

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS  
TRÓPICOS – PPGCIPET**

**Tese**

**APLICAÇÃO DE LIPASES DE FUNGOS AMAZONICOS PARA  
MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE ÓLEO DE PEIXE**

**HÉRLON MOTA ATAYDE**

**MANAUS - AM  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS  
TRÓPICOS – PPGCIPET**

**Tese**

**APLICAÇÃO DE LIPASES DE FUNGOS AMAZONICOS PARA  
MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE ÓLEO DE PEIXE**

**HÉRLON MOTA ATAYDE**

**Área de Concentração: Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais**

**Linha de Pesquisa: Tecnologias de Uso dos Recursos Pesqueiros**

**ORIENTADOR: ANTÔNIO JOSÉ INHAMUNS**

**MANAUS - AM  
2014**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A862a Atayde, Hérlon Mota  
Aplicação de lipases de fungos amazônicos para melhoramento biotecnológico de óleo de peixe / Hérlon Mota Atayde. 2014  
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Antônio José Inhamuns  
Tese (Doutorado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Enzima. 2. Ácido graxo. 3. Microrganismo. 4. Calophysus macropterus. 5. Piracatinga. I. Inhamuns, Antônio José II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“A ciência é um processo social. Decorre numa escala temporal mais longa do que a vida humana. Caso eu morra, alguém ocupará o meu lugar. Se tu morreres, alguém ocupará o teu. O que realmente importa é que alguém faça o trabalho.”

Alfred Weneger  
(1880-1930)  
autor da Teoria da  
Deriva dos Continentes

## **AGRADECIMENTOS**

Senhor, carinhosamente agradeço pelo direcionamento dado nessa caminhada. Entendo que as dificuldades enfrentadas somente tinham como propósito mostrar o caminho da fortaleza e perseverança. Nessa caminhada, o Senhor teve a benevolência de mostrar muitas pessoas que compartilhavam fervorosamente minha busca de saber. Para essas pessoas, desejo muitas graças.

Em especial, aos meus amores: Raimundo e Doracy, queridos pais, meu berço familiar e eterna base de minha vida; Jaqueline e Dimitry, esposa e filho, cada vez mais companheiros de jornada, dedicados e conscientes de seus importantes protagonismos em minha vida.

Ao Prof. Dr. Antônio José Inhamuns, pelo companheirismo e pelas orientações concedidas nessa longa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Micologia, aqui representados pela Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, sempre disponíveis para auxiliar na formação científica desse “filho” mais velho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia do Pescado, aqui representados pelo técnico Fábio Lopes e acadêmico Euclides Vasconcelos, pelo apoio prioritário dispensado.

Aos demais familiares e amigos, pela ENORME (numérica e qualitativa) torcida.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Pinto (Laboratório de Operações Unitárias da Universidade Federal do Rio Grande – FURG), Profa. Dr. Helena Teixeira Godoy (Laboratório de Análise de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP) e respectivos colaboradores, pela importantíssima contribuição.

Aos empresários dos frigoríficos Iranduba Frigorífico de Pescado, Frigorífico Rio-Mar e Friolins, pela colaboração na execução desse trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras, sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Edwar Freitas, pela sempre terna atenção dispensada.

À Secretaria Municipal de Educação de Manaus (SEMED), pela liberação concedida através do Programa QUALIFICA e à família Escola Municipal Desembargador Cândido Honório Ferreira, pelo prazeroso acolhimento.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela crescente valorização dos programas de pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em particular à Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES).

Senhor Deus, que tudo seja segundo Tua vontade, amém!

## RESUMO

Óleos de peixe são importantes produtos para a indústria farmacêutica e alimentícia. Quando obtidos a partir de resíduos adequadamente manipulados, contribuem para diminuição dos danos ambientais gerados pelo descarte. Adicionalmente, a utilização de enzimas microbianas como ferramenta biotecnológica para o enriquecimento de ácidos graxos poli-insaturados em óleos de pescado é crescente. No entanto, pesquisas que abordem a obtenção de óleo refinado a partir de resíduos de espécies amazônicas e a utilização de enzimas lipolíticas para o beneficiamento dos mesmos é desconhecida. Nessa pesquisa, selecionou-se um fungo conservado na Coleção de Culturas DPUA/UFAM para aplicação da respectiva enzima, verificação de seus efeitos sobre o óleo refinado dos resíduos de piracatinga (*Callophysus macropterus*). As culturas de fungo foram reativadas e autenticadas conforme literatura especializada, submetidas aos ensaios de potencial lipolítico (em meio sólido e por titrimetria) e de toxicidade contra *Artemia salina*. O extrato lipolítico bruto (lipases) foi sintetizado por fermentação submersa, parcialmente caracterizado (pH e temperatura ótimos) e liofilizado. O óleo bruto foi termomecanicamente extraído e devidamente refinado. Em condições ótimas demonstradas pela caracterização parcial, aplicou-se o extrato bruto do fungo selecionado sobre o óleo refinado de piracatinga. Quanto às características do óleo, os quantitativos de EPA e DHA em piracatinga são análogos à maioria das espécies de água doce. Entre os fungos analisados, a cultura *Aspergillus wentii* DPUA 1725 é fonte segura (ausência de toxicidade contra *Artemia salina*) para obtenção de lipases para a indústria de alimentos. Quanto às condições ótimas (pH 6,6 e temperatura 42 °C), a lipase de *A. wentii* DPUA 1725 não difere da maioria das culturas de fungos estudados em outras pesquisas. No entanto, a utilização de sua enzima sobre o óleo de piracatinga *C. macropterus* apresentou importante aumento (113,8%) na concentração de ácidos graxos polinsaturados.

## ABSTRACT

Fish oils are important products for pharmaceutical and food industry. When obtained from properly handle waste, reduce environmental damage caused by its disposal. Additionally, the microbial enzymes use as biotechnological tool for polyunsaturated fatty acids enrichment of fish oils is increasing. However, research about the refined oil achievement from waste Amazonian fish species and the lipolytic enzymes use for processing thereof are unknown. In this research, a fungus preserved in the Culture Collection of DPUA / UFAM was selected for application of the respective enzyme, check their effects on refined oil from piracatinga (*Collophysus macropterus*) wastes. The fungal cultures were reactivated and certified as literature, submitted to lipolytic potential (solid medium and titrimetric methods) and toxicity against *Artemia salina* tests. The crude lipolytic extract (lipases) was synthesized by submerged fermentation, partially characterized (optimum pH and temperature) and lyophilized. The crude oil was thermomechanically extracted and refined. Under optimal conditions demonstrated by partial characterization, was applied the fungus crude extract on piracatinga refined oil. Regarding the oil characteristics, the EPA and DHA in piracatinga are similar to most freshwater species. Among the analyzed fungi, *Aspergillus wentii* DPUA 1725 culture is a safe source (no toxicity against *Artemia salina*) to obtain lipase enzymes for food industry. Regarding the optimal conditions (pH 6.6 and temperature 42 ° C), the lipase from *A. wentii* DPUA 1725 does not differ from most fungal cultures studied in other researches. However, the enzyme use on piracatinga oil showed a significant increase (113.8%) of polyunsaturated fatty acids concentration.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	10
2 – REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1 – LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS.....	12
2.1.1 – Classificação e nomenclatura dos ácidos graxos.....	14
2.1.2 – Metabolismo dos ácidos graxos.....	17
2.1.3 – Importância fisiológica e nutricional dos ácidos graxos polinsaturados .....	19
2.1.4 – Recomendações quanto à ingestão proporcional de ácidos graxos polinsaturados.....	23
2.1.5 – Fontes para obtenção de ácidos graxos insaturados .....	24
2.2 - ÁCIDOS GRAXOS EM MÚSCULO E DERIVADOS DE PEIXE.....	26
2.2.1 – Perfil dos ácidos graxos em peixes.....	28
2.3 – PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO REFINADO .....	30
2.4 – PIRACATINGA .....	31
2.5 – FUNGOS FILAMENTOSOS.....	40
2.5.1 – Formas de conservação de fungos em coleções de cultura .....	40
2.6 – ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	41
2.7 – <i>Artemia salina</i> E ENSAIOS DE TOXICIDADE .....	43
2.7.1 – Aspectos bioecológicos da <i>Artemia</i> .....	43
2.7.2 – Utilização da <i>Artemia salina</i> em ensaios de toxicidade .....	43
3 - OBJETIVOS .....	44
4 – ARTIGOS A SEREM PUBLICADOS .....	55
5 – CONCLUSÕES .....	93
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
<i>Capítulo I</i> – PROSPECÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO DE FUNGO AMAZÔNICO PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS .....	55
<i>Capítulo II</i> – RENDIMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA QUALIDADE DE ÓLEOS DE PIRACATINGA <i>Calophysus macropterus</i> E EFEITO DO EXTRATO LIPOLÍTICO DE <i>Aspergillus wentii</i> DPUA 1725 SOB O ÓLEO REFINADO .....	72

# APLICAÇÃO DE LIPASES DE FUNGOS AMAZONICOS PARA MELHORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE ÓLEO DE PEIXE

## 1 - INTRODUÇÃO

Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) livres (com destaque para o ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)) e seus mono e diglicerídios, encontrados de forma abundante no músculo de peixes gordos e óleos de peixe, são usados na produção de uma variedade de produtos farmacêuticos e aditivos alimentícios (SHARMA et al., 2001; SIJTSMA; SWAAF, 2004; ESPINOSA et al., 2008).

Nas décadas passadas, considerava-se que somente peixes marinhos apresentavam quantitativo expressivo dos ácidos EPA e DHA (OGAWA; MAIA, 1999). Porém, algumas pesquisas utilizando peixes de água doce, incluindo peixes da Região Amazônica, contrariaram essa afirmação (INHAMUNS; FRANCO, 2001, INHAMUNS; FRANCO, 2008).

Resíduos do processamento desses animais geram importantes subprodutos quando adequadamente manipulados, como farinha e óleo de peixe, entre outros. Mesmo diante do custo do processo de purificação no produto final ser economicamente elevado, os óleos de peixe despertam grande interesse (SIJTSMA; SWAAF, 2004; PINHEIRO, 2006; RAMEL et al., 2008).

Óleos de peixe, quando brutos, apresentam impurezas, outros compostos e materiais coloidais que o tornam inadequado para consumo humano. Pelo processo de refino, busca-se remover os componentes não-triacilgliceróis que afetam a estabilidade desse óleo (MORAIS et al., 2001; CREXI et al., 2007):

Produtos alimentícios enriquecidos com esses óleos refinados ou encapsulados nutracêuticos de óleo de peixe são alternativas de consumo de AGPI, importantes em populações onde o índice de consumo de peixe é baixo. Tais concentrados têm demonstrado efeitos benéficos na aterosclerose, trombose, arritmia, eczema tópico, psoríase, asma e artrite reumatóide quando administrados em humanos (CARVALHO et al., 2003; ESPINOSA et al., 2008; LEE et al., 2008).

Para obtenção desses concentrados lipídicos, diversas pesquisas têm sido relatadas utilizando métodos físicos, químicos e enzimáticos. Entre esses métodos, a aplicação das lipases microbianas (método enzimático), em sua maioria extracelulares, tem destaque porque apresentam procedimento mais simples para isolamento a partir do caldo fermentativo, são mais

estáveis e apresentam propriedades intrínsecas mais diversificadas quando comparadas às lipases de fonte animal ou vegetal (CARVALHO et al., 2003; CREXI et al., 2012).

A maioria das lipases disponíveis comercialmente é de origem microbiana, produzidas principalmente a partir de fungos e bactérias (CORZO; REVAH, 1999; SHARMA et al., 2001; LIU et al., 2008).

Na indústria de alimentos, lipases microbianas têm sido utilizadas para obtenção de ácidos graxos livres e partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em alimentos, conferindo particularidades físico-químicas, organolépticas e nutricionais a diversos alimentos. Como exemplo, pela aplicação de lipases em óleo de bacalhau obteve-se um incremento de ácidos graxos poli-insaturados nesse produto que conferiu atividades anti-carcinogênicas e anti-escleróticas ao mesmo (PINHEIRO, 2006).

No Amazonas, diante do potencial existente para aproveitamento de resíduos gerados pelas indústrias frigoríficas de pescado, foi implantada uma indústria produtora de farinha de peixe, diminuindo-se assim o impacto gerado pelo descarte efetuado. No entanto, essa nova indústria não aproveita o óleo proveniente desse processo devido desconhecem as etapas necessárias para o seu beneficiamento e não possuem estrutura para tal fim, desperdiçando assim um recurso passível de exploração comercial. Ademais, a utilização de fungos da Amazônia para melhoramento da qualidade de óleos de peixe é desconhecida, significando um potencial biotecnológico inédito a ser explorado.

Diante dessas considerações, nesse trabalho se procurou identificar um fungo com grande potencial lipolítico, isolado de substrato amazônico, armazenado na Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Federal do Amazonas e conduzir a aplicação das enzimas lipolíticas produzidas por esse microrganismo sobre óleo obtido a partir de resíduos de peixes amazônicos. O efeito da aplicação do extrato enzimático desse microrganismo no óleo de peixe foi cromatograficamente caracterizado e quantificado, comparando-se o resultado obtido nos óleos enzimaticamente tratados com os óleos sem tratamento enzimático e com o óleo bruto.

Dessa forma, pretende-se diminuir o impacto ambiental gerado pelo descarte dos bio-resíduos de peixe pelos frigoríficos locais e tornar o óleo de peixe amazônico mais atrativo para utilização com fins alimentícios ou farmacêuticos, conforme o efeito da enzima fúngica aplicada.

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS

O termo lipídios (ou lipídeos, ambas as grafias são corretas) abrange uma grande variedade de substâncias com aspecto oleoso ou gorduroso, cujas principais funções são atuarem como componentes estruturais importantes de membranas celulares, isolantes térmicos, impermeabilizantes, mecanismos para ajuste de densidade corpórea ao ambiente circundante e/ou servirem como reserva energética. Encontrados nos organismos vivos animais ou vegetais, geralmente são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, a exemplo do álcoolis, clorofórmio e éteres (VISENTAINER; FRANCO, 2006; NELSON; COX, 2014).

Uma emergente definição vem sendo proposta, na qual consta que como lipídios são considerados os ácidos graxos e seus derivados, e outras substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a esses compostos (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

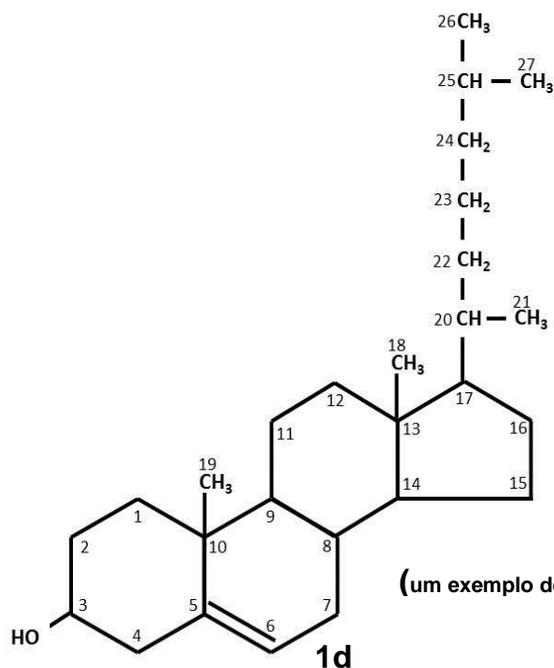
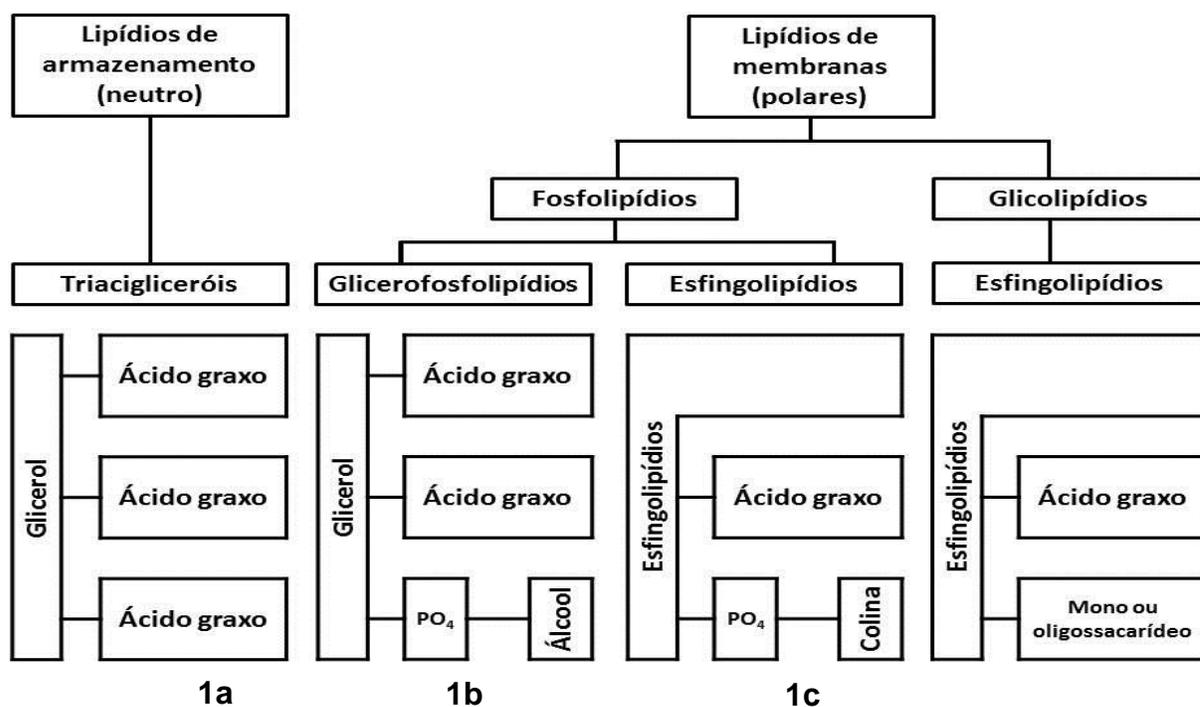
Outros termos mais coloquiais que abrangem os lipídios são óleos e gorduras, diferenciados de acordo com o estado físico (líquido e sólido, respectivamente) destes à temperatura ambiente. No entanto, dependendo da localização geográfica, um óleo na região tropical pode ser uma gordura na região ártica (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

No Brasil, o Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define 20 °C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando os outros componentes com ponto de fusão abaixo desse valor como óleos (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

De acordo com a estrutura química, os lipídios podem ser classificados como:

- monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis (Figura 1a) – diferenciados pela quantidade de ácidos graxos (respectivamente, um, dois e três) ligados ao glicerol;
- ceras
- glicerofosfolipídios (Figura 1b)
- esfingolipídios (Figura 1c)
- esteróis (Figura 1d) – caracterizado pelo núcleo esteroide (formado por quatro anéis fundidos, sendo três com seis carbonos e um com cinco carbonos).

Entre todos os tipos acima mencionados, os triacilgliceróis são os mais abundantes.



### Colesterol

(um exemplo de ESTEROIDES, caracterizado pelo núcleo esteroide)

Figura 1 - Principais classes de lipídios e respectivos constituintes da estrutura química molecular (adaptada de NELSON; COX, 2014)

Apesar dos profissionais da área de saúde preferirem triglicérides ou triglicerídeos como denominação dos triacilgliceróis, esta última está diretamente relacionada à constituição da estrutura molecular desse composto, conforme figura 1a. Verifica-se, portanto, que um

triacilglicerol apresenta-se quimicamente como uma molécula de glicerol cujos átomos de hidrogênio da hidroxila foram substituídos por ácidos graxos (NELSON; COX, 2014; VISENTAINER; FRANCO, 2006).

A maioria dos triacilgliceróis de ocorrência natural são mistos, ou seja, contêm dois ou mais ácidos graxos diferentes ligados ao glicerol (NELSON; COX, 2014).

Entre os vários esteroides, merece destaque o colesterol, substância necessária para a realização de várias funções metabólicas e transportado pelo sangue como lipoproteínas. O colesterol é classificado principalmente pelas densidades apresentadas por suas frações, também utilizadas em separado ou englobadas no termo colesterol total, para medição do índice de colesterol sanguíneo. As frações são lipoproteínas de baixa densidade (*low density protein* – LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (*very-low density protein* – VLDL) e lipoproteína de alta densidade (*high density protein* – HDL). Para reduzir o risco de doença cardiovascular, é importante encontrar o equilíbrio correto entre HDL/LDL e a redução do VLDL e triglicerídeos (NELSON; COX, 2014).

### 2.1.1 – Classificação e nomenclatura dos ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeia hidrocarbonada, variando entre 4 até 36 átomos de carbono na cadeia principal, que podem ou não conter duplas ligações entre os carbonos; podem apresentar ainda anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações de grupos metila (Figura 2) (NELSON; COX, 2014).

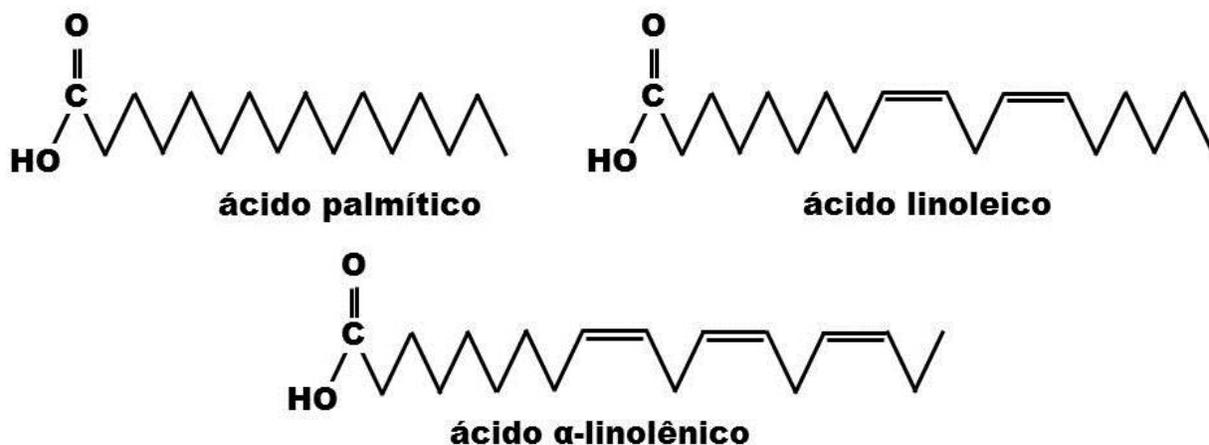


Figura 2 – Estrutura química de alguns ácidos graxos (adaptado de MARTIN et al., 2006; NELSON; COX, 2014).

Na natureza, ácidos graxos insaturados estão tanto esterificados em fosfolipídios ou triacilgliceróis ou ainda, devido à hidrólise parcial, encontram-se na forma livre (BURRI et al., 2012).

Para classificação dessas moléculas, consideram-se os tipos de ligações e, quando presentes duplas ligações, a quantidade dessas entre os carbonos da cadeia principal (NELSON; COX, 2014). Na existência exclusiva de ligações simples, denominam-se ácidos graxos saturados (AGS); quando presente uma dupla ligação, ácidos graxos monoinsaturados (AGMI); caso presentes mais de uma dupla ligação, ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (SANT'ANA, 2012) (Quadro 1).

Uma nomenclatura simplificada para esses compostos especifica o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações, separados por dois pontos (NELSON; COX, 2014) (Quadro 1).

Apesar de regras estabelecidas pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), onde as moléculas são enumeradas a partir do grupo químico característico, aos ácidos graxos são atribuídos nomes comuns amplamente utilizados, relacionados com alguma característica da molécula e que desconsideram a regra formal dessa comissão (Quadro 1).

Especialmente, ácidos graxos insaturados (AGI) são comumente classificados em grupo ômega ( $\omega$ ) ou "n", seguidos de número indicativo referente à posição da primeira dupla ligação contada a partir da terminação metil da cadeia carbônica (Figura 3). Os AGI também apresentam na natureza isomeria geométrica cis-trans, sendo minoritários os isômeros trans.

