percentage on studied variables

Main effects	C18:1 (%)	p*	C18:2 (%)	p*	C18:3 (%)	p*
Means	31.3	0.000	25.1	0.000	4.4	0.001
Enzyme concentration (%)	1.1	0.838	0.3	0.891	1.9	0.366
Water addition (%)	-14.2	0.025	-6.0	0.040	4.8	0.041
Substrate molar ratio	-3.8	0.483	-2.2	0.402	2.8	0.192
Time (h)	2.0	0.703	5.8	0.046	-0.5	0.817

* $p < 0.05$ was considered significant; standard error = 5.14, 2.45, 1.97 respectively for oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3).

It was verified, according to Table 2, that water addition on the reactional medium was the only significant effect ($p < 0.05$) for all unsaturated fatty acids evaluated. But for linoleic (C18:2) the reaction time was also significant. In the latter, when the reaction time increased from 8 h to 24 h, the linoleic percentage increased in 5.7%. However, the addition of water until 10% decreased linoleic content in 6%. For linolenic, the water addition (10%) was positively significant, increasing this fatty acid up to 4.8%, probably due to its melting point, which is smaller than the others, conferring higher solubility in the reaction medium. Oleic acid percentage decreased until 14.2% when water was added, probably because is the most abundant fatty acid present, thus this difference was not so large.

Lipases need a certain amount of water to maintain an optimal catalytic activity, but an excess of water contributes to the hydrolysis of triglycerides and facilitates the acyl-migration. The optimum amount of water in the reaction medium depends on the type of lipase and solvent used. There are several works describing the influence of the water and the solvent on lipase-catalyzed reactions in organic media. In general, the optimal content is found between zero and 10% (w/w water/lipase) and in many cases these values coincide with the amounts of water retained in the support matrix during enzyme immobilization (usually 1-5%) (Paez et al, 2003).

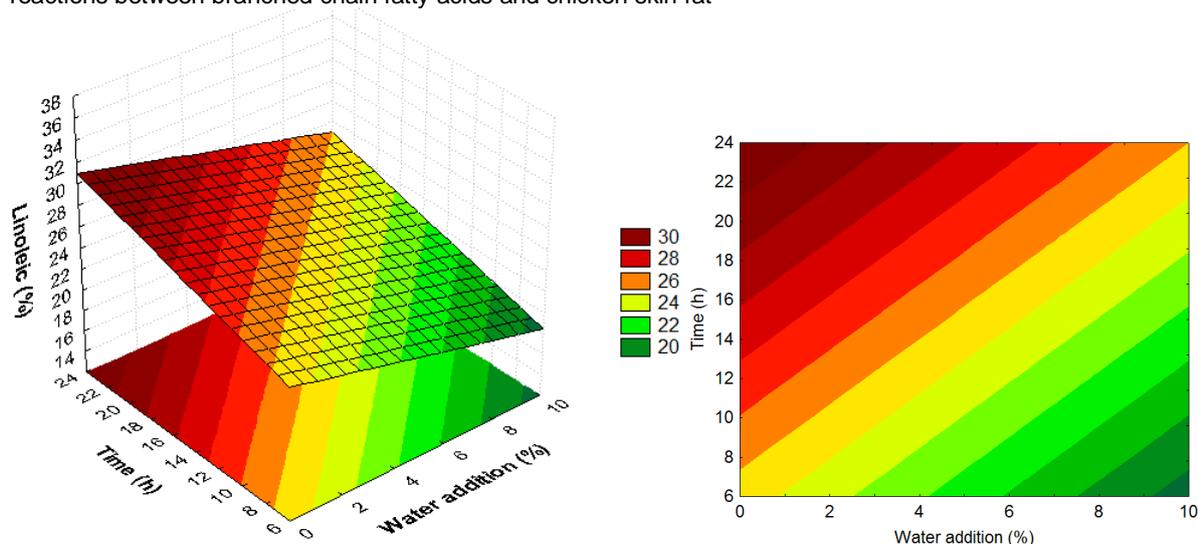
In water-abundant systems, the hydrolysis will be the main reaction. Enzymatic reactions conducted in solvent systems have been reported to be highly depended on the polarity of solvents. Enzymes in solvents with high polarity have in general lower catalytic activities since the solvent will remove bound water from the enzyme and, as a consequence, suppress products synthesis. Different parameters are known to suppress the hydrolysis reaction; these include employment of high substrate ratios and having low water activity. Water addition may be required to increase enzyme activity; however, this will at the same time increase hydrolysis, which results in lower yields (Xu et al, 1999; Yang et al, 2003; Vikbjerg, Mu & Xu, 2005).

As linoleic acid (C18:2) had two significant effects (water addition and time), analysis of variance (ANOVA) was carried out, where F-value (5.31) was higher than the tabulated value (3.63) at 5% significance. On the basis of this, a coded model describing the behavior of the interesterification reactions between branched chain fatty acids and chicken skin fat was established (Equation 1)

$$\% \text{linoleic} = 22.3430 - 0.5998X_3 + 0.3608X_4 \quad (1)$$

Where X_3 = water addition (%) and X_4 = time (h), which varied from 0 to 10% and 8 to 24 h respectively. Figure 3 shows the response surface and contour plots for linoleic acid (C18:2) after interesterification reactions, type acidolysis, in modified TAG.

FIGURE 3 – Response surface and contour plots for linoleic percentage in modified TAG after interesterification reactions between branched chain fatty acids and chicken skin fat



Based on the results shown in Figure 3, it was verified that for higher amounts of linoleic acid, no water needs to be added, but long periods of time are needed (24 h). As there was no significant difference between the molar ratio as well as the enzyme amount used in this study, it's recommended to use the lower levels, 5% of enzyme and molar ratio of 2:1 branched fatty acids: chicken skin fat.

4 CONCLUSION

The highest linoleic (C18:2) percentage obtained in modified TAG was 35.2%, when 5% of enzyme was used, besides 24 h interesterification reaction and molar ratio 2:1 of branched fatty acids and chicken skin fat. For the other two unsaturated fatty acids, oleic and linolenic, only water addition was significant ($p < 0.05$), showing a negative effect for the first one, and positive for the latter. The maximum oleic and linolenic acids obtained were 44.8% and 18.1%, respectively. Modified lipids with this composition can be used for different purposes like nutritional and technological applications.

ACKNOWLEDGMENTS

Agrobiotechnology lab of Aarhus University (Denmark), Novozymes and CAPES/PDEE scholarship (process number 1104-09-8) given to the first author are thanked.

REFERENCES

ABEF – Brazilian Association of Chicken Producers and Exporters. Statistics. Available at: <<http://www.abef.com.br/>>. Access at: 18 nov. 2009.

Behr, A.; Gomes, J.P. The refinement of renewable resources: New important derivatives of fatty acids and glycerol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.112, p.31–50, 2010.

- Bligh E.G.; Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- Christie, W.W. *Lipid analysis*. Oxford: Pergamon Press, 1982. cap.3, p. 25-49. Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles.
- Kinsman, D.V. Isostearic and other branched acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.76, p. 823A-827A, 1979.
- Kniazeva M.; Crawford, Q.T.; Seiber, M.; Wang, C.Y.; Han, M. t branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. *Public Library of Science Biology*, v.2, n.9, p.1446-1459, 2004.
- Knothe, G., Kenar, J.A., Gunstone, F.D. Chemical properties. In: Gunstone, F.D.; Harwood, J.L., Dijkstra, A. J. (3rd. ed.). *The Lipid Handbook with CD-ROM*. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.535-590.
- Lee, K.T.; Akoh, C.C. Structured lipids: Synthesis and applications. *Food Reviews International*, v.14, p.17-34, 1998.
- Lee, K-T.; Foglia, T.A. Synthesis, Purification, and Characterization of Structured Lipids Produced from Chicken Fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.77, n.10, p.1027-1034, 2000.
- Ockerman, H.W.; Hansen, C.L. *Industrialización de subproductos de origen animal*. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A.: 1994, p. 387.
- Paez, B.C.; Medina, A.R.; Rubio, F.C.; Cerdán, L.E.; Grima, E.M. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.78, p.461-470, 2003.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v.19, p.627-662, 2001.
- Sheu, K.S.; Chen, T.C. Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained from five rendering methods. *Journal of Food Engineering*, v.55, n.3, p.263-269, 2002.
- Smedes, F.; Thomasen, T.K.; Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, v.32, n.8/9, p.681-688, 1996.
- Tyrrell, D. The fatty acid composition of some Entomophthoraceae. II. The occurrence of branched-chain fatty acids in *Conidiobolus denoesporus* drechsl. *Lipids*, v.3, n.4, p.368-372, 1968.
- Vikbjerg, A.; Mu, H.; Xu, X. Lipase-catalyzed acyl exchange of soybean phosphatidylcholine in n-hexane: a critical evaluation of both acyl incorporation and product recovery. *Biotechnology Progress*, v.21, p.397-404, 2005.
- Xu, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.105, n.6, p.289-304, 2003.
- Xu, X. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. *INFORM (International News of Fats, Oils and Related Materials)*, v.11, p.1121-1129, 2000a.
- Xu, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.102, p.287-303, 2000b.
- Xu, X.; Mu, H.; Skands, A.R.H.; Høy, C-E.; Adler-Nissen, J. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.76, n.2, p.175-181, 1999.
- Yang T.; Xu, X.; He, C.; Li, L. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, v.80, p.473-481, 2003.

Trabalho Aceito - XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Sexta-feira, 30 de Julho de 2010 20:28:23

De: Operador GT5 <TRABALHOS@GT5.COM.BR> [Adicionar a contatos](#)
Para: VFEDDERN@YAHOO.COM.BR



30/07/2010

AUTOR:VIVIAN FEDDERN**INSTITUIÇÃO:**

A Comissão Científica do XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS tem o prazer de informar que o trabalho abaixo identificado foi **APROVADO**.

TÍTULO:Síntese de composto fenólico e sua transesterificação com triacilglicerol de cadeia média**CÓDIGO:**00000009760%**CASO HAJA MUDANÇA NO TÍTULO DO TRABALHO, FAVOR INFORMAR AO E-MAIL: TRABALHOS@GT5.COM.BR****Lembre-se:** O trabalho para ser publicado é necessário que sua inscrição esteja **paga** até o dia 18.08.10, impreterivelmente.

Informações sobre data e horário de apresentações do trabalho estarão disponíveis em breve no site do congresso.
Contamos com sua presença !

Cordialmente,

Comissão Científica do XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

* Título: Síntese de composto fenólico e sua transesterificação com triacilglicerol de cadeia

* Tipo: POSTER

* Tema: BIOTECNOLOGIA, BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

* Nome do Apresentador: VIVIAN FEDDERN

* Quantidade de Autores: 5

* Autor 1:

- * Nome: VIVIAN FEDDERN
- * E-mail: VFEDDERN@YAHOO.COM.BR
- * Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

* Autor 2:

- * Nome: Leonor Almeida de Souza Soares
- * E-mail: leonor.souzasoares@gmail.com
- * Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

* Autor 3:

- * Nome: Eliana Badiale Furlong
- * E-mail: bafu@vetorial.net
- * Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

* Autor 4:

- * Nome: Zhiyong Yang
- * E-mail: yang@mb.au.dk
- * Instituição: University of Aarhus

* Autor 5:

- * Nome: Xuebing Xu
- * E-mail: xu@mb.au.dk
- * Instituição: University of Aarhus

* Quantidade de Palavras Chaves: 6

* Palavra Chave 1: dihidrocafeato de octila

* Palavra Chave 2: tricaprilina

* Palavra Chave 3: TCM

* Palavra Chave 4: Novozym 435

* Palavra Chave 5: lipase

* Palavra Chave 6: DHCA

* Resumo: MÁXIMO DE 2800 CARACTERES CONTANDO COM ESPAÇOS!
Caracteres restantes **2800**

O ácido dihidrocafeico (DHCA) é um metabólito do ácido cafeico com propriedades antioxidantes, além de ser capaz de proteger as células da pele quando exposta à radiação ultravioleta. Baseado nisso, o objetivo do presente trabalho foi produzir éster fenólico a partir do DHCA, além de realizar reações de transesterificação deste éster com tricaprilina, um triacilglicerol de cadeia média. A reação de esterificação foi realizada em duas relações molares com base nos reagentes DHCA e octanol (1:1 e 1:3), enquanto que as reações de transesterificação foram realizadas em quatro relações molares (1:1, 1:2, 1:5 e 1:10) entre o éster produzido e a tricaprilina. Para avaliar a reação de transesterificação, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) variando a quantidade de enzima (1,6% a 18,4%), tempo de reação (9,9 a 35,1 h) e temperatura (43 a 77 °C), utilizando-se três fatores e cinco níveis sobre a resposta (%) dos reagentes dihidrocafeato de octila e tricaprilina consumidos. A lipase Novozym® 435 de Candida antarctica foi utilizada como catalisador de todas reações em um sistema de terc-butanol. Foi verificado que a maior produção de éster (50%) ocorreu em oito dias. Nas reações de transesterificação, a relação molar em que houve maior consumo do éster produzido foram 1:5 em que foi obtido 21,1% de residual de dihidrocafeato de octila em 24 h. Foi verificado que em temperaturas próximas a 70 °C e tempo superior a 26 h, o consumo de dihidrocafeato de octila foi maior (18,2%). Foram identificados três diferentes compostos fenólicos, contendo em sua estrutura dihidrocafeato de octila e ácido caprílico.