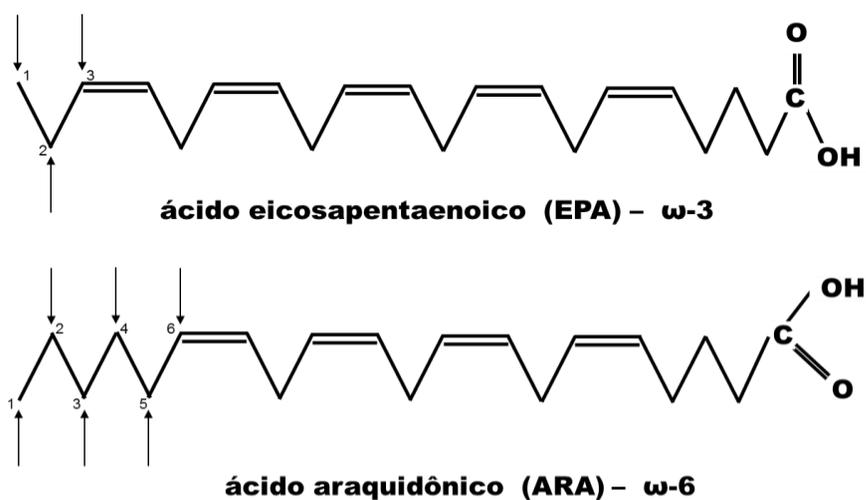


Figura 3 – Exemplo ilustrado da numeração indicativa de posição da primeira dupla ligação dos ácidos graxos polinsaturados de duas diferentes classes (adaptado de MARTIN et al., 2006; NELSON; COX, 2014).

Quadro 1 – Fórmula molecular e nomenclaturas de alguns ácidos graxos

Fórmula	Nomenclaturas		
	IUPAC	comum (derivação)	$\omega$ (ou n)
<i>Exemplos de ácidos graxos saturados</i>			
CH <sub>3</sub> COOH	ácido etanoico	ácido acético	-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	ácido dodecanoico	ácido láurico (do latim <i>laurus</i> , “árvore de louro”)	-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	ácido hexadecanoico	ácido palmítico (do latim <i>palma</i> , “palmeira”)	16:0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	ácido eicosanoico	ácido araquídico (do latim <i>Arachis</i> , gênero de leguminosa)	-
<i>Exemplos de ácidos graxos monoinsaturados</i>			
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ácido cis-9-hexadecenoico	ácido palmitoleico	16:1 ( $\omega$ -7)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ácido cis-9-octadecenoico	ácido oleico (do latim <i>oleum</i> , “óleo”)	18:1 ( $\omega$ -9)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	ácido cis-11-eicosenoico	ácido gadoleico	20:1 ( $\omega$ -9)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	ácido cis-13-docosenoico	ácido erúcico	22:1 ( $\omega$ -9)
<i>Exemplos de ácidos graxos poli-insaturados</i>			
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	ácido cis-7,10,13-hexadecatrienoico	ácido alfa-linolênico	18:3 ( $\omega$ -3)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico	ácido eicosatrienoico	20:3 ( $\omega$ -3)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	ácido eicosapentaenoico	20:5 ( $\omega$ -3)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>6</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico etil éster	ácido docosahexaenoico	22:6 ( $\omega$ -3)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ácido cis-9,12,-octadecadienoico	ácido linoleico (do latim <i>linon</i> , “linho”)	18:2 ( $\omega$ -6)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH=CH) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	ácido araquidônico	20:4 ( $\omega$ -6)

Adaptado de SANT'ANA (2005); SAHENA et al. (2009); NELSON; COX (2014).

### 2.1.2 – Metabolismo dos ácidos graxos

Nos tecidos animais há quatro famílias de ácidos graxos, denominados  $\omega$ -3,  $\omega$ -6,  $\omega$ -7 e  $\omega$ -9 (Quadro 2). Os ácidos linoleico (LA) e linolênico (LNA), pertinentes respectivamente às duas primeiras famílias acima mencionadas, são considerados AGPI essenciais aos seres humanos porque somente são adquiridos através da alimentação e são capazes de serem convertidos a outros AGPI de interesse ao organismo (Quadro 2) (SANT'ANA, 2012).

<b><math>\omega</math>-3</b>	<b><math>\omega</math>-6</b>	<b><math>\omega</math>-7</b>	<b><math>\omega</math>-9</b>
		Palmítico (C16:0)	Estearíco (C18:0)
		↓	↓
		<b><math>\Delta^9</math> – dessaturase</b>	
$\alpha$ – linolênico (LNA) (C18:3)	Linoleico (LA)	Palmitoleico (C16:1)	Oleico (C18:1)
↓	↓	↓	↓
		<b><math>\Delta^6</math> – dessaturase</b>	
Estearidônico (C18:4)	$\gamma$ – linolênico (LNA) (C18:3)	C16:2	C18:2
↓	↓	↓	↓
		<b>Elongase</b>	
Eicosatetraenoico C20:4	Dihomo- $\gamma$ -linolênico (C20:3)	C18:2	C20:2
↓	↓	↓	↓
		<b><math>\Delta^5</math> – dessaturase</b>	
Eicosapentaenoico (EPA) (C20:5)	Araquidônico (C20:4)	$\gamma$ -linolênico (LNA) C18:3	Dihomo- $\gamma$ -linolênico C20:3
↓	↓	↓	↓
		<b>Elongase</b>	
Docosapentaenoico (C22:5)	Docosatetraenoico C22:4	Dihomo- $\gamma$ -linolênico C20:3	C22:3
↓	↓	↓	↓
		<b>Elongase</b>	
C24:5	C24:4	C22:3	C24:3
↓	↓	↓	↓
		<b><math>\Delta^6</math> – dessaturase e <math>\beta</math> – oxidação</b>	
Docosahexaenoico (DHA) (C22:6)	Docsapentaenoico C22:5	C22:4	C22:4

Quadro 2 – Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de SANT'ANA, 2012; SAHENA et al., 2009).

Na ausência desses AGPI essenciais, o homem e demais animais demonstram capacidade de sintetizar alguns ácidos graxos. Essa síntese pode ser efetuada a partir de carboidratos e aminoácidos, em uma síntese chamada “de novo” a partir da acetil coenzima A

(acetil-CoA), pela ação de uma enzima chamada ácido graxo sintetase, originando o ácido palmítico (C16:0). Esse ácido, pela ação de elongases, responsáveis pelo aumento da cadeia, pode originar o ácido esteárico (C18:0), todos saturados (SANT'ANA, 2012).

No entanto, o organismo necessita de ácidos graxos insaturados para vários processos fisiológicos (Figura 4). Através do mecanismo de dessaturação (Quadro 2), facilitado por enzimas denominadas dessaturases ou acetil-CoA dessaturases, é possível a introdução de insaturações (do tipo duplas ligações) nesses ácidos graxos saturados (SANT'ANA, 2012).

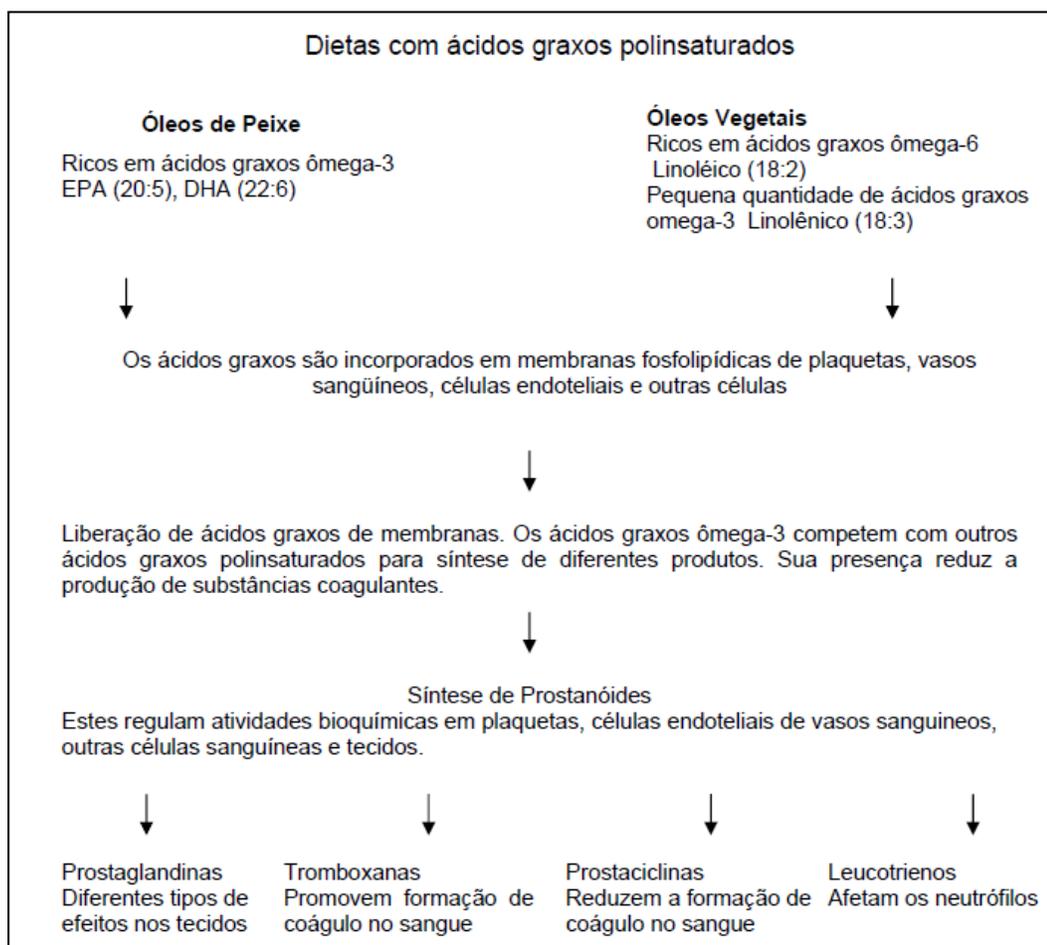


Figura 4 – Metabolismo e importância dos ácidos graxos poli-insaturados para a fisiologia dos homens (extraída de PACHECO, 2005).

A maioria dessas reações ocorre no retículo endoplasmático liso. Poucas, predominantemente encurtamento de cadeias, ocorrem nos peroxissomos. As posições da cadeia carbônica para introdução dessas ligações dependem das dessaturases atuantes (NELSON; COX, 2014).

Apesar da possibilidade de conversão do LNA em EPA e DHA, é mais recomendada a ingestão direta desses últimos porque a enzima responsável pelo processo apresenta baixo quantitativo em humanos, resultando em baixo índice de conversão, ligeiramente mais eficiente em mulheres (WARD; SINGH, 2005; CANDELA et al., 2011). Como exemplo, foram apontados os seguintes índices de conversão do LNA em EPA/DHA, respectivamente: aproximadamente 7,0/0,013% (GOYENS et al., 2005); 0,3/menos que 0,01% (HUSSEIN et al., 2005) e 5-10/2-5% (CANDELA et al., 2011).

### **2.1.3 – Importância fisiológica e nutricional dos ácidos graxos poli-insaturados**

Nos anos 1970, um pioneiro estudo que procurava elucidar a relação entre doenças coronarianas e os componentes da dieta de esquimós *inuits* e dinamarqueses, atribuiu a baixa incidência dessas doenças em *inuits* devido o elevado consumo de peixes, conseqüentemente, ácidos graxos  $\omega$ -3, em quantidade cinco vezes superior quando comparado aos dinamarqueses (SANT'ANA, 2012).

Atualmente, várias pesquisas apontam efeitos fisiológicos benéficos relacionados à ingestão de AGPI  $\omega$ -3. Esses efeitos são explicados pela alteração ocorrida no metabolismo zicosanoide do sistema circulatório, que permite a formação de prostaglandinas consideravelmente menos eficientes na indução da agregação plaquetária quando comparadas aquelas dos AGPI  $\omega$ -6. Entre esses efeitos, podem ser enumerados (SAHENA et al., 2009; TUR et al., 2012):

- redução dos triglicérides do plasma
- inibição da agregação plaquetária
- diminuição da viscosidade sanguínea
- diminuição da pressão sanguínea
- redução da arteriosclerose, artrites, psoríase, asma e tumores.

Discute-se ainda o papel preventivo contra o câncer devido os AGPI originarem carbonilas livres, consideradas tumorais.

Em nível celular, atuam na manutenção da estrutura, funções e fluidez das membranas celulares. São envolvidos na regulação de proteínas transportadoras, ATPase e complexos de histocompatibilidade, na resposta imune e adaptação ao frio. Regulam a expressão de alguns

genes, incluindo aqueles codificadores da ácido graxo sintase, óxido-nítrico sintase e proteínas dos canais de sódio (SAHENA et al., 2009; BURRI et al., 2012).

Nas plantas, os AGPI são transformados por uma variedade de enzimas em moléculas oxigenadas (desde simples aldeídos até oxilipinas), que por sua vez atuam como agentes anti-infecciosos, reguladores, hormonais e quimiostáticos; exercem ainda papel no odor e gosto desses vegetais (SAHENA et al., 2009).

Nos humanos, a relação entre o metabolismo dos AGPI e a função eicosanoide tornou-se importante quando se descobriu que o araquidonato é o precursor de prostaglandinas. Eicosanoides é um diverso grupo de hormônios incluindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os hormônios eicosanoides são fundamentais para a manutenção da homeostase e são relacionados a importantes condições fisiológicas e patofisiológicas (SAHENA et al., 2009).

Existem evidências importantes relacionando AGPI  $\omega$ -3 à prevenção e ao tratamento da artrite reumatoide e outras condições inflamatórias. Pelo aumento do consumo diário de 30g de peixe gordo (8% de lipídios no filé), diminui em 49% o risco dessas patologias, além de propiciarem redução das dosagens farmacológicas necessárias ao tratamento (McMANUS et al., 2011).

Doenças cardiovasculares podem ser evitadas consumindo-se peixe assado ou cozido ao menos uma ou duas vezes por semana. Os riscos de morte foram diminuídos em 20% para arritmia, 36% para doenças coronarianas e 17% para mortalidade em geral (McMANUS et al., 2011). A meta-análise conduzida por Djoussé et al. (2012) também aponta o menor risco de problemas cardíacos associado ao consumo de ácidos graxos  $\omega$ -3 marinhos.

Para diabetes tipo II e albuminúria (indicador de dano renal), observou-se redução associada ao grande consumo de peixes e frutos marinhos. A mesma associação foi verificada para os níveis de triglicérides na diabetes tipo I (McMANUS et al., 2011). Outros trabalhos apontam resultados similares para diabetes tipo II em chinesas (VILLEGAS et al., 2011).

Resultado contraditório às afirmações acima foi apontado por Kaushik et al. (2009). De acordo com meta-análise conduzida por Wallin et al. (2012), os resultados heterogêneos apontadas por essas pesquisas deve-se à condições geográficas, recomendando a permanência das atuais recomendações da saúde pública sobre o consumo de peixe.

Importantes resultados, favoráveis ao consumo de peixes ou derivados por indivíduos em sobrepeso ou obeso, foram apontados pelos trabalhos de Ramel et al. (2010) e McManus et al.

(2011). Ramel et al. (2010) atestou redução de pressão e gordura em consumidores de peixes e derivados, enquanto McManus et al. (2011), em trabalho de revisão, apresentou várias evidências.

O ácido araquidônico (ARA) é o mais abundante AGPI em humanos, presente em diversos órgãos e tecidos, e o principal  $\omega$ -6 existente no cérebro. Adicionalmente, o ARA é precursor direto de vários eicosanoides reguladores do metabolismo lipoprotéico, reologia sanguínea, função leucocitária e ativação de plaquetas (WARD; SINGH, 2005).

Ensaio clínico de suplementação com óleo de algas rico em DHA resultou em modificações potencialmente benéficas em alguns marcadores de risco cardio-metabólico: quanto ao tamanho das partículas, nos transportadores do colesterol ocorreu diminuição da VLDL e aumento das LDL e HDL; quanto à concentração, diminuição do VLDL e dos triglicerídeos (TAG) totais; diminuições na pressão sanguínea, ritmo cardíaco e stress oxidativo. Todos esses efeitos são comparáveis aos observados com óleo de peixe (TUR et al., 2012).

Quando administradas doses moderadas de óleo de peixe (3g/dia, contendo 1,2:0,7:0,3, g:g:g, respectivamente  $\omega$ -3 total:DHA:EPA) durante 12 semanas de tratamento de pacientes com acidente isquêmico, não se observou efeito algum na disposição ou biomarcadores cardiovasculares desses indivíduos. As prováveis causas desse resultado são dosagem insuficiente, tratamento de curto prazo e/ou oxidação dos óleos de peixe utilizado (POPPIT et al., 2009).

Pesquisas apontam que o excesso ou a deficiência quanto ao consumo de AGPI  $\omega$ -3 durante a gravidez e amamentação causam transmissão neural deficiente ao longo da via auditiva, retardo no crescimento e tendência de aumento da mortalidade pós-natal. Portanto, evidencia-se a importância do consumo moderado (SAHENA et al., 2009).

Até o momento, as pesquisas não são unânimes quanto à afirmação do papel positivo da ingestão de óleo de peixe no desenvolvimento cerebral e nas funções visuais (MAKRIDES et al., 2010; SWANSON et al., 2013). Esse mesmo quadro contraditório é verificado para a diminuição dos sintomas da doença de Alzheimer (SWANSON et al., 2013). No entanto, sabe-se que o DHA pode contribuir na fertilidade masculina devido associações positivas entre a alta concentração desse composto no sêmen e a maior motilidade dos espermatozoides (WARD; SINGH, 2005).

Adicionalmente, AGPI  $\omega$ -3 podem atuar como protetores contra o desenvolvimento de doenças alérgicas (asma, febre do feno, eczema tópico), principalmente durante a gravidez e primeira infância, devido sua habilidade em inibir a produção de mediadores inflamatórios (FURUHJELM et al., 2009; VAN DEN ELSEN et al., 2012). Quando manifestadas as doenças alérgicas, verificou-se uma relação inversa entre o consumo de peixe e a sensibilização alérgica em mulheres, mas não em homens (SCHNAPPINGER et al., 2009).

Quanto à prevenção contra o câncer através do consumo de AGPI  $\omega$ -3, apesar de algumas evidências positivas, ainda não se tem afirmações conclusivas devidas ao baixo número amostral e a falta de uniformidade metodológica das pesquisas até hoje implementadas (McMANNUS et al., 2011).

Devido toda a importância fisiológica e nutricional acima mencionada, diversas entidades, em vários continentes, estabeleceram recomendações relativas ao consumo de ácidos graxos.

No Oriente, a *European Food Safety Agency ou Authority* (EFSA) propõe 250 mg de EPA+DHA como o ingestão diária recomendável para adultos (TUR et al., 2012).

No Ocidente, a *American Hearth Association* (AHA) recomenda para a população em geral o consumo de peixes (125 g) ao menos duas vezes por semana (uma porção de peixe gordo, outra porção de peixe magro). Tal quantitativo implicará em um consumo de EPA+DHA próximo a 430mg/dia (TUR et al., 2012).

A *World Health Organization* (WHO) indica entre 300 e 500mg/dia. A *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL) aconselha 500mg/dia. No entanto, a *North Atlantic Treaty Organization* (NATO) aponta 800mg/dia (TUR et al., 2012).

A AHA também indica ingestão EPA+DHA equivalente a 1g de EPA+DHA de peixe ou óleo de peixe para indivíduos com algum histórico de doença cardiovascular ou ainda, 2-4g como suplemento para aqueles com alto índice de triglicerídeos no sangue (TUR et al., 2012).

A *World Health Organization* (WHO) recomenda para a população em geral o consumo regular (1 ou 2 vezes por semana) de peixe (aproximadamente 200-500 mg de EPA+DHA). Vegetarianos ou não consumidores de peixe devem assegurar a ingestão adequada de fontes vegetais contendo LNA, devido o papel como precursor (0,5 – 20%) desses ácidos graxos (TUR et al., 2012).

Na intenção de atingir as quantidades acima mencionadas, recomenda-se principalmente o consumo de fonte animal, com destaque para o peixe, devido o baixo índice de conversão do LNA (abundante em vegetais) em EPA e DHA (CANDELA et al., 2011).

Para a escolha de suplementos de EPA ou EPA+DHA de qualquer fonte animal ou vegetal, visando à redução de problemas cardiovasculares, deve-se levar em conta três indicações da *Academy of Nutrition and Dietetics Evidence Analysis Library* (CUNNINGHAM, 2012):

- pacientes sem doença coronariana – não há estudos que atestem os efeitos sobre a suplementação de  $\omega$ -3 nesses indivíduos;
- pacientes com doença coronariana, mas sem quadros de angina ou implante de equipamento regulador da função cardíaca – suplementação de 850 mg/dia de EPA e/ou DHA reduziu em 45% o risco de morte súbita;
- pacientes com doença coronariana, adicionalmente apresentando angina ou implante de equipamento regulador da função cardíaca – suplementos são contra-indicados.

#### **2.1.4 – Recomendações quanto à ingestão proporcional de ácidos graxos poli-insaturados**

Nos primórdios da história da humanidade, a dieta era predominantemente pobre em calorias (20-25%) e baixo índice de gorduras saturadas (<6%), resultando em uma proporção de  $\omega$ -6: $\omega$ -3 aproximadamente igual a 1-2:1. Devido o atual conhecimento da relevância do DHA na fisiologia humana, acredita-se que essa situação pré-histórica tenha contribuído para o desenvolvimento cognitivo e cerebral da espécie (CRAWFORD et al., 1999).

As mudanças socioeconômicas ocorridas ao longo dos anos, com destaque para a Revolução Industrial, caracterizam atualmente a dieta humana como altamente calórica, com elevado índice de gorduras saturadas (>10%), alto quantitativo de AGPI  $\omega$ -6 e baixo quantitativo de  $\omega$ -3. Essa característica resulta em uma razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 nutricionalmente inadequada (CANDELA et al., 2011).

Para a constatação dos efeitos benéficos, recomenda-se que a razão da ingestão entre essas famílias de AGPI seja ao menos entre 4-5:1 (MARTIN et al., 2006), preferencialmente entre 1-2:1 (SIMOPOULOS, 2004). Todas essas recomendações estão bem abaixo do atual índice (razão 20-30:1), o que pode acarretar ou intensificar sintomas de vários problemas fisiológicos (CANDELA et al., 2011).

Outro fator contribuinte para esse desequilíbrio foi o interesse pelo aumento da produção e/ou produtividade. Isso acarretou o uso de alimentação alternativa, em sua maioria ração industrialmente produzida. Essas rações, elaboradas utilizando grande quantidade de ingredientes vegetais ricos em  $\omega$ -6, apresentando excessiva quantidade energética e associada ao confinamento adotado pelo sistema, propiciaram perdas quantitativa e proporcional de  $\omega$ -3 em alimentos naturalmente ricos nesse composto – a exemplo de carnes vermelhas, peixe e frangos (SIMOPOULOS, 2009; CANDELA et al., 2011).

### **2.1.5 – Fontes para obtenção de ácidos graxos insaturados**

Ácidos graxos insaturados (AGI), especialmente  $\omega$ -3, podem ser encontrados em algas, bactérias, fungos, plantas e animais. Industrialmente AGI, são obtidos a partir de sementes e algumas fontes marinhas.

Entre as algas, espécies de *Nitzschia*, *Nannochloropsis*, *Navicula*, *Phaeodactylum* e *Porphyridium* são recomendadas para a produção de EPA. Apresentam como desvantagem a maior parte desse ácido graxo estar dissociada do glicerol ou, nas espécies que apresentam essa associação, necessitam de equipamento regulador de luminosidade devido serem fototróficas obrigatórias. Devido essa necessidade, oneram os gastos financeiros, tornando essa fonte não atrativa para produção de EPA em nível industrial (WARD; SINGH, 2005; MARTINS et al., 2013).

Uma alternativa para a minimização desses custos seria a utilização de algas heterotróficas, como espécies de *Chlorella*, *Nitzschia*, *Cyclotella* e *Tetraselmis*, capazes de crescerem em fermentadores convencionais devido a substituição da fotossíntese para produção de energia por fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura, como exemplo a glicose (WARD; SINGH, 2005; WANG et al., 2014).

Óleo da microalga *Schizochytrium* sp. fornece quantidade considerável de ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5  $\omega$ -6). Ressalta-se que consumidores desse produto tiveram aumento da concentração plasmática de ARA, ácido adrênico, DPA e DHA plasmáticos; aumento de DPA e DHA em fosfolipídios dos eritrócitos, aumento dos colesterolis LDL e HDL e aumento da atividade do Fator VII na coagulação (TUR et al., 2012).

Existem fungos do gênero *Mortierella* capazes de produzir ARA associado ao glicerol (OGAWA et al., 2012; DEKYUKHINA et al., 2014), no entanto a produtividade obtida é

típicamente baixa (máximo de 0,2g/L/dia), apesar de *Mortierella alpina* atingir produtividade máxima de 1,2g/L/dia (WARD; SINGH, 2005).

Fontes bacterianas como *Photobacterium profundum*, *Shewanella* e *Moritella marina* (também denominada *Vibrio marinus*), podem ser utilizadas. Algumas culturas apresentam EPA e DHA em quantitativo superior a 25% do total de ácidos graxos presentes na membrana celular. Devido a maiorias dessas espécies bacterianas requererem para cultivo baixas temperaturas e alta pressão, tornam-se desprezíveis para a produção comercial. Apesar disso, devido facilitarem o entendimento do mecanismo bioquímico e genético para a síntese de AGPI, significam potencial fonte de material genético passível de transferência para organismos com potencial industrial (WARD; SINGH, 2005; EL RAZAK et al., 2013; BIANCHI et al., 2014; EL RAZAK et al., 2014).

Espécies dos fungos *Mortierella*, *Mucor* e *Cunninghamella* podem produzir óleo com  $\gamma$ -LNA em concentrações entre 15-25% dos ácidos graxos totais. As taxas de produtividade obtidas em fermentações submersa e sólida foram 0,6g/L/dia e 1,3g/Kg substrato/dia, respectivamente, em curtos períodos (10 dias). Essa produtividade pode ser otimizada quando se utiliza o rompimento da célula fúngica (WARD; SINGH, 2005; SALUNKE et al., 2014; VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014).

AGPIs também são oriundos de fontes vegetais e podem apresentar importantes benefícios à saúde do consumidor (EGERT et al., 2009; LEMAITRE et al., 2009; SIOEN et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009; MALGEUNSINAE et al., 2010).

Somente o LNA proveniente do consumo de vegetais fontes de AGPIs  $\omega$ -3 diminuiu o risco de demência leve entre os idosos coreanos (MALGEUNSINAE et al., 2010).

Quando adequadamente enriquecidos, produtos de consumo diário ou derivados de origem animal são importantes veículos de ingestão de AGPI  $\omega$ -3. Somente para os derivados cárneos foram observados efeitos adversos - diminuição da qualidade sensorial e o tempo de vida útil (TUR et al., 2012).

Um animal marinho que atualmente aparece como importante fonte de AGPI é o krill (*Euphausia superba*). Pertinente ao grupo dos zooplânctons, é um crustáceo similar ao camarão, mas que não é tradicionalmente consumido por humanos. A alimentação desses animais consiste de algas e ocorre em águas oceânicas profundas. São apontados como o maior recurso alimentício

de animais maiores, como peixes, focas e baleias (BURRI et al., 2012; CUNNINGHAM, 2012; TUR et al., 2012).

No mercado, já existem cápsulas com óleo de krill, que apresenta entre 30–65% dos ácidos graxos incorporados nos fosfolipídios (CUNNINGHAM, 2012). Pesquisas apontam que esse óleo em doses menores ou iguais aquelas utilizando óleo de peixe demonstraram efeito mais significativo na redução da glicemia, triglicerídeos e LDL (TUR et al., 2012).

## **2.2 - ÁCIDOS GRAXOS EM MÚSCULO E DERIVADOS DE PEIXE**

Óleos de peixe são obtidos principalmente de peixes capturados para tal propósito (como exemplo os peixes marinhos anchova, sardinha, cavala e savelha) ou são subprodutos da fabricação de farinha de peixe. Também podem ser oriundos de resíduos do processamento de indústrias de pescado (RAMEL et al., 2008; FIORI et al., 2012; MENEGAZZO et al., 2014).

Quando somente o filé é comercializado, restam resíduos importantes como matéria-prima para a extração de óleo de peixe, como exemplo a cabeça, pele, espinhas e vísceras (FIORI et al., 2012; MENEGAZZO et al., 2014).

Para uma categorização *premium* do óleo de peixe, a qualidade e frescor da matéria-prima são fatores importantes na preparação desse produto. Quanto mais fresco, menor a ação enzimática e bacteriológica sofrida, mantendo-se assim a conservação e melhor qualidade. Particularmente para o óleo de peixe, existe uma relação inversa entre a qualidade do óleo e o conteúdo de ácidos graxos livres, ou seja, quanto mais alto o conteúdo de ácidos graxos livres no óleo, menor a qualidade e, conseqüentemente, o valor comercial (AIDOS et al., 2003).

Industrialmente, de forma majoritária, esses óleos são extraídos pelo “processo de redução úmida”, que consiste de três etapas básicas: cocção, prensagem e centrifugação (FIORI et al., 2012).

Independente da origem, esses óleos despertam grande interesse devido aos AGPI presentes nesse produto conferirem efeitos fisiológicos e terapêuticos importantes, apesar do custo de purificação do óleo bruto ser economicamente elevado (SIJTSMA; SWAAF, 2004; PINHEIRO, 2006; RAMEL et al., 2008).

Quando refinados e desodorizados, consistem principalmente de triacilgliceróis com uma complexa composição em ácidos graxos, variável conforme a localização geográfica,

estação do ano, fatores dietéticos e origem da espécie (selvagem ou cultivado) (MENEZZO et al., 2014).

Esses óleos são prontamente incorporados ao coração e membranas do músculo esquelético e podem reduzir a demanda do corpo inteiro ou do miocárdio por oxigênio durante exercícios físicos, sem afetar o desempenho (TUR et al., 2012).

Normalmente, cada cápsula de óleo de peixe apresenta o quantitativo de 180-300 mg de EPA e 120-200 mg de DHA (CUNNINGHAM, 2012).

Apesar do produto purificado indubitavelmente ser considerado a melhor opção para consumo, a ingestão de iguais quantidades de EPA+DHA a partir de peixe gordo ou cápsulas de óleo, respectivamente semanalmente e diariamente, foram igualmente efetivas para o enriquecimento de  $\omega$ -3 no sangue (HARRIS et al., 2007).

Uma dieta restritiva (-30% do requerimento estimado) utilizando o consumo de peixes gordos ou cápsulas de óleo de peixe, aplicada a indivíduos em sobrepeso de ambos os sexos, atestou a maior redução da pressão sanguínea diastólica e menor quantitativo de DHA na membrana eritrocitária dos consumidores desses produtos quando comparado aos consumidores de peixe magro e grupo controle (RAMEL et al., 2010).

A redução de peso em jovens homens em sobrepeso ou obesos, quadro que aumenta o risco de outras doenças crônicas, foi obtida pela inclusão de peixes magros como parte de outra dieta restritiva de energia (McMANUS et al., 2011).

Na verificação dos efeitos do óleo de peixe encapsulado comercialmente disponível sobre a função endotelial, consumidores de dietas altamente calóricas ingeriram esse produto (1g de EPA+DHA = grupo teste) ou placebo (cápsulas de lactose = grupo controle) como suplemento logo após as refeições. Enquanto a função endotelial dos indivíduos que ingeriram placebo foi significativamente alterada, no grupo teste ela permaneceu imutável (FAHS et al., 2010).

Outra pesquisa, conduzida com homens japoneses saudáveis, de meia-idade, que naturalmente apresentavam alto consumo de peixe, demonstrou interessante resultado sobre os parâmetros hematológicos (níveis de TAG plasmático, colesterol, VLDL, viscosidade sanguínea ou composição de ácidos graxos nos fosfolípidios de plasma e hemácias). Durante quatro semanas, logo após as refeições, eram consumidas cinco cápsulas de óleo de peixe (1260 mg de EPA + 540 mg de DHA – grupo teste) ou placebo (óleo de oliva – grupo controle). Os resultados não demonstraram qualquer alteração, sugerindo que a suplementação com cápsulas de óleo de

peixe somente é efetiva em indivíduos que apresentem baixo consumo de peixe (WATANABE et al., 2009).

Os chineses, tradicionais consumidores de vegetais e grãos integrais, atualmente apresentando incremento maior de recurso alimentício animal na dieta devido mudanças no estilo de vida, acreditam que a gordura animal apresenta impacto negativo na saúde. Adicionalmente, crêem que o benefício do consumo de peixe é somente atribuído aquelas espécies com alto índice protéico e baixo índice lipídico, preferencialmente de água doce (ZHANG et al., 2010).

No entanto, pesquisa com homens dislipidêmicos (portadores de níveis anormais de lipoproteínas no sangue) demonstrou que a ingestão de peixe marinho gordo (nesse caso, salmão) favoravelmente aumentou o índice de EPA e DHA, além de reduzir significativamente os níveis séricos dos marcadores de risco de doenças cardiovasculares (HDL-colesterol e interleucina-6) desses indivíduos (ZHANG et al., 2010).

Em relação aos AGPI na forma de fosfolipídios, um subproduto da indústria pesqueira considerado rica fonte desse elemento, especialmente quando proveniente do salmão, é o “*fish roe*”, termo que abrange tanto óvulos quanto os ovários repletos de óvulos dos frutos do mar, incluindo os peixes (BURRI et al., 2012).

O comparativo de determinada espécie de peixe apresenta diferente conteúdo de ácidos graxos ou gorduras totais conforme a procedência (cultivados ou selvagens) devido o uso de fontes vegetais na elaboração das rações. Na maioria das vezes, os peixes cultivados apresentam maior conteúdo de gordura total e frações AGPI quando comparados aos peixes selvagens da mesma espécie (BURRI et al., 2012; FIORI et al., 2012).

### **2.2.1 – Perfil dos ácidos graxos em peixes**

O perfil de ácidos graxos em peixes (Quadros 3, 4 e 5) é bastante influenciado pelos ácidos graxos provenientes da dieta.

Aidos et al. (2002) verificaram variação sazonal no perfil de ácidos graxos de óleos brutos extraídos de filé e resíduos de arenque *Clupea harengus*, peixe marinho pelágico categorizado como peixe gordo.

Em outra pesquisa, Aidos et al. (2003) compararam o efeito da temperatura (5 e 15 °C) e do tempo de estocagem (0, 8, 24, 48 e 72 h) no perfil de ácidos graxos de resíduos dessa espécie, utilizados como matéria-prima para extração de óleo. Verificou-se que resíduos desse peixe

apresentam alto conteúdo de ácidos graxos monossaturados (475 g/kg), com destaque para o ácido docosenoico – 22:1 (197 g/kg) e ácido eicosenoico – 20:1 (130 g/kg). Já os AGPI somam 177 g/kg, sendo 49 g/kg para EPA e 66 g/kg para DHA; adicionalmente, o conteúdo desses últimos não foi afetado pela temperatura ou tempo (Quadro 5).

Por sua vez, os óleos extraídos desse peixe, apesar de também serem ricos em ácidos graxos monossaturados (447 g/kg), apresentaram maior quantitativo de EPA (53 g/kg) e DHA (67 g/kg) quando comparados à matéria-prima. Ressalta-se ainda que tais quantitativos foram maiores quanto mais tempo de armazenamento (72 h) apresentava a matéria-prima. Atribui-se esse aumento de AGPI a ruptura da membrana celular ocorrida no processo de deterioração, o que libera os DHA ali existentes. Já a maior temperatura de estocagem (15 °C) da matéria-prima é favorável à liberação do EPA associado aos triacilgliceróis, presentes principalmente em depósitos de gordura (AIDOS et al., 2003) (Quadro 5).

Para consumo, a maioria dos pratos culinários a base de peixe utilizam procedimentos de cocção (assado ao forno, assado na brasa, frito) que imprimem efeitos não-apreciáveis no conteúdo de EPA e DHA quando comparados ao peixe cru (NEFF et al, 2014).

No Brasil, pesquisas sobre o perfil lipídico de peixes são crescentes.

Em artigo de Castro et al. (2007), utilizaram-se duas espécies de ocorrência mundial (carpa comum – *Cyprinus carpio* e tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus*) e um híbrido “tambacu” (derivado do tambaqui – *Colossoma macropomum* e pacu – *Piaractus mesopotamicus*), todos de crescente interesse para a piscicultura continental. O objetivo era avaliar o perfil lipídico de exemplares com e sem pele, frescos e durante intervalos de tempo mantidos sob congelamento, assim como verificar os efeitos de tratamentos térmicos (assado e cozido) nos mesmos.

Como resultado, verificou-se que a retirada da pele foi importante para a redução do conteúdo lipídico total, apesar da composição percentual de ácidos graxos ser pouco afetada por esse procedimento e pelos métodos de cozimento empregados (CASTRO et al., 2007).

Por sua vez, Visentainer et al. (2007) detectaram índices significativos de  $\omega$ -3, principalmente DHA, em espécies marinhas capturadas em Santos, litoral do estado de São Paulo. Em relação ao EPA, merecem destaque xerelete (*Caranx crysus*), sardinha da lage (*Opisthonema oglinum*), sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*), savelha (*Brevoortia aurea*) e anchova

(*Pomatomus saltatrix*). Comparando os valores obtidos com espécies de origem antártica, verificou-se maior quantitativo total de  $\omega$ -3 nas espécies da costa brasileira.

Estudos sobre o perfil de ácidos graxos em peixes amazônicos tem conquistado mais importância ao longo dos últimos anos.

Inhamuns; Franco (2001), verificaram os tipos de ácidos graxos existentes no filé (Quadro 3) e na cavidade ocular do mapará (*Hypophthalmus* sp.), em dois diferentes períodos do ano (seca e cheia). Para o mapará, não foi detectada diferença significativa entre os períodos para qualquer uma das partes analisadas.

Um peixe amazônico de grande importância comercial, tanto para o varejista quanto para o piscicultor, o matrinxã (atualmente catalogado como *Brycon amazonicum*, anteriormente *Brycon cephalus*) teve o conteúdo de ácidos graxos investigado. Quando comparados os trabalhos de Moreira et al. (2001) e Almeida et al. (2009), os resultados obtidos são bastante discrepantes e, em exemplares da natureza, apresentam grande flutuação nesse índice (Quadro 3). Provavelmente essa diferença seja explicada pela composição nutricional da alimentação fornecida/obtida pelos exemplares utilizados em cada trabalho.

Outro peixe comercial muito importante, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi investigado quanto aos ácidos graxos extraídos do filé (ALMEIDA; FRANCO, 2006; OLIVEIRA, 2008).

Almeida; Franco (2006) determinaram os ácidos graxos existentes em exemplares de *C. macropomum* provenientes do Rio Amazonas (nos períodos de cheia e seca) e da piscicultura em viveiros, todos no estado do Amazonas (Quadro 3). Os resultados obtidos apontaram os peixes selvagens como ideais para a adequada ingestão de EPA e DHA, além dessa espécie ser melhor fonte de AGPI de cadeia longa, quando comparado ao tucunaré (*Cichla* sp.)

A pesquisa conduzida por Oliveira (2008) buscou quantificar os ácidos graxos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado em sistema semi-intensivo no estado de Roraima. Os resultados apresentaram destaque para ácidos com 18 átomos de carbono (Quadro 3). Particularmente para LA, LNA, AA, EPA e DHA, os valores foram bastante diferentes daqueles obtidos por Almeida; Franco (2006).

### **2.3 – PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO REFINADO**

Óleos de peixe, quando brutos, apresentam impurezas, outros compostos e materiais coloidais – ácidos graxos livres, esteroides, vitaminas, pigmentos, carboidratos, proteínas e produtos da degradação desses compostos – que o tornam inadequado para consumo humano. Pelo processo de refino, como é denominado o processo de purificação, busca-se remover os componentes não-triacilgliceróis que afetam a estabilidade desse óleo (MORAIS et al., 2001; CREXI et al., 2007; MENEGAZZO et al., 2014).

Quimicamente, nesse processo incluem-se etapas denominadas degomagem, neutralização, lavagem, clarificação e desodorização (MORAIS et al., 2001; CREXI et al., 2007) cujas finalidades são apresentadas a seguir:

*Degomagem* – visa a remoção, eliminação ou inativação de fosfolipídios e substâncias afins, sabões e íons metálicos;

*Neutralização* – os ácidos graxos livres são neutralizados com solução aquosa de álcali em excesso e eliminados com hidratação;

*Lavagem* – separa os resíduos de processo por centrifugação ou decantação, com posterior secagem da água;

*Clarificação* – visa a remoção de pigmentos, produtos de oxidação, metais, entre outros;

*Desodorização* – realizada para obtenção de um óleo praticamente inodoro e insípido.

## **2.4 – PIRACATINGA**

A família Pimelodidae compreende um grande grupo de siluriformes (peixes com ventre achatado) exclusivos de água doce, genericamente denominados bagres (SÁNCHEZ et al., 2000). Entre os gêneros pertinentes a esse grupo, está o monotípico *Calophysus*, representado por *Calophysus macropterus* (Figura 5), vulgarmente conhecido como piracatinga, pintadinho, simi, mota, blanquillo ou zamurito (RAMIREZ-GIL et al., 1998; SANTOS et al., 2006).

Tem o corpo alongado e desprovido de escamas. A cabeça é pequena e a boca proporcionalmente grande. Apresenta uma coloração cinza prateado uniforme, com dorso mais escuro e com pequenas manchas escuras por todo o corpo. A cabeça e as nadadeiras, exceto a nadadeira adiposa, são de tonalidades mais escuras. Possui duas placas de dentes viliformes e dentes incisivos. Não apresenta espinhos nas nadadeiras, sendo a adiposa bastante comprida.

Espécie de médio porte, atinge 45cm de comprimento total e 1 kg de peso (SOARES et al., 2008).

Essa espécie é encontrada dispersa pela Bacia Amazônica e no Rio Orinoco. É um peixe bentônico e habita lagos, paranás e rios de águas brancas, claras ou pretas. É oportunista, onívora e muito voraz, ingerindo restos de peixe e outros animais mortos, além de outros itens de origem vegetal. É chamada “o urubu da água”, devido a similaridade com o comportamento alimentar da ave. Tem hábito migratório, facilitado pela adaptabilidade fisiológica, importante para exploração de ambientes com características diversas (RAMIREZ-GIL et al., 1998; SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2008).

Provavelmente é uma espécie de desova total, com reprodução ocorrendo na época da enchente. Apresenta alta taxa de crescimento, curto período de vida e alta mortalidade natural (PÉREZ; FABRÉ, 2002; 2009; SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2008).



Figura 5 – *Calophysus macropterus* (Imagem gentilmente cedida por Antônio Fábio Lopes de Souza – Laboratório de Tecnologia do Pescado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 2014).

Apresenta importância comercial em ambos os sistemas – Amazonas e Orinoco (RAMIREZ-GIL et al., 1998), principalmente na Colômbia e Venezuela, onde é bastante apreciada (SANTOS et al., 2006; PÉREZ; FABRÉ, 2009). Apesar de não ser uma espécie consumida pelos ribeirinhos do Amazonas, sua pesca é abundante e praticada durante o ano

inteiro. Para sua pesca, os ribeirinhos utilizam restos de jacarés e boto, caracterizando como predatória a caça desses animais para tal finalidade (SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2008).

Os registros de quantidade total desembarcada da piracatinga no Amazonas são variáveis, crescentes na região do Alto Solimões (SOARES et al., 2008; BATISTA et al., 2012). Essa espécie é utilizada pelos frigoríficos locais, durante o período de chuva, como substituta de outras espécies de bagres de maior importância comercial, principalmente para a produção de filés (LOZANO; FABRÉ, 2002).

Quadro 3 – Perfil de ácidos graxos de peixes de água doce capturados no Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
	saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
	12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
cachara <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (selvagem, tecido muscular)	0	1,6	19,3	1,7	7,6	0,4	0,3	0,8	5,0	3,8	23,0	1,5	1,8	5,3	4,1	2,0	0,6	1,6	RAMOS FILHO, 2007
dourado <i>Salminus maxillosus</i> (selvagem, tecido muscular)	0,1	0,6	3,9	0,1	1,4	0,1	0	0,1	1,4	0,7	3,7	0,3	0	1,1	0,6	0,5	0,2	0,6	RAMOS FILHO, 2007
mapará <i>Hypophthalmus</i> sp. (selvagem, tecido muscular, seca)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,0	15,0	INHAMUNS; FRANCO, 2008.
mapará <i>Hypophthalmus</i> sp. (selvagem, tecido muscular, cheia)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	18,0	INHAMUNS; FRANCO, 2008.
matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> (piscicultura, tecido muscular)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	197,6	75,7	165,0	4,1	30,0	ALMEIDA et al., 2009
matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> (selvagem, tecido muscular, cheia)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	438,2	118,3	42,7	5,2	10,2	ALMEIDA et al., 2009
matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> (selvagem, tecido muscular, seca)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	193,1	40,0	43,4	8,1	61,3	ALMEIDA et al., 2009
matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> (piscic. viveiro, tecido muscular)	-	13,2	265,7	2,0	99,4	-	-	-	28,7	16,7	410,3	8,1	-	111,5	6,9	0,5	0,6	3,7	MOREIRA et al., 2001.
matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> (piscic. tanque-rede, tecido muscular)	-	12,3	228,1	1,0	105,0	-	-	-	23,1	15,7	450,1	7,6	-	101,7	5,4	0,7	1,0	7,8	MOREIRA et al., 2001.
pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> (selvagem, tecido muscular)	4,6	10,2	35,6	1,1	17,5	0,2	0	0,1	9,4	6,4	66,4	2,4	0	4,7	1,3	2,6	0,2	0,6	RAMOS FILHO, 2007

Quadro 3 (continuação) – Perfil de ácidos graxos de peixes de água doce capturados no Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
	saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
	12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
pintado <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> (selvagem, tecido muscular)	0	0,3	4,8	0,3	2,0	0,1	0,1	0,2	1,3	1,0	5,4	0,5	0	1,1	0,5	0,8	0,3	1,3	RAMOS FILHO, 2007
piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> (piscic. tanque-rede, tecido muscular)	-	12,0	23,4	2,0	99,0	-	-	-	42,3	19,4	421,8	4,8	-	97,9	2,3	11,8	1,3	13,8	MOREIRA et al., 2001
piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> (piscic. viveiro, tecido muscular)	-	11,3	228,5	3,1	83,2	-	-	-	35,1	25,0	397,4	8,6	-	137,7	2,0	10,6	2,1	9,2	MOREIRA et al., 2001
piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	12,4	1,0	2,0	97,2	-	-	-	47,7	22,4	487,7	8,0	-	22,9	-	8,3	4,8	10,5	MOREIRA et al., 2001
piraputanga <i>Brycon microlepis</i> (piscicultura, tecido muscular)	-	11,2	223,3	2,6	89,7	-	-	-	29,4	20,6	452,3	8,0	-	110,3	6,7	6,8	1,4	2,1	MOREIRA et al., 2001
piraputanga <i>Brycon microlepis</i> (selvagem, tecido muscular)	-	15,7	219,0	9,1	156,6	-	-	-	22,9	30,0	403,1	7,5	-	51,0	9,7	10,1	1,7	2,7	MOREIRA et al., 2001
tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> (piscicultura, tecido muscular)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	208,0	12,4	57,9	5,0	25,1	ALMEIDA; FRANCO, 2006
tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> (selvagem, cheia, tecido muscular)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	297,3	50,7	32,2	3,8	14,1	ALMEIDA; FRANCO, 2006

Quadro 3 (continuação) – Perfil de ácidos graxos de peixes de água doce capturados no Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
	saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
	12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> (selvagem, seca, tecido muscular)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	262,0	48,0	157,6	9,3	40,2	ALMEIDA; FRANCO, 2006
tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> (piscicultura, CMS, óleo bruto)	0,4	29,7	255,4	2,2	72,4	1,6	4,6	-	71,3	-	315,0	19,8	7,1	137,3	0,9	-	1,6	25,8	MENEGAZZO et al., 2014.
tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> (piscicultura, CMS, óleo refinado)	0,4	26,9	216,0	7,4	70,1	2,9	3,4	-	75,4	-	300,2	25,9	7,2	147,3	1,2	-	2,8	30,2	MENEGAZZO et al., 2014.
tucunaré <i>Cichla</i> sp. (selvagem, tecido muscular, cheia)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	18	INHAMUNS et al., 2008.
tucunaré <i>Cichla</i> sp. (selvagem, tecido muscular, seca)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	15	INHAMUNS et al., 2008.