Palavras-chave: dihidrocafeato de octila, tricaprilina, TCM, Novozym 435, lipase, DHCA

* Comentários dos Autores:





* Campos Obrigatórios

APÊNDICE VI – ARTIGO NAS NORMAS DA EUROPEAN JOURNAL OF LIPID
SCIENCE AND TECHNOLOGY

European Journal of Lipid Science and Technology



European Journal of
Lipid Science and Technology

**Physico-chemical composition, fractionated glycerides and
fatty acid profile of chicken skin fat**

Journal:	<i>European Journal of Lipid Science and Technology</i>
Manuscript ID:	ejlt.201000072.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Feddem, Vivian; FURG, School of Chemistry and Food Kupski, Larine Cipolatti, Eliane Giacobbo, Gregory Mendes, Gabriela Badiale-Furlong, Eliana Souza-Soares, Leonor
Keywords:	DAG, TAG, MAG
Additional Keywords (select from list):	Lipid oxidation, Chemical composition, Chicken fat, Fatty acid profile, Iodine value

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Physico-chemical composition, fractionated glycerides and**
4 **fatty acid profile of chicken skin fat**
5
6
7

8 Vivian Feddern, Larine Kupski, Eliane P. Cipotatti, Gregory Giacobbo, Gabriela L. Mendes, Eliana
9 Badiak-Furlong and Leonor A. de Souza-Soares
10

11
12
13 **Chicken Skin Fat Composition**
14
15

16 School of Chemistry and Food, Laboratory of Food Science, Federal University of Rio Grande
17 (FURG), Rio Grande, RS, Brazil.
18
19

20
21
22 **Correspondence:** Vivian Feddern, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Ciência de
23 Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua Eng. Alfredo Huch 475 – Pav. 6 –
24 96201-900 – Rio Grande, RS, Brazil.
25

26
27 **Fax:** + 55 53 32338745
28

29 **Email:** vfeddern@yahoo.com.br
30
31

32
33 **Keywords:** Gaseous chromatography / Chicken skin fat / MUFA / p-anisidine / TBA
34
35

36 **Abbreviations:** AI, atherogenic index; CSE, chicken skin fat; FFA, free fatty acids; HH, Σ
37 hypocholesterolemic / Σ hypercholesterolemic; SFA, saturated fatty acids; sn, stereospecific
38 number; TBA, thiobarbituric acid; TI, Thrombogenic index
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Summary

Skin is one of the several co-products of chicken meat industries, considered as waste, being rarely utilized or underutilized. Brazil is the world leader in chicken exports (3.6 million tons) and the third largest producer with 10.9 million tons, from which 440000 ton/year are residues. Therefore, this work aimed at characterizing chicken skin fat (CSF), comparing it with soybean oil, a well-known and abundant compound, evaluating the physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile, searching for CSF use in interesterification reactions. For that, determination of peroxide, thiobarbituric acid, p-anisidine, iodine, saponification, acidity, unsaponified matter and refraction indexes were accomplished, besides the glycerides fractionation, followed by FAME derivatization and identification by GC. The nutritional quality indexes were calculated from the lipid profile. GPF showed satisfactory quality due to low acidity (0.65 g oleic acid.100 g⁻¹), peroxide (2.14 meq.kg⁻¹), p-anisidine (0.70 absorbance units.g⁻¹) values, besides presenting high proportion of MUFA (40%). However, due to CSF low hypocholesterolemic/hypercholesterolemic value (HH=2.72), it may be difficult to use it for nutritional purposes the way it's found, once it tends to increase cholesterol. Thus it's a promising residue for different purposes like interesterification reactions and biodiesel production.

Practical applications

The practical application is the use of low cost lipids, like fat residues (chicken skin) for different purposes (e.g. feed or interesterification reactions including production of biodiesel, among others).

1 Introduction

Brazil is the world leader in chicken exports (3.6 million tons) and the third largest producer (10.9 million tons), being overcome by the United States (16.6 million of tons) and China (11.9 million tons), occupying 15% of the world market in the production of chicken meat [1]. Considering the total national production, about 440000 ton/year of residues are being generated, for this reason it becomes necessary to reutilize these residues, which are also rich in lipids and proteins.

Chicken skin is one of the several co-products of chicken meat industries which is considered as a residue, not-utilized or underutilized, being in a proportion of 4% in relation to the

weight of an alive animal. Due to this high amount, it generates additional costs of elimination and problems to the environment, besides the loss of a product with nutritional potential [2].

Poultry products have a growing market, since they are not forbidden by any religion, so chicken fat can be incorporated into refined products [3] presenting substantial nutritional value, due to the different composition of fatty acids compared with other unsaturated fats of animal origin [4], attracting more consumers. According to Chiu *et al* [5], because chicken fat is liquid or semi-liquid at room temperature, it can be used for various purposes, such as in condiments, cakes and chips. It also can be used to improve the consistency of creams.

Rodrigues *et al.* [6] suggested the employment of abdominal chicken fat as raw material for biodiesel production. Gomes [7] studied the potential for oil production from poultry wastes and estimated that approximately 20,400 tons of oil and 19,500 tons of biodiesel can be produced annually by five cooperatives of Parana state, Brazil.

Sheu and Shen [8] reported that different cuts of chicken (adipose tissue, skin and flesh) showed no significant difference ($P < 0.05$) for any fatty acid. An average of 43% oleic acid (the most abundant fatty acid), 27% palmitic and 14% linoleic was found. Other authors also reported a similar composition [5, 9-11]. Oleic fatty acid is associated with reduced risk of cardiovascular diseases by lowering blood cholesterol levels in non-hypertriglyceridemic individuals [12].

Compared to other sources of animal fat, chicken has the highest amount of unsaturated fatty acids (65-68%) [4, 8, 11]. Mottram *et al* [4] found that the distribution of fatty acids in the sn-2 position of chicken fat TAG indicates that it has the lowest content of C16:0 (9.4%) compared to beef (11.6%), sheep (20.8%) and porcine fat (54.8%). Furthermore, chicken fat has high contents of C18:1 (40.5%), C18:2 (29.4%) and C18:3 (4.1%) in this same position (sn-2) compared to other animal fats. According to Brockerhoff *et al* [13], the presence of 80% unsaturated and 20% saturated fatty acids (SFA) in the sn-2 position of chicken fat TAG, turns it more nutritious and physiologically available.

Chiu *et al* [5] studied the mixture of chicken fat and medium chain TAG, noting that the structured lipids presented a balanced composition containing both medium chain monounsaturated and EFA, besides the formation of new TAG, nonexistent in the original sample. Lee and Foglia [11] interesterified chicken fat and medium-chain fatty acids (caprylic) with 1,3 specific lipase from papaya latex for the production of functional structured lipids containing monounsaturated and medium chain fatty acids with different physical properties (melting point) and chemical properties of chicken fat used as substrate.

The high production of residues by the poultry industry and the potential of chicken skin fat (CSF) in different applications, considering the lack of CSF full characterization motivated this

1
2
3 study. The objective of this work was to evaluate the physico-chemical composition as well as the
4 fatty acid profile and fractionated glycerides of CSF compared to a well known (soybean) oil,
5 looking forward to CSF employment in interesterification reactions.
6
7
8

9 2 Material and methods

10 2.1 Sample

11 The soybean oil sample was acquired at the local market, while chicken skins were donated
12 by the Laboratory of Food Technology of the Federal University of Rio Grande (FURG), acquired
13 from a chicken meat industry. The experiments were accomplished at the Laboratory of Food
14 Science in the same University.
15
16
17
18
19

20 2.2 Lipid extraction

21 Chicken skin fat was extracted by two different methods to verify its yield in the extraction,
22 the first one followed the official method number 965.33 [14] and the second one followed Bligh
23 and Dyer [15] with modifications [16, 17]
24
25
26
27
28
29

30 2.3 Physico-chemical characterization

31 2.3.1 Peroxide index

32 According to method number 965.33 [14], 5 g of oil were weighed into a 250 mL
33 erlenmeyer, then added 30 mL of acetic acid-chloroform solution (3:2) and 0.5 mL of potassium
34 iodate saturated solution. The flask was maintained in rest for 1 min, and after that 30 mL of
35 distilled water and 1 mL of 1% indicative starch solution were added. The mixture was titrated with
36 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ standardized with potassium dichromate until the blue color disappeared. A sample
37 in white was led and the results were expressed in meq.kg^{-1} .
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 2.3.2 Iodine index

49 An amount of 0.2 g of oil was weighed, added by 20 mL chloroform and 25 mL of Wijs
50 solution. The mixture was shaken and soon placed in the absence of light for 30 min at 25 °C. Soon
51 after, a solution of 15% KI, 100 mL of distilled water and 1 mL of the indicative starch solution
52 (1%) were added. The mixture was then titrated with standardized 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution
53 according to method number 993.20 [14].
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.3.3 Saponification index

Oil sample and 0.5 N KOH alcoholic solution (1:10_{w/v}) were refluxed for 1 h. After this time, 1 mL of 1% phenolphthalein indicator was added and the mixture was titrated with 0.5 N HCl standardized solution following standard method number 920.160 [14].

2.3.4 Acidity index

The free fatty acids (FFA) presented in the samples were dissolved (1:10_{w/v}) in alcohol: ether (1:2) and titrated with a 0.01 N NaOH standardized solution. The results were expressed in grams of oleic acid per 100 g of sample according to the method 940.28 [14].

2.3.5 Refraction index

The refraction index was determined in an ABBE refractometer at 20 °C, according to official method number 921.08 [14]. The values read were later corrected for the temperature of 40 °C through calculation, according to Equation (1), where IR = refraction index; IR' = refraction index at the temperature in which the reading was accomplished; T = standard temperature (°C); T' = Temperature in which the index reading was accomplished (°C); K = constant (0.000385).

$$IR = IR' + K(T' - T) \quad (1)$$

2.3.6 Unsaponified matter

The oil sample (1:10_{w/v}) was saponified with 50%_{w/v} KOH aqueous solution. The unsaponified matter was extracted from this aqueous solution, which contains fatty acid salts, with ethyl ether, three times. The residue was determined after ethyl ether evaporation at 75 °C, until constant weight, according to method Ca 6a-40 [18].

2.3.7 TBA (2-thiobarbituric acid) value

For TBA determination, 5 g of sample were weighed, and then 30 mL of 7.5% trichloroacetic acid (TCA) was added. The solution was filtrated and aliquots of 5 mL from the filtrate were transferred into tubes together with 5 mL of 0.02 M TBA. A blank sample was conducted with 5 mL of TBA and 5 mL of 7.5% TCA. All tubes were submitted to a water-bath at 100 °C for 40 min. After that the samples were read in an UV-visible spectrophotometer (Varian Cary 100 conc, Palo Alto, CA, USA) at 538nm. For malonaldehyde determination formed through the reaction with TBA, an analytic curve was used with 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMP) standard at the concentration of $1 \cdot 10^{-9}$ to $7 \cdot 10^{-9}$ mol·mL⁻¹ ($y = 1 \cdot 10^8 x$; $R^2 = 0.9995$) [19].

2.3.8 Determination of p-anisidine value

The determination of p-anisidine value followed AOCS [18]. Accurate weigh of oil (1 g) was dissolved in 25 mL and measured in a 1 cm cuvette, at 350 nm by using UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 100 conc, Palo Alto, CA, USA). This solution (5 mL) was mixed with 1 mL of 0.25% (w/v) p-anisidine in acetic acid for 10 min. The absorbance was read at 350 nm. Equation 2 shows p-anisidine value calculation, where A_1 = absorbance before adding p-anisidine, A_2 = absorbance after adding p-anisidine and W = weight of sample (g).

$$\text{p-anisidine value} = 25 \times \left(\frac{1.2 \times A_2 \times A_1}{W} \right) \quad (2)$$

2.3.9 Glycerides fractionation

The method used was adapted from official method number 965.35 [14], in which 2 g of oil were dissolved in 15 mL of chloroform eluted in column (60 cm height x 2.5 cm of diameter) containing 15 g of silica gel 60 (Vetec) dissolved in 30 mL chloroform. The solvents were used in the following order and the fractionated samples were collected in flat-bottom flasks:

- TAG were eluted with 100 mL of benzene;
- DAG were eluted with 100 mL of benzene and ethyl ether (9:1);
- MAG were eluted with 100 mL of ethyl ether.

The solvents were evaporated in a water bath rotaevaporator at the boiling temperature of each solvent. After that, the residual solvent was evaporated at 90 °C for 30 min.

2.4 Lipids esterification and fatty acid profile

The fatty acids were eluted from the column, and 1 g of soybean oil or CSF was derivatized to obtain FAME, according to adaptation of the Metcalfe *et al.* [20] method, by addition of 5 mL of a 0.5 N KOH methanolic solution, under reflux during 15 min. After cooling, 7.5 mL of methanolic BF_3 solution (20%) and 7.5 mL of methanol were added and the mixture refluxed for 7 min. After that, the mixture was transferred to separation funnel, where 10 mL of petroleum ether and 15 mL of saturated saline solution were added. The upper layer was separated and the lower phase was twice extracted only with petroleum ether. Afterward, the three combinations of the upper phase (ether) were washed with 15 mL of distilled water. The aqueous phase was discarded and the organic phase was filtered in glass syringes containing glass wool and anhydrous sodium sulfate desolventized by rotaevaporator and dried at 70 °C. The esterified fraction was transferred to dark flasks and then the residual solvent was evaporated under nitrogen stream for 5 min.

FAME were separated by gaseous chromatography, in which 1 μ L of the esterified residue was resuspended in 1 mL hexane p.a., being injected into the chromatograph (Varian Star Chromatograph 3400CX, Palo Alto, CA, USA), equipped with split/splitless injector and FID detector. The separation occurred in polyethyleneglycol capillary column (ZB-WAX 30 x 0.32 mm) and film thickness of 0.25 μ m (Zebron, USA). The temperature of the column was programmed to vary between 40 and 230 $^{\circ}$ C for 6 $^{\circ}$ C.min⁻¹ in each one of the three steps. The first consisted of elevating the temperature from 40 to 100 $^{\circ}$ C (holding during 1 min), the second from 100 to 160 $^{\circ}$ C (during 5 min) and the last from 160 to 230 $^{\circ}$ C, for 10 min. The injector and detector temperatures were 250 $^{\circ}$ C and 300 $^{\circ}$ C, respectively, being hydrogen the carrier gas at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹.

The peaks identification was determined by comparing the fatty acid retention times of the samples with the standard ones (Sigma-Supelco 18919) and the quantification was made by normalization of peak areas. The results were presented as percentage of each fatty acid identified in the lipid fraction.

2.4.1 Nutritional quality indexes of lipids

The nutritional quality of lipid fraction was evaluated by three indexes (Equations 3-5) from the fatty acid composition data, through the calculations proposed by Ulbricht and Southgate [21], namely Atherogenic index (AI) and Thrombogenic index (TI) and ratio of hypocholesterolemic and hypercholesterolemic fatty acids (HH), according to Santos-Silva *et al* [22].

$$AI = \frac{C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0}{\sum MUFA + \sum \omega 6 + \sum \omega 3} \quad (3)$$

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{(0.5 \times \sum MUFA) + (0.5 \times \sum \omega 6) + (3 \times \sum \omega 3) + (\sum \omega 3 / \sum \omega 6)} \quad (4)$$

$$HH = \frac{C18:1cis9 + C18:2\omega 6 + C20:4\omega 6 + C18:3\omega 3 + C20:5\omega 3 + C22:5\omega 3 + C22:6\omega 3}{C14:0 + 16:0} \quad (5)$$

3 Results and discussion

The yield found for lipid extraction in chicken skin through Soxhlet official method [14] was only 14% comparing to 30%, obtained by Bligh and Dyer [15] with modifications [16, 17]. According to Brum *et al* [23], the low yields obtained by Soxhlet method can be attributed to the solvent reflux for many hours, which propitiates hydrolysis and peroxidation reactions, compromising the yield and subsequent analytic evaluations. Besides, the unpolar solvent employed doesn't interact efficiently in the water/lipid interface of the animal skin. For further determinations, Bligh and Dyer method with the abovementioned modifications was used, because besides

1
2 extracting approximately twice more from the skin fat, it avoids the alterations caused by thermal
3 treatment foreseen in the hydrolytic methods or thermal extraction by Soxhlet system.
4

5
6 Brum *et al* [23] studied various methods of lipid extraction from chicken breast fat (moisture
7 = 73.8%) and reported that the best method was Bligh and Dyer [15], modified by Christie [16] and
8 Smedes and Thomasen [17]. According to these authors, the use of a single solvent is not
9 recommended for the extraction of lipids from animal tissues, but the mixture of solvents should be
10 sufficiently polar to extract the fatty matter of the tissues from their association with cell
11 membranes or lipoproteins, without chemical reaction occurrence. Souza *et al* [24] found 26.5% of
12 CSF extracted by Bligh and Dyer [15] method, similar to the value found in this study.
13
14

15
16 Table 1 shows the results of the physico-chemical composition of soybean oil (used as
17 reference in the present work) and CSF, as well as the range values predetermined by Brazilian
18 legislation and literature.
19

20
21 All the accomplished determinations, except iodine index (II) showed that the values found
22 were similar or close to those established in the literature [9, 25]. Low II can be attributed due to the
23 fact that commercial oil used in this work can be derived from genetically modified soya and the
24 patterns of legislation do not take this into account. Some oils have low linolenic fatty acid content
25 in order to decrease lipid oxidation, presenting higher stability than conventional oils [26, 27].
26
27

28
29 Low II of 82 and 98.8 were found for oils high in oleic and stearic acids, respectively [26].
30 Because II reflects the unsaturation degree of the lipid fraction, it was lower for soybean oil i.e. the
31 lower the unsaturation number, the lower the II. This may be reflected in the refraction index value,
32 which was slightly lower for this oil.
33

34
35 For CSF, II was twice higher than in the mammals fat (Table 1), being close to the values of
36 78.5 and 76 g I₂/100 g⁻¹ found by Luddy [28] and Chiu *et al.* [5], respectively, for chicken adipose
37 tissue. Tavares *et al.* [29] found II and refraction index at 40 °C for soybean oil of 129.2 I₂/100 g⁻¹
38 and 1.467 respectively. The refraction index of oils and fats can be used as an identity data and it
39 tends to increase with carbonic chain increase and unsaturation degree of the fatty acids.
40

41
42 Peroxide, TBA and p-anisidine values indicate the good quality of the samples suggesting
43 that they were stored in satisfactory conditions and were not oxidized. According to Jorge and
44 Janieri [30], several factors can affect the TBA reaction, such as the oil type, package form and
45 storage, besides the applied technique and the presence of substances that reduce oxidation.
46
47

48
49 In relation to acidity index, as the soybean oil was refined, it should present low amount of
50 FFA, once that in the refine process they should be removed [31]. For CSF, the acidity value was
51 also low and within the range reported in the literature (Table 1). The acidity and peroxide indexes
52 indicate the hydrolytic and oxidative rancidity respectively, being these values in the analyzed
53
54
55
56
57
58
59
60

sample within the range stipulated by the literature for chicken fat, beef tallow and pig fat [9]. The peroxide index is below the value found by Ferrari and Kotler [10] for chicken fat, which was 2.8 meq.kg⁻¹. These authors mentioned that values up to 5 meq.kg⁻¹ of this index indicate that unpleasant sensorial characteristics of fat are already perceptible to the palate, however when the index reaches values of 10 meq.kg⁻¹, the product is already completely in rancification process, being inappropriate for consumption.

There are pigments and steroids in the unsaponified fraction and in CSF this fraction went up to 6 times higher than allowed for chicken oil [9], suggesting the need to explore its components.

Oils are constituted of about 96% TAG, 2% phospholipids, 1.6% of unsaponified and 0.5% of FFA [31]. Soybean oil and CSF fractionation in the chromatographic column, presented respectively 0.8% and 1.5% MAG, 4.6% and 1.0% DAG, 94.6% and 97.4% TAG. These percentages were taken into account for the calculation of TAG, DAG and MAG lipid profiles, presented in Table 2 and 3. The predominant fatty acids in soybean oil and its fractions were linoleic (C18:2), oleic (C18:1), palmitic (C16:0) and linolenic (C18:3) acids, respectively. In MAG and DAG the same fatty acids prevailed, however in smaller proportions, once the amount of these lipids was very low.

The profile found was within the range reported in the literature [25, 29, 32] according to Table 2, where it was noticed the high content of PUFA, around 60%, mainly of the ω 6 type (54%), followed by monounsaturated and saturated ones.

The ω 6/ ω 3 ratio has been calculated to remember the need for a balance between the two families that metabolically originate eicosanoids, to avoid a "proinflammatory status" on one hand and an "immunodeficient status" on the other hand. The recommendations vary according to the country, while Germany and Sweden have been establishing a proportion of 5:1, England demands maximum 4, being Japan the most rigorous country, establishing a ratio of 2:1. FAO is less demanding establishing an ingestion of ω 6/ ω 3 at a ratio of 5-10:1 [32], close to the value found in the present work (10.7).

Table 3 shows the lipid profile of CSF and its fractions. The main fatty acids found in CSF were oleic, linoleic and palmitic, and there was a predominance of MUFA, around 40%. The total of unsaturated was 70% approximately, which is in agreement with other authors who studied chicken fat [5, 8, 11].

Compared to other sources of animal fat, chicken presents the highest amount of unsaturated fatty acids (65-68%) being 45-50% monounsaturated [4, 8, 11] while lard contains 52-55% unsaturated [9, 33, 34] and beef tallow, 44-45% [9, 35], from which 30-40% are MUFA.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Mottram *et al* [4] when comparing the fatty acid composition of animal origin, observed that chicken fat has a substantially higher proportion of unsaturated fatty acids (65%) than sheep (37%) and beef (33%) and a lower proportion of stearic acid (10%) when compared to bovine fat (31%), sheep (32%) or lard (14%).

Sheu and Chen [8] observed that there was no significant difference among the lipid profile of the skin, adipose tissue and meat (Table 4). This can be an indicative that skin is a valuable residue that is being lost or under-utilized. CSF would be interesting in interesterification reactions, as well as for biodiesel production, among others, minimizing deposition of these residues in nature.

According to Brockerhoff *et al.* [13], the sn-2 position of TAG in chicken fat is composed by 80% of unsaturated and 20% of SFA. Usually the acyl groups located in the sn-2 position of TAG are considered as being more nutritionally and physiologically available than if the same groups were in the sn-1,3 position of TAG. Thus, interesterification reactions catalyzed by 1,3 specific lipases would be viable, once they would preserve the sn-2 position and alter the fatty acids in other positions.

Table 5 shows the nutritional quality indexes of lipids. Ulbricht and Southgate [21] suggested that the atherogenic or hyperlipidemic SFA are lauric (C12:0) myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids, while the thrombogenic fatty acids are myristic, palmitic and stearic (C18:0) acids. The long-chain unsaturated ω 6 (linoleic) and ω 3 (linolenic) fatty acids are thought to be anti-atherogenic and anti-thrombogenic. Therefore these indexes can indicate if a food is suitable for the prevention of human cardiovascular disease and should be low in the diet. On the other hand, the HH index is related more specifically to cholesterol metabolism, thus by the nutritional point of view, the higher the value the better.

It was observed that CSF showed HH index about four times lower and IT and IA about four times higher when compared to soybean oil. This fact indicates that, from a nutritional standpoint, CSF (HH = 2.72) is more likely to raise cholesterol than soybean oil, since it has a high amount of SFA, mainly palmitic (23.5%), decreasing HH index. Also, fat has more pro-thrombogenic and atherogenic (saturated C16 and C18) fatty acids than soybean oil. Thus, CSF will hardly find nutritional application in the manner is presented, being necessary a modification to adapt it to another application.

However, when the HH content found in this study for CSF is compared with other animal sources such as fish oil, the latter showed lower values (<1.8) [36, 37]. Bentes *et al.* [36] evaluated three different species of fish, and the indices studied did not differ between these species (HH=0.96). The low values were due to the high content of C16:0 found in these fish (28.5%), which was the predominant fatty acid. Ramos-Filho *et al* [37] found values slightly higher (1.6 to

1.8) of HH for four different species of fish. In some species oleic acid prevailed while in others palmitic acid was the main fatty acid.

The more hypercholesterolemic or atherogenic SFA in potential order comprise myristic acid (C14:0), palmitic (C16:0) and lauric (C12:0). Palmitic is the most often hypercholesterolemic SFA found. However, the substitution of SFA by MUFA decreases the level of serum cholesterol and LDL, and TAG indices will be similar to PUFA ones. Oleic acid, a component of the Mediterranean diet showed anti-inflammatory effects [38].

Ramos-Filho *et al* [37] determined AI and TI indices for four species of fish, obtaining values of respectively 0.54 and 0.59 for cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), 0.49 and 0.33 for pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), 0.86 and 1.16 for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and 0.70 and 0.35 for dourado (*Golden dorado*). Bentes *et al* [36] found an average of 0.69 for AI and 0.33 for TI. The values reported by both authors are close to those observed in this study for CSF.

According to the abovementioned results, the use of CSF becomes viable for other applications, such as CSF interesterification with other fatty acids of interest for functional lipid production [39]. Another potential application is to use residues to produce biodiesel. According to Gomes [7] during poultry slaughter, blood, feathers, viscera, bones, residues and tailings are discarded. From poultry weight 30% is waste, from which 11.3% are constituted by fat. The same author studied the potential of five cooperatives in the state of Parana, Brazil, to produce oil and biodiesel from viscera, estimating an annual production of approximately 20,400 tons of oil and 19,500 tons of biodiesel. According to Arnaud *et al* [3], chicken fat can be incorporated into refined products (delicatessen), with substantial nutritional value, plus there is a growing market for poultry products, since these are not forbidden by any religion.

Structured lipids from animal fats rather used have been obtained by interesterification reactions between lard and soybean oil [33, 34, 40] as an alternative to obtain human milk substitutes. It has also been reported acidolysis between chicken fat and medium-chain fatty acids (caprylic) for production of structured lipids containing functional monounsaturated and medium chain fatty acids with different physical properties (melting point) and chemical properties of chicken fat used as substrate [11].

4 Conclusions

The use of CSF showed low rates of lipid oxidation (IP = 2.14 meq.kg⁻¹, p-anisidine = 0.70 absorbance units) and high amount of unsaturated fatty acids as oleic (34.8%) and linoleic (28.3%). Long-chain SFA as palmitic (23.5%), the most abundant one, may be replaced by another type of fatty acid so that CSF may be suitable for different applications such as production of functional

1
2
3 lipids by interesterification or biodiesel. Furthermore, the use of CSF may minimize deposition of
4 residues on the environment.
5
6
7