Quadro 4 – Perfil de ácidos graxos de peixes marinhos capturados no Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
	saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
	12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
anchova <i>Pomatomus salatrix</i> (selvagem, tecido muscular)	-	43,0	204,0	-	62,0	-	-	-	77,0	-	252,0	-	26,0	16,0	32,0	11,0	40,0	134,0	VISENTAINER et al., 2007.
atum <i>Thunnus thynnus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	20,0	147,0	-	83,0	-	-	-	19,0	-	101,0	-	63,0	15,0	11,0	6,0	47,0	363,0	VISENTAINER et al., 2007.
badejo-mira <i>Mycteroperca acutirostris</i> (selvagem, tecido muscular)	-	35,0	181,0	-	54,0	-	-	-	58,0	-	96,0	-	52,0	11,0	15,0	12,0	89,0	251,0	VISENTAINER et al., 2007.
bonito cachorro <i>Auxis thazard thazard</i> (selvagem, tecido muscular)	-	27,0	182,0	-	86,0	-	-	-	33,0	-	75,0	10,0	36,0	16,0	18,0	-	88,0	332,0	VISENTAINER et al., 2007.
cavalinha <i>Scomber colias</i> (selvagem, tecido muscular)	-	51,0	114,0	-	29,0	-	-	-	120,0	-	336,0	18,0	16,0	40,0	24,0	9,0	91,0	65,0	VISENTAINER et al., 2007.
goete <i>Cynoscion jamaicensis</i> (selvagem, tecido muscular)	-	72,0	190,0	-	42,0	-	-	-	87,0	-	118,0	24,0	22,0	32,0	23,0	8,0	128,0	166,0	VISENTAINER et al., 2007.
peixe espada <i>Trichiurus lepturus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	42,0	151,0	-	43,0	-	-	-	45,0	-	107,0	-	57,0	12,0	16,0	23,0	77,0	209,0	VISENTAINER et al., 2007.
peixe-porco <i>Aluterus monocerus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	-	119,0	-	51,0	-	-	-	21,0	-	79,0	-	115,0	8,0	13,0	-	90,0	304,0	VISENTAINER et al., 2007.
sardinha brasileira <i>Sardinella brasiliensis</i> (selvagem, tecido muscular)	-	75,0	224,0	-	52,0	-	-	-	77,0	-	85,0	16,0	25,0	22,0	21,0	-	85,0	225,0	VISENTAINER et al., 2007.

Quadro 4 (continuação) – Perfil de ácidos graxos de peixes marinhos capturados no Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
	saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
	12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
sardinha-da-lage <i>Opisthonema oglinum</i> (selvagem, tecido muscular)	-	77,0	234,0	-	62,0	-	-	-	61,0	-	93,0	13,0	35,0	17,0	24,0	-	68,0	190,0	VISENTAINER et al., 2007.
savelha <i>Brevoortia aurea</i> (selvagem, tecido muscular)	-	38,0	147,0	-	58,0	-	-	-	56,0	-	122,0	17,0	44,0	30,0	17,0	9,0	116,0	247,0	VISENTAINER et al., 2007.
serra <i>Sarda sarda</i> (selvagem, tecido muscular)		53,0	130,0	-	32,0	-	-	-	112,0	-	296,0	20,0	17,0	41,0	24,0	8,0	112,0	80,0	VISENTAINER et al., 2007.
tainha <i>Mugil liza</i> (selvagem, tecido muscular)	-	20,0	182,0	-	100,0	-	-	-	23,0	-	80,0	7,0	73,0	20,0	12,0	7,0	94,0	246,0	VISENTAINER et al., 2007.
xerelete <i>Caranx crysus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	37,0	228,0	-	72,0	-	-	-	59,0	-	156,0	10,0	18,0	17,0	16,0	12,0	65,0	197,0	VISENTAINER et al., 2007.
xixarro <i>Trachurus trachurus</i> (selvagem, tecido muscular)	-	31,0	184,0	-	73,0	-	-	-	44,0	-	92,0	10,0	35,0	13,0	17,0	13,0	84,0	281,0	VISENTAINER et al., 2007.

Quadro 5 – Perfil de ácidos graxos de peixes capturados em outros países, exceto o Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Habitat natural	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
		saturados							monoinsaturados							poli-insaturados				
		12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
anchova <i>Engraulis encrasicolus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	2,1	68,0	270,7	-	52,1	-	-	4,1	42,0	13,2	85,4	17,0	5,1	18,5	15,4	6,6	77,5	210,8	ZLATANOS; LASKARIDIS, 2007.
anchova <i>Engraulis engrasicolus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	62,9	269,7	-	60,6	-	-	-	52,1	-	130,2	-	-	33,9	-	11,7	116,8	258,5	BAYIR et al., 2006.
annular sea bream <i>Diplodus annularis</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	39,9	287,9	-	34,4	-	-	11,1	84,9	-	137,2	-	-	-	-	32,1	116,3	140,6	BAYIR et al., 2006.
arenque <i>Clupea harengus</i> (selvagem, resíduos)	água salgada	-	120,0	172,0	-	18,0	-	-	-	56,0	-	-	130,0	197,0	20,0	14,0	-	49,0	66,0	AIDOS et al., 2003.
arenque <i>Clupea harengus</i> (selvagem, óleo de resíduos)	água salgada	-	87,0	125,0	-	16,0	-	-	-	30,0	-	-	119,0	221,0	23,0	14,0	-	53,0	67,0	AIDOS et al., 2003.
black rockfish <i>Sebastes schlegeli</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	52,0	143,0	4,0	28,0	2,0	-	-	102,0	37,0	163,0	19,0	1,0	13,0	9,0	6,0	95,0	119,0	SAITO; ISHIKAWA, 2014.
bluefish <i>Pomatomus saltatrix</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	146,5	196,7	-	22,5	6,0	-	4,8	103,2	-	215,3	15,8	-	15,4	-	5,7	61,8	121,5	BAYIR et al., 2006.
bonito do Atlântico <i>Sarda sarda</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	1,2	45,8	188,1	17,3	45,0	7,1	1,2	-	68,7	-	177,1	24,1	-	20,7	-	10,5	82,1	196,1	BAYIR et al., 2006.
carpa comum <i>Cyprinus carpio</i> (selvagem, tecido muscular)	água doce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,35	0,9	-	0,6	0,2	NEFF et al., 2014.
carpa prateada <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (piscicultura, tecido muscular)	água salgada	-	47,1	246,5	-	69,0	-	-	6,8	72,1	256,0	-	-	-	28,7	15,6	-	38,5	54,8	TALAB et al., 2010.

Quadro 5 (continuação) – Perfil de ácidos graxos de peixes capturados em outros países, exceto o Brasil.

PEIXE (procedência, material analisado)	Habitat natural	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
		saturados							monoinsaturados						poli-insaturados					
		12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
garfish <i>Belone belone</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	27,8	196,8	4,6	39,2	12,8	1,1	-	54,6	-	89,9	25,3	-	16,6	-	13,5	61,4	349,2	BAYIR et al., 2006.
gilthead seabram <i>Sparus aurata</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	46,6	188,6	4,6	35,3	11,8	2,0	-	76,0	-	153,3	14,5	2,2	83,3	-	16,3	87,4	205,5	BAYIR et al., 2006.
grey mullet <i>Mugil cephalus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	36,9	237,8	-	48,8	-	-	-	74,8	-	93,7	-	-	-	-	35,8	87,0	227,1	BAYIR et al., 2006.
horse mackerel <i>Trachurus trachurus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	43,7	244,3	-	52,0	-	-	-	105,8	-	286,2	-	-	9,0	-	8,4	74,8	105,7	BAYIR et al., 2006.
mackerel <i>Scomber scombrus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	7,4	88,0	204,2	6,4	20,8	15,3	-	-	74,2	-	158,2	17,4	7,3	15,0	-	12,1	102,2	127,0	BAYIR et al., 2006.
piçãõ-verde <i>Sander vitreus</i> (selvagem, tecido muscular)	água doce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,5	-	0,5	1,4	NEFF et al., 2014.
picarel <i>Spicara smaris</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	1,2	46,2	226,6	-	41,9	-	-	7,1	67,0	14,9	138,9	21,9	2,6	12,8	15,8	8,9	92,6	184,4	ZLATANOS; LASKARIDIS, 2007.
salmão <i>Salmo salar</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	69,8	167,6	-	24,7	8,8	4,5	-	93,3	-	229,8	4,8	-	49,9	-	11,5	60,2	206,6	BAYIR et al., 2006.
salmão real <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada (anádromo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,6	-	0,6	23,1	NEFF et al., 2014.
sardinha <i>Sardina pilchardus</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	1,2	70,3	232,2	-	33,7	-	-	2,3	60,9	23,2	70,6	12,1	8,2	15,2	19,6	12,0	106,7	208,3	ZLATANOS; LASKARIDIS, 2007.

PEIXE (procedência, material analisado)	Habitat natural	Ácidos graxos (valores médios, em mg/g)																		Referência
		saturados							monoinsaturados							poli-insaturados				
		12:0	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	14:1 ω-5	16:1 ω-7	18:1 ω-7	18:1 ω-9	20:1 ω-9	22:1 ω-9	18:2 ω-6 LA	18:3 ω-3 LNA	20:4 ω-6 ARA	20:5 ω-3 EPA	22:6 ω-3 DHA	
sea catfish, “gogo” <i>Arius madagascariensis</i> (selvagem, tecido muscular)	água doce	2,9	24,8	277,2	12,4	110,8	5,2	-	-	84,2	30,3	122,2	7,1	-	44,8	27,4	58,6	7,6	55,3	RASOARAHONA et al., 2008.
truta do lago <i>Salvelinus namaycush</i> (selvagem, tecido muscular)	água doce	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	2,6	-	3,2	7,9	NEFF et al., 2014.
two-banded bream <i>Diplodus vulgaris</i> (selvagem, tecido muscular)	água salgada	-	22,2	168,6	-	50,3	-	-	-	35,4	-	94,6	-	-	52,0	-	183,9	187,4	202,8	BAYIR et al., 2006.
white sucker <i>Catostomus commersonii</i> (selvagem, tecido muscular)	água doce (catádro- mo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,1	-	0,9	1,4	NEFF et al., 2014.

## 2.5 – FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos filamentosos são seres eucariontes, multinucleados, heterotróficos e caracterizados por uma parede celular quitinosa. Geralmente ocorrem em colônias multicelulares (agrupadas no formato denominado micélio). Estima-se que eles são responsáveis pela deterioração de grande parte de todos os derivados de plantas e alimentos produzidos anualmente. Os mais conhecidos são *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, que produzem uma gama extensiva de metabólitos secundários após completarem sua fase exponencial de crescimento (BHAT *et al.*, 2010; ATANDA *et al.*, 2011).

Muitas espécies também são responsáveis por uma elevada incidência global de micotoxinas, um tipo de metabólito secundário responsável pela resposta tóxica chamada micotoxicose após animais superiores e humanos ingerirem gêneros alimentícios contaminados. Essas micotoxinas podem apresentar efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos ao homem ou demais indivíduos parasitados e/ou consumidores de alimentos contaminados (ATANDA *et al.*, 2011; KLARIĆ, 2012; WOLOSHUK; SHIM, 2012).

Outras espécies são úteis por produzirem enzimas e outros bioprodutos com elevada importância para aplicação industrial, como amilases, xilanases, endoglucanases, poligalacturonases e lipases, entre outros (TREICHEL *et al.*, 2010; STROPARO *et al.*, 2012).

### 2.5.1 – Formas de conservação de fungos em coleções de cultura

A conservação das espécies de fungos em geral em coleções de cultura, de maneira que preservem por longo período de tempo suas características morfofisiológicas e genéticas (BORMAN *et al.*, 2006; ABD-ELSALAM *et al.*, 2010), é uma iniciativa de grande valoração.

A partir de isolados, são efetuadas transferências e inóculos com o intuito de obter culturas puras, ou seja, colônias cujos indivíduos apresentem características macro e micromorfológicas estritamente iguais, para posterior identificação.

Essas culturas puras devidamente identificadas devem se apresentar completamente estáveis antes da preservação, pois posteriormente podem servir para vários objetivos, entre os quais se destacam existência de cepas padrões para identificação taxonômica de outros isolados, controle de qualidade, estudos epidemiológicos, ensino e pesquisa (BORMAN *et al.*, 2006; ABD-ELSALAM *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Vários métodos podem ser utilizados para a preservação de fungos: repiques (transferências) periódicos para ágar inclinado em tubos; cultura pura desenvolvida sob ágar e imersa em água, óleo mineral ou solução salina; em sílica-gel; em solo ou areia; em matéria orgânica (grãos, como exemplo); solução aquosa de esporos (suspensão de esporos); congelamento; criopreservação; liofilização (BORMAN et al., 2006; ABD-ELSALAM et al., 2010). Algumas técnicas apresentam associação de dois ou mais métodos mencionados.

Preferencialmente, para depósito em coleções, cada cultura pura deve ser submetida à, pelo menos, dois métodos de preservação. Tal cuidado é explicado pelas diferentes reações adversas observadas por uma mesma espécie ao meio de cultura ou técnica adotada, assegurando-se a adequada viabilidade da cultura e estabilidade morfológica em ao menos um dos métodos escolhidos (BORMAN et al., 2006; ABD-ELSALAM et al., 2010).

Devido o baixo custo de preparo e manutenção, o método de conservação em água é amplamente utilizado. Alguns trabalhos apontam a viabilidade da cultura conservada sob esse método em tempo superior a 7 anos (BORMAN et al., 2006; ABD-ELSALAM et al., 2010)

## **2.6 – ENZIMAS LIPOLÍTICAS**

Pelo uso de enzimas criou-se oportunidade para o desenvolvimento perfeito em química industrial sustentável e moderna, devido à excelente especificidade econômica, tendo condições de reação suave, processo de economia de energia e simplicidade (LI; ZONG, 2010).

Entre as diversas enzimas existentes, as enzimas lipolíticas verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídios (acilhidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras) (CARVALHO et al., 2003; TREICHEL et al., 2010).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza, inclusive produzidas por microrganismos. São as mais utilizadas industrialmente porque, além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo, são mais estáveis, apresentam propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes e são, em sua maioria, extracelulares. O interesse em utilizar estes biocatalisadores na modificação estrutural de

óleos e gorduras tem recebido considerável atenção devida sua especificidade em relação ao substrato (CARVALHO et al., 2003; TREICHEL et al., 2010).

As lipases microbianas têm sido classificadas em três grupos, em função de sua especificidade com relação ao substrato, de acordo com Carvalho et al., 2003:

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

- Lipases não específicas - catalisam a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que este está esterificado no glicerol.

- Lipases ácido graxo específicas - catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG.

O mercado global de enzimas aumentou gradativamente de US\$1,0 bilhão em 1995 para US\$1,5 bilhão em 2000 e, em seguida, para US\$2,2 bilhões em 2006. Estima-se que a venda global atinja US\$2,7 bilhões até o final de 2012 (LI; ZONG, 2010).

Do ponto de vista industrial, fungos são especialmente valorizados devido majoritariamente produzirem enzimas extracelulares, com facilitada recuperação a partir do caldo fermentativo (WOLSKI, 2008). Como exemplo da utilização de enzimas lipolíticas em óleo de peixe, seguem breves descrições de algumas publicações.

Lipases purificadas de *Penicillium abeanum* aplicadas em óleo de atum demonstraram capacidade para enriquecimento de DHA (SUGIHARA et al., 1996).

Yamaguchi et al. (2004) utilizaram com sucesso a lipase comercial obtida do fungo *Thermomyces lanuginosus* em óleo de peixe para a produção de lipídios estruturados.

Kahveci; Xu (2011) aplicaram lipase obtida da levedura *Candida rugosa* para enriquecimento de ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 em óleo de salmão, obtendo ao final um índice de concentração duas vezes maior que o índice inicial.

Nesse sentido, a utilização de fungos da Amazônia para melhoramento da qualidade de óleos de pescado é desconhecida, significando um potencial biotecnológico inédito a ser explorado.

## **2.7 – *Artemia salina* E ENSAIOS DE TOXICIDADE**

### **2.7.1 – Aspectos bioecológicos da *Artemia***

*Artemia* são microcrustáceos filtradores, com variadas formas de reprodução, capazes de produzir ovos com casca grossa (cistos) em condições ambientais desfavoráveis. Esses cistos são passíveis de aquisição no comércio de *pet shops* e, quando submetido à condições favoráveis, podem ser eclodidos e as larvas (náuplios), usadas em testes toxicológicos in vitro (ATAYDE et al., 2011).

As espécies do gênero possuem uma rara adaptabilidade às condições extremas, propiciando sua detecção em ambientes onde outras formas de vida são insustentáveis, a exemplo dos lagos com alta taxa de salinidade e salinas, entre outros (NUNES et al., 2006).

### **2.7.2 – Utilização da *Artemia salina* em bioensaios de toxicidade**

Bioensaios de toxicidade são úteis para avaliar a exposição de uma grande variedade de extratos (microbiano, animal, vegetal ou mineral) no crescimento ou sobrevivência de um determinado organismo – coelhos, ratos, camundongos, entre outros. Entre os organismos utilizados, *Artemia salina* é uma das espécies mais utilizadas (RICE; MANESS, 2004).

Para utilização de *Artemia salina* nesses ensaios, é preferível a utilização do estágio larval 1, caracterizado pela presença de olho larval, primeiro e segundo pares de antenas (respectivamente, antênula e antena) simétricos no comprimento e largura, mandíbula e, principalmente, ausência de perfuração anal (característica do estágio larval 2) (BUSTOS-OBREGON; VARGAS, 2010).

Vários trabalhos, realizados dentro ou fora da região amazônica, apontam uma boa relação entre a letalidade alcançada no teste e a detecção de compostos tóxicos (ATAYDE et al., 2011). Como exemplo, Atayde (2008) empregou o ensaio de toxicidade contra *Artemia* utilizando extratos brutos de fungos filamentosos isolados de rações extrusadas para peixe, constatando-se a maior ocorrência de potenciais produtores de metabólitos tóxicos.

Diante dessas considerações, trabalhos voltados para aproveitamento e melhoramento biotecnológico de óleos de pescado no Estado do Amazonas apresentam significativa

expressividade no meio científico/tecnológico e industrial, propiciando o uso e valorização de produtos regionais, minimização de impactos ambientais, renda alternativa para as indústrias do setor pesqueiro e economia para as indústrias farmacêuticas locais.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo geral:**

Extrair e refinar o óleo de resíduos de piracatinga (*Callophysus macropterus*) e verificar o efeito do extrato lipolítico de fungo amazônico na concentração dos ácidos graxos desse produto.

#### **3.2 – Objetivos específicos:**

- Determinar o rendimento e a qualidade nutricional (em perfil de ácidos graxos) de óleos bruto e refinado, termomecanicamente obtidos a partir de resíduos de piracatinga;
- Selecionar um fungo armazenado na Coleção de Culturas DPUA-UFAM com características adequadas para aplicação de suas lipases em alimentos destinados ao consumo humano;
- Determinar o rendimento e caracterizar parcialmente as condições ótimas para ação do extrato lipolítico do fungo amazônico selecionado;
- Verificar o efeito do extrato lipolítico bruto do fungo selecionada na concentração de ácidos graxos poli-insaturados do óleo refinado de piracatinga.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A. et al. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. *Fungal Diversity*, v.45, p.21-32, 2010.

AIDOS, I. et al. Composition and stability of herring oil recovered from sorted byproducts as compared to oil from mixed byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2828-2824, 2002.

AIDOS, I. et al. Quality of crude fish oil extracted from herring byproducts of varying states of freshness. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 2, p. 458-485, 2003.

ALMEIDA, N. M.; FRANCO, M. R. B. Determination of essential fatty acids in captured and farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*) from the Brazilian Amazonian area. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 83, n. 8, p. 707-711, 2006.

ALMEIDA, N. M.; JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B. Determination of essential fatty acids in captured and farmed matrinxã (*Brycon cephalus*) from the Brazilian Amazonian area. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 86, n. 8, p. 717-722, 2009.

ATANDA, S.A. et al. Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, n. 5, v. 25, p. 4373-4382, 2011.

ATAYDE, H. M. et al. Bioensaios de toxicidade com espécies de *Artemia*, p. 190-207. In: TEIXEIRA, M. F. S. et al. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*, Manaus:Editora da Universidade Federal do Amazonas, 255p., 2011.

ATAYDE, H. M. Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricadas no Estado do Amazonas. *Dissertação* (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

BATH, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p. 57-91, 2010.

BATISTA, V. S. et al. *Peixes e pesca no Solimões-Amazonas: uma avaliação integrada*. Brasília: IBAMA/Provárzea, 2012, 276p.

BAYIR, A. et al. Fatty acid composition in some selected marine fish species living in Turkish waters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 163-168, 2006.

BIANCHI, A. C. et al. Antarctic microorganisms as source of the omega-3 polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 1869-1878, 2014.

BORMAN, A. M. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, v. 161, p. 361-368, 2006.

BURRI, L. et al. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 15401-15419, 2012.

BUSTOS-OBREGON, E.; VARGAS, A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biological Research*, v. 43, p. 357-362, 2010.

CANDELA, C. G.; LÓPEZ, L. M. B.; KOHEN, V. L. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*, v.26, n. 2, p. 323-329, 2011.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, F. A. F. et al. Fatty acid composition of three freshwater fishes under different storage and cooking processes. *Food Chemistry*, v. 103, p. 1080-1090, 2007.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 173-180, 1999.

CRAWFORD, M. A. et al. Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the Modern hominid brain. *Lipids*, v.34 (suppl.), s39-47.

CREXI et al. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: chemical hydrolysis and urea complexation. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 89, p. 329-334, 2012.

CREXI, V. T. et al. Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânica de farinha. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 50 -56, 2007.

CUNNINGHAM, E. Are krill oil supplements a better source on n-3 fatty acids than fish oil supplements? *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, p. 344, 2012.

DEDYUKHINA, E. G. et al. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. (article in press). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014. Disponível em <http://www.scopus.com>

DJOUSSÉ, L. et al. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: a meta-analysis. *Clinical Nutrition*, v. 31, n. 6, p. 846-853, 2012.

EGERT, S. et al. Dietary alpha-linolenic acid, EPA and DHA, have differential effects on LDL fatty acid composition but similar effects on serum lipid profiles in normolipidemic humans. *Journal of Nutrition*, v. 139, n. 5, p. 861-868, 2009.

EL RAZAK, A. A.; WARD, A. C.; GLASSEY J. Responses surface methodology for opmitising the culture conditions for eicosapentaenoic acid production by marine bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 40, n. 5, p. 477-487, 2013.

\_\_\_\_\_. Process development of eicosapentaenoic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 53-62, 2014.

ESPINOSA, S.; DIAZ, M. S.; BRIGNOLE, E. A. Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 213-219, 2008.

FAHS, C.A. et al. The effect of acute fish-oil supplementation on endothelial function and arterial stiffness following a high-fat meal. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v. 35, n. 3, p. 294-302, 2010.

FIORI, L. et al. Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera: trout by-products as a possible source of omega-3 lipids? *Food Chemistry*, v. 134, p. 1088-1095, 2012.

FURUHJELM, C. et al. Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy. *Acta Paediatrica*, v. 98, p. 1461-1467, 2009.

GOYENS, P. L. et al. Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *Journal of Lipid Research*, n. 46, p. 1474-1483, 2005.

HARRIS, W. S. et al. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, n.86, p. 1621-1625, 2007.

HUSSEIN, N. et al. Long-chain conversion of [13]linolenic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *Journal of Lipid Research*, n. 46, p. 269-280, 2005.

INHAMUNS, A. J. ; FRANCO, M. R. B. ; BATISTA, W. S. . Seasonal variations in total fatty acid composition of muscles and eye sockets of tucunare (*Cichla* sp.) from the Brazilian Amazon Area. *Food Chemistry*, v. 117, p. 272-275, 2009.

INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B. Composition of total, neutral and phospholipids in mapará (*Hypophthalmus* sp.) from the Brazilian Amazonian area. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4859-4863, 2001.

INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B. EPA and DHA quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia. *Food Chemistry*, v. 107, p. 587-591, 2008.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hidrolisis process is effective for enrichment of ômega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1552-1558, 2011.