8 Acknowledgements

9 The authors would like to thank CAPES due to financial support.
10
11

12 Conflict of interest statement

13 The authors have declared no conflict of interest.
14
15
16
17

18 References

- 19
20
21
22 [1] ABEP: Brazilian Association of Chicken Producers and Exporters. *Statistics*. Available online
23 at: <<http://www.abef.com.br/>>. Last accessed: Nov. 2009.
24
25 [2] H. W. Ockerman, C. L. Hansen: *Industrialization of animal by-products*. Editorial Acribia
26 S.A., Zaragoza, (España) 1994.
27
28 [3] E. Arnaud, P. Retkin, M. Pina, A. Collignan: Characterization of chicken fat dry fractionation
29 at the pilot scale. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2004, **106** (9), 591-598.
30
31 [4] H. R. Mottram, Z. M. Crossman, R. P. Evershed: Regiospecific characterisation of the
32 triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric
33 pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2001, **126**, 1018-1024.
34
35 [5] M. C. Chiu, L. A. Gioielli, R. Grimaldi: Structured lipids from chicken fat, its stearin and
36 medium chain triacylglycerol blends. I - Fatty acid and triacylglycerol compositions. *Quim*
37 *Nova* 2008, **31** (2), 232-237.
38
39 [6] K. F. Rodrigues, A.C. Fraga, P. C. Neto, J. A. S. Maciel, O. C. Lopes: Capability of chicken
40 fat to produce biodiesel. Biodiesel: the new fuel of Brazil. In: *Congress of the Brazilian*
41 *Biodiesel Technology*. ABIPTI, Brasília. 2005, pp.129-132.
42
43 [7] L. F. S. Gomes: M. D. Dissertation, State University of West Paraná, Cascavel (Brazil) 2005.
44
45 [8] K. S. Sheu, T. C. Chen: Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained
46 from five rendering methods. *J Food Eng.* 2002, **55** (3), 263-269.
47
48 [9] C. Bellaver, D. L. Zanotto: *Quality parameters in fat and protein products of animal origin*.
49 Apinco Conference, Santos, SP. In: *Apinco Conference of Poultry Science and Technology*.
50 FACTA, Campinas, SP (Brazil) 2004, pp. 79-102. v. 1.
51
52 [10] R. A. Ferrari, F. R. Kottler: The fractioning of chicken fat. *Publ UEPG Exact Earth Sci Agr*
53 *Sci Eng.* 2001, **7** (1), 43-51.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [11] K.-T. Lee, T. A. Foglia: Synthesis, purification, and characterization of structured lipids
4 produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc.* 2000, **77** (10), 1027-1034.
- 5
6 [12] E. Lopez-Huertas: Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and
7 DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res.* 2010, **61** (3), 200-
8 207.
- 9
10 [13] H. Brockerhoff, R. J. Hoyte, N. Wolmark: Positional distribution of fatty acids in triglycerides
11 of animal depot fats. *Biochim Biophys Acta.* 1966, **116** (1), 67-72.
- 12
13 [14] AOAC: *Official Methods of Analysis of AOAC International.* AOAC International, Arlington,
14 VA (USA) 1995. 16th ed.
- 15
16 [15] E. G. Bligh, W. J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J*
17 *Biochem and Physiol.* 1959, **37** (8), 911-917.
- 18
19 [16] W. W. Christie: Lipid analysis. Oxford: Pergamon Press, 1982. cap.3, p. 25-49.
20 Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles.
- 21
22 [17] F. Smedes, T. K. Thomasen: Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Mar*
23 *Pollut Bull.* 1996, **32** (8/9), 681-688.
- 24
25 [18] AOCS: *Official Methods and Recommended Practices of AOCS.* AOCS Press, Champaign, IL,
26 (USA) 1997. 5th ed.
- 27
28 [19] Adolfo Lutz: *Analytical Standards of the Adolfo Lutz Institute. Chemical and Physical*
29 *Methods for Food Analysis.* 3rd Edn. São Paulo (Brazil) 1985.
- 30
31 [20] L. D. Metcalfe, A. A. Schmitz, J. R. Pelka: Rapid preparation of fatty acid esters from lipids
32 for gas chromatographic analysis. *Anal Chem.* 1966, **38**, 514-515.
- 33
34 [21] T. L. V. Ulbricht, D. A. T. Southgate: Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet.*
35 1991, **338** (8773), 985-992.
- 36
37 [22] J. Santos-Silva, R. J. B. Bessa, F. Santos-Silva: Effect of genotype, feeding system and
38 slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock*
39 *Prod Sci.* 2002, **77** (2/3), 187-194.
- 40
41 [23] A. A. S. Brum, L. F. Arruda, M. A. B. Regitano-D'Arce: Extraction methods and quality of
42 the lipid fraction of vegetable and animal samples. *Quím Nova.* 2009, **32** (4), 849-854.
- 43
44 [24] S. A. B. de Souza, M. Matsushita, N. E. de Souza: Protein, lipids and cholesterol in roasted
45 chicken. *Rev Unimar.* 1997, **19** (4), 1069-1073.
- 46
47 [25] ANVISA: Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance. *Technical Regulation for*
48 *Identity and Quality Fixation of Vegetable Oils and Fats.* RDC 482, from Sep. 23th. 1999.
- 49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [26] J. S. B. Costa: M. D. Dissertation, University of Porto (Portugal) 2008. Available online at <<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/20791/2/DISSERTAO.pdf>>. Last accessed: July 2010.
- [27] E. A. A. Sanibal, J. Mancini Filho. Physical, chemical and nutritional changes in oils submitted to frying process. Available online at <http://hygeia.fsp.usp.br/~eatorres/gradu/frituras.pdf>. Last accessed: July 2010.
- [28] F. E. Luddy, G. R. Fertsch, R. W. Riemenschneider. Glyceride composition of fats and oils determined by oxidation and crystallization methods. *J Am Oil Chem Soc.* 1954, **31**, 266-268.
- [29] M. Tavares, J. C. Barbério, E. S. G. Badolato, F. D. Maio, J. B. Carvalho: Gas-chromatographic identification and quantification of palm oil adulterants. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1989, **49** (2), 145-150.
- [30] N. Jorge, C. Janieri: Evaluation of soybean oil submitted to the frying process of varied food. *Cienc Agrotec.* 2005, **29** (5), 1001-1007.
- [31] FAO Agricultural Services Bulletins no. 97: *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans.* Available online at: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e02.htm>. Last accessed: July 2010.
- [32] V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier: Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2007, **109** (7), 710-732.
- [33] R. C. da Silva, L. A. Gioielli: Physical properties of structured lipids from lard and soybean oil. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006, **42** (2), 223-235.
- [34] T. Yang, X. Xu, C. He, L. Li.: Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chem.* 2003, **80**, 473-481.
- [35] A. C. Pinto, L. L. N. Guarieiro, M. J. C. Rezende, N. M. Ribeiro, E. A. Torres, W. A. Lopes, P. A. P. Pereira, J. B. Andrade: Biodiesel: an overview. *J Braz Chem Soc.* 2005, **16** (6b), 1313-1330.
- [36] A. S. Bentes, H. A. L. Souza, X. M. F. D. Mendonça, M. G. Simões: Physical and chemical characterization and lipid profile of three amazon fish species. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial.* 2009, **3** (2), 97-108.
- [37] M. M. Ramos Filho, M. L. L. Ramos, P. A. Hiane, E. M. T. Souza: Lipid profile of four species of fish from the pantanal region of Mato Grosso do Sul. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2008, **28** (2), 361-365.
- [38] L. K. Mahan, S. Escott-Stump: *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy.* 12th Edn. WB Saunders Company, Philadelphia (USA) 2007.
- [39] V. Feddern: Ph. D. Thesis, Federal University of Rio Grande, Rio Grande (Brazil) 2010.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [40] N.S. Nielsen, T. Yang, X. Xu, C. Jacobsen: Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chem.* 2006, **94**, 53-60.

For Peer Review

Table 1. Physico-chemical composition of soybean oil and chicken skin fat.

Analysis ^a	Soybean oil sample	Soybean oil ^b	CSF sample	Chicken oil ^c	Beef tallow ^d	Pig fat ^e
Saponification index [mg KOH.g ⁻¹]	188.43±0.87	189-195	216.5±2.12	190-196	190-202	190-194
Acidity index [g oleic acid.100 g ⁻¹]	0.00±0.00	Max. 0.3	0.65±0.13	Max. 2	Max. 2	Max. 1
Iodine index [g I ₂ .100g ⁻¹]	119.11±0.80	120-143	81±1.48	73-85	35-48	55-68
Peroxide index [meq.kg ⁻¹]	2.61±0.19	Max. 10	2.14±0.60	Max. 5	Max. 5	Max. 5
Refraction index [40 °C]	1.4526±0.00	1.466-1.470	1.47±0.00	-	1.46	-
TBA [μmoles.g ⁻¹]	ND	-	ND	-	-	-
p-anisidine value [absorbance units.g ⁻¹]	0.18±0.01	-	0.70±0.14	-	-	-
Unsaponified matter [g.100 g ⁻¹]	0.6±0.17	Max. 1.5	1.9±0.30	Max. 0.3	Max. 0.90	Max. 1

CSF, chicken skin fat; ND, not detected; Max., maximum

^a Means of triplicates± SD

^b ANVISA, 1999

^c Bellaver and Zanotto, 2004

^d Bellaver and Zanotto, 2004

^e Bellaver and Zanotto, 2004

Table 2. Lipid profile [%] of soybean oil and its fractionated glycerides.

Fatty acid	Common name	Soybean oil ^{††}	Soybean oil	TAG	DAG	MAG
C14:0	Myristic acid	0-0.1	0.10	0.08	0.01	0.003
C16:0	Palmitic acid	7.0-14.0	7.67	7.03	0.63	0.139
C16:1	Palmitoleic acid	0-0.2	0.10	0.10	0.00	0.009
C18:0	Stearic acid	1.4-5.5	2.39	2.27	0.18	0.052
C18:1 ω 9	Oleic acid	17.7-30.0	29.76	27.93	1.16	0.196
C18:2 ω 6 c	cis - linoleic acid	44.0-62.0	54.27	50.97	2.31	0.341
C18:2 ω 6 t	trans - linoleic acid	-	0.37	0.45	0.02	0.004
C18:3 ω 3	Linolenic acid	4.0-11.0	5.18	4.81	0.20	0.038
C20:0	Arachidic acid	0.1-0.7	0.26	0.22	0.02	0.004
	Eicosamonoenoic acid	0-0.3				
C20:1			0.51	0.45	0.04	0.008
C20:2	Eicosadienoic acid	-	tr	tr	tr	tr
C20:3	Eicosatrienoic acid	-	tr	tr	tr	tr
C20:5 ω 3	EPA	-	tr	tr	tr	tr
C22:0	Behenic acid	-	tr	tr	tr	tr
Σ Saturated		13.7-16.2	10.7	9.9	0.9	0.2
Σ MUFA		22.0-24.2	30.4	28.5	1.2	0.2
Σ PUFA		59.9-62.8	59.8	56.2	2.5	0.4
Σ ω 6		52.1-60.8	54.6	51.4	2.3	0.3
Σ ω 3		7.1-8.7	5.2	4.8	0.2	0.0
Relation ω 6 / ω 3		6.1-7.7	10.6	10.7	11.6	9.0

Means of triplicates (SD < 3%); tr = traces (<0.1%)

^{††} Dubois et al., 2007; ANVISA, 1999; Tavares et al., 1989.

Table 3. Lipid profile [%] of chicken skin fat and its fractionated glycerides.

Fatty acid	Common name	CSF	TAG	DAG	MAG
C14:0	Myristic acid	0.53	0.41	0.00	0.01
C16:0	Palmitic acid	23.52	21.17	0.18	0.30
C16:1	Palmitoleic acid	4.18	3.70	0.04	0.08
C18:0	Stearic acid	6.11	6.38	0.08	0.12
C18:1 ω 9	Oleic acid	34.78	34.88	0.37	0.44
C18:2 ω 6	Linoleic acid	28.23	28.18	0.29	0.45
C18:3 ω 3	Linolenic acid	2.37	2.44	0.02	0.05
Σ Saturated		30.2	28.0	0.3	0.4
Σ MUFA		39.0	38.6	0.4	0.5
Σ PUFA		30.6	30.6	0.3	0.5
Σ ω 6		28.2	28.2	0.3	0.4
Σ ω 3		2.4	2.4	0.0	0.0
Relation ω 6 / ω 3		11.9	11.6	11.9	9.7

Means of triplicates (SD < 3%), CSF, chicken skin fat

Table 4. Fatty acid profile of different chicken cuts according to the literature.

Fatty acid	Skin ^{**}	Adipose tissue ^{**}	Meat ^{***}	Oil ^{***}	Fat ^{***}	Adipose tissue ^{***}
C14:0	0.8	0.9	0.7	0.5	0.7	0.7
C14:1	-	-	-	-	0.3	-
C16:0	27.1	26.7	27.0	26.5	25.2	23.8
C16:1	8.0	7.5	6.6	-	7.8	7.3
C18:0	6.3	6.3	5.5	5.5	5.9	5.6
C18:1	42.5	43.7	44.4	43.5	40.5	40.5
C18:2	14.1	14.0	15.2	14.5	18.4	20.9
C18:3	0.5	0.4	0.4	0.8	0.7	1.0
C20:1	-	-	-	-	0.5	-

^{**} Shen & Chen (2002)^{**} Shen & Chen (2002)^{***} Shen & Chen (2002)^{***} Bellaver and Zanotto (2004), oil obtained from non-edible parts of slaughtered poultry, followed by pressing, decantation or filtration^{***} Lee and Foglia (2000), fat obtained from Tyson Foods (Springdale, AR)^{***} Ferrari and Koller (2001)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 5. Nutritional quality indexes of lipids.

Fatty acid	HH	TI	AI
Soybean oil	11.53	0.17	0.09
Chicken skin fat	2.72	0.74	0.37

HH, \sum hypocholesterolemic / \sum hypercholesterolemic;

TI, Thrombogenic index; AI, Atherogenic Index

For Peer Review

ANEXOS

1 **ANEXO I - ARTIGO EXTRA ELABORADO COM O GRUPO DE PESQUISA NA**
2 **DINAMARCA**

3
4
5 Enzymatic synthesis and optimisation of dihydrocaffoylated glycerides using octyl
6 dihydrocaffeate as an intermediate

7
8
9 Zhiyong Yang¹, Vivian Feddern², Marianne Glasius³, Zheng Guo¹, Xuebing Xu^{1*}

10
11
12 ¹ Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Gustav Wieds Vej 10, 8000
13 Aarhus C, Denmark

14
15
16 ² School of Chemistry and Food, Laboratory of Food Science, University of Rio Grande,
17 Alfredo Huch St. 475, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

18
19
20 ³ Department of Chemistry, University of Aarhus, Langelandsgade 140, 8000 Aarhus C,
21 Denmark

22
23
24 *Corresponding author: Xuebing Xu, Department of Molecular Biology, University of
25 Aarhus, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C, Denmark

26 Tel: +45-89425089, Fax: +45-86123178, Email: xu@mb.au.dk

27 **Abstract:**

28 Phenolic acids are known for their antioxidation property. However their function is limited
29 by their low solubility in hydrophobic environment. Enzymatic lipophilization represents an
30 alternative method to obtain the desired property. A novel reaction protocol was developed in
31 this work, among which octyl dihydrocaffeate was firstly enzymatic synthesized and then
32 employed as synthetic intermediate for further solvent-free transesterification with tricaprylin
33 to generate target dihydrocaffoylated glycerides. The results demonstrated that this novel
34 system has remarkable advantages over existing approaches, namely, high enzyme specific
35 activity (up to 9.57 $\mu\text{mol}/\text{min}/(\text{g Novozym 435})$) and high volumetric productivity (146.98
36 $\text{mol}/\text{L}/\text{h}/(\text{kg Novozym 435})$). Response surface methodology (RSM) was employed for
37 further reaction system optimization, with the outcome of an optimized condition:
38 temperature, 65.2 °C; reaction time 43.6 h; enzyme load 19.92% (on substrate base); substrate
39 molar ratio, 4.97 (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate ester). A validation reaction was conducted
40 with the recommended conditions accordingly, and 86% bioconversion of octyl
41 dihydrocaffeate and 78.03% yield of dihydrocaffoylated glycerides were achieved,
42 respectively.

43

44 **Keywords:** Phenolic acids; lipase; transesterification; octyl dihydrocaffeate; dihydrocaffeic
45 acid (DHCA); Response Surface Methodology (RSM)

46 **1. Introduction**

47 Phenolic acids are naturally occurring antioxidants, which are widely distributed in fruits,
48 vegetables, spices, and aromatic herbs (Figuroa-Espinoza and Villeneuve 2005). Phenolic
49 acids are not essential for short-term well-being, and they were treated as non-nutrient
50 physiologically active compounds to human being in a long term (Crozier et al. 2009).
51 Recently, interests on phenolic acids are growing because of their potential biological
52 properties, such as anticancer or anticarcinogenic/antimutagenic, antiatherosclerotic,
53 antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory activities to a greater or lesser extent (Huang et
54 al. 2010). Due to their hydrophilic property, phenolic acids have very low solubility in
55 hydrophobic media, which limits their application in oil based food processing and cosmetic
56 industries (Figuroa-Espinoza and Villeneuve 2005).

57 Structurally, enhancement of lipophilicity of phenolic acids could be carried through by
58 grafting or incorporating long-chain alkyl or acyl group etc hydrophobic moieties. There have
59 been several studies on the modification of phenolic acids through enzymatic esterification
60 with aliphatic alcohol or transesterification with triglyceride (Compton et al. 2000; Sabally et
61 al. 2005a; Sabally et al. 2005b; Compton et al. 2006; Laszlo and Compton 2006; Sabally et al.
62 2006a; Sabally et al. 2006b; Sabally et al. 2007). These modifications only improve the
63 lipophilic solubility of phenolic acids, but also result in new structured lipids with specific
64 properties for nutritional and pharmaceutical applications (Compton et al. 2000). However,
65 transesterification of phenolic acids with triglyceride is generally suffered from long reaction
66 time and low efficiency. According to previous reports (Guyot et al. 1997; Guyot et al. 2000;
67 Buisman et al. 1998; Stamatis et al. 1999; Stamatis et al. 2001), there are several key factors
68 governing reaction efficiency: molecular structure of phenolic acids, property of reaction
69 media and enzyme activity. The molecular structure of phenolic acids is critical not only
70 because it determines the solubility of a phenolic acid but also governs the reactive activity of

71 reactive group (e.g. $-\text{COOH}$, in DHCA) by electronic and/or steric hindrance effects
72 (Figueroa-Espinoza and Villeneuve 2005). However, the reaction medium also plays
73 important role in improving reaction rate and volumetric productivity by creating compatible
74 environment for both substrates and enzyme (Sabally et al. 2006a; Lue et al. 2005; Sabally et
75 al. 2006b; Stamatis et al. 2001).

76 In this work, we reported a two-step protocol for enzymatic synthesis of dihydrocaffoylated
77 glycerides. An intermediate product octyl dihydrocaffeate was firstly synthesized by lipase
78 catalyzed esterification of DHCA with octanol, and purified for next step use. Then, the end
79 products were generated in the second step through enzymatic transesterification between
80 octyl dihydrocaffeate and triglyceride. Establishment of this protocol is from the following
81 considerations: (1) Octyl dihydrocaffeate is supposed to have better compatibility with
82 glycerides than dihydrocaffeic acid or short-chain alcohol ester like ethyl dihydrocaffeate; (2)
83 Good mixing of octyl dihydrocaffeate and glycerides allows a solvent-free reaction to occur;
84 thus a faster reaction and a better productivity could be expected. More focus was centred on
85 transesterification of triglyceride with octyl dihydrocaffeate, and tricaprylin was used as a
86 model triglyceride. The effects of important parameters, like enzyme species, temperature
87 were preliminarily examined. Response surface methodology (RSM) was employed for
88 further reaction optimisation.

89 **2. Materials and Methods**

90 **2.1. Materials**

91 Dihydrocaffeic acid (DHCA, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl) propionic acid) and octanol (>99%)
92 were purchased from Sigma Aldrich Co. (Brøndby, Denmark). Tricaprylin was from (Sigma
93 Aldrich Co. >98%, St. Louis, MO, USA). Novozym 435 (*Candida Antarctica* lipase B),
94 Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) and Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*)

95 were obtained from Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). All other solvents were of
96 analytical or HPLC grades and procured from Fisher Scientific Inc. (Aarhus, Denmark).

97 **2.2. Preparing octyl dihydrocaffeate**

98 Octyl dihydrocaffeate was synthesized in large scale according to the method of Sabally et al.
99 with some modification (Sabally et al. 2005a). DHCA was firstly dissolved in butanone as
100 500 mM stock solution, and then was diluted by hexane with end volume ratio
101 hexane/butanone 65/35, (v/v) and final DHCA concentration was 50mM. Octanol was added
102 into the binary solvent mixture afterward at a concentration of 150 mM. Around 200 ml
103 substrate solution was added to a 500 ml flask and thermostated at 60 °C by waterbath with
104 magnetic stirring at 300 rpm. The reaction was initiated by adding 2 g Novozym 435 and 2 g
105 activated molecular sieves (3Å). The reaction was conducted for 7 days to reach maximal
106 bioconversion, and then the reaction was terminated through filtration for removing enzyme
107 and molecular sieves. The remaining hexane/butanone solvent mixture and unreacted octanol
108 were removed through vacuum evaporation at 70 °C. The product still contained some
109 unreacted DHCA after evaporation. The product was dissolved in 20 ml of hexane again and
110 diluted with equal volume of water (contain 0.5 M NaCl), the remaining DHCA was then
111 extracted into water phase. The hexane phase was washed with salt water for a few times to
112 remove of DHCA. Finally the hexane phase was collected and removed by vacuum
113 evaporation at 70 °C. The end product was found to be around 97% purity (contain 3% of
114 DHCA) according to the analysis by HPLC.

115 **2.3. Transesterification of Octyl Dihydrocaffeate with Tricaprylin**

116 Transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricapyrylin was conducted in a 100 ml
117 jacketed reactor and thermostated by circulated waterbath. For a typical reaction, 0.154 g of
118 octyl dihydrocaffeate (0.5 mmol) was mixed with 0.705 g of tricapyrylin (1 mmol).

119 Transesterification reaction was initiated by adding 10% of enzyme (on the basis of octyl
120 dihydrocaffeate) at 60 °C and stirred (300 rpm) by a magnetic plate. Sample aliquots from
121 reaction mixture were periodically withdrawn and diluted 100 times by methanol, then
122 subjected to HPLC analysis after centrifuged (12,000 rpm for 10 min) to remove solid
123 impurity.

124 To examine the effects of substrate form and solvent property and compare with above
125 solvent-free transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricaprylin, other two types of
126 reactions: solvent-free direct transesterification of DHCA with tricaprylin and hexane
127 mediated transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricaprylin were conducted under
128 other identical conditions, respectively. Namely, for the former system 0.5 mmol DHCA was
129 reacted with 1 mmol tricaprylin and for the latter system 0.5 mmol octyl dihydrocaffeate with
130 1 mmol tricaprylin in 10 ml hexane, with the same agitation rate, reaction temperature and
131 enzyme dosage as for the solvent-free transesterification of octyl dihydrocaffeate with
132 tricaprylin.

133 **2.4. HPLC Analysis**

134 The analysis of reaction mixture was performed on a RP C18-column (250×4.6 mm, 5 μm)
135 connected to a Survival Plus HPLC System (Thermo Scientific, Denmark). The Survival Plus
136 HPLC System is equipped with a LC pumper, an autosampler, and a PDA detector. Injection
137 of 10 μl sample was eluted by 90% of solvent A (methanol) and 10% of solvent B (water with
138 0.75% of acetic acid) for 16 min. The flow rate was 1 ml/min and the detection was set at 284
139 nm. The bioconversion of octyl dihydrocaffeate was calculated as $(1-M_t/M_0) \times 100\%$, where
140 M_0 and M_t represent the area percentage of octyl dihydrocaffeate on the basis of components
141 concerning dihydrocaffoyl moiety (including DHCA) at initial time of reaction and reaction
142 time t , respectively. And the yield of dihydrocaffoylated glycerides was calculated as M_i/M_{total}
143 $\times 100\%$, where M_i represents area of i kind of dihydrocaffoylated glyceride and M_{total}

144 represents total area of the components concerning dihydrocaffoyl moieties, respectively. The
145 enzyme activity was calculated from the slope, obtained by polynomial regression of the
146 initial part of the plot of bioconversion of octyl dihydrocaffate vs. reaction time. The unit of
147 enzymatic activity was defined as μmol of octyl dihydrocaffate consumed in 1 minute and
148 catalyzed by 1 g of immobilized lipase.

149 **2.5. HPLC-EIS-MS analysis**

150 HPLC-ESI-MS analyses were performed with an electrospray ionisation (ESI) coupled to a
151 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Bruker micrOTOF-Q, Bremen, Germany). The
152 column used and elution conditions for HPLC part were the same as in 2.4. Ionisation was
153 performed in the negative mode with an 8 L/min nitrogen flow, 0.8 bar nebuliser pressure and
154 a temperature of 190 °C. Scan range was from 50–1200 m/z.

155 **2.6. Optimization by Response Surface Methodology (RSM)**

156 Response Surface Methodology (RSM) was employed to optimize parameters of lipase-
157 catalyzed transesterification between octyl dihydrocaffate and tricaprylin. The software
158 Modde 8.0, Umetrics (Umeaa, Sweden) was used to design the reaction sets and fit the
159 experimental data. Four factors were chosen for investigation with three-level setting (Table
160 1): temperature (40, 55 and 60 °C), molar ratio of tricaprylin/octyl dihydrocaffate (1/1, 3/1,
161 5/1), reaction time (0.5, 24.25 and 48 h) and enzyme load (50, 150 and 250 mg). The 3 levels
162 of each parameter, in an increasing order, were coded as -1, 0 and 1, respectively. Central-
163 Composite-Face-centred (CCF) design combined with RSM was used to fit full second-order
164 polynomial model. Table 1 shows the individual factors (x_i), levels, and experimental design
165 in terms of coded and uncoded values.

166 **2.7. Statistical Analysis**

167 The mathematical relationship among variables with each response can be calculated by the
168 quadratic polynomial equation:

169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Where β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are regression coefficients (β_0 is a constant term, β_i is a liner effect term, β_{ii} is a squared effect term, and β_{ij} is an interaction effect term) and Y is the predicted response value.

3. Results and Discussion

3.1. Establishment of reaction protocol

Octyl dihydrocaffeate was firstly synthesized by using DHCA and octanol, and the ester product was purified by solvent extraction and concentrated by vacuum. HPLC analysis showed the purity of the ester product was 97% with minor unreacted DHCA. The ester product was then used for transesterification with tricaprylin for synthesis of dihydrocaffoylated glycerides. Scheme 1 showed the possible products from transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricaprylin. Figure 1A depicted the HPLC chromatograph of a typical reaction mixture of lipase-catalyzed transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricaprylin in a solvent-free system. Four major peaks were detected in the reaction mixture, and their structures were further indentified by HPLC ESI-MS analysis (Figure 1B). It was found that the first peak corresponded to products of mono- and di-DHCA glycerol (Compound D and E in Scheme 1) with mass of 255 and 419 ($[M-H]^-$) respectively. It was also found that fragment pattern of first peak contains some of DHCA (181, $[M-H]^-$) (Compound F in Scheme 1), which was in lower abundant than other two products identified at this position and it probably came from the added substrate which contains around 3% of DHCA. The second peak was identified to be di- and mono-DHCA monocaprylin (Compound B and C in Scheme 1) with mass of 545 and 381 ($[M-H]^-$), respectively. Analysis of the fragment pattern of the third peak indicates it is octyl dihydrocaffeate with mass of 293 ($[M-$

194 HJ]). Similarly, MS analysis of the last peak showed its structural patter corresponding to
195 mono-DHCA dicaprylin with mass of 507 ([M-H]) (Compound A in Scheme 1). Thus,
196 through HPLC and HPLC-MS analysis, the reaction protocol was established and the
197 structures of desired products were confirmed.

198 **3.2. Comparison of 3 different reaction systems**

199 To have an overview about the effectiveness of solvent-free transesterification of octyl
200 dihydrocaffeate with tricaprylin in other two systems, namely transesterification of octyl
201 dihydrocaffeate with tricaprylin in hexane and direct solvent-free transesterification of DHCA
202 with tricaprylin, were designed for comparison under similar reaction conditions (Figure 2). It
203 is evident that, in terms of conversion of phenolics, by direct transesterification with
204 tricaprylin DHCA only achieved 3.2% conversion after 72 h. In contrast, at 24 h the
205 conversion of octyl dihydrocaffeate reached around 60% and over 70% at 72 h in solvent-free
206 transesterification with tricaprylin. However, further dilution of octyl dihydrocaffeate-
207 tricaprylin by hexane did not result in any improvement, instead of deduction (14% at 24 h). It
208 has been well acknowledged that bad mixing (or low solubility of DHCA in tricaprylin) could
209 account for low reaction of DHCA with tricaprylin (Figure 2). The interesting thing is that
210 introducing hexane to octyl dihydrocaffeate-tricaprylin system generated negative effect,
211 contradicting to a possible benefit from solvent introduction – improving mass transfer. The
212 real reason is not clear, however, the results seem suggest that, compared to solvent-free
213 system, hexane-mediated system showed lower enzyme activity and didn't facilitate
214 bioconversion of octyl dihydrocaffeate as well.

215 To further quantify the efficiency of these three systems, we calculated the individual enzyme
216 specific activity based on an estimation of initial reaction rate (Table 2). Based on these data,
217 the enzyme activity (Novozym 435) of solvent-free octyl dihydrocaffeate-tricaprylin
218 transesterification system is over 4 times higher than the hexane-mediated system;

219 remarkably, 190 times higher than solvent-free DHCA-tricaprylin system. There is no exactly
220 the same system reported for comparison. Sabally et al. (Sabally et al. 2006a) reported lipase-
221 catalyzed transesterification of DHCA with trilinolein and trilinolein in hexane/2-butanone
222 (75:25, v/v), with the enzyme activity of around 0.5 $\mu\text{mol/g}$ solid enzyme/min. If we neglect
223 the difference between the two systems, within the protocol developed this work the enzyme
224 activity was >18 times higher than in hexane/2-butanone system. The reason accounting for
225 this could be ascribed to the significant difference of substrate concentrations between two
226 systems. The general concentration of DHCA in the system of Sabally et al. was at 10 mM
227 level (Sabally et al. 2006a), while the concentration of octyl dihydrocaffeate in the solvent-
228 free system added up to around 625 mM.

229 From commercial point of view, a considerable volumetric productivity is an important
230 criterion to evaluate a reaction protocol. As indicated in Table 2, the solvent-free octyl
231 dihydrocaffeate-tricaprylin transesterification system was superior to the other two systems in
232 terms of volumetric productivity (15 and 34 times higher respectively). It also can be
233 estimated that the system developed in this work is also much higher than that of hexane/2-
234 butanone (Sabally et al. 2006a).