- KAUSHIK, M. et al. Long-chain omega-3 fatty acids, fish intake, and the risk of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, n. 3, p. 613-620, 2009.
- KLARIĆ, M. Š. Adverse effects of combined mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, n. 63, v. 4, p. 519-530, 2012.
- LEE, J. H. et al. Omega-3 fatty acids for cardioprotection, *Mayo Clinic Proceedings*, n. 83, v. 3, p. 324-332, 2008.
- LEMAITRE, R. N. et al. Red blood cell membrane alpha-linolenic acid and the risk of sudden cardiac arrest. *Metabolism*, n. 58, p. 534-540, 2009.
- LI, N.; ZONG, M.-H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 66, p. 43 – 54, 2010.
- LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 445-451, 2008.
- MAKRIDES, M. et al. Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial. *JAMA*, n. 304, p. 1657-1675, 2010.
- MALGEUNSINAE, K. et al. Erythrocyte –linolenic acid is associated with the risk for mild dementia in Korean elderly. *Nutrition Research*, v. 30, p. 756-761, 2010.
- MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 e ômega-3: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.
- MARTINS, D. A. et al. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Marine Drugs*, v. 11, n. 7, p. 2259-2281, 2013.
- McMANUS, A. et al. Health benefits of seafood men. *Journal of Men's Health*, v. 8, n. 4, p. 252-257, 2011.

MENEGAZZO, M. L.; PETENUCCI, M. E.; FONSECA, G. G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. *Food Chemistry*, v. 157, p. 100-104, 2014.

MORAIS, M. M. et al. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, n. 1, p. 23-33, 2001.

MOREIRA, A. B. et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, p. 565-574, 2001.

NEFF et al. Effects of different cooking methods on fatty acid profiles in four freshwater fishes from the Laurentian Great Lakes region. *Food Chemistry*, v. 164, p. 544-550, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger princípios de bioquímica*. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, n. 144, p. 453-462, 2006.

OGAWA, J. et al. Polyunsaturated fatty acids production and transformation by *Mortierella alpine* and anaerobic bacteria. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 114, n. 10, p. 1107-1113, 2012.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. *Manual de pesca: Ciência e Tecnologia de Pescado*. v.1, São Paulo: Varela. 1999, 430 p.

OLIVEIRA, H. H. Razão entre ômega-6/ômega3, AGPI/AGS e caracterização físico-química do óleo de *Colossoma macropomum* (tambaqui) cultivados no estado de Roraima. *Dissertação* (Mestrado em Química), Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2008.

PACHECO, S. G. A. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado e acondicionado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. *Dissertação* (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz Vaz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005. 76p.

PÉREZ L. A.; FABRÉ, N. N. Aspectos reproductivos de la piracatinga *Calophysus macropterus* Lichtenstein, 1819 (Pisces: Pimelodidae) en la Amazonia Central, Brasil. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, v. 36, n. 3, p. 266-288, 2002.

PÉREZ, A.; FABRÉ, N. N. Seasonal growth and life history of the catfish *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (Siluriformes: Pimelodidae) from the Amazon foodplain. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 25, p. 343-349, 2009.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada da Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim – Rio Grande do Sul, Erechim, 2006.

POPPIT, S. D. et al. Effects of moderate-dose omega-3 fish oil on cardiovascular risk factors and mood after ischemic stroke. *Stroke*, v. 40, p. 3485-3492, 2009.

RAMEL, A. et al. Moderate consumption of fatty fish reduces diastolic blood pressure in overweight and obese European young adults during energy restriction. *Nutrition*, v. 26, n. 2, p. 168-174, 2010.

RAMEL, A. et al. Beneficial effects of long-chain *n*-3 fatty acids included in a n energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults. *Diabetologia*, v. 51, p. 1261-1268, 2008.

RAMIREZ-GIL, H. et al. Karyological, biochemical and physiological aspects of *Calophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1449-1458, 1998.

RAMOS FILHO, M. M. Qualidade nutricional da fração lipídica de espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Tese*. Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Ciências da Saúde-Rede Centro-Oeste, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007.

- RASOARAHONA, J. R. E. et al. Muscle lipids and fatty acid profiles of the sea catfish (*Arius madagascariensis*) in Madagascar Inland Waters. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 85, p. 435-440, 2008.
- RICE, S. A.; MANESS, I. B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. *The American Biology Teacher*, v. 66, n. 3, p. 208-14, 2004.
- SAHENA, F. et al. PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, p. 59-74, 2009.
- SAITO, H.; ISHIKAWA, S. Lipid classes and fatty acid profile of cultured and wild black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Journal of Oleo Science*, v. 63, n. 6, p. 555-566, 2014.
- SALUNKE, D. et al. Bioconversion of alpha-linolenic acid into long chain polyunsaturated fatty acids by oleaginous fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 5, n. 2, p. B27-B35, 2014.
- SANT'ANA, L. S. Biodisponibilidade de lipídios. In: COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. Barueri, SP:Editora Manole, 1.ed., 2005.
- SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. *Peixes comerciais de Manaus*. Manaus: IBAMA/AM, Provárzea, 2006, 144p.
- SCHNAPPINGER, M. et al. Fish consumption, allergic sensitization and allergic diseases in adults. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 54, p. 67-74, 2009.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SIJTSMA, L.; SWAAF, M. E. Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied and Microbiological Biotechnology*, v. 64, p. 146-153, 2004.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.

SIMOPOULOS, A. P. *Omega-6/Omega-3 essential fatty acids: biological effects*. In SIMOPOULOS, A. P.; BAZAN, N. G. (eds). *Omega-3 fatty acid, the brain and retina*, Switzerland: Reinhardt Druck, Basel, 2009. p. 1-16.

SIOEN, I. et al. Effect of ALA-enriched food supply on cardiovascular risk factors in males. *Lipids*, n. 44, p. 603-611.

SOARES, M. G. M. et al. *Peixes de lagos do Médio Rio Solimões*, 2.ed., Manaus: Instituto Piatam, 2008, 160p.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUGIHARA, A. et al. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization, and Its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOUSA, S. A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, n.3, p.1-7, 2013.

TALAB, H. A. et al. Extraction and purification of omega-3 fatty acids concentrate from *Hypophthalmichthys molitrix* oil. *Nutrition and Food Science*, v. 40, n. 2, p. 193-203, 2010.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Coleções de cultura como centro de recursos para pesquisa em biotecnologia. p. 230-236, In: TEIXEIRA, M. F. S. et al. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*, Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, 255p., 2011.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, n. 3, p. 182-196, 2010.

TUR, J. A. et al. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *British Journal of Nutrition*, v.107, p. S23-S52, 2012.

VADIVELAN, G.; VENKATESWARAN, G. Production and enhancement of omega-3 fatty acid from *Mortierella alpina* CFR-GV15: Its food and therapeutic application. *BioMed Research International*, v. 2014, article number 657414, 9p., 2014.

VAN DEN ELSEN, L.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of allergic and cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n. 16, p. 2375-2392, 2012.

VILLEGAS, R et al. Fish, shellfish, and long-chain n-3 fatty acid consumption and risk of incident type 2 diabetes in middle-aged Chinese men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 94, n. 2, p. 543-551, 2011.

VIRTANEN, J. K. et al. Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men. *Circulation*, v. 120, p. 2315-2321, 2009.

VISENTAINER, J. V. et al. Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the Southeast Coast of Brazil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, p. 543-547, 2007.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. *Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. São Paulo:Editora Varela, 2006. 120p.

WALLIN, A. et al. Fish consumption, dietary long-chain n-3 fatty acids, and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care*, v. 35, n. 4, p. 918-929, 2012.

WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. *Biomass and Bioenergy*, v.47, p. 402-409, 2014.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3627-3652, 2005.

WATANABE, N. et al. Administration of dietary fish oil capsules in healthy middle-aged Japanese men with a high level of fish consumption. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60, n. 5 (supl.), p. 136-142, 2009.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W.-B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews*, n. 37, v. 1, p. 94-109, 2012.

WOLSKI, E. Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado. *Dissertação*. Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campos de Erechim, 2008. 94p.

YAMAGUCHI, I.; AKOH, C. C.; LAI, O. M. Modification of fish oil by lipozyme TL IM to produce structured lipid. *Journal of Food Lipids*, v. 11, p. 65-73, 2004.

ZHANG, J. et al. Inclusion of Atlantic salmon in the Chinese diet reduces cardiovascular disease risk markers in dyslipidemic adult men. *Nutrition Research*, v. 20, n. 7, p. 447-454, 2010.

ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish – sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry*, v. 103, p. 725-728, 2007.

## **5 – ARTIGOS A SEREM PUBLICADOS**

**Capítulo I - PROSPECÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO DE FUNGO AMAZÔNICO PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

**Capítulo II – RENDIMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA QUALIDADE DE CARÇAÇA E ÓLEOS DE PIRACATINGA *Calophysus macropterus* E EFEITO DO EXTRATO LIPOLÍTICO DE *Aspergillus wentii* DPUA 1725 SOBRE O ÓLEO REFINADO**

## 5 – Artigos a serem publicados - *Capítulo I*

### PROSPECÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO, TOXICOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO BRUTO DE FUNGO AMAZÔNICO PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

#### 1 - Introdução

Lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente porque apresentam isolamento simplificado a partir do caldo fermentativo, maior estabilidade, maior diversificação de suas propriedades e, em sua maioria, são extracelulares. O interesse em utilizar estes biocatalisadores na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido considerável atenção diante de sua especificidade em relação ao substrato (CARVALHO et al., 2003; TREICHEL et al., 2010)

Apesar de muitas espécies de fungos produzirem compostos tóxicos ao homem, outras espécies também podem produzir enzimas e outros bioprodutos com elevada importância industrial, entre eles as lipases (TREICHEL et al., 2010; ATANDA et al., 2011; KLARIĆ, 2012; STROPARO et al., 2012; WOLOSHUK; SHIM, 2012).

Como exemplos da utilização de lipases a partir de fungos em alimentos, resultados satisfatórios foram obtidos em óleo de peixe. Foi detectado enriquecimento de ácido docosahexaenóico em óleo de atum após aplicação de lipase purificada de *Penicillium abeanum* (SUGIHARA et al., 1996) e de duplicação da concentração de ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 após aplicação de lipase de *Candida rugosa* em óleo de salmão (KAHVECI; XU, 2011).

Para a utilização de lipases e demais enzimas microbianas pela indústria de alimentos, deve-se garantir a saúde dos consumidores quanto à minimização ou ausência de toxicidade dos microrganismos produtores. Entre as diversas formas de análise dessa toxicidade, o bioensaio de toxicidade contra *Artemia salina* é um método de baixo custo e com expressivo resultado (RICE; MANESS, 2004; ATAYDE et al., 2011). Ainda, a síntese e eficiência dessas enzimas é dependente da composição do meio de cultura, condições de cultivo, aeração, temperatura, pH e pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio empregadas no meio (VICI et al., 2008; TREICHEL et al., 2010; SHING; MUKHOPADHYAY, 2012).

A utilização de fungos da Amazônia para produção de lipases destinadas ao melhoramento da qualidade de óleos é desconhecida, significando um potencial biotecnológico inédito a ser explorado. Adicionalmente, estudos sobre o rendimento, estabilidade e/ou ação dessas lipases indicam as condições ideais para produção e/ou utilização em processos tecnológicos.

Nessa pesquisa foi efetuada a prospecção do potencial lipolítico e toxicológico de fungos amazônicos armazenados na Coleção de Culturas de Fungos DPUA-UFAM, do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal do Amazonas, buscando sugerir uso e valorização desses microrganismos e/ou seus metabólitos pela indústria de alimentos. Adicionalmente, determinou-se o rendimento (extrato aquoso e extrato liofilizados), as melhores condições de pH e temperatura para ação do extrato lipolítico oriundo da cultura fúngica com a maior atividade lipolítica associada a menor categorização de toxicidade.

## 2 – Metodologia

*2.1 – Microrganismos:* Os microrganismos utilizados foram vinte e duas culturas de fungos (Quadro 1), todos provenientes de substratos amazônicos e conservados na Coleção de Culturas DPUA – UFAM, sob água destilada esterilizada (BORMAN et al., 2006; ABD-ELSALAM et al., 2010), Figura 1. Todos foram reativados em meios seletivos para cada taxa e devidamente autenticados, conforme literatura especializada (Figura 2). As espécies autenticadas foram submetidas ao ensaio subsequente, todos em triplicata.



Figura 1 – Culturas de fungos conservadas sob água destilada esterilizada (Imagem gentilmente cedida por Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira – Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, 2014).

Quadro 1 – Fungos conservados na Coleção de Culturas DPUA – UFAM e utilizados para autenticação e posterior triagem da atividade lipolítica e toxicológica.

<i>Aspergillus candidus</i> DPUA 1577	<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1669
<i>Aspergillus carneus</i> DPUA 1560	<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1673
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1539	<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1660
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1623	<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1668
<i>Aspergillus flavus</i> DPUA 933	<i>Penicillium lividum</i> DPUA 1661
<i>Aspergillus japonicus</i> DPUA 1727	<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1667
<i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624	<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1674
<i>Aspergillus wentii</i> DPUA 1725	<i>Penicillium paxilli</i> DPUA 1574
<i>Penicillium bilaiae</i> DPUA 1602	<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1666
<i>Penicillium citrinum</i> DPUA 1617	<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1671
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1672	<i>Penicillium waksmanii</i> DPUA 1670

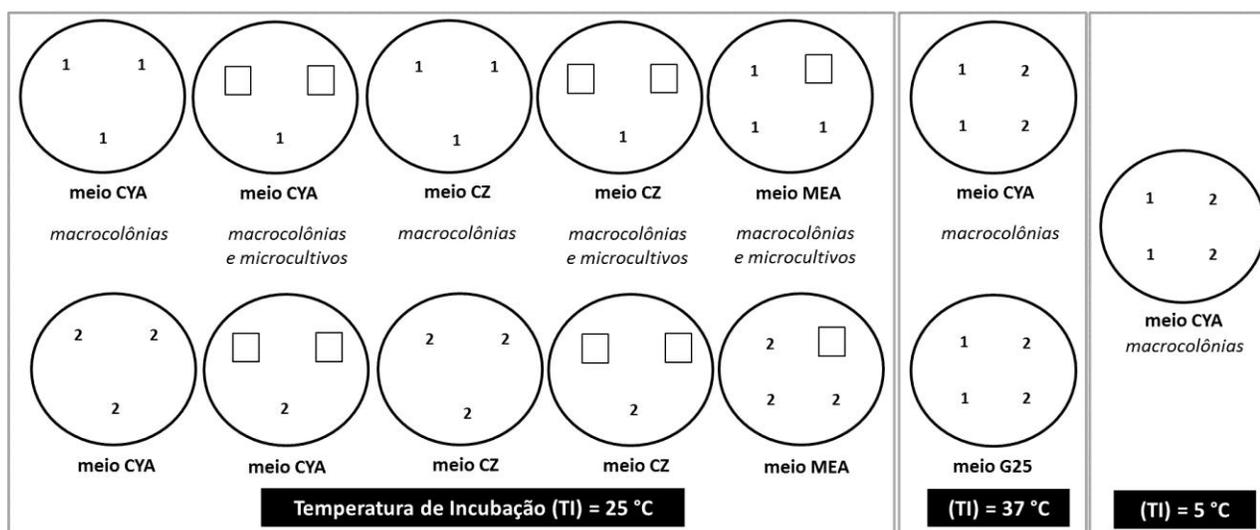


Figura 2 – Esquema para autenticação das cultura de fungos.

2.2 – Seleção em meio sólido dos microrganismos com potencial lipolítico: Todos os microrganismos foram submetidos à verificação prévia do potencial lipolítico em meio sólido, utilizando o método da difusão em ágar Lipase, conforme Haba et al. (2000) modificado por Palheta et al. (2011). Fragmentos das culturas (diâmetro de 5 mm) foram separadamente inoculados na parte central superficial do ágar Lipase – ágar Nutriente 2%, cloreto de cálcio

0,01% e Tween 80 1%. Durante cinco dias, observações diárias foram efetuadas para verificação da formação de halo de degradação, caracterizado pelo aparecimento superficial de pequenos cristais ao redor no fragmento de cultura inoculado (PALHETA et al., 2011). As culturas com o mais expressivo potencial lipolítico em meio sólido, categorizados como *potencial lipolítico alto* (formação de cristais em toda a superfície do meio de cultura) foram submetidos à produção de lipases por fermentação submersa, posterior quantificação da atividade lipolítica, produção de biocompostos por fermentação submersa e bioensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*.

**2.3 – Produção de lipases por fermentação submersa:** As culturas foram conduzidas para produção das lipases em fermentação submersa utilizando meio de cultivo (meio PESO) contendo peptona 8%, extrato de levedura 1%, cloreto de sódio 3% e óleo de oliva extra-virgem 1%, previamente esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos. Para a fermentação, utilizou-se concentração de esporos equivalente à  $2 \times 10^6$  esporos/mL. A fermentação submersa foi conduzida a 28 °C, 150 rpm, durante 72 horas. O extrato aquoso foi coletado após filtragens em papel de filtro qualitativo previamente esterilizado (filtragem preliminar, Figura 3A e B) e em sistema de filtro 0,22 µm (filtragem definitiva, figura 3C) e utilizado para a quantificação da atividade lipolítica (PINHEIRO, 2006).

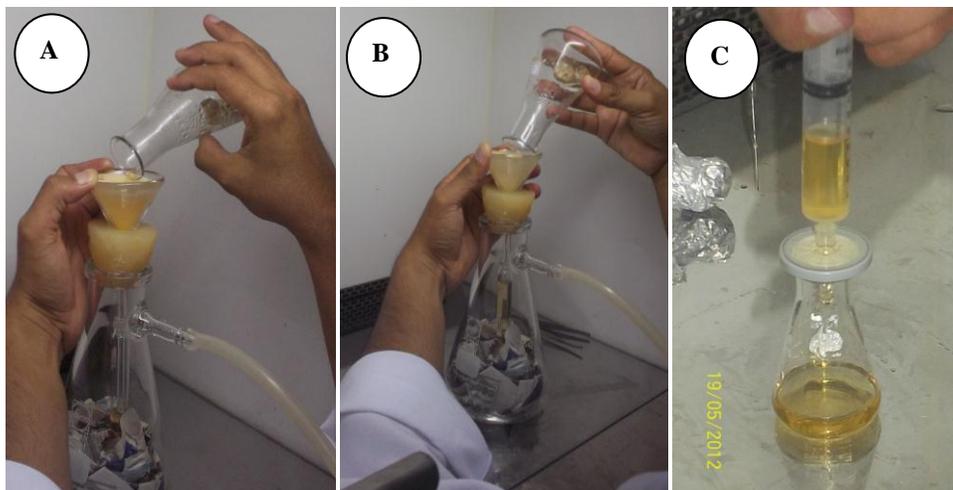


Figura 3 – Filtragem preliminar (A e B) e definitiva (C) do extrato lipolítico bruto.

**2.4 – Quantificação da atividade lipolítica:** Foi utilizada emulsão contendo óleo de oliva extra-virgem 10% (p/v), goma arábica 5% (p/v) e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0. Dessa emulsão, 18 mL foram acondicionados em erlenmeyers de 125 mL, no qual foram adicionados 2 mL do extrato aquoso proveniente da fermentação submersa. Para reação, essa

mistura foi incubada a 37 °C, 150 rpm, durante 15 minutos. Ao final desse período, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos após adição de 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1, v/v) e titulados com hidróxido de sódio 0,05 M, até pH 11. Os brancos foram 18 mL da solução-tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 suplementado apenas com óleo de oliva extravirgem 10% e goma arábica 5%, submetidos à mesma condição de incubação, interrupção de reação e titulação acima mencionada (Figura 4). Para quantificação da atividade lipolítica utilizou-se a fórmula  $A = [(V_a - V_b) \times M \times 1000] / (T \times V_c)$ , onde A = atividade lipolítica (em U/mL),  $V_a$  = volume de amostra titulada (em mL),  $V_b$  = volume do branco titulado (em mL),  $V_c$  = volume da amostra usada na reação (em mL), t = tempo de reação (em min) e M = molaridade da solução de NaOH (PINHEIRO, 2006; GRIEBELER et al., 2009).

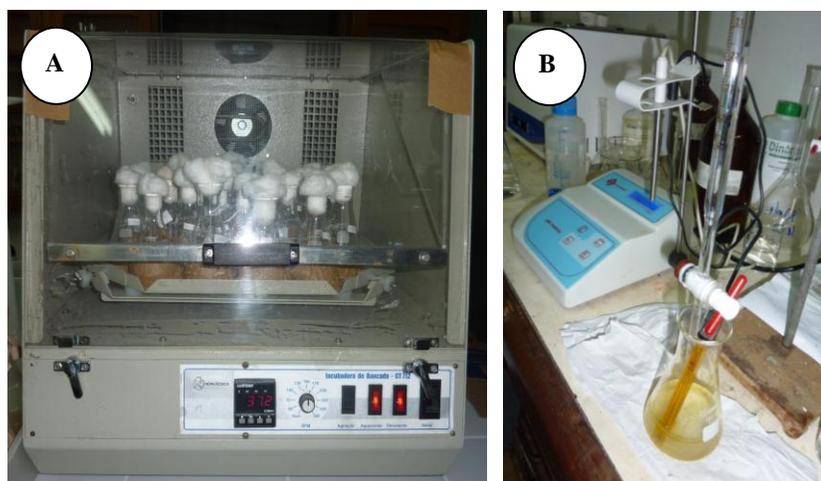


Figura 4 – Misturas de emulsão e extrato aquoso em agitador orbital com temperatura controlada (A) e titrimetria da atividade lipolítica (B).

*2.5 – Produção de biocompostos por fermentação submersa para bioensaio de toxicidade:* Foram utilizados 20 mL de meio líquido YES – extrato de levedura 2% (p/v) sacarose 15% (p/v), em frasco de Erlenmeyer de 125 mL. Uma alíquota de suspensão de esporos de culturas puras foi transferida para o YES, de maneira a se obter  $2 \times 10^6$  esporos/mL. Os cultivos foram incubados a 25 °C, 180 rpm, durante sete dias. Após esse período, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. O pH de cada extrato bruto foi ajustado a 6,5 e posteriormente utilizados no bioensaio em larvas de *A. salina* (HARWIG; SCOTT, 1971; SALLENAVE-NAMONT et al., 2000; ATAYDE, 2011).

2.6 – *Eclosão dos cistos de A. salina para bioensaio de toxicidade*: Foram adicionados 0,2 g de cistos comerciais em 100 mL de solução de sal marinho não-iodado 3% (p/v), pH 6,5, previamente esterilizada a 121 °C/45 min em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 30 °C, 140 rpm, sob iluminação constante (Figura 5A), durante tempo necessário (aprox. 36 horas) para atingir o estágio larval 1 (caracterizado pela ausência de perfuração anal) (HARWIG; SCOTT, 1971; RICE; MANESS, 2004; ATAYDE et al., 2011).

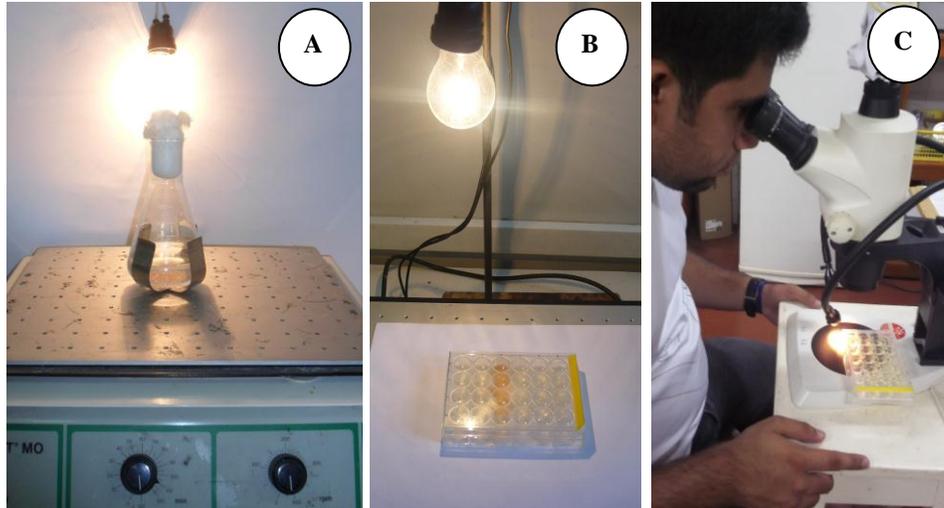


Figura 5 – Procedimentos para eclosão dos cistos (A), ensaio de toxicidade em placa multipoços (B) e visualização da mortalidade sob estereomicroscópio (C).

2.7 – *Bioensaio de toxicidade utilizando A. salina*: Cada bioensaio foi realizado em placa multipoço 6x4. Em cada poço foi inoculado 300 µL de extrato bruto e 1000 µL de suspensão de larvas (estágio larval 1) de *A. salina*. Como controles foram utilizadas larvas em solução salina. As placas foram mantidas sob luminosidade (40 watts) e temperatura (30 °C) constantes, por 24 horas (Figura 5B). Após esse período, a mortalidade de *A. salina* foi determinada em estereomicroscópio com base na imobilidade externa ou interna, observada durante 20 segundos (Figura 5C).

Ao término da contagem dos náuplios mortos, 500 µL de formol foram adicionados em cada poço para contagem do total de larvas presentes. A taxa de mortalidade foi determinada em  $\% \text{ mortalidade} = (\text{número de indivíduos mortos} \times 100) \div \text{número total de indivíduos}$  e o grau de toxicidade foi classificado de acordo a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico(NT); 10-49% = ligeiramente tóxico(LT); 50-89% = tóxico(T); 90-100% = altamente tóxico(AT). Quando

constatada mortalidade no controle, o índice de mortalidade observado nos extratos foi corrigido conforme a fórmula:  $\% \text{ mortalidade corrigido} = \% \text{ entre sobreviventes no branco} - \% \text{ de sobreviventes no tratamento}$  (HARWIG; SCOTT, 1971; FORGIARINI, 2006; GONZÁLEZ et al., 2007; ATAYDE et al., 2011).

2.8. – *Critério para seleção da cultura fúngica submetida à caracterização parcial do respectivo extrato lipolítico bruto* – Dentre as culturas fúngicas em teste, aquela que apresentou o maior quantitativo (em U/mL) de atividade lipolítica associado a menor categoria de toxicidade (não tóxica) foi selecionada para determinação de rendimento do extrato e sua caracterização parcial.

Para essas determinações, novamente procedeu-se a fermentação submersa em meio PESO, conforme proporções e condições descritas anteriormente (item 2.3), em quantitativo total de 1000 mL de meio PESO, dividido em cinco recipientes (capacidade de 1000 mL) contendo 200 mL do meio. Em seguida, efetuaram-se os procedimentos abaixo.

2.9 – *Biomassa seca*: O meio PESO foi filtrado através de papel de filtro pré-aferido. A massa micelial de *A. wentii* DPUA 1725 retida foi desidratada em estufa regulada à 105 °C até peso constante. Para as pesagens, utilizou-se balança analítica. Posteriormente, essa biomassa foi relacionada aos quantitativos de extrato lipolítico bruto nos estados aquoso e liofilizado, para verificação do rendimento (Figura 6).



Figura 6 – Extrato bruto no processo de liofilização. Visão geral dos recipientes contendo extrato acoplados ao liofilizador (A) e detalhe do recipiente (B).

2.10 – *Rendimento (R) percentual de extrato lipolítico bruto aquoso (ELBA):* Para o cálculo desse rendimento, o volume de meio PESO utilizado no início da fermentação submersa foi relacionado ao volume de ELBA obtido após a separação da biomassa micelial (item 2.3) seguida de outra filtragem utilizando sistema de filtro 0,22 µm (Figura 7). Nessa relação, utilizou-se a seguinte fórmula:  $R_{ELBA}(\text{em } \%) = [(\text{volume de ELBA, em mL}) \times 100] \div (\text{volume de PESO, em mL})$ .

2.11 – *Rendimento (R) percentual de extrato lipolítico bruto liofilizado (ELBL):* Amostras do ELBA de *A. wentii* DPUA 1725 (sete réplicas) foram submetidas à liofilização. O rendimento médio de extrato lipolítico bruto liofilizado (ELBL) foi calculado a partir dos dados obtidos em cada réplica de ELBA, submetidos à seguinte fórmula:  $R_{ELBL}(\text{em } \%) = [(\text{peso de ELBL, em g}) \times 100] \div (\text{volume de ELBA, em mL})$ .



Figura 7 – Segunda separação por filtração (filtro 0,22 µm) sob vácuo das frações biomassa micelial e extrato lipolítico bruto.

2.12 – *Estimativa da massa efetiva de ELBL (em g) aplicada em teste quantitativo padrão utilizando meio líquido:* A partir deste rendimento, foi estimada a quantidade (em g) de ELBL efetivamente existente em 2 mL de ELBA usado em teste quantitativo padrão (item 2.4). O valor estimado foi fixado como a quantidade de ELBL a ser empregada nos demais testes quantitativos dessa pesquisa.

2.13 – *Verificação da condição ótima de pH na atividade enzimática do fungo com maior potencial lipolítico:* O quantitativo previamente fixado de ELBL (0,23 g) foi separadamente diluído em 18 mL das soluções tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0; pH 7,0 e pH 8,0 e tampão Tris-HCl pH 9,0. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Em cada

réplica, foi adicionado óleo de oliva extra-virgem 10% (p/v) e goma arábica 5% (p/v). A incubação foi realizada a 37 °C, 150 rpm, durante 15 minutos. Ao final desse período, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos após adição de 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1, v/v). Os brancos para cada pH foram 18 mL da solução-tampão pH em teste suplementado apenas com óleo de oliva extra-virgem 10% e goma arábica 5%, submetidos à mesma condição de incubação e interrupção de reação, já mencionados. Os sistemas foram submetidos à quantificação da atividade lipolítica, através de titrimetria (item 2.9).

*2.14 – Verificação da condição ótima de temperatura na atividade enzimática do microrganismo com a maior potencial lipolítico:* Para verificação da temperatura ótima de atividade lipolítica, o ELBL (0,23 g) foi separadamente diluído em 18 mL da solução-tampão com o pH ótimo previamente verificado. Realizou-se a incubação nas temperaturas de 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45 e 47 °C. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Para todas as temperaturas, utilizou-se agitação de 150 rpm, durante 15 minutos. Ao final desse período, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos após adição de 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1, v/v). Os brancos foram 18 mL da solução-tampão pH ótimo previamente verificado suplementado apenas com óleo de oliva extra-virgem 10% e goma arábica 5%, submetidos à temperatura de incubação em teste, agitação, tempo e interrupção de reação acima mencionadas, com posterior titrimetria para quantificação da atividade lipolítica (item 2.4).

### **3 – Resultados e discussão**

Das 22 culturas submetidas à autenticação, verificou-se resultado positivo para 73% (n=16) como autenticação imediata, ou seja, tiveram a espécie confirmada conforme a literatura taxonômica especializada (Tabela 1).

As demais culturas (27%, n=6) apresentaram pleomorfismo moderado. Nessas culturas não autenticadas, quando verificadas amostras miceliais e exsudatos apenas em partes (zonas viáveis) da colônia, podia-se verificar a espécie procurada. No entanto, devido visualização de características distintas da espécie procurada em outras partes (zonas pleomorfisadas), foram descartadas para submissão nos demais ensaios. Devido critérios adotados nessa pesquisa, os tratamentos de recuperação dessas culturas não foram utilizados.

Tabela 1 – Sumário de dados catalográficos e testes de autenticidade, atividade lipolítica qualitativa e quantitativa, grau de toxicidade de fungos da Coleção de Culturas DPUA-UFAM, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, conservados sob água destilada esterilizada.

Microrganismos	Autenticidade	Potencial político	Atividade lipolítica (U/mL)	Grau de toxicidade
<i>Aspergillus candidus</i> DPUA 1577	-	nr	nr	nr
<i>Aspergillus carneus</i> DPUA 1560	+	PLM	nr	AT
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1539	+	PLM	nr	AT
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> DPUA 1623	-	nr	nr	nr
<i>Aspergillus flavus</i> DPUA 933	+	PLM	nr	AT
<i>Aspergillus japonicus</i> DPUA 1727	+	PLA	14,8±0,4	NT
<i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624	+	PLA	24,9±0,8	AT
<i>Aspergillus wentii</i> DPUA 1725	+	PLA	18,4±0,4	NT
<i>Penicillium bilaiae</i> DPUA 1602	+	PLA	23,2±1,2	AT
<i>Penicillium citrinum</i> DPUA 1617	+	PLM	nr	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1669	+	PLM	nr	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1672	+	PLA	25,8±0,8	AT
<i>Penicillium janczewskii</i> DPUA 1673	+	PLA	20,0±0,9	AT
<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1660	+	PLA	22,3±1,9	AT
<i>Penicillium janthinellum</i> DPUA 1668	-	nr	nr	nr
<i>Penicillium lividum</i> DPUA 1661	+	PLM	nr	AT
<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1667	+	PLM	nr	AT
<i>Penicillium miczynskii</i> DPUA 1674	+	PLA	21,2±0,7	AT
<i>Penicillium paxilli</i> DPUA 1574	-	nr	nr	nr
<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1666	-	nr	nr	nr
<i>Penicillium simplicissimum</i> DPUA 1671	+	PLA	26,2±0,2	AT
<i>Penicillium waksmanii</i> DPUA 1670	-	nr	nr	nr

Diante dos resultados majoritariamente satisfatórios quanto à autenticação imediata (73%), verifica-se sucesso quanto ao método de conservação em água destilada adotado pela Coleção de Culturas DPUA-UFAM.

Das 16 culturas submetidas ao ensaio qualitativo de potencial lipolítico em meio sólido, 44% (n=7) foram categorizadas como *potencial lipolítico moderado* e excluídas dos

ensaios subsequentes. Nesse mesmo ensaio, a maioria (56%; n=9) foi categorizada como *potencial lipolítico alto* e submetidas aos ensaios subsequentes.

Dessas mesmas 16 culturas, após submetidas ao bioensaio de toxicidade contra *A. salina*, a maioria (87%, n=14) foi categorizada como *altamente tóxica* (100% de mortalidade das larvas de *A. salina*) e consideradas inviáveis para utilização como microrganismo *GRAS* – *Generally Regarded As Safe* – para a indústria de alimentos. No entanto, duas culturas se destacam com o perfil GRAS – *Aspergillus japonicus* DPUA 1727 e *Aspergillus wentii* DPUA 1725 – pois foram categorizadas como *não tóxica* (0% de mortalidade das larvas de *A. salina*).

As 9 culturas tiveram sua atividade lipolítica quantificada, obtendo-se valores entre 14,8±0,4 e 26,2±0,2 U/mL (mínimo e máximo, respectivamente). As três culturas com os menores teores de atividade lipolítica foram *Aspergillus japonicus* DPUA 1727 (14,8±0,4 U/mL), *Aspergillus wentii* DPUA 1725 (18,0±0,4 U/mL) e *Penicillium janczewskii* DPUA 1673 (20,0±0,9 U/mL). As três culturas com maiores teores de atividade lipolítica foram *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 (24,9±0,8 U/mL), *Penicillium janczewskii* DPUA 1672 (25,8±0,8 U/mL) e *Penicillium simplicissimum* DPUA 1671 (26,2±0,2 U/mL).

Kaushik et al (2006) obteve 13 U/mL como atividade lipolítica máxima para *Aspergillus carneus* cultivado sob fermentação submersa, valor abaixo daqueles obtidos para as outras espécies de *Aspergillus* utilizadas nessa pesquisa. Wolski (2009) também obteve menor atividade lipolítica (9,5 U/mL) para *Penicillium* sp.

Portanto, as culturas amazônicas aqui selecionadas, por suas características metabólicas intrínsecas, se mostraram bem adaptadas às condições de cultivo e, principalmente, maior potencial de ação sobre substrato rico em lipídios. Os efeitos dessa ação sobre esses substratos necessitam de investigação mais aprofundada, visando definir adequadamente o emprego tecnológico.

Pela associação entre a ausência de toxicidade e expressiva atividade lipolítica, verifica-se que somente as culturas *Aspergillus japonicus* DPUA 1727 (não tóxica e 14,8±0,4 U/mL) e, ligeiramente com melhor resultado, *Aspergillus wentii* DPUA 1725 (não tóxica e 18,0±0,4 U/mL), podem ser consideradas adequadas como fonte de lipases de interesse industrial.

Devido o maior índice de atividade lipolítica verificado no extrato bruto de *A. wentii* DPUA 1725, verificou-se o seu rendimento (em solução aquosa e liofilizado) e suas melhores condições de pH e temperatura para atividade enzimática.

Os rendimentos obtidos de ELBA e ELBL relacionados ao volume inicial do meio, à biomassa micelial seca desenvolvida e o quantitativo, em mL, de ELBL em 2mL de ELBA são apresentados na Tabela 2.

O crescimento celular (biomassa seca) de *A. wentii* DPUA 1725 observado nesse experimento (1,53 g/100mL) foi bastante superior ao verificado em *Penicillium verrucosum* (0,11 g/100 mL) por Pinheiro (2006) e ligeiramente maior ao observado em *Penicillium restrictum* (1,42 g/100 mL) por Freire et al. (1997). Verificam-se assim indícios da adequação do fungo em análise aos componentes utilizados na formulação do meio e às condições de fermentação empregadas nessa pesquisa.

Tabela 2 – Rendimento dos extratos lipolíticos brutos (ELB) e relação entre ELB liofilizado (ELBL) em ELB aquoso (ELBA) de *Aspergillus wentii* DPUA 1725 proveniente da Coleção de Culturas DPUA-UFAM, do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

Biomassa seca (g/100 mL de meio PESO*)	Rendimentos dos extratos lipolíticos brutos				Relação ELBL:ELBA (g:2mL) (g)
	Aquoso (ELBA) (%)	Liofilizado (ELBL) (%)	ELBA  vs Biomassa seca	ELBL	
1,53	88,8±1,1	10,4±2,2	58,2 mL/g	6,7 g/g	0,23

LEGENDA: \*meio PESO = meio utilizado para fermentação submersa, composto de peptona 8%, extrato de levedura 1%, cloreto de sódio 3% e óleo de oliva extra-virgem 1%.

O extrato enzimático bruto liofilizado apresentou condições ótimas de atividade lipolítica à pH 7,0 e 42 °C (Figura 8).

De acordo com Wolski (2008), vários trabalhos apontam o pH neutro (pH 7,0) como ótimo para a atividade lipolítica, corroborando o dado obtido nessa pesquisa. Kamini et al. (1998) também obtiveram pH 7,0 como ótimo para atividade lipolítica de *A. niger* sob fermentação sólida. Para outras culturas dessa mesma espécie, Falony et al. (2006) e Pera et al. (2006) obtiveram pH ótimo ligeiramente menores (respectivamente, pH 6,0 e 6,5), com acentuado e leve decréscimo, respectivamente. Mais acentuada diferença foi obtida na pesquisa de Namboodiri; Chattopadhyaya (2000), que apontaram pH ótimo na faixa 5,0-6,0.

Kamini et al. (1998) verificaram termo-estabilidade da atividade lipolítica para *A. niger* em até 40 °C, com ótima condição em 37 °C, diferente dos dados obtidos nessa pesquisa, que sugerem relativa estabilidade a partir de 42 °C, esta última apontada como a melhor temperatura para atividade lipolítica do extrato bruto analisado nessa pesquisa.

Em sua pesquisa, Pera et al. (2006) apontou, quando comparado ao dado obtido nessa pesquisa, um menor valor de temperatura (35 °C) para atividade ótima de *A. niger* MYA 135, ocorrendo contínuo decréscimo de atividade a partir de 37 °C.

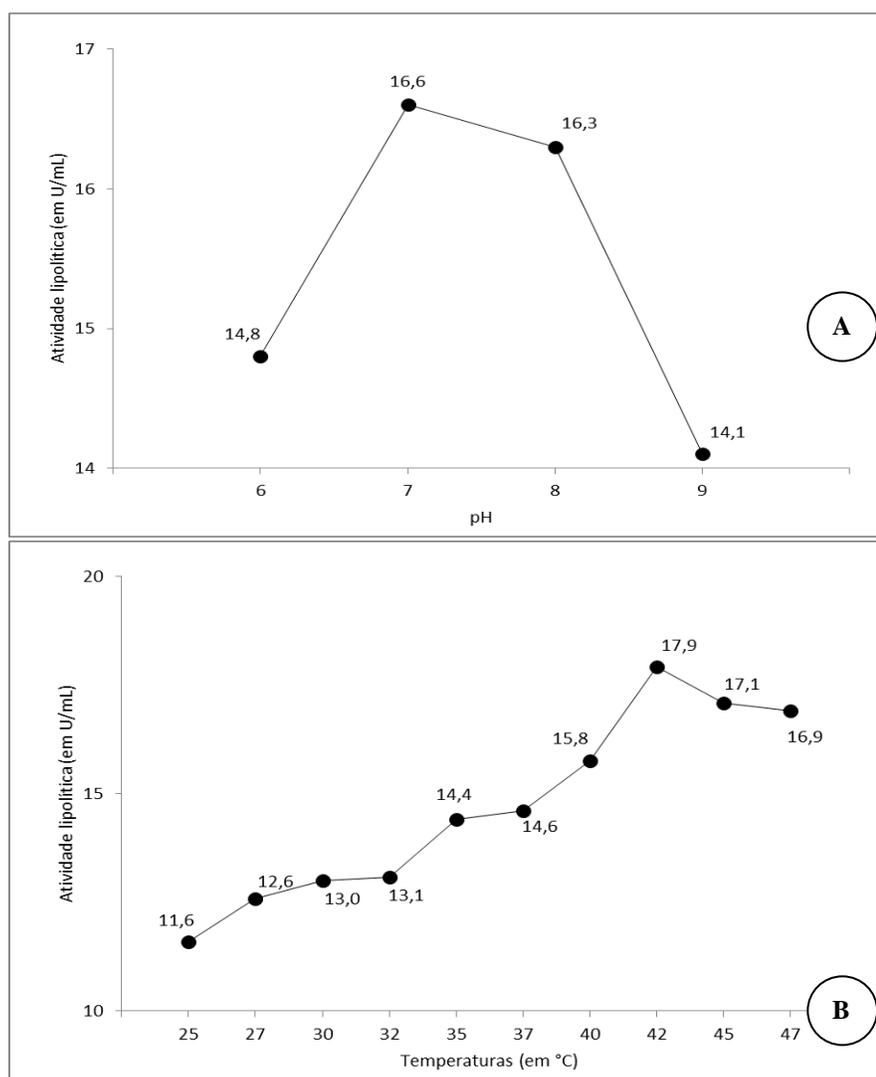


Figura 8 – Condições ótimas de pH (A) e temperatura (B) para atividade da lipase extracelular produzida por *Aspergillus wentii* DPUA 1725 .

Resultados mais similares aos obtidos nessa pesquisa foram publicados por Namboodiri; Chattopadhyaya (2000) e Falony et al. (2006) com diferentes culturas de *Aspergillus niger*. Namboodiri; Chattopadhyaya (2000) apontaram a faixa de 40-45 °C como ótima para atividade lipolítica da enzima purificada. Falony et al. (2006) também obtiveram para *Aspergillus niger* J-1 um ligeiro decréscimo da atividade lipolítica desde a temperatura de 40 até 60 °C, ocorrendo drástica queda nas temperaturas superiores.

Constata-se que as condições ótimas de pH e temperatura para atividade lipolítica de *A. wentii* DPUA 1725 (Figura 8) não diferem da maioria das culturas de fungos estudados em outras pesquisas. Em contrapartida, a relativa termo-estabilidade em temperaturas mais elevadas (Figura 8B) se torna interessante diante da potencial utilização de seu extrato em operações onde o aquecimento é imprescindível. Ressalta-se ainda a necessidade de determinar a temperatura máxima de atividade lipolítica desse extrato.

Quanto à atividade lipolítica, Falony et al. (2006) e Sarkar; Laha (2013) apresentaram 1,46 U/mL como atividade máxima da lipase de *A. niger* obtida sob fermentação submersa. Hamdy; Abo-Tahon (2012) obteve 7,83 U/mL como atividade máxima da lipase de *Aspergillus terreus* var. *africanus* cultivado sob condição de incubação similar aquela utilizada nesse experimento.

Todos esses índices são bastante inferiores quando comparados ao verificado em *A. wentii* DPUA 1725, cultura utilizada nessa pesquisa. Um índice mais aproximado, ainda ligeiramente menor, foi obtido por Prabakhar et al. (2002), com 14,3 U/mL de atividade lipolítica máxima para *A. niger* isolado na Índia.

O extrato obtido a partir de *A. wentii* DPUA 1725, isolado de substrato amazônico e pertencente ao grupo *A. niger*, mostra-se um importante diferencial quando comparado às demais culturas já estudadas.

#### **4 – Conclusão**

Constatou-se que todos os fungos analisados apresentam atividade biológica, com destaque para *Aspergillus japonicus* DPUA 1727 e *Aspergillus wentii* DPUA 1725. Ambas as culturas se apresentam como fonte segura de lipases de interesse para a indústria alimentícia

devido expressiva atividade lipolítica em óleo extra-virgem e ausência de toxicidade contra *A. salina*.

## 5 - REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A. et al. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. *Fungal Diversity*, v. 45, p. 21-32, 2010.

ATANDA, S. A. et al. Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, n. 5, v. 25, p. 4373-4382, 2011.

ATAYDE, H. M. et al.. Bioensaios de toxicidade com espécies de *Artemia*, p. 190-207. In: TEIXEIRA, M. F. S. et al. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*, Manaus:Editora da Universidade Federal do Amazonas, 255p., 2011.

BORMAN, A. M. et al. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, v. 161, p. 361-368, 2006.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, v. 26, p. 75-80, 2003.

FALONY, G. et al. Production of extracelular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FORGIARINI, E.. Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima *horseradish* peroxidase. Florianópolis: UFSC, 2006. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

FREIRE, D. M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63-65, p.409-421, 1997.

GONZÁLEZ, A. M. et al. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 59-61, 2007.

GRIEBELER, N. et al. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioprocess Technology*, 2009.

HABA, E, et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, 2000.p.40-44.

HAMDY, H. S.; ABO-TAHON, M. A. Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. *africanus* (CBS 130.55): production, purification and characterization. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 1723-1736, 2012.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiology*, v. 21, n. 6, p. 1011-06, 1971.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of  $\omega$  3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1552-1558, 2011.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KAUSHIK, R. et al. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, n.40, p.121–126, 2006.

KLARIĆ, M. Š. Adverse effects of combined mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, n. 63, v. 4, p. 519-530, 2012.

NAMBOODIRI, V. M. H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*, v. 35, n. 5, p. 495-502, 2000.

PALHETA, R. A. et al. Enzimas e aplicações biotecnológicas, p.126-153. In: TEIXEIRA, M. F. S. et al. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*, Manaus:Editora da Universidade Federal do Amazonas, 255p., 2011.

PERA, L. M. et al. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 247-252, 2006.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada da Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim – Rio Grande do Sul, Erechim, 2006

PRABAKHAR, T.; KUMAR, K. A.; ELLAIAH, P. The effect of cultural conditions on the production of lipase by fungi. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 61, p. 123-127, 2002.

RICE, S. A.; MANESS, I. B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. *The American Biology Teacher*, v. 66, n. 3, p. 208-14, 2004.

SALLENAVE-NAMONT, C. et al. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia*, n. 149, p. 21-5, 2000.

SARKAR, D.; LAHAR, S. Optimization of extracellular lipase enzyme production from *Aspergillus niger* by submerged and solid-state fermentation process. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 4, n. 4(B), p. 978-985, 2013.

SHING, A. K.; MUKHOPADYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 486-520, 2012.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUGIHARA, A. et al. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization, and Its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, n. 3, p. 182-196, 2010.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W.-B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews*, n. 37, v. 1, p. 94-109, 2012.

WOLSKI, E. Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campos de Erechim, 2008. 94p.

## ITEM 5 – Artigos a serem publicados *Capítulo II*

### RENDIMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA QUALIDADE DE CARÇAÇA E ÓLEOS DE PIRACATINGA *Calophysus macropterus* E EFEITO DO EXTRATO LIPOLÍTICO DE *Aspergillus wentii* DPUA 1725 SOBRE O ÓLEO REFINADO

#### 1 - Introdução

Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), principalmente da família  $\omega$ -3, são encontrados de forma abundante em peixes gordos e óleos de peixe, principalmente nas espécies de águas frias (HARRIS et al., 2007; RAMEL et al., 2010; FIORI et al., 2012). Esses ácidos conferem importantes efeitos benéficos aos consumidores (BURRI et al., 2012; DJOUSSÉ et al., 2012; McMANUS et al., 2012; TUR et al., 2012; VAN DEN ELSEN et al., 2012) e são passíveis de utilização pela indústria farmacêutica e alimentícia (ESPINOSA et al., 2008).

Apesar de afirmações contrárias, várias pesquisas utilizando óleos de peixes de água doce, incluindo espécies amazônicas, demonstram quantitativos expressivos de AGPI, principalmente ácido araquidônico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) (INHAMUNS; FRANCO, 2001, INHAMUNS; FRANCO, 2008), capazes de conferir efeitos fisiológicos e terapêuticos importantes, sendo melhor biologicamente aproveitados pelo consumo de concentrados de óleos de peixes (SUN et al., 2002; RAMEL et al., 2010; ZHANG et al., 2010; McMANUS et al., 2011; TUR et al., 2012).

Para obtenção desses concentrados, podem ser utilizadas diversas técnicas, das quais a hidrólise enzimática apresenta mais vantagens, como exemplo, produção de acilgliceróis, mais nutricionalmente favoráveis que os ésteres metílicos ou etílicos e menor possibilidade de hidrólise de EPA e DHA (SUN et al., 2002).

Entre as diversas fontes de enzimas lipolíticas, aquelas de origem microbiana, especialmente obtidas a partir de fungos, são as mais utilizadas industrialmente porque são mais estáveis, apresentam propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes e são, em sua maioria, extracelulares, facilitando sua recuperação à partir do caldo fermentativo. O uso desses biocatalisadores na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido considerável atenção devida sua especificidade em relação ao substrato (CARVALHO et al., 2003; WOLSKI, 2008; TREICHEL et al., 2010).

Como exemplo da utilização de enzimas lipolíticas fúngicas em óleo de peixe, algumas publicações relataram promissores resultados, mas a efetividade dessas lipases é variável em função da espécie de peixe utilizada para a extração do óleo (SUGIHARA et al., 1996; WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998; YAMAGUCHI et al., 2004; KAHVECI; XU, 2011).

Na Amazônia, a espécie *Calophysus macropterus*, vulgarmente chamada piracatinga ou zamurito, entre outras denominações, apesar de não ser preferencialmente consumida pelos ribeirinhos (SOARES et al., 2008; PÉREZ; FABRÉ, 2009), é utilizada na entressafra pelos frigoríficos locais como substituta de outras espécies de bagres de maior importância comercial, principalmente para a produção de filés (PÉREZ; FABRÉ, 2002; BATISTA et al., 2012).

Quando somente o filé de peixe é comercializado, restam resíduos importantes como matéria-prima para a extração desses óleos, como exemplo a cabeça, pele, espinhas e vísceras (FIORI et al., 2012). Quando adequadamente refinados, óleos de peixe tornam-se adequados para o consumo humano (CREXI et al., 2007).

Buscando o aproveitamento comercial dos resíduos gerados pela indústria frigorífica local, nesse trabalho foi verificado o rendimento e caracterização parcial da qualidade de óleos extraídos pelo processo termomecânico a partir de resíduos de piracatinga *C. macropterus*. Adicionalmente, verificou-se o efeito do extrato lipolítico de *Aspergillus wentii* DPUA 1725 na concentração de ácidos graxos poli-insaturados do óleo refinado desse peixe.

## 2 – Metodologia

2.1 – *Coleta das amostras* – Carcaças congeladas (formada por cabeça, nadadeiras e estrutura óssea principal) de piracatinga (*Callophysus macropterus*) foram coletadas no Iranduba Frigorífico de Pescado, transportadas ao Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas e mantidas em congelador horizontal até o momento dos procedimentos extrativos e analíticos.

2.2 – *Composição lipídica da carcaça* - As amostras de carcaça foram submetidas à secagem até peso constante e, a partir da amostra seca, efetuou-se a extração de lipídios totais conforme descrição das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 2008), em triplicata.

2.2.1 – *Determinação do índice de umidade* – Cinco gramas de carcaças foram pesados em um cadinho de platina previamente seco e tarado, a partir de então denominado

conjunto. Este conjunto foi submetido à secagem em estufa regulada em 105 °C, com pesagens utilizando balança analítica a cada 24 horas, até peso constante. Os dados obtidos foram aplicados na fórmula a seguir, sendo o resultado expresso em percentual de umidade por grama de produto (%): Umidade =  $[(100 \times N) \div P] \times FCU$ , onde: N = diferença de peso (em g) entre a amostra integral e a amostra seca, P = peso da amostra (em g), FCU = fator de conversão de umidade.

O FCU foi calculado por:  $FCU = 100 \div MS$ , onde: MS (matéria seca), por sua vez calculada na fórmula  $MS = (\text{peso da amostra seca} \div \text{peso da amostra úmida}) \times 100$ .

2.2.2 – *Determinação do índice de lipídios totais* – Em triplicata, foram pesados 3,00 a 3,50 g da amostra de carcaça seca e moída, que foi transferida para tubos de ensaio (capacidade 70 mL) com tampa rosqueável. Nesse tubo, foram adicionados 10 mL de clorofórmio + 20 mL de metanol + 8 mL de água destilada (proporção 1:2:0,8), sendo então hermeticamente fechados. Os tubos foram ajustados em agitador rotativo por 30 minutos.

Em seguida, para separação da fração contendo o conteúdo lipídico, foram adicionados 10 mL de clorofórmio + 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Novamente, esses tubos foram hermeticamente fechados e submetidos à mistura em agitador rotativo por 2 minutos. Ocorrida a separação, a camada superior (água + metanol) foi cuidadosamente desprezada com sifão, mantendo-se a camada inferior (clorofórmio + amostra) no tubo. Nessa última camada foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro, sendo essa mistura transferida para tubos de 30 mL, utilizando-se um funil contendo papel de filtro qualitativo, para retenção dos sais, tendo a solução recolhida obrigatoriamente o aspecto límpido.

Deste filtrado foi recolhido 5 mL e transferido para um copo de béquer 50 mL, previamente aquecido, resfriado em dessecador e pesado. Esse béquer foi acondicionado em estufa regulada a 105 °C, até evaporação do solvente. Para pesagem, esse béquer foi previamente resfriado em dessecador.

Os dados obtidos foram aplicados na fórmula LT (lipídios totais) =  $[(PL \times 4) \div (P \times FCU)] \times 100$ , onde PL = peso dos lipídios após a evaporação do solvente; P = peso da amostra; FCU = fator de correção da umidade. O resultado foi expresso em percentual (%) de lipídios por 100 gramas de produto (em matéria integral, amostra úmida).

2.3 – *Extração termomecânica e rendimento do óleo de peixe* – As amostras de carcaça foram pesadas e submetidas à cocção em recipiente metálico (peixe:água de poço

artesiano sem tratamento complementar, aproximadamente 1:2, kg:L), por 30 minutos contados após o início da fervura. Posteriormente, todo o conteúdo cozido foi filtrado em dupla camada de tela comum, para separação da fração sólida menos particulada (ossos e demais tecidos cozidos em grandes pedaços, entre outros) da fração líquida (água, resíduos teciduais mais particulados e óleo bruto). A fração líquida foi submetida à separação em funil de decantação, sendo coletada apenas a fração de óleo bruto.

*2.3.1 – Cálculo de rendimento do óleo bruto em relação ao conteúdo lipídico da carcaça* – A fração óleo bruto obtida após decantação foi pesada, efetuando-se uma relação dessa fração com a quantidade de lipídios extraídos por solventes orgânicos da carcaça antes de submetida à cocção, através da fórmula  $Rendimento\ de\ óleo\ bruto(\%) = [(Óleo\ bruto(em\ g) / Conteúdo\ lipídico\ da\ carcaça\ (em\ g))] \times 100$ .

*2.3.2 – Cálculo de rendimento do óleo bruto em relação ao quantitativo de carcaça* – A fração óleo bruto obtida após decantação foi pesada, efetuando-se uma relação dessa fração com a quantidade de carcaça submetida à cocção, através da fórmula  $Rendimento\ de\ óleo\ bruto(\%) = [(Óleo\ bruto(em\ g) / Peso\ da\ carcaça\ (em\ g))] \times 100$ .

*2.4 – Refino do óleo bruto de peixe* – O óleo bruto foi submetido às etapas de pré-limpeza, degomagem, neutralização, lavagem, secagem, clarificação e filtração (MORAIS et al., 2001; CUNHA et al., 2002; CREXI et al., 2007), necessárias para obtenção do óleo refinado, em sistema experimental (Figura 1). Uma fração desse produto foi submetida ao tratamento enzimático descrito posteriormente.



Figura 1 – Sistema experimental utilizado para refino de óleo.

Na pré-limpeza, para remoção dos sólidos em suspensão, as amostras de óleo bruto (1500 mL) foram centrifugadas a 5000 rpm em centrífuga de copos. O sobrenadante (óleo pré-limpo) foi separado do sedimento (Figura 2), transferindo-se esse óleo para recipiente adequado. O quantitativo de óleo pré-limpo, em g, foi devidamente registrado.



Figura 2 – Óleo bruto de piracatinga após centrifugação para pré-limpeza.

Ao recipiente contendo fração óleo pré-limpo, acomodado sobre aparelho agitador magnético termostaticado, foram adicionados agitadores magnéticos, necessários para a etapa de degomagem, onde foi utilizado ácido fosfórico 85% numa quantidade equivalente a 1% da massa do óleo. Este ácido ficou em contato com o óleo durante 30 minutos, sob temperatura (80 °C) e agitação (500 rpm) constantes (Figura 3) (MORAIS et al., 2001; CUNHA et al., 2002; CREXI et al., 2007).



Figura 3 – Óleo de piracatinga na etapa de degomagem.

Para neutralização, foi utilizado hidróxido de sódio 20% (em 1% de excesso em relação ao índice de acidez previamente determinado), a temperatura de 50 °C, sob agitação constante (500 rpm) e sob vácuo de 400-500 mmHg, durante 20 minutos (MORAIS et al., 2001; CUNHA et al., 2002).

Em seguida, sob agitação lenta (200 rpm), a temperatura foi elevada até 80 °C, quando foi cessado o aquecimento. Para a separação das impurezas sólidas aglutinadas nessa etapa, foi utilizada a centrifugação (CUNHA et al., 2002).

Imediatamente foram realizadas três lavagens com água quente (90-95 °C) (Figura 4A) em quantidade equivalente a 10% da massa do óleo, sob agitação constante (500 rpm), com tempo de contato entre água e óleo durante 5 minutos, sob vácuo (440 mgHg) (MORAIS et al., 2001; CUNHA et al., 2002; CREXI et al., 2007) (Figura 4A).

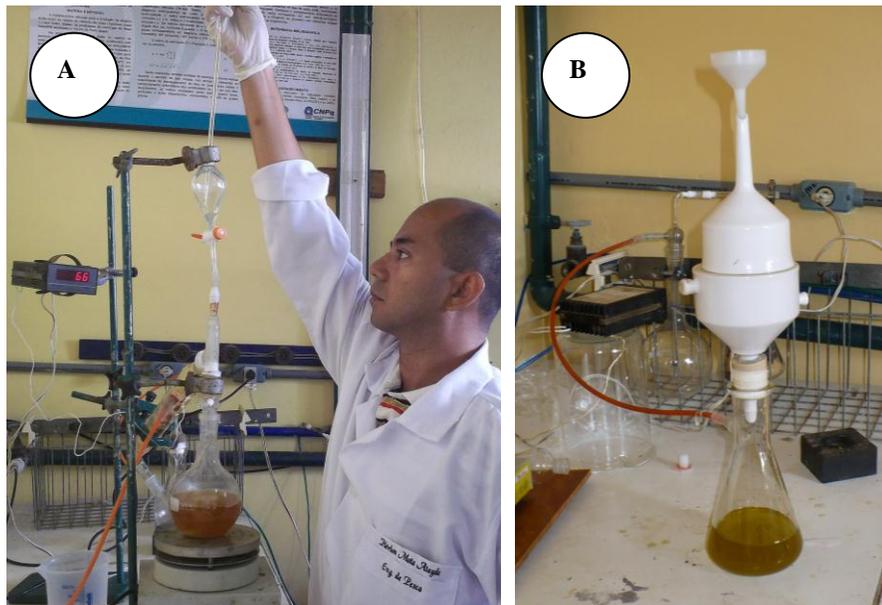


Figura 4 – Procedimentos de lavagem (A) e filtragem (B) do óleo.

Para secagem, a água foi separada do óleo por decantação sob vácuo (700 mmHg), em temperatura de 90-95 °C, até obtenção de umidade equivalente a 0,1%.

Posteriormente, para clarificação, foi adicionado ao óleo um adsorvente (mistura de celite super cell:carvão ativado em pó (9:1, p/p)), em quantidade equivalente a 5% da massa do óleo, sob agitação constante (40 rpm), a uma temperatura de 70 °C e sob vácuo (660 mmHg), durante 20 minutos (CUNHA et al., 2002; CREXI et al., 2007).

A seguir, para separação dos sólidos e obtenção do óleo refinado de peixe, a filtração (Figura 4B) foi realizada em funil de Büchner previamente revestido com uma pré-capa de terra diatomácea (MORAIS et al., 2001; CUNHA et al., 2002; CREXI et al., 2007).

2.5 – *Cálculo de rendimento do óleo refinado em relação ao óleo bruto* – A fração óleo refinado foi pesada, efetuando-se uma relação dessa fração com a quantidade de óleo bruto submetido ao processo de refino (item abaixo), através da fórmula *Rendimento de óleo refinado*(%) = [(Óleo refinado(em g) / Óleo bruto(em g)) x 100.

2.6 – *Caracterização parcial da qualidade físico-química dos óleos de peixe obtidos* – Amostras de óleo de peixe (bruto e refinado) foram submetidas à determinação do índice de acidez em ácido oleico, percentual de ácidos graxos livres, índices de iodo, saponificação e umidade (SÃO PAULO, 2009).

2.6.1 – *Índice de acidez* - Dois gramas de amostra foram pesados em um frasco de erlenmeyer de 125 mL, sobre o qual foram adicionados 25 mL de solução neutra de éter:álcool (2:1, v/v) e, em seguidas, misturados sob agitação manual. Nessa mistura adicionou-se duas gotas de solução indicadora de fenolftaleína e, em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até coloração rósea. Os índices de acidez foram calculados pela aplicação dos dados obtidos na fórmula abaixo, onde V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação (em mL), f = fator de solução de hidróxido de sódio e P = peso da amostra (em g) (SÃO PAULO, 2008):  $IA = [(V \times f \times 5,61) \div P]$ . Os dados obtidos para índice de acidez foram convertidos em Acidez em ácido oléico e Percentual de ácidos graxos livres, conforme fórmulas abaixo: IA em ácido oleico (AAO), em % = IA  $\div$  1,99 (SÃO PAULO, 2008); Percentual de ácidos graxos livres (AGL), em % = IA em ácido oléico x 0,503 (ATAYDE, 2008).

2.6.2 – *Índice de iodo (II), método de Wijs* – 0,25 gramas de amostras foram pesadas em vidro de relógio e cuidadosamente transferidos para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL, utilizando-se 10 mL de tetracloreto de carbono. Nessa solução foi adicionado 20 mL de solução de Wijs, homogêneos sob rotação leve e deixados em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura de aproximadamente 25 °C. Após decorrido o tempo, foram adicionados 10 mL de solução de iodeto de potássio 15% e 100 mL de água recentemente fervida e resfriada. Em seguida, sob agitação constante, foi procedida a titulação com tiosulfato de sódio 0,1 até a obtenção de uma coloração amarela fraca. Adicionou-se 1-2 mL de solução de amido e retomou-se a titulação até o desaparecimento da coloração azul. Ao frasco foi adicionada uma rolha, sendo

o conteúdo titulado vigorosamente agitado. Uma solução branco (sem a amostra) foi preparada nas mesmas condições acima descritas. O índice de iodo foi obtido pela aplicação dos dados do procedimento acima descrito na fórmula  $II = [(B-A) \times f \times 1,27] \div P$ , A = quantidade (em mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N gasta na titulação da amostra, B = quantidade (em mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,01 N gasta na titulação do branco, f = fator da solução de tiosulfato de sódio e P = peso (em gramas) da amostra (SÃO PAULO, 2008).

2.6.3 – *Índice de saponificação (IS)* – Dois gramas de amostra foram acondicionados em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Com auxílio de uma bureta, foram adicionados 20 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio 4%. Ao frasco de Erlenmeyer foi adaptado um refrigerante de refluxo, aquecido até ebulição branda, durante 30 minutos. Após ligeiramente resfriado, foram adicionadas duas gotas do indicador fenolftaleína. Uma solução branco (sem a amostra) foi preparada nas mesmas condições acima descritas. Tanto a amostra quanto o branco foram tituladas com ácido clorídrico 0,5 N até desaparecimento da coloração rósea. O índice de saponificação foi obtido pela aplicação dos dados do procedimento acima descrito na fórmula  $IS = (V \times f \times 28) \div P$ , onde V = diferença entre as quantidades (em mL) do ácido clorídrico 0,5 N gastos nas duas titulações, f = fator do ácido clorídrico 0,5 N e P = peso (em gramas) da amostra (SÃO PAULO, 2008).

2.6.4 – *Determinação de umidade* – Para esta determinação pesou-se 5 g da amostra em uma cápsula de porcelana de 50 mL, previamente aquecida por 1 hora em estufa a 105 °C, resfriada em dessecador com cloreto de cálcio anidro e pesada. Aqueceu-se a amostra em estufa a 130 °C, por 3 horas. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente (aproximadamente 25 minutos) e procedeu-se a pesagem. Em seguida aqueceu-se novamente em estufa a 105 °C, por 1 hora, resfriando-a em dessecador até a temperatura ambiente, procedendo-se a pesagem. Esta última etapa foi repetida até peso constante da amostra. A umidade foi calculada através da seguinte fórmula: Umidade á 105 °C (em %) =  $(100 \times N) / P$ , onde: N = n.º de grama de umidade; e P = n.º de grama da amostra (SÃO PAULO, 2008).

2.7 – *Produção de lipases por fermentação submersa* – A produção das lipases pela cultura de *Aspergillus wentii* DPUA 1725, conservado na Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas, foi conduzida por fermentação submersa em meio PESO (peptona 8%, extrato de levedura 1%, cloreto de sódio 3% e óleo de oliva extra-virgem 1% esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos). Um quantitativo de suspensão de esporos da cultura pura, variável de

acordo com a concentração de esporos obtida na preparação dessa suspensão, foi transferida para o meio PESO de maneira a se obter  $2 \times 10^6$  esporos/mL. Os cultivos foram incubados a 25 °C, 150 rpm, durante 72 horas. A biomassa micelial foi separado do extrato bruto por filtração. Este extrato bruto aquoso foi submetido à liofilização e conservado em ambiente seco até o momento da aplicação (PINHEIRO, 2006).

2.8 – *Tratamento do óleo refinado com extrato liofilizado de A. wentii DPUA 1725* – Para essa etapa, obedeceu-se as condições ótimas de pH, temperatura e a massa de extrato liofilizado efetivamente utilizada em teste quantitativo padrão para a atividade lipolítica dessa cultura (capítulo 1), previamente determinadas.

Utilizou-se 1,8 gramas de óleo refinado de piracatinga emulsionados em goma arábica 5% (p/v) e tampão fosfato de sódio 0,1 M ajustado para pH 7,0, em quantitativo final de 18 mL, acondicionados em erlenmeyers de 125 mL. Nesse sistema adicionou-se 0,23g de extrato enzimático bruto liofilizado de *A. wentii* DPUA 1725. A incubação foi realizada a 42 °C, 150 rpm, durante 15 minutos. Ao final desse período, a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de solução acetona:etanol (1:1), seguida da adição de 20 mL de clorofórmio.

Por titrimetria (até pH 11), adicionou-se solução de hidróxido de sódio 0,05 M. Em seguida, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, obtendo-se um sistema bifásico. A parte aquosa (fase inferior) foi removida por decantação. A parte solvente orgânico (fase superior) foi submetida à desidratação do conteúdo aquoso residual por filtragem em sulfato de sódio anidro. O óleo refinado enzimaticamente tratado foi obtido após a remoção dos solventes em evaporador rotativo (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998; SUN et al., 2002).

2.9 – *Determinação do perfil de ácidos graxos* – Amostras de óleo de peixe (bruto, somente refinado e refinado enzimaticamente tratado) foram submetidas à separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando-se um cromatógrafo à gás com injetor automático e detector por ionização em chama (GC-FID). Empregou-se coluna capilar com fase estacionária polisiloxano modificada com 90% de cianopropil, medindo 100m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e filme de 0,25 µm de espessura. Os parâmetros ajustados foram: temperatura do injetor (245°C); temperatura do detector (245°C); injeção no modo *split* (1:80); vazão do gás de arraste H<sub>2</sub> (1,4 mL min<sup>-1</sup>); vazão dos gases do detector H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/Ar Sintético (30/30/300 mL min<sup>-1</sup>); programa de temperatura (195°C por 0,5 min, aumentando para 235°C a 4°C por min, mantendo-se esta temperatura por 10,5 min e então aumento para 245°C, a 5°C por

min, mantendo-se esta temperatura final por 42 min). A identificação dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi feita por comparação com os tempos de retenção observado para os padrões dos ésteres metílicos de ácidos graxos, obtidos nas mesmas condições cromatográficas. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando-se fator resposta teórico nos cálculos, seguindo-se o procedimento descrito por Visentainer (2012).

2.10 – *Análises estatísticas* – Os resultados obtidos foram submetidos às análises descritivas e comparativas. Diante da não normalidade dos dados, optou-se pelos Modelos Lineares Generalizados utilizando-se o modelo Lognormal, para verificação das diferenças entre óleos e o quantitativo de ácidos graxos. Para as comparações múltiplas, utilizou-se o teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

### 3 – Resultados e discussão

A composição lipídica da carcaça de piracatinga apresentou acentuado índice –  $16,65 \pm 0,60\%$ . Esse dado permite classificar essa espécie como “gorda” ou “muito gorda” conforme indicações de, respectivamente, Stansby e Ackman (SOUZA, 2008).

O rendimento e índices de qualidade (acidez em ácido oleico e percentual de ácidos graxos livres; índice de iodo, índice de saponificação, índice de refração e umidade) nos óleos bruto e refinado de carcaça de piracatinga são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimentos e índices de qualidade obtidos em óleos de carcaça de piracatinga (*C. macropterus*).

Tipo do óleo de carcaça de piracatinga	Rendimento (%)			Índices físico-químicos de qualidade				
	CLR	PC	POB	Acidez (%)		II	IS	Umidade (%)
				AO	AGL			
Óleo bruto	7,2	1,2	-	1,30	0,66	85,8	185,4	2,07
Óleo refinado	-	-	52,5	0,28	0,14	139,6	176,9	0,5

Legenda: CLR = relativo ao conteúdo lipídico do resíduo; PC = relativo ao peso da carcaça utilizada para extração; POB = relativo ao peso do óleo bruto empregado no início do refino; AO = acidez em ácido oleico; AGL = percentual de ácidos graxos livres; II = índice de iodo; IS = índice de saponificação (em mg KOH/g).

Considerando o conteúdo lipídico disponível nesses resíduos, o rendimento em óleo bruto obtido a partir da carcaça de piracatinga *C. macropterus* foi 7,2%, salientando que o método de extração por cocção nas condições experimentais dessa pesquisa, apesar de barato e refletir o método usual adotado nas indústrias de farinha de peixe, não se mostrou eficiente na extração de óleos. Verificou-se que o rompimento celular ocasionado pelo cozimento, promotor da liberação da fração lipídica (MANDARINO; ROESSING, 2001), também acarreta a desnaturação da fração proteica, promovendo o aparecimento de muitos fragmentos. Essa fração proteica fragmentada provavelmente impediu uma separação adequada do óleo liberado ao se utilizar somente a decantação. Recomenda-se a adoção de centrifugação em alta rotatividade para uma maior eficiência na separação dessas frações.

Considerando o rendimento em relação ao peso da carcaça, o rendimento obtido foi bastante inferior àqueles de Andrade (2009) e Segura (2012). Andrade (2009) efetuou a extração de óleo a partir da mistura de resíduos de cinco tipos de peixes caraciformes amazônicos, obtendo 4,8% como índice de rendimento. Por sua vez, Segura (2012) obteve índices diferenciados a partir de resíduos de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (27,6%), pacu *Piaractus mesopotamicus* (42,5%) e curimatá *Prochilodus* spp. (13,8%) separadamente processados. Nos dois trabalhos, as vísceras foram incluídas como componentes do resíduo utilizado, favorecendo a expressiva diferença quando comparados ao rendimento em óleo do resíduo utilizado neste trabalho, exclusivamente carcaça de piracatinga *C. macropterus*.

Pereira (2010) ao utilizar exclusivamente mistura de carcaças de bagres amazônicos obteve 1,3% de rendimento em óleo, índice próximo ao obtido nessa pesquisa. Dessa forma constata-se a importância da inclusão de vísceras como componente dos resíduos a serem utilizados na extração de óleo bruto de peixe, conferindo-se um interessante aumento do rendimento.

Quanto ao índice de acidez em percentual de ácidos graxos livres (%AGL), os dados obtidos nessa pesquisa foram bastante inferiores aos obtidos em óleos brutos de truta arco-íris (6,06%), pacu (4,92%) e curimatá (4,12%) analisados por Segura (2012) e ao óleo bruto obtido em mistura de resíduos de caraciformes (1,73%) por Andrade (2009). No entanto, quando comparado o índice de %AGL dessa pesquisa àquele obtido por Pereira (2010), cujo valor foi de 0,25%, suscitam-se indícios de que as condições experimentais (extração termomecânica)

utilizadas no presente estudo e por Pereira (2010) são mais adequadas para a obtenção de óleos de peixe exclusivamente a partir de carcaças.

Os percentuais de AGL obtidos em óleo bruto nessa pesquisa e por Pereira (2010) também foram bastante inferiores ao valor indicativo do alto nível de deterioração da matéria-prima (iguais ou superiores à 5%), conforme divulgado por Moraes (2000), demonstrando ótima conservação das carcaças provenientes da indústria frigorífica pesqueira local. Devido os critérios higiênicos e de conservação aplicados nesses locais, seus resíduos são matéria-prima de boa qualidade para a extração de óleo de peixe.

O percentual de acidez em ácido oleico (%AO) do óleo bruto obtido nessa pesquisa foi bastante inferior ao índice de 5,5% detectado por Crexi (2005) em óleo extraído da silagem de resíduos (principalmente cabeças) de corvina (*Micropogonias furnieri*). Adicionalmente, aproxima-se da acidez máxima para azeite bruto de oliva (máximo de 1,0% em AO), estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005).

O índice de iodo (II) é diretamente proporcional e indicativo do grau de insaturação do óleo analisado. Para II, os valores obtido nessa pesquisa foram inferiores aos detectados em óleo bruto de pescados marinhos (*Belone belone* – 177; *Mugil auratus* – 184; *Trachurus trachurus* – 189 e *Alosa fallax* – 197, todos em miligramas de iodo por grama de óleo) (BORAN et al, 2006).

Conforme Crexi (2005), o II para os óleos de sardinha, atum, fígado de bacalhau e fígado de cação variam entre, respectivamente, 170-193, 160-195, 145-180 e 140-205 mg I/g de óleo. O II do óleo refinado da carcaça de piracatinga somente aproximou-se do quantitativo mínimo observado em óleo de fígado de cação. Com base nesse índice, as amostras analisadas (óleo bruto e refinado) nessa pesquisa parecem não apresentar expressivo quantitativo de ácidos graxos insaturados, condizente com a constatação apresentada na tabela 3.

Por sua vez, o índice de saponificação (IS) é inversamente proporcional ao conteúdo de ácidos graxos de alto peso molecular na amostra. O IS detectado no óleo bruto das carcaças de piracatinga foi próximo aquele detectado em *Micropogonias furnieri* (187 mg KOH/g), considerado uma fonte favorável de PUFA (Crexi, 2005). Nessa espécie, o conteúdo de ácidos graxos EPA e DHA foi de 52 e 55 mg/g, respectivamente (CREXI, 2005).

Quando comparado ao óleo bruto, ocorreu uma diminuição do IS no óleo refinado de carcaça de piracatinga, presumindo-se assim que o processo de refino efetuou a concentração dos ácidos graxos de alto peso molecular presentes na matéria-prima, propiciando uma melhoria da qualidade nutricional do produto, conforme constatada na tabela 3. Não há dados sobre II e IS em óleos brutos de outras espécies amazônicas que permitam alguma comparação com a Tabela 1.

Os teores de umidade dos óleos de peixe obtidos nesse experimento foram 0,5% que aqueles obtidos por Andrade (2009) e Pereira (2010), respectivamente 0,08% (centrifugação) e 2,35% (decantação). O índice máximo de umidade admitido em óleos é em torno de 0,3% (MORAIS, 2000) pois valores maiores favorecem processos hidrolíticos danosos ao produto e, em óleos brutos, dificultam o refino. Os dados obtidos nessa pesquisa indicam que a decantação utilizada para separação de óleo bruto e água não foi adequado. Com fins de redução de umidade, consequente manutenção da qualidade e aumento da vida útil desse produto, recomenda-se o processo de centrifugação.

O quantitativo dos principais ácidos graxos detectados nos óleos bruto, refinado e refinado enzimaticamente tratado de carcaça de piracatinga são mostrados na Tabela 2. As amostras de óleo dessa pesquisa apresentaram alto conteúdo de ácidos graxos saturados, similar ao observado na gordura dos demais animais marinhos (ZAMBLAZI, 2003).

Considerando apenas os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (16:0) se apresentou como o mais abundante, como usualmente quantificado em peixes de água doce (Inhamuns et al. 2009). Esse dado também é equivalente aos resultados de Wanasundara; Shahidi (1998) em *Brevoortia* sp., Sun et al. (2002) em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) cultivado e outras compilações de Crexi (2005).

Entre os monoinsaturados, os ácidos graxos mais prevalentes foram ácido oleico (18:1 $\omega$ -9) e palmitoleico (16:1). O ácido oleico, apesar de ser um dos ácidos insaturados prevalentes em óleos de várias espécies de peixe, como exemplo perca do Nilo *Lates niloticus* (MBATIA et al., 2010), não é o mais predominante em albacore, cavala e sardinha (CREXI, 2005; PADILHA; AUGUSTO-RUIZ, 2007). O quantitativo de ácido palmitoleico foi similar aos índices obtidos por Moreira et al. (2001) e Ramos Filho (2007) em piracanjuba *Brycon orbignyanus* e superior aos demais peixes de água doce selvagens cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*, dourado *Salminus maxillosus*, pacu *Piaractus mesopotamicus*, pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (RAMOS FILHO, 2007), piraputanga *Brycon microlepis* e

Tabela 2 – Quantitativo de ácidos graxos em óleos de carcaça de piracatinga (*C. macropterus*).

Óleo de carcaça de piracatinga (tipo)	Ácidos graxos (em mg/g, média ± desvio padrão)														
	saturados							monoinsaturados			poli-insaturados				
	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	21:0	16:1	18:1 ω-9	20:1 ω-9	18:2 ω-6	20:2	18:3 ω-3	20:3 ω-6 + 20:4 ω-6*	
<b>Óleo bruto</b>	30,4 ± 1,8	12,7 ± 0,6	257,6 ± 4,6	13,3 ± 0,4	101,4 ± 0,80	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	58,9 ± 2,8	259,1 ± 3,5	9,1 ± 0,4	50,7 ± 1,4	4,3 ± 0,4	17,3 ± 0,4	10,8 ± 0,4	
<b>Óleo refinado</b>	27,8 ± 3,7	9,5 ± 1,1	287,8 ± 37,3	13,6 ± 1,3	118,6 ± 15,5	3,7 ± 0,7	5,8 ± 0,7	43,1 ± 8,2	228,6 ± 42,5	13,1 ± 1,0	40,8 ± 15,2	5,1 ± 0,8	11,4 ± 3,5	16,4 ± 1,9	
<b>Óleo refinado enzimaticamente tratado</b>	23,7 ± 0,9	9,5 ± 0,4	219,7 ± 4,3	27,8 ± 3,7	10,7 ± 0,4	4,1 ± 0,1	3,9 ± 0,1	46,7 ± 1,0	257,4 ± 1,6	7,8 ± 0,2	117,8 ± 2,2	3,7 ± 0,3	23,9 ± 0,1	12,2 ± 0,2	

LEGENDA: \*Houve co-euição completa entre os ácidos, utilizando-se o fator de resposta de 20:3ω-6 para a quantificação (somatório de ambos).  
 NOMENCLATURA DOS ÁCIDOS GRAXOS: 14:0 (ácido mirístico), 15:0 (ácido pentadecanoico), 16:0 (ácido palmítico), 17:0 (ácido heptadecanoico), 18:0 (ácido esteárico), 20:0 (ácido araquídico), 21:0 (ácido henecosanoico), 16:1 (ácido palmitoleico), 18:1ω-9 (ácido oleico), 20:1ω-9 (ácido 11-eicosenoico), 18:2ω-6 (ácido linoleico), 20:2 (ácido 11,14-eicosadienoico), 18:3ω-3(ácido α-linolênico), 20:3ω-6 (ácido 8,11,14-eicosatrienoico) e 20:4ω-6 (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico).

matrinxã *Brycon amazonicus* (MOREIRA et al., 2001).

O quantitativo de ácido linoleico (18:2) detectado nos óleos de carcaça de piracatinga apresenta grande diferença quando comparado aos trabalhos de Inhamuns; Franco (2001), Moreira et al. (2001), Ramos Filho (2007), Inhamuns; Franco (2008), Oliveira (2008), Almeida et al. (2009) e Inhamuns et al. (2009).

Cabe ressaltar que nos óleos extraídos do filé de mapará, peixe amazônico siluriforme pertinente à mesma família (Pimelodidae) das amostras utilizadas nessa pesquisa, os ácidos EPA e DHA foram detectados em médias anuais, seca e cheia, de 18,0 e 16,5 mg/g, respectivamente (INHAMUNS; FRANCO, 2008). Esses quantitativos são superiores ao salmão (14,6 e 6,9 mg/g) e sardinha (4,7 e 5,1 mg/g), EPA e DHA respectivamente, reconhecidos como importantes fontes de ácidos graxos ômega-3 (MARTIN et al., 2006; LEE et al., 2008).

O efeito do extrato lipolítico bruto de *A. wentii* DPUA 1725 sobre o óleo refinado de piracatinga pode ser verificado através do perfil de ácidos graxos (Tabela 2) e do comparativo das classes de ácidos presentes nos óleos (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantitativo total por classe de ácidos graxos em óleos de carcaça de piracatinga (*C. macropterus*)

Óleo de carcaça de piracatinga	Classe de ácidos graxos		
	saturados	monoinsaturados	poli-insaturados
<b>Óleo bruto (1)</b> (mg/g)	424,2 <sup>a</sup>	327,1 <sup>a</sup>	83,1 <sup>a</sup>
<b>Óleo refinado (2)</b> (mg/g)	466,9 <sup>b</sup>	284,8 <sup>b</sup>	73,7 <sup>b</sup>
<b>Óleo enzimaticamente tratado (3)</b> (mg/g)	357,8 <sup>c</sup>	311,9 <sup>a</sup>	157,6 <sup>c</sup>
<b>Diferença 1 vs 2</b> (%)	+ 10,1	- 23,5	- 11,3
<b>Diferença 2 vs 3</b> (%)	- 23,4	+ 9,5	+ 113,8

Observa-se que o ácido palmítico (16:0), o mais prevalente ácido graxo em óleo refinado, teve seu quantitativo reduzido após o tratamento enzimático (Tabela 2). Em contraponto, o ácido oleico (18:1  $\omega$ -9) foi menos afetado pelo extrato enzimático, tornando-se mais prevalente. O único ácido graxo que praticamente não foi afetado pelo extrato enzimático foi o pentadecanoico (15:0).

Considerando o somatório do quantitativo de cada ácido graxo conforme a classe (Tabela 1) verificou-se uma predominância de ácidos graxos saturados em relação aos ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados presentes nos óleos bruto e refinado.

Crexi (2005) obteve aumento de AGI e redução de AGS ao aplicar as mesmas condições de refino dessa pesquisa em óleo de resíduos (principalmente cabeças) de corvina (*Micropogonias furneiri*). Menegazzo et al. (2014) também obteve incremento de AGPI e redução de AGS após refino do óleo de tilápia. No entanto, nas amostras dessa pesquisa, o refino aplicado não se mostrou eficiente (Tabela 3) devido os resultados contrários obtidos (redução de AGI e aumento de AGS), provavelmente pela prevalência de ácidos graxos saturados nas carcaças de piracatinga. Para que futuros êxitos sejam obtidos, as condições de refino devem ser adaptadas às matérias-primas amazônicas.

Pelo teste de Tukey, os índices médios de ácidos graxos apresentaram diferença significativa entre óleo bruto vs óleo refinado ( $p = 0,0199$ ) e óleo refinado vs óleo enzimaticamente tratado ( $p = 0,0009$ ).

De acordo com Wanasundara; Shahidi (1998), as condições amenas da hidrólise enzimática quando comparada às demais formas de concentração de  $\omega$ -3 propiciam a produção da forma acilglicerol, considerada a mais nutricionalmente adequada.

Especificamente para PUFA, Wanasundara; Shahidi (1998) obtiveram um incremento de 24,6% após aplicação (por 80 horas) de lipase comercial de *A. niger* (15500 U/g) em óleo refinado de menhaden (*Brevoortia* sp.), sem comprometimento do conteúdo de EPA e DHA. Comparado ao incremento de PUFA obtido nessa pesquisa, o índice obtido por Wanasundara; Shahidi (1998) foi bastante menor, salientando-se assim a eficiência do extrato enzimático de *A. wentii* DPUA 1725 como alternativa para concentração de PUFA em óleos refinados. A ausência de EPA e DHA no óleo utilizado nessa pesquisa não permite mais considerações.

Pelo teste Friedman, as variâncias das classes de ácidos graxos diferiram significativamente entre os óleos ( $p=0,050$ ).

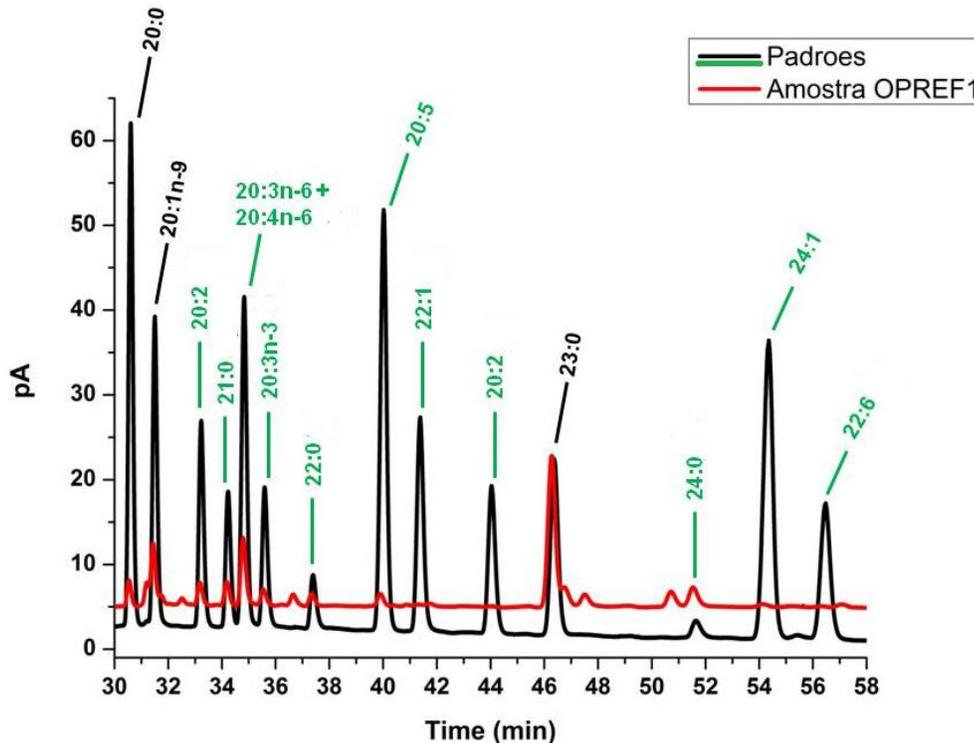


Figura 5 – Cromatograma da amostra refinada e do padrão interno do aparelho GC-FID.

Índices de AA, EPA e DHA (importantes AGI) não foram divulgados nessa pesquisa devido o conteúdo existente (traços) não ter sido detectado pela análise cromatográfica (como exemplo, figura 5). Um baixo quantitativo de EPA também foi detectado por Moreira et al. (2001) em matrinxã (*Brycon cephalus*) cultivado.

#### 4 – Conclusão

Para obtenção de óleo bruto a partir de resíduos de piracatinga, não se recomenda a exclusão de vísceras, fato que acarretou o baixo rendimento do produto. Os quantitativos de ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo termomecânico de piracatinga são análogos à maioria das espécies de peixe de água doce. No entanto, diante da expressiva redução dos ácidos graxos saturados e maior incremento no quantitativo de ácidos graxos poli-insaturados, foi

revelado o potencial de aplicação industrial do extrato lipolítico de *A. wentii* DPUA 1725 na obtenção de concentrados de AGPI, particularmente a partir de óleo de peixe.

## 5 - REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. M.; JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B. Determination of essential fatty acids in captured and farmed matrinxã (*Brycon cephalus*) from the Brazilian Amazonian area. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 86, n. 8, p. 717-722, 2009.

ANDRADE, J. O. S. Caracterização físico-química de óleos de peixe produzidos em escala industrial e laboratorial. *Monografia*. Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Pesqueiras, Curso de Engenharia de Pesca, Manaus-AM, 65p. 2009.

ATAYDE, H. M. Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricadas no Estado do Amazonas. *Dissertação* (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

BATISTA, V. S. et al. *Peixes e pesca no Solimões-Amazonas: uma avaliação integrada*. Brasília: IBAMA/Provárzea, 2012, 276p.

BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chemistry*, v. 98, p. 693-698, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n° 1, de 30 de janeiro de 2012*. Estabelece o Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva.

BURRI, L. et al. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 15401-15419, 2012.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, v. 26, p.75-80, 2003.

CREXI, V. T. Refino de óleos de pescado provenientes dos processos de silagem ácida e termomecânico de farinha. *Dissertação*. Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 107p. 2005.

CREXI, V. T. et al. Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânica de farinha. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 50 -56, 2007.

CUNHA, D. C. et al. Estudo do fracionamento físico do óleo de pescado via “winterização”. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 5, p. 183-188, 2002.

DJOUSSE, L. et al. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: a meta-analysis. *Clinical Nutrition*, v. 31, n. 6, p. 846-853, 2012.

ESPINOSA, S.; DIAZ, M. S.; BRIGNOLE, E. A. Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 213-219, 2008.

FIORI, L. et al. Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera: trout by-products as a possible source of omega-3 lipids? *Food Chemistry*, v. 134, p. 1088-1095, 2012.

HARRIS, W. S. et al. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, n.86, p. 1621-1625, 2007.

INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B. Composition of total, neutral and phospholipids in mapará (*Hypophthalmus* sp.) from the Brazilian Amazonian area. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4859-4863, 2001.

INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B. EPA and DHA quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia. *Food Chemistry*, v. 107, p. 587-591, 2008.

INHAMUNS, A. J. ; FRANCO, M. R. B. ; BATISTA, W. S. . Seasonal variations in total fatty acid composition of muscles and eye sockets of tucunare (*Cichla* sp.) from the Brazilian Amazon Area. *Food Chemistry*, v. 117, p. 272-275, 2009.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hidrolisis process is effective for enrichment of ômega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1552-1558, 2011.

LEE, J. H. et al. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clinic Proceedings*, n. 83, v. 3, p. 324-332, 2008.

MANDARINO, J. M. J; ROESSING, A. C. Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40p.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 e ômega-3: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MBATIA, B. et al. Enzymatic enrichment of ômega-3 polyunsaturated fatty acids in Nile perch (*Lates niloticus*) viscera oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, n. 9, p. 977-984, 2010.

McMANUS, A. et al. Health benefits of seafood men. *Journal of Men's Health*, v. 8, n. 4, p. 252-257, 2011.

MORAIS, M. M. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Dissertação*. Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Química, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande- RS, 107p. 2000.

MORAIS, M. M. et al. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, n. 1, p. 23-33, 2001.

MOREIRA, A. B. et al. Fatty acids profile and cholesterol contentes of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, p. 565-574, 2001.

NELSON, D.L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2014, 1298p.

OLIVEIRA, H. H. Razão entre ômega-6/ômega3, AGPI/AGS e caracterização físico-química do óleo de *Colossoma macropomum* (tambaqui) cultivados no estado de Roraima. *Dissertação* (Mestrado em Química), Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2008.

PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, 2007.

PEREIRA, G. D. S. Caracterização de óleos brutos de pescado amazônico. *Relatório*. Programa de Apoio à Iniciação Científica, Universidade do Estado do Amazonas, Curso de Tecnologia em Produção Pesqueira, Manacapuru-AM, 15p. 2010.

LOZANO, A. P.; FABRÉ, Nidia Noemi. Aspectos reproductivos de la piracatinga *Calophysus macropterus* Lichtenstein, 1819 (Pisces: Pimelodidae) en la Amazonia Central, Brasil. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, v. 36, n. 3, p. 266-288, 2002.

PÉREZ, A.; FABRÉ, N. N. Seasonal growth and life history of the catfish *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (Siluriformes: Pimelodidae) from the Amazon foodplain. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 25, p. 343-349, 2009.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada da Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim – Rio Grande do Sul, Erechim, 2006.

RAMEL, A. et al. Moderate consumption of fatty fish reduces diastolic blood pressure in overweight and obese European young adults during energy restriction. *Nutrition*, v. 26, n. 2, p. 168-174, 2010.

SÃO PAULO. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 4.ed., 1.ed.digital, Instituto Adolfo Lutz:São Paulo, 2008.

SEGURA, J. G. Extração e caracterização de óleos de resíduos de peixes de água doce. *Dissertação*. Mestrado em Ciências, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 95p. 2012.

SOARES, M. G. M. et al. *Peixes de lagos do Médio Rio Solimões*, 2. ed., Manaus: Instituto Piatam, 2008, 160p.

SOUZA, A. F. L. Rendimento, composição química e perfil de minerais das principais espécies de peixes comercializadas no Estado do Amazonas. *Dissertação*. Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

SUGIHARA, A. et al. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization, and Its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

SUN, T.; PIGOTT, G. M.; HERWIG, R. P. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids from viscera of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Food Science*, v. 67, n. 1, p. 130-136, 2002.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, n. 3, p. 182-196, 2010.

TUR, J. A. et al. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *British Journal of Nutrition*, v. 107, p. S23-S52, 2012.

VAN DEN ELSEN, L.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of allergic and cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n. 16, p. 2375-2392, 2012.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 8, p. 945-951, 1998.

WOLSKI, E. Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado. *Dissertação*. Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. 94p. 2008.

YAMAGUCHI, I.; AKOH, C. C.; LAI, O. M. Modification of fish oil by lipozyme TL IM to produce structured lipid. *Journal of Food Lipids*, v. 11, p. 65-73, 2004.

ZAMBIAZI, R. *Tecnologia de Óleos e Gorduras*. Apostila. Curso de Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003. 152p.

ZHANG, J. et al. Inclusion of Atlantic salmon in the Chinese diet reduces cardiovascular disease risk markers in dyslipidemic adult men. *Nutrition Research*, v. 20, n. 7, p. 447-454, 2010.

## 6 - CONCLUSÕES

Os resíduos do processamento industrial de piracatinga (*C. macropterus*) são fontes de baixo rendimento de óleo de peixe. O óleo obtido, mesmo refinado, é nutricionalmente carente de ácidos graxos poli-insaturados importantes, principalmente EPA e DHA, igual a maioria das espécies de peixes de água doce.

Em contraponto, constatou-se a potencial aplicabilidade de lipases sintetizadas por *A. wentii* DPUA 1725 no melhoramento de óleo de peixe. Essa cultura associou ausência de atividade biológica tóxica e importante desempenho do respectivo extrato lipolítico na concentração dos ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo refinado de piracatinga.

## 7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se a possibilidade de uso e valorização de lipases sintetizados por fungos amazônicos no melhoramento das características intrínsecas de óleos em geral, especialmente aqueles ricos em ácidos graxos polinsaturados.

Recomenda-se que as lipases obtidas sejam submetidas à purificação e posterior estudo detalhado da cinética enzimática (como exemplo condições de fermentação, tempo, concentração enzimática, velocidade de reação, especificidade e mecanismo de ação) com fins de otimização dos processos industriais.

Propõe-se a aplicação e verificação do efeito das lipases de *A. wentii* DPUA 1725 no óleo proveniente de espécies de mapará (*Hypophthalmus* spp.), peixe amazônico reconhecidamente rico em ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA.