235 **3.3. Reaction time course and effects of lipase species**

236 Figure 3 displayed a typical time course of Novozym 435 catalyzed transesterification of
237 octyl dihydrocaffeate with tricapyrin in a solvent-free system. As depicted, three groups of
238 phenolic derivatives from octyl dihydrocaffeate are generally converted with the
239 concentration di-DHCA/mono-DHCA monocaprylin > mono-DHCA dicaprylin > mono-
240 DHCA/di-DHCA glycerol. This indicated the reaction simultaneously proceeds in different
241 stages of the transesterification, and less mono-DHCA/di-DHCA glycerol might be a natural
242 result with excessive tricapyrin and little water presence. As can be seen, this solvent-free
243 system was intrinsically fast, within 24 h 60% of octyl dihydrocaffeate converted to products.

244 After another 24 h the reaction conversion arrived at 70%, thereafter the increases of products
245 slowed down indicating close to the equilibrium of the reaction. Compared with the system
246 previously reported (Sabally et al. 2006a; Safari et al. 2006), this system is relatively faster,
247 since most of the system need 4-5 days to reach equilibrium. Moreover, this result also
248 presented an important hint for the level setting of reaction time for later RSM optimization.

249 In order to determine the appropriate biocatalyst, three commercially available enzymes were
250 examined for their capacity to catalyze transesterification of octyl dihydrocaffeate with
251 tricaprylin (Table 2). It is clear that, in terms of specific activity, Lipozyme TL IM (0.57
252 $\mu\text{mol/g/min}$) was not so different from Lipozyme RM IM (0.44 $\mu\text{mol/g/min}$), while Novozym
253 435 was significantly higher (9.57 $\mu\text{mol/g/min}$). This fact again proved that *Candida*
254 *antartica* lipase B (Novozym 435) was a robust lipase for synthesis application as observed in
255 many different systems (Compton et al. 2000; Sabally et al. 2005a; Sabally et al. 2005b;
256 Compton et al. 2006; Laszlo and Compton 2006; Sabally et al. 2006a; Sabally et al. 2006b;
257 Sabally et al. 2007; Guyot et al. 1997). Therefore, Novozym 435 was chosen as a biocatalyst
258 for RSM optimization.

259 **3.4. Modelling fitting**

260 Because both di- and mono-DHCA monocaprylin and mono-DHCA dicaprylin are desired
261 glycerides, they are combined together and treated as one responds factor. Response surface
262 methodology (RSM) was employed to evaluate the relationship between a set of controllable
263 experimental factors on the bioconversion of octyl dihydrocaffeate and yield of
264 dihydrocaffoylated glycerides (Table 1). All the experiment trials were conducted in solvent
265 free condition with Novozym 435 as biocatalyst.

266 Experimental results of individual reaction based on RSM set conditions were presented in
267 Table 1. Among the experiment trials, the highest bioconversion (87%) was achieved in trial
268 16, and the lowest bioconversion (0.06%) was obtained trial 1. Coefficients of a full model

269 were evaluated by regression analysis and tested for their significance. The insignificant
 270 coefficients were eliminated stepwise on the basis of the p value after the coefficients were
 271 tested (Table 3). As indicated in Table 3, the independent variables (x_1 , x_2 , x_3 and x_4),
 272 quadratic terms (x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 and x_4^2) and interactions (x_1x_2 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_3x_4) were
 273 significant ($p < 0.05$) for bioconversion of octyl dihydrocaffeate and the independent variables
 274 (x_1 , x_2 , x_3 and x_4), quadratic terms (x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 and x_4^2) and interactions (x_1x_2 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_4 ,
 275 x_3x_4) were significant ($p < 0.05$) for yield of dihydrocaffoylated glycerides. On the other hand,
 276 the interaction terms x_2x_3 did not produce a significant effect on the yield within the designed
 277 intervals ($p > 0.05$) and therefore were removed from the original model. Thus the two final
 278 second polynomial models were generated as:

$$279 \quad \text{Bioconversion}(\%) = 63.32 + 23.97x_1 + 20.85x_2 + 33.14x_3 + 18.70x_4 - 15.71x_1^2 - 6.00x_2^2 \\ - 24.76x_3^2 - 5.94x_4^2 - 9.77x_1x_2 - 1.82x_1x_3 - 5.08x_1x_4 - 1.29x_2x_3 - 2.83x_2x_4 + 1.57x_3x_4 \quad (2)$$

$$280 \\ 281 \quad \text{Yield of dihydrocaffoylated glycerides}(\%) = 60.06 + 21.42x_1 + 19.29x_2 + 29.30x_3 + 19.21x_4 \\ - 13.79x_1^2 - 5.53x_2^2 - 24.60x_3^2 - 5.81x_4^2 - 8.97x_1x_2 - 1.67x_1x_3 - 3.21x_1x_4 - 2.18x_2x_4 + 3.63x_3x_4 \quad (3)$$

282 where x_i is the coded value of each factor.

283 3.4.1. ANOVA and adequacy test of the model

284 According to the ANOVA analysis, the coefficient of determination (R^2) of the first model
 285 (equation 2) was 0.998, which indicates that these two models are suitable to represent the
 286 real relationship among the selected reaction parameters. At the same time, the probabilities
 287 for regression of the first model were found to be significant ($p < 0.0001$) and lack of fit of the
 288 model was insignificant ($p = 0.234$), which indicate that the model was statistically prominent
 289 and adequate to explain most of the variability for bioconversion of octyl dihydrocaffeate.
 290 Similarly, ANOVA analysis on the second model (equation 3) yielded the same conclusion:
 291 the regression was significant ($p < 0.0001$) and the lack of fit of the model was insignificant

292 ($p=0.157$). Thus, two model-generated equations for prediction of bioconversion of octyl
293 dihydrocaffeate and yield of dihydrocaffoylated glycerides were successfully established.

294 **3.4.2. Mutual interaction effects of the parameters**

295 The mutual interaction effects between investigated variables can be better understood
296 through examining contour plots constructed based on above model generated from RSM.

297 Figure 4A and 5A revealed interaction effect of enzyme load and temperature on
298 bioconversion of octyl dihydrocaffeate and yield of dihydrocaffoylated glycerides
299 respectively, where reaction time was 24.25 h and substrate molar ratio was 3. When enzyme
300 load was increased to 14% and temperature was to 60 °C, bioconversion was increased to
301 70.6% and yield was increased to 67.1%, and further increase of temperature and enzyme load
302 could lead to 80.4% of bioconversion and 76.6% yield of dihydrocaffoylated glycerides.
303 Moreover, this plot also indicates that positive effect of these two variables is mutually
304 interactive. When one of two variables remained unchanged, there was only slight increase of
305 bioconversion and yield by increasing another variable.

306 Figure 4B and 5B depicted mutual effects of enzyme load and substrate molar ratio
307 (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate) on bioconversion and yield, where temperature was 55 °C
308 and reaction time was 24.25 h. It was found that 80.4% of bioconversion and 79.5% of yield
309 were obtained when enzyme load was increased to 16% and substrate molar ratio was
310 increased to 5. However, there was no significant increase of bioconversion and yield by
311 further increasing the enzyme load.

312 Figure 4C and 5C showed effect of reaction time and substrate molar ratio (tricaprylin/
313 dihydrocaffeate) on bioconversion and yield at 55 °C and 11% of enzyme load. This plot
314 indicates the longer reaction time is more important to determine the bioconversion and yield
315 when substrates molar ratio was low. The highest bioconversion (88.2%) and yield (83.9%)
316 can be achieved when substrate molar ratio was 5 after 40 h reaction.

317 **3.5. Model validation**

318 Based on model prediction, two parameter settings could be generated with expected high
319 yield and bioconversion (Table 4). Two experiments were thus conducted base on the
320 predicted optimum conditions to validate the RSM model predictions (Table 4). As shown
321 in Table 4, the experiment values generally agreed with the predicted ones, which
322 confirmed the validity and adequacy of models prediction. Moreover, the high
323 bioconversion and yield of desired dihydrocaffoylated glycerides obtained in this validation
324 test were achieved in a relatively shorter reaction time (24-44 h), indicating an intrinsic
325 advantage over the reported systems (Sabally et al. 2006a).

326 **4. Conclusions**

327 In this study, a novel route for enzymatic synthesis of dihydrocaffoylated glycerides was
328 established successfully. In this protocol, octyl dihydrocaffeate was employed as an
329 intermediate for target product synthesis by lipase catalyzed transesterification between
330 tricaprylin and octyl dihydrocaffeate in a solvent-free system. The results demonstrated that
331 the new approach has distinct advantages over reported solvent systems, namely, faster
332 reaction rate and higher volumetric productivity. The enzyme specific activity amounted to
333 9.57 $\mu\text{mol}/\text{min}/(\text{g Novozym 435})$ and the volumetric productivity added up to 146.98
334 $\text{mol}/\text{L}/\text{h}/(\text{kg Novozym 435})$. The system was further optimized with assistance of RSM
335 model. An optimized condition was generated by the model: temperature, 65.2 °C; reaction
336 time, 43.6 h; enzyme load, 19.97% (on substrate base); and substrate molar ratio, 4.97
337 (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate). With the optimized conditions, a validation reaction was
338 conducted. 86.47% bioconversion of octyl dihydrocaffeate and around 78.07% yield of
339 dihydrocaffoylated glycerides were achieved. The experiment values generally agreed with
340 the model predicted values, which indicated the model is valid and adequate.

341 **Acknowledgement**

342 This work was supported by the Strategic Food and Health Program (FoSu) as well as grant
343 from the Graduate School of Science, Aarhus University is appreciated.

344

345

346

347 References

348

349 Buisman, G. J. H., van Helteren, C. T. W., Kramer, G. F. H., Veldsink, J. W., Derksen, J. T.
350 P., and Cuperus, F. P. (1998). "Enzymatic esterifications of functionalized phenols for
351 the synthesis of lipophilic antioxidants." *Biotechnology Letters*, 20(2), 131-136.

352 Compton, D. L., Laszlo, J. A., and Berhow, M. A. (2000). "Lipase-catalyzed synthesis of
353 ferulate esters." *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(5), 513-519.

354 Compton, D. L., Laszlo, J. A., and Berhow, M. A. (2006). "Identification and quantification
355 of feruloylated mono-, di-, and triacylglycerols from vegetable oils." *J. Am. Oil Chem.*
356 *Soc.*, 83(9), 753-758.

357 Crozier, A., Jaganath, I. B., and Clifford, M. N. (2009). "Dietary phenolics: chemistry,
358 bioavailability and effects on health." *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.

359 Figueroa-Espinoza, M. C., and Villeneuve, P. (2005). "Phenolic acids enzymatic
360 lipophilization." *J. Agric. Food Chem*, 53(8), 2779-2787.

361 Guyot, B., Bosquette, B., Pina, M., and Graille, J. (1997). "Esterification of phenolic acids
362 from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free
363 medium." *Biotechnology Letters*, 19(6), 529-532.

- 364 Guyot, B., Gueule, D., Pina, M., Graille, J., Farines, V., and Farines, M. (2000). "Enzymatic
365 synthesis of fatty esters in 5-caffeoyl quinic acid." *European Journal of Lipid Science*
366 *and Technology*, 102(2), 93-96.
- 367 Huang, W. Y., Cai, Y. Z., and Zhang, Y. (2010). "Natural phenolic compounds from
368 medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention." *Nutr Cancer*,
369 62(1), 1-20.
- 370 Laszlo, J. A., and Compton, D. L. (2006). "Enzymatic glycerolysis and transesterification of
371 vegetable oil for enhanced production of feruloylated glycerols." *J. Am. Oil Chem.*
372 *Soc.*, 83(9), 765-770.
- 373 Lue, B. M., Karboune, S., Yeboah, F. K., and Kermasha, S. (2005). "Lipase-catalyzed
374 esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media." *J Chem*
375 *Technol Biotechnol*, 80, 462-468.
- 376 Sabally, K., Karboune, S., St-Louis, R., and Kermasha, S. (2006a). "Lipase-Catalyzed
377 Transesterification of Trilinolein or Trilinolenin with Selected Phenolic Acids." *J. Am.*
378 *Oil Chem. Soc.*, 83, no. 2, 101-107.
- 379 Sabally, K., Karboune, S., St-Louis, R., and Kermasha, S. (2006b). "Lipase-catalyzed
380 transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic
381 lipids." *J. Biotechnol.*, 127(1), 167-176.
- 382 Sabally, K., Karboune, S., St-Louis, R., and Kermasha, S. (2007). "Lipase-catalyzed synthesis
383 of phenolic lipids from fish liver oil and dihydrocaffeic acid." *Biocatal. Biotransform.*,
384 25(2-4), 211-218.

- 385 Sabally, K., Karboune, S., Yeboah, F. K., and Kermasha, S. (2005a). "Enzymatic
386 esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media."
387 *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(1), 37-44.
- 388 Sabally, K., Karboune, S., Yeboah, F. K., and Kermasha, S. (2005b). "Lipase-catalyzed
389 esterification of selected phenolic acids with linolenyl alcohols in organic solvent
390 media." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127(1), 17-27.
- 391 Safari, M., Karboune, S., St-Louis, R., and Kermasha, S. (2006). "Enzymatic synthesis of
392 structured phenolic lipids by incorporation of selected phenolic acids into triolein."
393 *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(4), 272-279.
- 394 Stamatis, H., Sereti, V., and Kolisis, F. N. (1999). "Studies on the enzymatic synthesis of
395 lipophilic derivatives of natural antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists
396 Society*, 76(12), 1505-1510.
- 397 Stamatis, H., Sereti, V., and Kolisis, F. N. (2001). "Enzymatic synthesis of hydrophilic and
398 hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media." *Journal of
399 Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 11(4-6), 323-328.
- 400

401 **Table 1:** Experimental design for transesterification between octyl dihydrocaffeate and
 402 tricaprylin and results of CCF design.

Trials	Enzyme (%)	Temperature (°C)	Time (hour)	Molar Ratio (Oil/Ester)	Bioconversion of ester (%)	Yield of DG (%)
1*	2 (-1)	40 (-1)	0.5 (-1)	1 (-1)	0.06	0.00
2*	20 (1)	40 (-1)	0.5 (-1)	1 (-1)	1.13	1.86
3*	2 (-1)	70 (1)	0.5 (-1)	1 (-1)	0.35	0.64
4	20 (1)	70 (1)	0.5 (-1)	1 (-1)	6.80	4.22
5*	2 (-1)	40 (-1)	48 (1)	1 (-1)	22.00	12.50
6	20 (1)	40 (-1)	48 (1)	1 (-1)	38.24	27.93
7	2 (-1)	70 (1)	48 (1)	1 (-1)	28.00	23.44
8	20 (1)	70 (1)	48 (1)	1 (-1)	64.31	52.43
9*	2 (-1)	40 (-1)	0.5 (-1)	5 (1)	0.94	0.00
10	20 (1)	40 (-1)	0.5 (-1)	5 (1)	5.97	7.70
11	2 (-1)	70 (1)	0.5 (-1)	5 (1)	2.65	2.20
12	20 (1)	70 (1)	0.5 (-1)	5 (1)	25.82	25.60
13	2 (-1)	40 (-1)	48 (1)	5 (1)	19.85	20.00
14	20 (1)	40 (-1)	48 (1)	5 (1)	75.09	71.83
15	2 (-1)	70 (1)	48 (1)	5 (1)	74.43	72.18
16	20 (1)	70 (1)	48 (1)	5 (1)	87.58	86.08
17	2 (-1)	55 (0)	24.25 (0)	3 (0)	25.18	25.94
18	20 (1)	55 (0)	24.25 (0)	3 (0)	70.43	67.05
19	11 (0)	40 (-1)	24.25 (0)	3 (0)	36.95	34.85
20	11 (0)	70 (1)	24.25 (0)	3 (0)	78.07	74.67
21	11 (0)	55 (0)	0.5 (-1)	3 (0)	5.33	7.28
22	11 (0)	55 (0)	48 (1)	3 (0)	72.18	64.09
23*	11 (0)	55 (0)	24.25 (0)	1 (-1)	37.28	22.80
24	11 (0)	55 (0)	24.25 (0)	5 (1)	76.47	73.91
25	11 (0)	55 (0)	24.25 (0)	3 (0)	63.85	59.06
26	11 (0)	55 (0)	24.25 (0)	3 (0)	62.42	59.52
27	11 (0)	55 (0)	24.25 (0)	3 (0)	62.55	60.26

403 DG = dihydrocaffoylated glycerides

404 * These trials were removed from model prediction.

Substrate	Enzyme	Solvent	Enzyme Activity ^a ($\mu\text{mol}/(\text{g min})$)	Bioconversion ^b (%)	Yield ^c (%)		Volumetric productivity ($\text{mol}/\text{L}/\text{h}/(\text{kg enzyme})^{\text{f}}$)
					Product 1 ^d	Product 2 ^e	
Ester/tricaprylin (1/2)	Lipozyme RMIM	No	0.44 \pm 0.0201 ^g	14.74 \pm 2.43 ^g	8.75 \pm 2.02 ^g	5.27 \pm 0.33 ^g	21.33 \pm 4.12 ^g
Ester/ tricaprylin (1/2)	Lipozyme TLIM	No	0.57 \pm 0.0004 ^g	12.78 \pm 0.49 ^g	6.87 \pm 0.09 ^g	5.54 \pm 0.12 ^g	12.19 \pm 3.99 ^g
Ester/ tricaprylin (1/2)	Novozym 435	No	9.57 \pm 0.0608 ^g	72.64 \pm 0.51 ^g	35.62 \pm 0.35 ^g	28.92 \pm 0.21 ^g	146.98 \pm 2.14 ^g
DHCA/ tricaprylin (1/2)	Novozym 435	No	0.05 \pm 0.0031 ^g	3.22 \pm 1.81 ^g	1.11 \pm 0.97 ^g	2.11 \pm 0.85 ^g	9.06 \pm 4.37 ^g
Ester/ tricaprylin (1/2)	Novozym 435	Hexane	2.31 \pm 0.0110 ^g	24.25 \pm 3.40 ^g	9.16 \pm 1.21 ^g	4.90 \pm 0.11 ^g	4.48 \pm 0.34 ^g

405 **Table 2:** Effects of enzymes and substrate on bioconversion and yield of dihydrocaffoylated glycerides.

406 ^a Enzyme activity was defined as μmol of conversion substrate (octyl dihydrocaffate or DHCA)/g solid enzyme/min reaction time.

407 ^b Bioconversion was calculated as $(1-M_t/M_0) \times 100\%$, where M_0 and M_t was the area of octyl dihydrocaffate or DHCA divided by total area of
408 dihydrocaffoylated glycerides (including DHCA and octyl dihydrocaffate) at initial time of reaction and time t of reaction respectively.

409 ^c Yield of dihydrocaffoylated glycerides were calculated base on the total area of product divided by total area of dihydrocaffoylated glycerides
410 and multiplied by 100%.

411 ^d Product 1 represents yield of di-DHCA/mono-DHCA monocaprylin.

412 ^e Product 2 represents yield of mono-DHCA dicaprylin.

413 ^f Volumetric productivity was calculated as bioconversion of octyl dihydrocaffate or DHCA to dihydrocaffoylated glycerides within 48
414 hours/reaction volume/reaction time/enzyme amount.

415 ^g The calculation of relative standard deviation was based on duplicated determinations.

416 **Table 3:** Regression coefficients and significance ($p < 0.05$) after backward elimination for
 417 bioconversion of octyl dihydrocaffeate and yield of dihydrocaffoylated glycerides

Variables	Bioconversion		Yield of dihydrocaffoylated glycerides	
	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value
Constant	63.32	1.97E-11	60.06	1.92E-11
x_1	23.97	1.08E-08	21.42	1.50E-08
x_2	20.85	2.49E-08	19.29	2.80E-08
x_3	33.14	1.55E-09	29.30	2.30E-09
x_4	18.70	1.29E-07	19.21	7.77E-08
x_1^2	-15.71	1.73E-06	-13.79	2.66E-06
x_2^2	-6.00	0.00043	-5.53	0.000492
x_3^2	-24.76	1.16E-07	-24.60	8.57E-08
x_4^2	-5.94	0.00255	-5.81	0.002127
x_1x_2	-9.77	1.35E-06	-8.97	1.59E-06
x_1x_3	-1.82	0.012046	-1.67	0.013538
x_1x_4	-5.08	8.01E-05	-3.21	0.000737
x_2x_3	-1.29	0.045697	-0.39	0.446667
x_2x_4	-2.83	0.001907	-2.18	0.005103
x_3x_4	1.57	0.026613	3.63	0.000376

418 x_1 : enzyme load (%); x_2 : temperature (°C); x_3 : reaction time (hour); x_4 : substrate molar ratio
 419 (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate)

420 **Table 4:** Optimum conditions predicted by the model and the results from validation

421 reactions.

422

		Run 1	Run 2	
Temperature (°C)		70	65.2	423
Reaction time (hour)		24.25	43.6	424
Enzyme load (%)		14.6	19.92	425
Molar ratio (tricaprylin/ester)		3	4.97	426
Bioconversion (%)	Predicted	81.33	91.91	427
	Experiment±SD*	79.81±0.37	86.47±0.21	428
Yield (%)	Predicted	76.61	89.86	429
	Experiment±SD*	76.54±0.22	78.03±1.75	430

433 *Mean± standard deviation of duplicate determinations.

434 **Figure captions:**

435 **Scheme 1:** Possible products from transesterification between octyl dihydrocaffeate and
436 tricaprylin. A: mono-DHCA dicaprylin; B: di-DHCA monocaprylin; C: mono-DHCA
437 monocaprylin; D: mono-DHCA acylglycerol; E: di-DHCA acylglycerol; F: dihydrocaffeic
438 acid (DHCA). (The potential isomers not shown)

439

440 **Figure 1:** HPLC (A) and HPLC-ESI-MS (B) analysis of transesterification reaction. Reaction
441 conditions: Temperature, 70 °C; reaction time, 24.25 h; substrate molar ratio, 3/1
442 (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate); Novozym 435 load, 14.6% (on the basis of substrates).

443

444 **Figure 2:** Bioconversion of octyl dihydrocaffeate or DHCA in different reaction systems
445 catalyzed by Novozym 435. (Δ) solvent-free transesterification of octyl dihydrocaffeate and
446 tricaprylin. (\diamond) transesterification of DHCA with tricaprylin. (\circ) hexane-mediated
447 transesterification of octyl dihydrocaffeate with tricaprylin.

448

449 **Figure 3:** Time course of Novozym 435 catalyzed transesterification of octyl dihydrocaffeate
450 with tricaprylin: (\square) yield of di-DHCA/mono-DHCA monocaprylin; (Δ) yield of mono-
451 DHCA dicaprylin. (\diamond) yield of mono-DHCA/di-DHCA acylglycerol. (\circ) percentage of octyl
452 dihydrocaffeate.

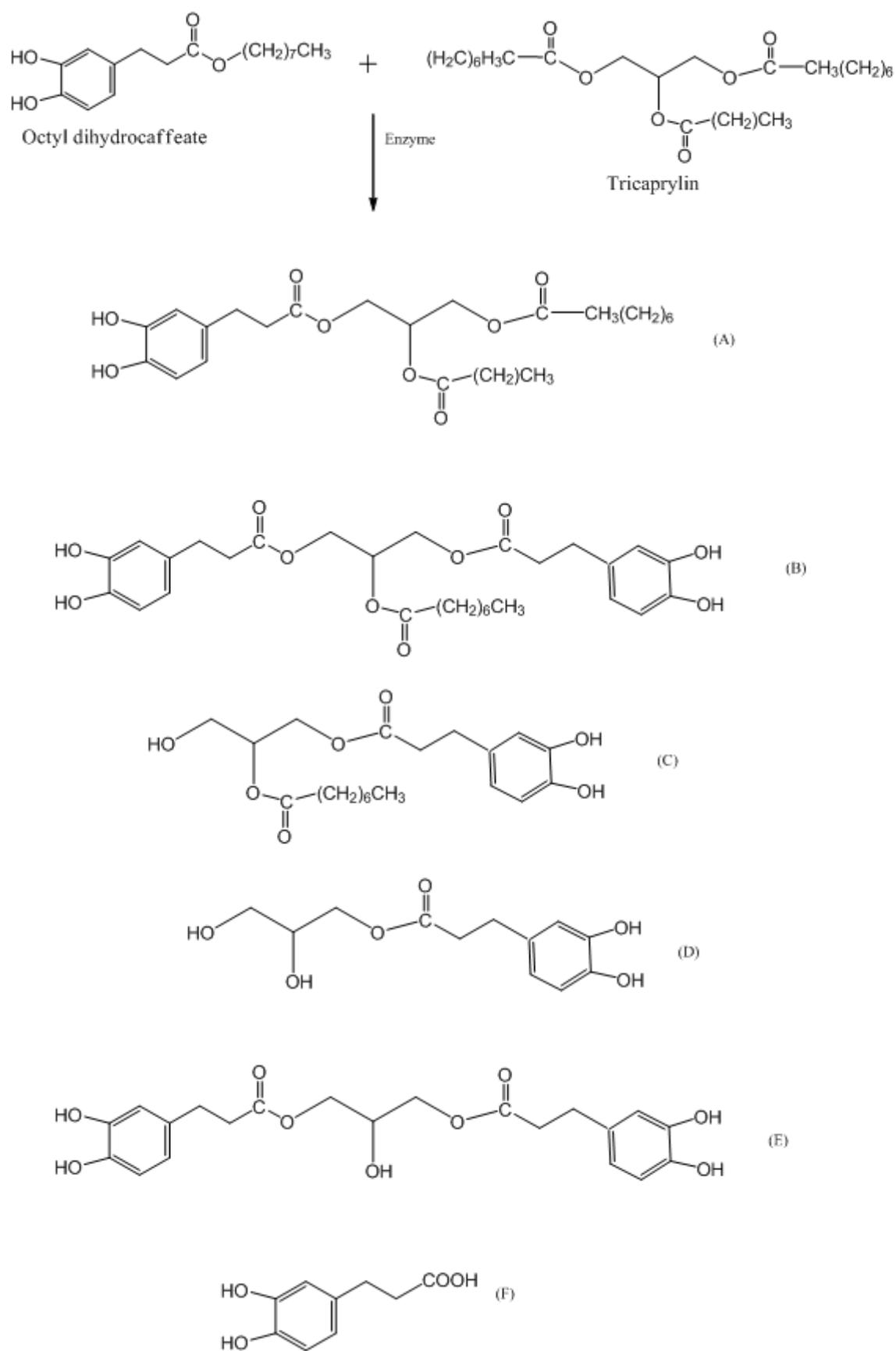
453

454 **Figure 4:** Response contour plots between two parameters for bioconversion of octyl
455 dihydrocaffeate: (A) mutual effects of temperature and enzyme load at 24.25 h and 3 of
456 substrate molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate); (B) mutual effects of enzyme load
457 and substrate molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate) at 55 °C and 24.25 h; (C) mutual

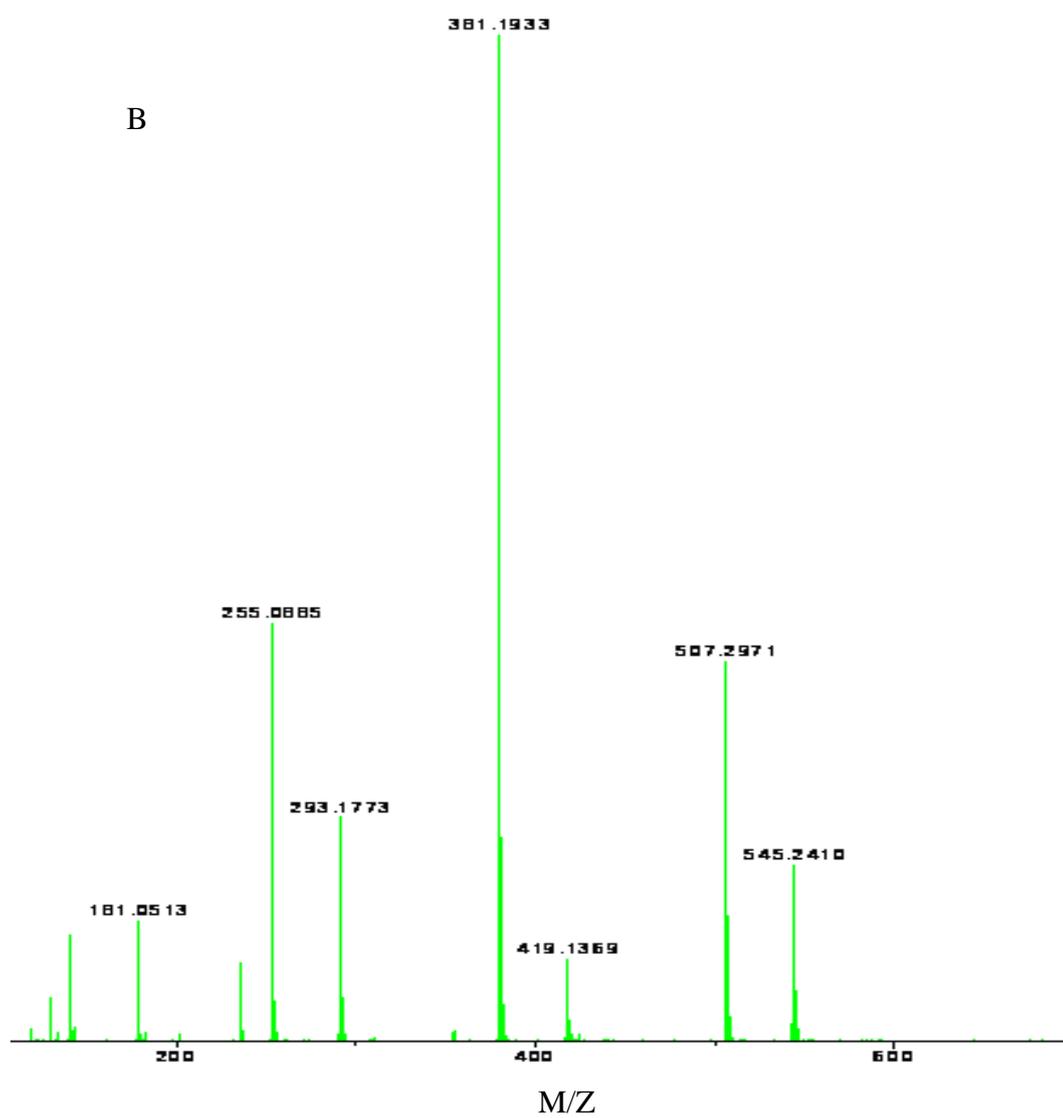
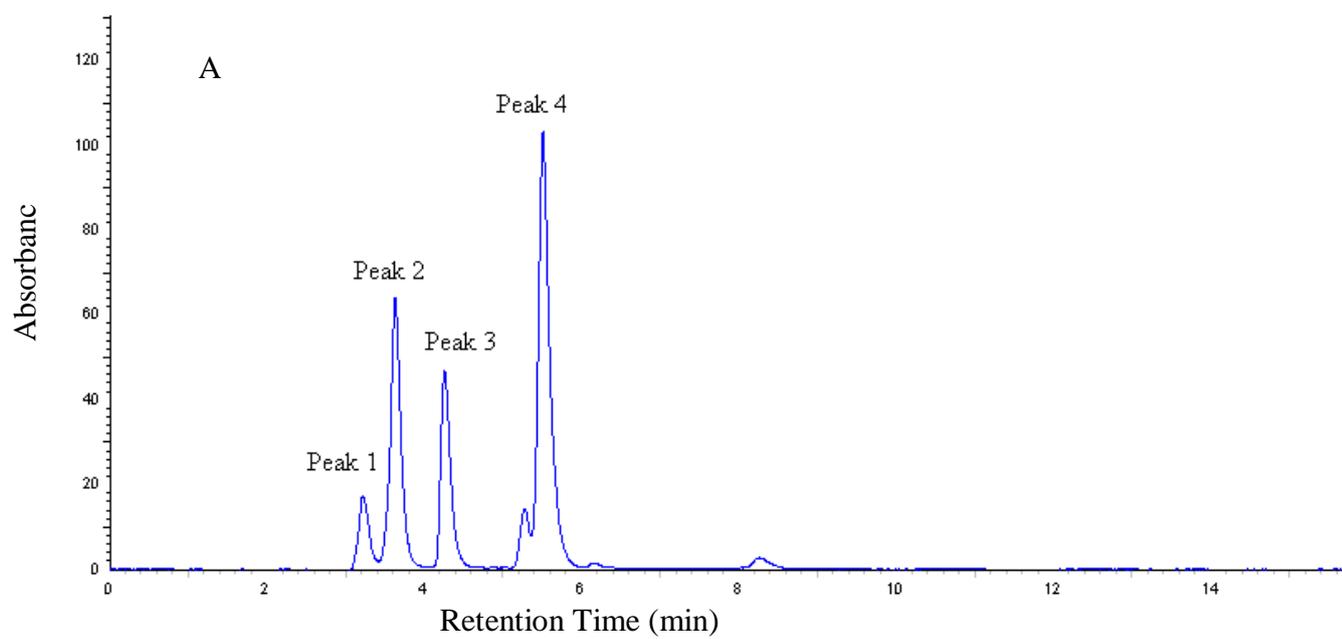
458 effects of reaction time and substrate molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate) at 55 °C
459 and 11% of enzyme load.

460

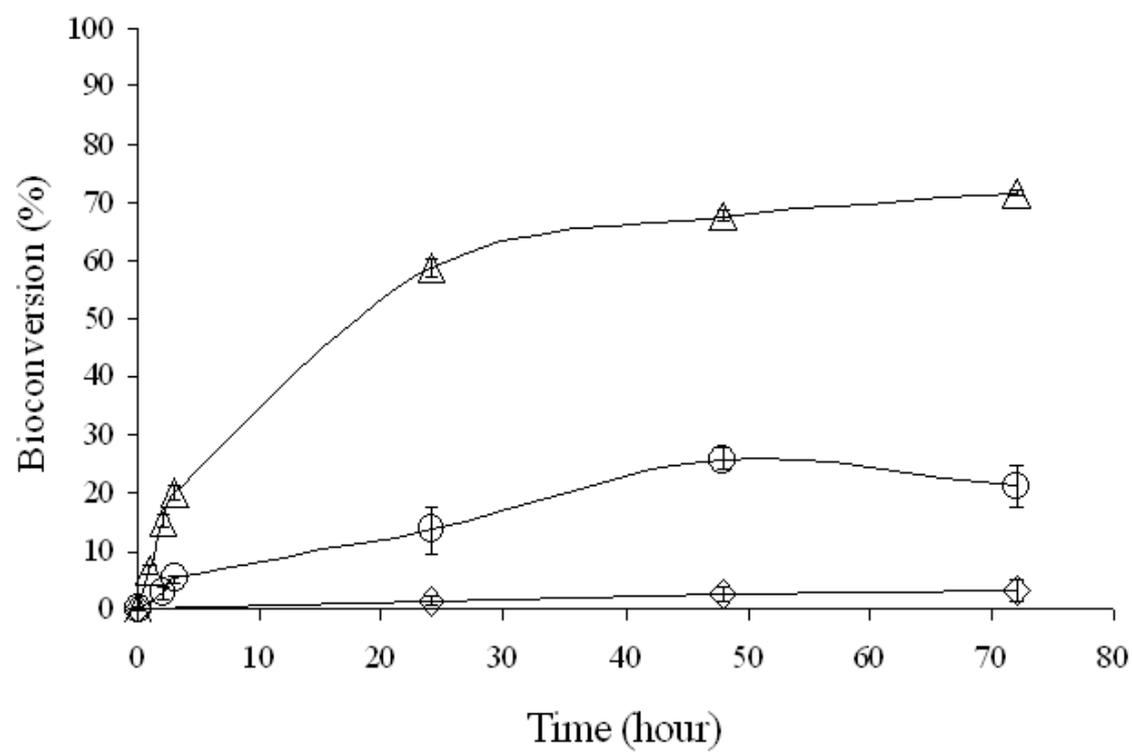
461 **Figure 5:** Response contour plots between two parameters for yield of dihydrocaffoylated
462 glycerides: (A) mutual effects of temperature and enzyme load at 24.25 h and 3 of substrate
463 molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate); (B) mutual effects of enzyme load and
464 substrate molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate) at 55 °C and 24.25 h; (C) mutual
465 effects of reaction time and substrate molar ratio (tricaprylin/octyl dihydrocaffeate) at 55 °C
466 and 11% of enzyme load.

467 **Scheme 1:**

468 **Figure 1:**
469



470 **Figure 2:**
471



472

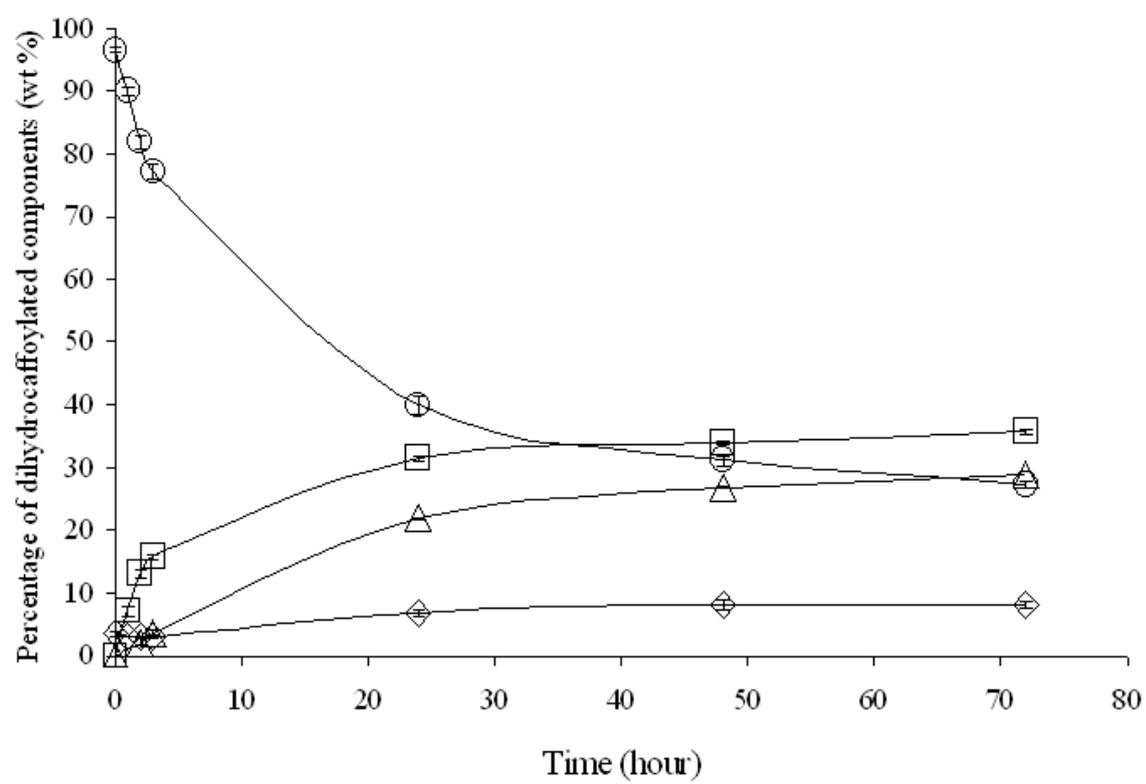
473 **Figure 3:**

Figure 4:

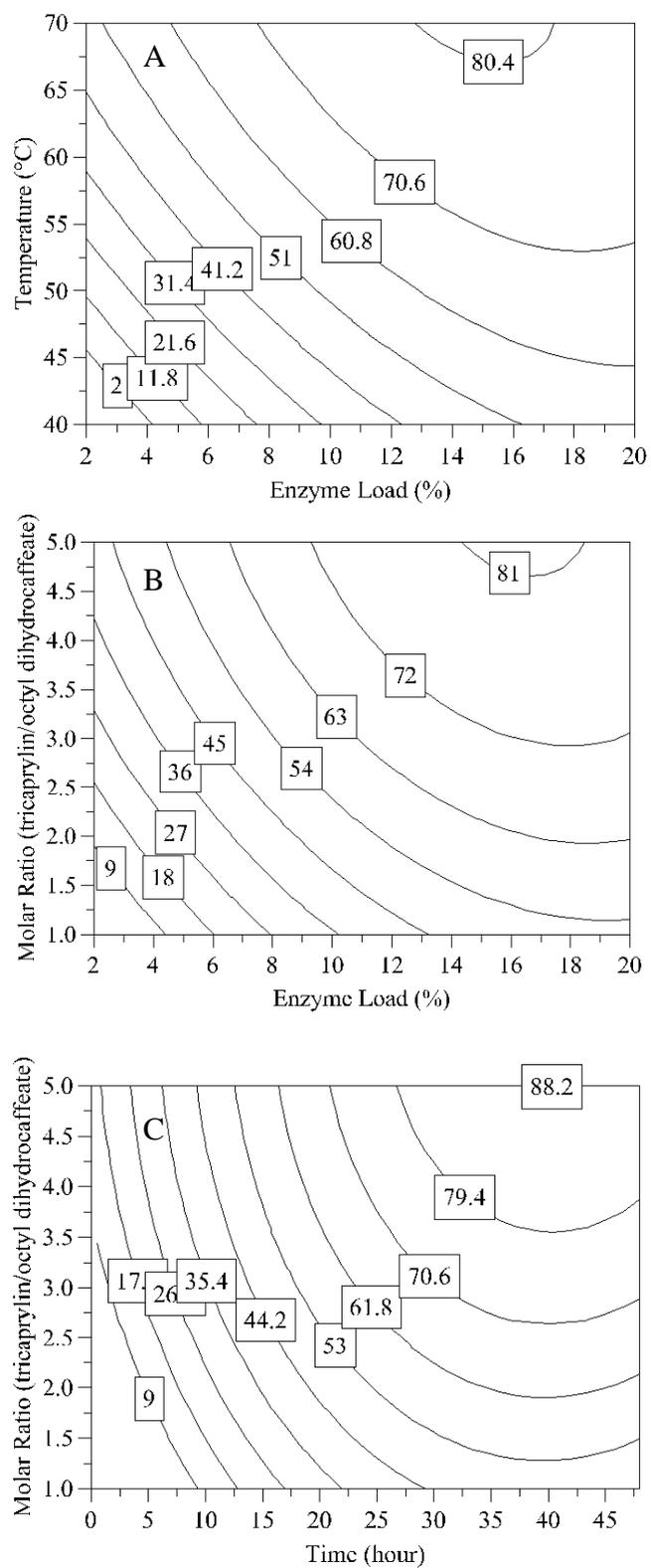


Figure 5:

