



ANDREA DE OLIVEIRA FALCÃO

INFLUÊNCIA DA INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEOS DA AMAZÔNIA

CAMPINAS

2015

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDREA DE OLIVEIRA FALCÃO

INFLUÊNCIA DA INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEOS DA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestra em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição Experimental e Aplicada à tecnologia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Alves Macedo

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Andrea de Oliveira Falcão, e orientada pela Prof.^a Dr.^a Juliana Alves Macedo

Assinatura da orientadora

Campinas 2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

F182i Falcão, Andréa de Oliveira, 1986-
Influência da interesterificação enzimática nas propriedades biológicas de
óleos da Amazônia / Andréa de Oliveira Falcão. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Juliana Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Buriti. 2. Óleo. 3. Interesterificação enzimática. 4. Atividade antioxidante. I.
Macedo, Juliana Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of enzymatic interesterification in the biological
properties of
Amazonian oils.

Palavras-chave em inglês:

Buriti

Oil

Enzymatic interesterification

Antioxidant activity

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo

Marcelo Lima Ribeiro

Paula Speranza

Data de defesa: 11-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo

Presidenta
FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Membro Titular
Universidade São Francisco

Prof^a. Dr^a. Paula Speranza

Membro Titular
FEA / UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri

Membro Suplente
IBB / UNESP

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Badan Ribeiro

Membro Suplente
FEA / UNICAMP

RESUMO

No Brasil, especialmente na Amazônia, a variedade de óleos vegetais pouco explorados, com excelentes propriedades nutricionais, vem atraindo o interesse de pesquisadores para o potencial biológico destes óleos. Somado a isto, há o crescente interesse da indústria alimentícia na obtenção de lipídios estruturados, com melhores propriedades físico-químicas e nutricionais. A interesterificação enzimática é usada na reestruturação dos triacilgliceróis, induzindo a troca dos ácidos graxos na estrutura do glicerol. O uso de lipases, em reações de interesterificação tem apresentado resultados positivos na síntese de gorduras zero-trans e também de produtos de alto valor agregado, como substitutos de gordura de leite materno e manteiga de cacau. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico, através da determinação dos compostos minoritários e da capacidade antioxidante, dos óleos amazônicos de buriti e murumuru, da mistura destes e dos novos lipídios estruturados, gerados pelo processo de interesterificação em três sistemas enzimáticos diferentes: com lipase não comercial, produzida por fermentação em estado sólido do microorganismo *Rhizopus* sp.; com lipase comercial Lipozyme TL-IM (NOVOZYME®); com a adição das duas lipases concomitantemente. Os resultados mostraram o óleo de buriti como fonte de carotenos e tocoferóis, sem efeitos citotóxicos e de boa capacidade antioxidante, sendo superior à gordura de murumuru em todos estes quesitos. A reação de interesterificação enzimática originou lipídios estruturados ricos em carotenos e tocoferóis, mantendo as características do óleo original. A capacidade antioxidante dos lipídios estruturados, em relação à simples mistura foi preservada ou melhorada de acordo com a lipase utilizada. As análises *in vitro* mostram os lipídios estruturados como substâncias capazes de modular a atividade das enzimas antioxidantes, podendo atuar no combate ao estresse oxidativo.

Palavras chave: Buriti, Murumuru, óleos, interesterificação enzimática, atividade antioxidante

ABSTRACT

In Brazil, especially in the Amazon, the variety of underexploited vegetable oils with excellent nutritional properties has attracted interest in the study of the biological potential of these oils. Added to this, there is growing interest in the food industry in obtaining structured lipids, with better physicochemical and nutritional properties. The enzymatic interesterification is used in restructuring the triglycerides, inducing exchange of the fatty acids in the glycerol structure. The use of lipases in interesterification reactions has shown positive results in the synthesis of zero-trans fats as well as high value-added products, as a substitute for breast milk fat and cocoa butter. Therefore, the purpose of this study was to assess the biological potential, by determining minor compounds and antioxidant capacity, of the Amazonian oils buriti and murumuru, of their blends and of the new structured lipids, generated by the interesterification process in three different enzymatic systems: with non-commercial lipase produced through solid-state fermentation by *Rhizopus* sp.; with commercial lipase Lipozyme (NOVOZYME®); and with concomitant addition of the two lipases. The results showed Buriti oil as a source of carotenes and tocopherols, without cytotoxic effects; and as an oil of good antioxidant capacity, being superior to murumuru fat in all these points. The reaction of enzymatic interesterification has originated structured lipids rich in carotenes and tocopherols, keeping the characteristics of the original oil. Antioxidant capacity of the structured lipids, compared to their simple mixture, was preserved or enhanced according to the lipase used. *In vitro* analysis show the structured lipids as substances capable of modulating antioxidant enzymes activity, being able to act on the combat of oxidative stress.

Keywords: Buriti, Murumuru, oils, enzymatic interesterification, antioxidant activity.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
DEDICATÓRIA	XV
AGRADECIMENTOS	XVII
LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE TABELAS	XXI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XXIII
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.)	5
Murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i> Mart.)	9
Interesterificação de óleos e gorduras	12
Atividade antioxidante	20
Potencial antioxidante em óleos e gorduras	24
Carotenóides	24
Tocoferóis.....	25
Compostos fenólicos	26
Modelo experimental de atividade antioxidante	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Caracterização química dos compostos minoritários bioativos	30
4.1.1. Teor de β -caroteno	30

4.1.2. Teor de Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)	31
4.1.3. Conteúdo de fenólicos totais	32
4.2. Avaliação da atividade antioxidante através de ensaios de sequestro de radicais livre	32
4.2.1. DPPH	32
4.2.2. ORAC	33
4.3. Cultivo Celular	34
4.3.1. Avaliação da citotoxicidade das amostras por ensaio de MTT	35
4.3.2. Avaliação da modulação de enzimas antioxidantes em hepatócitos humanos.....	36
4.3.2.1. Preparo do extrato enzimático	36
4.3.2.2. Dosagem de proteínas	37
4.3.2.3. Determinação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) ...	38
4.3.2.4. Determinação da atividade enzimática de catalase	38
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1. Caracterização do compostos minoritários bioativos	43
6.1.1. Teor de β -caroteno	43
6.1.2. Teor de Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)	45
6.1.3. Conteúdo de Fenólicos Totais	49
6.2. Avaliação da atividade antioxidante através de ensaios de sequestro de radicais livres	51
6.2.1. DPPH	51
6.2.2. ORAC.....	54

6.3. Cultivo celular.....	57
6.3.1. Avaliação da citotoxicidade das amostras por ensaio de MTT.....	57
6.3.2. Avaliação da produção de enzimas antioxidantes em hepatócitos humanos.....	60
Superóxido dismutase (SOD)	60
Catalase.....	62
7. CONCLUSÃO	67
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO I: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS POR INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS DA AMAZÔNIA	89
1. Reação de interesterificação enzimática	89
2. Caracterização das lipases utilizadas	89
3. Composição em ácidos graxos dos óleos	90
4. Composição em triacilgliceróis do óleo de buriti, da gordura de murumuru e dos lipídios estruturados formados	91

À minha mãe, Rosana, não apenas por ter me mostrado o caminho, mas por sempre acreditar que eu era capaz de segui-lo.

AGRADECIMENTOS

À minha família. Meus pais, Rosana e Odair pela educação, carinho, amor, apoio, incentivo e compreensão. Meus irmãos, que mesmo longe sempre estiveram presentes na minha vida e em meu coração. E minha vizinha que me criou com tanto amor e carinho. Cada conquista minha é de vocês também.

Aos meus amigos mais antigos: Rafa, Wesley, Mimi, Rosi e Cássio pela amizade inabalável depois de tantos anos. Mesmo que a distância nos separe, guardo um pedacinho de vocês em mim.

Aos queridos amigos que fiz em Campinas, desde o começo desta caminhada: MÔ, Beto, Paulinha, Vivi, aos novos amigos: Naldo e Thalles. Agradecimento especial ao Thi (Amore) pela amizade e companheirismo em todos esses anos. O que seria de mim, aqui, sem vocês?

Ao meu namorado Fe, que sempre acreditou no meu potencial, me motivando a fazer o mestrado. Obrigada por todo o carinho e pela compreensão.

Às minhas queridas colegas de laboratório, Vânia e Naiara, por todos os ensinamentos, ajuda e companhia, até mesmo aos finais de semana, quando fazíamos experimentos. Vou sentir saudades dos nossos bate-papos animados e inúmeras risadas! Às alunas de iniciação científica Liege e Tati, que tanto me ajudaram e também se tornaram amigas valiosas. Vocês são meninas de ouro e as guardarei no coração.

À Prof^a Dr^a Juliana pela confiança, paciência e orientação, desde o início deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp pela oportunidade proporcionada.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A: Fruto do buriti maduro integral. B: Fruto de buriti sem casca, expondo a polpa comestível (Fonte: SAMPAIO e CARRAZA, 2012)6
- Figura 2:** A: Detalhe do fruto de murumuru, casca e polpa. B: Semente preenchida de gordura (Fonte: Bezerra VS, 2012)9
- Figura 3:** Produtos resultantes da reação de interesterificação química e enzimática de diferentes lipídios. 3a. reação de diferentes glicerídios por catálise química ou com lipase não específica; 3b. reação de diferentes glicerídios catalisada com lipase 1,3 específica; 3c. reação de glicerídios e ácidos graxos livres por interesterificação química ou com lipase não específica; 3d. reação de glicerídios e ácidos graxos livres catalisada com lipase 1,3 específica; 3e. reação de glicerídios e ácidos graxos livres catalisada por lipase 1,3 específica para os ácidos graxos A e B (Fonte: CARVALHO et al., 2003)14
- Figura 4:** Células de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) vista ao microscópio em dois momentos distintos, baixa confluência à esquerda e confluência máxima à direita. Barra de escala = 100µm. Disponível em: ATCC < <http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 11 de nov. 201428
- Figura 5:** Atividade de sequestro do radical DPPH (%)52
- Figura 6:** Viabilidade da linhagem celular Hep-G2 (%) após exposição das amostras por 5 horas de ensaio58
- Figura 7:** Atividade específica *in vitro* da enzima superóxido dismutase citosólica (SOD-CuZn) em linhagem celular Hep-G2, após exposição das amostras por 5h, em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL61
- Figura 8:** Atividade *in vitro* da enzima catalase em linhagem celular Hep-G2 após exposição das amostras por 5h de ensaio em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL..63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas do óleo de buriti	7
Tabela 2: Características físico-químicas da gordura de murumuru	11
Tabela 3: Natureza e ação das espécies reativas do oxigênio (ROS)	21
Tabela 4: Descrição das amostras e dos sistemas enzimáticos avaliados	29
Tabela 5: Teor de β -caroteno do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados	43
Tabela 6: Teor de tocoferóis óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados	46
Tabela 7: Teor de fenólicos totais do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados	49
Tabela 8: Capacidade antioxidante do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados através de ensaio ORAC	55
Tabela 9: Composição em ácidos graxos (%) do óleo de buriti, da gordura de murumuru e da mistura	90
Tabela 10: Classe de triacilgliceróis no óleo de buriti, gordura de murumuru, mistura e lipídios estruturados catalisados por diferentes sistemas enzimáticos	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH - Radical hidroxila

$^1\text{O}_2^-$ - Oxigênio singlete

AUC – Área abaixo da curva

CuZn – Cobre e zinco, cofatores da enzima SOD citosólica

DHA - Ácido docosahexaenóico

DMSO – Dimetil sulfóxido

DPPH – Radical 2,2, difenil, 1 picrilhidrazila

GLA - Ácido γ -linoleico

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

Hep-G2 – Linhagem celular de hepatocarcinoma humano

MEM – Meio de cultura mínimo Essencial Eagle

Mg – Manganês, cofator da enzima SOD mitocondrial

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio].

O_2^- - Ânion radical superóxido

ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio

PBS – Tampão fosfato salino

ROS - Espécies Reativas do Oxigênio

Rpm – Rotações por minuto

SDS - Sulfato dodecil de sódio

SOD – Enzima superóxido dismutase

SSS – Triacilglicerol tri-saturado

SSU - Triacilglicerol monoinsaturado-di-saturado

SUU – Triacilglicerol di-insaturado-monoin saturado

TAG - Triacilglicerol

Trolox® - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromanol-2-ácido carboxílico

UUU – Triacilglicerol tri-insaturado

WST - Sal de tetrazólio (WST-1 (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-
2 H tetrazólio)

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Amazônia brasileira é extremamente rica e diversificada e possui um valioso reservatório de palmeiras. No mundo tem-se registro de 3.000 espécies de palmeiras, das quais 390 ocorrem no Brasil, com grande maioria nativa da Amazônia, onde há 41 gêneros e 290 espécies. Estas espécies vegetais são de grande utilidade à população local como alimento, material para artesanatos, cosméticos, remédios, utensílio doméstico e, no agronegócio de frutos, palmitos e óleos comestíveis. Porém, a maioria das espécies ainda é pouco conhecida quanto ao seu potencial biológico e sua contribuição às populações locais e para a sociedade de um modo geral (OLIVEIRA e RIOS, 2014).

As árvores oleaginosas diferem muito entre si em tamanho, forma e na qualidade do óleo produzido. As descrições sobre propriedades destes óleos resultavam do conhecimento acumulado pela população amazônica e por sua experiência empírica no uso cotidiano destes. Porém, acredita-se que os óleos amazônicos possuem grande potencial para aplicação nos diversos setores de cosméticos, fármacos e alimentos funcionais. Estudos sobre a qualidade nutricional destes óleos são escassos, mas já demonstram óleos ricos em tocoferóis, tocotrienóis e carotenóides, compostos capazes de proporcionar inúmeros benefícios à saúde (BALLIC e GERSHOFF, 1981; ALBUQUERQUE et al., 2005; SILVA et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010)

Diante deste cenário, a avaliação do potencial biológico dos óleos e gorduras da Amazônia é de grande interesse. Além dos óleos naturais, a produção de bases gordurosas com características físico-químicas mais apropriadas para aplicação industrial, apresentando também melhores propriedades biológicas e nutricionais, é uma necessidade iminente com grandes possibilidades de aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética.

Dentre as técnicas disponíveis para a produção destas bases gordurosas, as reações de interesterificação enzimática mostram-se uma opção interessante. Estas reações são utilizadas na reestruturação de triacilgliceróis (TAGs), induzindo

a troca de ácidos graxos na estrutura do glicerol. As mudanças na composição do TAG original, comparado a uma simples mistura de óleo/gordura, modifica as propriedades físicas e nutricionais do TAG reestruturado, aumentando assim as possíveis aplicações deste lipídio (IWASAKI e YAMANE, 2000; NUNES et al., 2011).

Muitos estudos têm sido realizados para a produção de lipídios estruturados ou modificados utilizando lipases disponíveis comercialmente. Nestes trabalhos são produzidos lipídios que podem ser utilizados como substitutos de leite materno, análogos ao de manteiga de cacau, margarinas zero trans, lipídios ricos em ω -3, entre outros (SENANAYAKE e SHAHIDI, 2002; RESHMA et al., 2008; SILVA et al., 2009; ADHIKARI et al., 2010; SHIN, AKOH e LEE, 2010; BORHAN; SAID e SAHRI, 2011; DEBNATH et al., 2012).

Os óleos e gorduras da Amazônia podem então ser modificados para aplicações específicas na indústria de alimentos, na formação de óleos e gorduras de uso nutricional e funcional, ou para as indústrias de cosméticos e fármacos, com a produção de bases gordurosas de aplicações específicas, como filtro solar, antioxidantes e antimicrobianos.

O potencial biológico das amostras será avaliado em função da sua capacidade antioxidante, propriedade funcional ligada a diversos aspectos da promoção de saúde, como prevenção de doenças crônico degenerativas não transmissíveis, quimioprevenção e antienvhecimento. A determinação do potencial antioxidante é uma ferramenta útil na prospecção de compostos e alimentos bioativos. Os ensaios selecionados buscam levantar dados do potencial nutracêutico e/ou cosmético das amostras.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial antioxidante do óleo de buriti e da gordura de murumuru provenientes da região amazônica, assim como dos lipídios estruturados gerados por via biotecnológica, a fim de promover novos produtos para a indústria nutracêutica e/ ou cosmética.

2.1. Objetivos específicos

- Quantificar os principais compostos antioxidantes do óleo de buriti, da gordura de murumuru, da mistura simples entre este óleo e esta gordura e dos lipídios estruturados formados após o processo de interesterificação enzimática (carotenóides, tocoferóis e fenólicos totais);
- Avaliar a capacidade antioxidante via sequestro de radicais livres das amostras originais, da mistura simples e dos lipídios estruturados gerados por via biotecnológica (ORAC e DPPH);
- Avaliar a toxicidade das amostras em cultura de células de hepatócito humano;
- Avaliar o potencial antioxidante das amostras por indução das enzimas antioxidantes de hepatócitos (superóxido dismutase e catalase).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O interesse em utilizar óleos e gorduras da região amazônica não se sustenta apenas no potencial biológico destes, mas também na manutenção do bioma amazônico e na melhora das condições de vida para a população local, que vive do extrativismo. A utilização de palmeiras nativas na região amazônica traz a perspectiva de melhorias no ambiente físico, como foi o caso da utilização da palma/dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), para recuperação de áreas devastadas no estado do Pará. Além da contribuição para o balanço do ecossistema, houve ainda a melhora no padrão de vida da população local (BALLIC, 1979; LOPES et al., 2007).

❖ **Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.)**

A palmeira de buriti cresce em regiões alagadas ao longo dos rios, em florestas e savanas, principalmente na região do Amazonas, onde existe uma grande concentração destas palmeiras. É uma planta nativa do Brasil, mas adaptou-se bem em países da América do Sul. Seu fruto, o buriti, é um componente importante na dieta dos índios Apinayé (BALLIC e GERSHOFF, 1981).

O fruto do buriti é duro, possui casca escamosa e vermelha e polpa de coloração laranja-avermelhada macia e oleosa (SILVA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010). Sua polpa é reconhecida como excelente fonte de carotenóides (provitamina A), superando em muitas vezes a quantia encontrada em cenouras e couve (LIMA, 1987; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; MALHÃES e SABAA-SRUR, 2011). A Figura 1 apresenta algumas das principais características do fruto de buriti.

Além do alto teor de carotenóides, diversos estudos apontam a polpa de buriti como uma ótima fonte de tocoferóis (vitamina E), possuindo ainda altas concentrações de fitoesteróis (COSTA et al., 2010; RODRIGUES, DARNET e SILVA, 2010). A deficiência de vitamina A é um problema frequente na população brasileira e leva ao desenvolvimento de certas doenças como infecção bucal, dor de dentes, infecção ocular e xerofthalmia. No Nordeste, a polpa de buriti é usada na preparação de doces e biscoitos visando suprir essa deficiência. O buriti pode

também fornecer uma boa quantidade de proteína na dieta humana. Sua polpa possui 11% de proteínas, quase igual ao teor encontrado no milho. A fruta também é usada na prevenção e recuperação de crianças desnutridas (CORREIA, 1926; MARIATH, LIMA, SANTOS, 1989, AQUINO et al., 2012a).

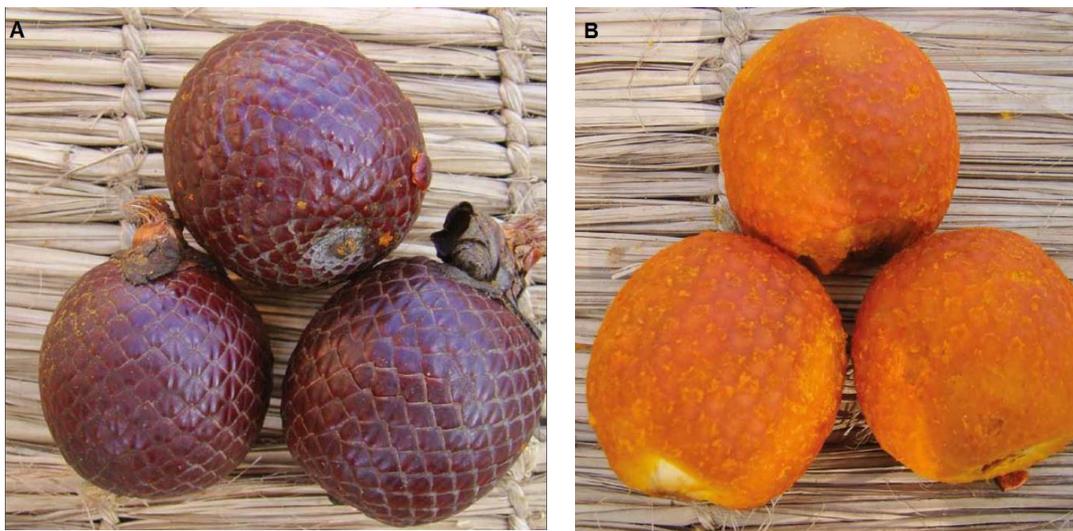


Figura 1: A: Fruto do buriti maduro integral. B: Fruto de buriti sem casca, expondo a polpa comestível (Fonte: SAMPAIO e CARRAZA, 2012).

O óleo de buriti é extraído de forma artesanal em comunidades indígenas e ribeirinhas e a composição e o valor nutricional deste óleo pode variar com a estação e o processo de extração. Os frutos são descascados, despulpados e a polpa é cozida em água fervente, até a separação total da fração oleosa. A extração industrial baseia-se em tecnologias convencionais e envolve etapas de despulpamento, secagem e prensagem da polpa para extração do óleo, seguida de extração sólido-líquido da torta, em alta temperatura, utilizando n-hexano para remover o óleo residual. Após a extração, segue-se o refino do óleo com etapas de degomagem, neutralização, clarificação e desodorização (RIBEIRO et al., 2010; AQUINO et al., 2012b). Na Tabela 1 são apresentadas algumas características do óleo de buriti extraído de forma artesanal, sem uso de solventes em laboratório de pesquisa.

Tabela 1: Características físico-químicas do óleo de buriti.

Substâncias	Quantidade
Ácidos graxos livres (%)	1,5
Índice de peróxido (meq O₂/kg)	7,4
Índice de estabilidade do óleo (h, 100°C)	16,9
Matéria insaponificável (%)	1,3
Compostos polares (%)	3,3
Esteróis totais (ppm)	2.332
Carotenos (ppm)	1.707
Tocoferóis (ppm)	800
Ácidos graxos	(%)
Saturados	
Mirístico (C14:0)	0,1
Palmítico (C16:0)	17,3 – 19,2
Esteárico (C18:0)	2,0
Insaturados	
Oleico (C18:1)	73,3 – 78,7
Linoleico (C18:2)	2,4 – 3,9

Fonte: SANTOS et al., 2013; SANTOS, ALVES e RUÍZ-MÉNDEZ, 2013; ALBUQUERQUE et al., 2005.

O óleo de buriti é de alta qualidade nutricional, com baixa acidez, devido a seu baixo teor de ácidos graxos livres. É rico em tocoferóis e possui concentrações altíssimas de carotenóides, principalmente o β -caroteno, responsável pela coloração vermelho alaranjada característica deste óleo, tornando-o uma das maiores fontes de carotenos da natureza (RODRIGUEZ AMAYA, 1999).

Os ácidos graxos presentes no óleo de buriti são predominantemente de cadeia longa, destacando-se, principalmente o ácido graxo insaturado oleico, com cerca de 75% do total, superior ao teor encontrado em azeite de oliva e o ácido graxo saturado palmítico com 18% do total de ácidos graxos (ALBUQUERQUE et al., 2005; SILVA et al., 2009).

Estudos de ALBUQUERQUE et al. (2003) sugerem a utilização do óleo de buriti na prevenção do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) devido a semelhança de seu espectro ao da trioleína, um triacilglicerol de ácido oleico, rico em ômega 9, capaz de atuar na diminuição dos níveis de colesterol LDL no organismo.

O interesse na utilização de ingredientes naturais em fármacos e cosméticos vem crescendo muito nas últimas décadas e o buriti ganha atenção por ser um fruto rico em carotenóides bem como seu óleo, que é frequentemente utilizado na produção de cosméticos. Ensaios *in vitro* com cremes e loções formulados com óleo de buriti apresentaram baixa citotoxicidade e aumentaram a viabilidade celular, devido as suas altas concentrações de carotenóides e tocoferóis, capazes de proteger a membrana celular contra o estresse oxidativo (ZANATTA et al., 2008).

KOOLEN et al. (2013) testou extratos de folhas, tronco e frutos de buriti quanto a sua capacidade antimicrobiana, porém, os resultados mostraram apenas atividade fraca ou moderada para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, dois patógenos, gram-positivo e gram-negativo, respectivamente. Outro estudo similar foi realizado com o óleo do fruto de buriti e demonstrou resultados satisfatórios de inibição de quatro patógenos, sendo um o *S. aureus*. Neste mesmo estudo, verificou-se a capacidade cicatrizante de um creme formulado com 10% de óleo de buriti, o qual demonstrou eficiência no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos *Wistar*, levando a regeneração mais rápida quando comparado ao controle (BATISTA et al., 2012). A utilização de óleo de buriti na formulação de cremes para tratamento pós-sol também foi avaliada e este foi considerado um bom veículo de transporte de antioxidantes para regeneração da pele queimada, porém, sua

efetividade como protetor solar não foi observada, ao contrário do esperado, uma vez que, este óleo é fonte de carotenos (ZANATTA et al., 2010).

❖ Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.)

O Murumuru ou muru-muru (*Astrocaryum murumuru*) é uma palmeira típica de áreas de florestas primárias, tanto de terra firme quanto periodicamente alagadas, podendo ainda ser encontrado em áreas secundárias (capoeiras) e pastagens cultivadas (BALLIC, 1979; SILVA, 1996). É uma árvore nativa da Amazônia, seu fruto contém polpa amarela e semente em formato cônico, de casca lenhosa, com interior preenchido por gordura branca, rica em ácidos graxos saturados láurico e mirístico e altamente nutritiva (PESCE, 1941). A Figura 2 apresenta algumas das principais características do fruto e da semente de murumuru. Os frutos e sementes do murumuru são consumidos crus, cozidos e assados pela população indígena e não indígena no estado do Acre (CAMPOS e EHRINGHAUS, 2003).

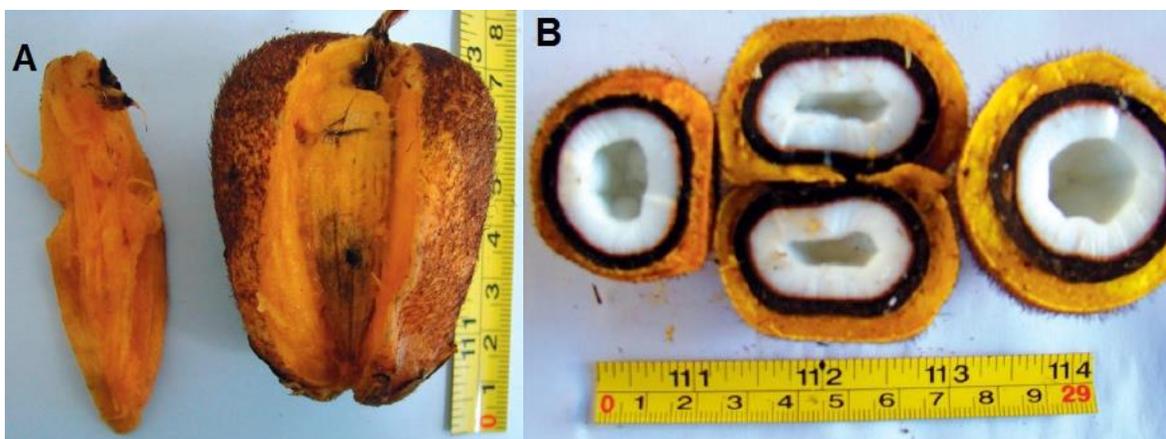


Figura 2: A: Detalhe do fruto de murumuru, casca e polpa. B: Semente preenchida de gordura (Fonte: Bezerra VS, 2012).

A gordura de murumuru é inodora, sem gosto especial e de baixa acidez, especialmente quando fresca. Esta gordura apresenta perfil de ácidos graxos

semelhantes as gorduras da amêndoa de tucumã, do palmiste e do óleo de coco, com altos teores de ácidos graxos saturados e ricas em ácido láurico (C12:0). Porém, tem vantagem de apresentar maior consistência devido ao seu ponto de fusão (32,5°C), superior ao do palmiste (25°C) e do óleo de coco (22,7°C). A qualidade dessa gordura possibilita a mistura com outras gorduras vegetais que derretem em temperatura mais baixa, podendo participar no preparo de substituto parcial da manteiga de cacau, na fabricação do chocolates, proporcionando a este produto uma consistência mais firme mesmo em locais com temperaturas mais elevadas (MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO, 1997; D'AGOSTINI e GIOELLI, 2002; MENEZES, 2012).

Na literatura, são escassos os trabalhos com gordura de murumuru, apesar de existirem diversas patentes de seu uso em loções cosméticas. Segundo SOUZA et al. (2004) a gordura de murumuru é comumente utilizada na indústria de cosméticos como constituinte na elaboração de sabonetes, cremes e xampus e ainda na indústria de tintas, como secativo.

O estudo de MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO (1997) apresenta a caracterização desta gordura, que se encontra detalhada na Tabela 2.

Tabela 2: Características físico-químicas da gordura de murumuru.

Substâncias	Quantidade
Ácidos graxos livres (%)	0,1
Índice de peróxido (meq/100g)	3,6
Ponto de fusão (°C)	32,7
Fósforo (ppm)	85,4
Matéria insaponificável (%)	0,9
Esteróis totais (%)	0,8
Ácidos graxos	(%)
Saturados	
Láurico (C12:0)	51,6
Mirístico (C14:0)	25,8
Palmitico (C16:0)	6,0
Insaturados	
Oleico (C18:1)	5,7
Linoleico (C18:2)	3,0

Fonte: MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO, 1997.

A gordura de murumuru é rica em ácidos graxos saturados de cadeia média, contendo aproximadamente 52% de ácido láurico, 26% de ácido mirístico, enquanto a quantidade de ácidos graxos insaturados é bastante inferior - menos de 10% do total, dos quais destacam-se os ácidos graxos oleico e o linoleico. A baixa porcentagem de ácidos graxos livres (0,1%) é responsável pela baixa acidez desta gordura. Dos compostos minoritários, apenas os carotenos totais foram identificados, com valor baixo, de apenas 5 ppm. O rendimento da extração de gordura é de 27,7%, considerado adequado para exploração comercial (MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO, 1997).

O estudo de SOUZA et al. (2004) descreve uma das formas de extração da gordura de murumuru de modo semi-artesanal. Os frutos maduros são coletados e mantidos imersos em água por até 48 horas. Após este período, os frutos são friccionados contra peneiras para a retirada total da polpa. As sementes então são secas ao sol, por um período de uma a duas semanas, quando há uma seleção destas para a retirada de sementes ocas, germinadas ou com outros problemas. A extração da casca se dá por processo manual ou automático. As amêndoas são então aquecidas ao sol ou em estufas e após esta etapa são prensadas para a extração de gordura em prensa contínua (expellers). A gordura extraída é filtrada e então armazenada.

❖ **Interesterificação de óleos e gorduras**

O desenvolvimento de métodos para melhorar as propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais de óleos e gorduras é de grande interesse para as indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (WILLS e MARANGONI, 2002). Dentre os métodos atualmente disponíveis para a modificação de óleos e gorduras, a interesterificação mostra-se como alternativa que vêm apresentando bons resultados (YAZDI e ALEMADEH, 2011; TANG et al., 2012; REENA e LOKESH, 2012).

O termo interesterificação refere-se à reação entre óleos e gorduras no qual os ésteres de ácidos graxos reagem com outros ésteres ou ácidos graxos a fim de produzir novos ésteres devido à troca dos ácidos graxos na estrutura da molécula de glicerol (O'BRIEN, 2009). Na reação de interesterificação os ácidos graxos permanecem inalterados, mas ocorre a redistribuição dos mesmos nas moléculas de TAG. Essa redistribuição de ácidos graxos tem como consequências mudanças nas propriedades físico-químicas, nutricionais e/ou funcionais do lipídio estruturado formado, aumentando muitas vezes o potencial de aplicação do mesmo (IWASAKI e YAMANE, 2000; NUNES et al., 2011).

A interesterificação pode ser química ou enzimática. Na interesterificação química a redistribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol ocorre de forma aleatória, não sendo possível controlar os produtos da reação. Na interesterificação enzimática, devido à alta especificidade de algumas enzimas em relação ao tipo de ácido graxo e/ou a posição na molécula de glicerol, obtêm-se maior controle dos produtos da reação, sendo possível estruturar lipídios que não poderiam ser sintetizados utilizando métodos químicos (WILLS e MARANGONI, 2002). A Figura 3 apresenta um esquema de produtos formados nas reações de interesterificação entre triacilgliceróis ou entre triacilgliceróis e ácidos graxos livres em função do agente catalisador da reação.

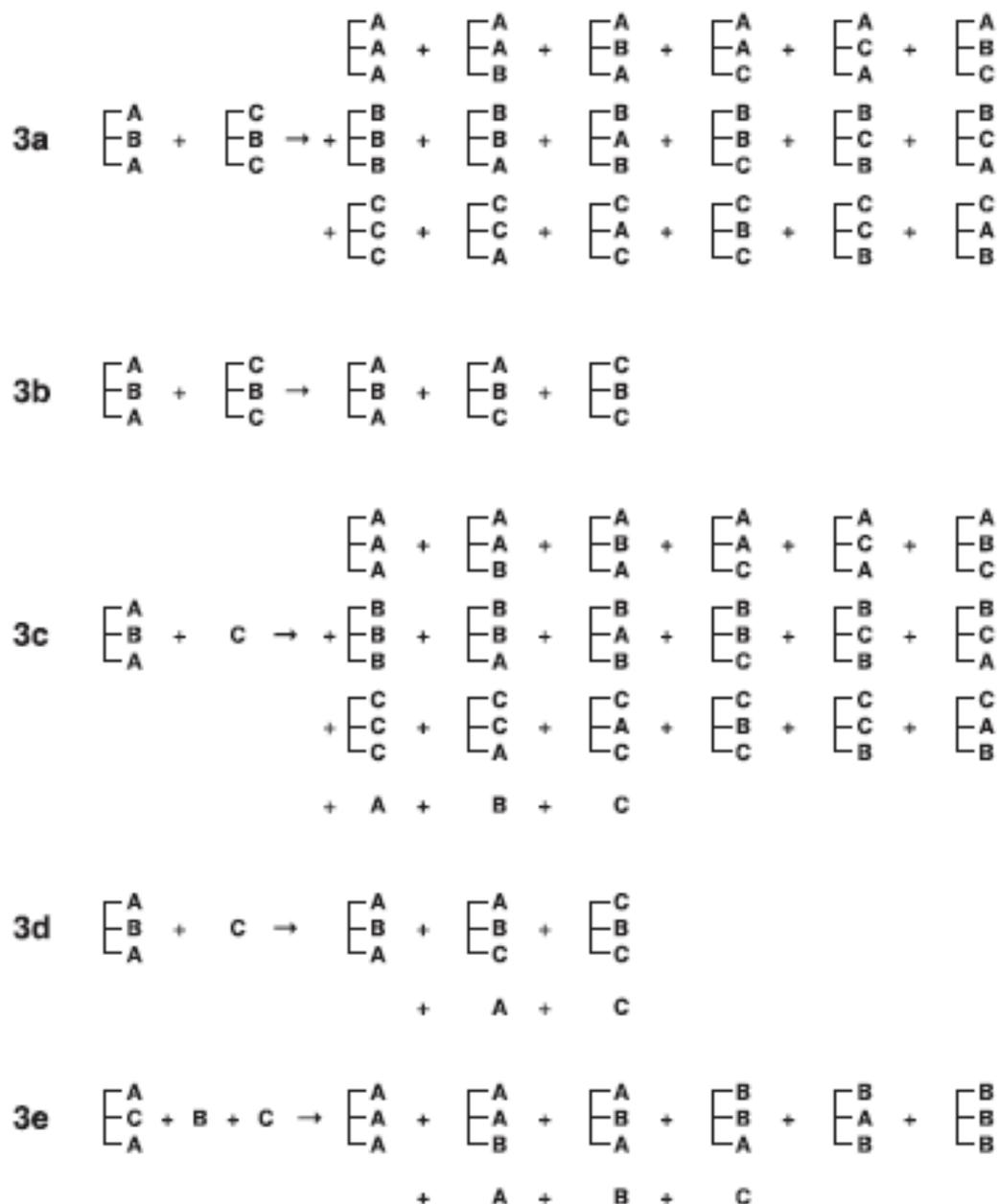


Figura 3: Produtos resultantes da reação de interesterificação química e enzimática de diferentes lipídios. 3a. reação de diferentes glicerídios por catálise química ou com lipase não específica; 3b. reação de diferentes glicerídios catalisada com lipase 1,3 específica; 3c. reação de glicerídios e ácidos graxos livres por interesterificação química ou com lipase não específica; 3d. reação de glicerídios e ácidos graxos livres catalisada com lipase 1,3 específica; 3e. reação de glicerídios e ácidos graxos livres catalisada por lipase 1,3 específica para os ácidos graxos A e B (Fonte: CARVALHO et al., 2003).

O enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma alternativa atraente para exploração na indústria de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas das vantagens desta rota, tais como: maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia, redução da quantidade de resíduos e introdução de rotas mais acessíveis de produção (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

Na literatura, interesterificação enzimática tem sido utilizada para a produção de lipídios estruturados com propriedades específicas (REENA e LOKESH, 2007; RESHMA et al., 2008; CRIADO et al., 2008; ADHIKARI et al., 2010; TEICHERT e AKOH, 2011; ZHAO et al., 2013; KANJILAL et al., 2013; RUAN et al., 2014). Estudos vêm sendo realizados principalmente com a fração intermediária do óleo de palma e com gorduras de frutos de plantas exóticas da Índia como sal, mahua, kokum, manga e dhupa e de frutos brasileiros, como o pequi (FASCIOLI e GONÇALVES, 1998; MOMENY, VAFAEI e RAMLI, 2013). Além disso, a reação de interesterificação enzimática ocorre em condições brandas, uma grande vantagem para a produção de lipídios estruturados com melhores propriedades nutricionais e funcionais. A seguir estão relatados exemplos de produção destes lipídios estruturados, indicando o potencial desta técnica.

FASCIOLI e GONÇALVES (1998) estudaram a transformação do óleo de pequi (*Cariocar brasiliense* Camb.) em um similar da manteiga de cacau, por meio da interesterificação enzimática usando a lipase comercial Lipozyme TL-IM® (Novozymes), que apresenta especificidade de posição sn-1,3. A manteiga de cacau é um produto de alto valor agregado com características únicas de cristalização, derretimento e ponto de fusão. Essas características estão intimamente ligadas ao perfil de ácidos graxos dessa gordura, que possui altos teores de ácido oleico, palmítico e esteárico. Dados da composição em ácidos graxos do óleo da polpa e da amêndoa do pequi mostram que os mesmos são constituídos, em sua maior parte por ácidos oleico e palmítico. A reação de interesterificação enzimática ocorreu na presença de ácido esteárico, o qual foi incorporado com sucesso na posição sn-1,3-3,1 do novo triacilglicerol, gerando um

lipídio estruturado com as características desejáveis da manteiga de cacau, essenciais na fabricação de chocolates e produtos de confeitaria.

RESHMA et al. (2008) produziram lipídios estruturados com características físico-químicas mais apropriadas para aplicação industrial e com alto conteúdo de compostos bioativos através de reação de interesterificação enzimática utilizando subprodutos agroindustriais. Os óleos utilizados para as reações de interesterificação foram estearina de palma e óleo de farelo de arroz, que é extremamente rico em fitoquímicos bioativos. A reação foi catalisada pela lipase comercial Lipozyme TL-IM®. Os lipídios estruturados apresentaram consideráveis reduções nos maiores picos de temperatura de derretimento e no conteúdo de gordura sólida, o que possibilitou o aumento da espalhabilidade mesmo em temperatura de refrigeração. Os lipídios estruturados apresentaram teores de tocóis, esteróis, orizanol e carotenos, mantendo os compostos fitoquímicos bioativos de seus óleos de origem. Com isso, foi possível o desenvolvimento de gorduras técnicas (shortenings) para diferentes aplicações sem a presença de gorduras trans e ricas em fitoquímicos bioativos.

ADHIKARI et al. (2010) produziram margarina sem a presença de gorduras trans após reação de interesterificação enzimática que ocorreu durante 24 horas a 65°C com óleo de pinho e estearina de palma utilizando lipase comercial Lipozyme TL-IM®, como catalisador. O óleo de pinho possui diversos compostos bioativos e é rico em ácido pinoleico (C18:3 cis-5, 9, 12) que exerce diversas funções fisiológicas como a prevenção da hipercolesterolemia, hipertensão e trombose. Os lipídios interesterificados produzidos apresentaram cerca de 40% de ácido palmítico, 29% de ácido oleico e até 5,9% de ácido pinoleico, além de teores de tocoferóis e fitoesteróis. A análise de difração de raio-x indicou que a forma polimórfica dos cristais nos lipídios estruturados apresentou-se na forma β' , característica desejada para margarinas. Os resultados indicaram que os lipídios estruturados sem a presença de ácidos graxos trans podem ser utilizados como uma alternativa à gordura parcialmente hidrogenada, apresentando ainda, melhora nas propriedades nutricionais dessa gordura.

CRIADO et al. (2008) produziram lipídios estruturados através de reação de interesterificação enzimática entre azeite de oliva extra virgem e óleo de palma totalmente hidrogenado, utilizando como catalisador da reação a lipase comercial, descrita como não-específica, Novozym 435® (Novozymes). Foram utilizadas diferentes concentrações do óleo e da gordura, o que proporcionou a formação de lipídios estruturados com diferentes características físico-químicas e funcionais. Em todos os lipídios estruturados houve maior concentração de ácidos graxos insaturados na posição sn-2, o que eleva a qualidade nutricional, uma vez que os ácidos graxos insaturados apresentam diversos benefícios à saúde e são absorvidos de forma mais eficiente pelo corpo humano quando na posição sn-2. A presença de ácidos graxos na posição sn-2 resultou ainda na diminuição na temperatura de fusão quando comparado a misturas físicas correspondentes. Todos os lipídios estruturados têm potencial para aplicação comercial, como margarinas e óleos para fritura, por serem ausentes de ácidos graxos trans e serem sintetizados com azeite de oliva, que apresenta diversos benefícios à saúde.

TEICHERT e AKOH (2011) produziram substituto de gordura de leite materno para formulações infantis através de dois lipídios estruturados de óleo de soja com ácido estearidônico, pré enriquecidos com ácido palmítico na posição sn-2, pelas lipases comerciais Novozym 435® e Lipozyme TL-IM®, de estudos anteriores. Os lipídios estruturados foram então enriquecidos com ácido γ -linoleico (GLA) ou ácido docosaheptaenóico (DHA), através de reação acidólise em pequena escala com a lipase Lipozyme TL-IM®. Os ácidos graxos poli-insaturados GLA e DHA favorecem o desenvolvimento cerebral infantil, além de possuir ação anti-inflamatória. Os produtos obtidos, mantiveram altos níveis de ácido palmítico na posição sn-2 (>50%), que contribui para a absorção de gorduras e cálcio em bebês e mais de 10% de GLA ou 9,7% de DHA nos lipídios estruturados, valores estes, superiores aos encontrados na gordura de leite materno.

REENA e LOKESH (2007) produziram lipídios estruturados, com efeito hipolipidêmico em ratos através da reação de interesterificação enzimática entre óleo de coco e óleo de farelo de arroz ou óleo de gergelim, utilizando a lipase

comercial Lipozyme IM-RM®, sn-1,3 específica (Novozymes) de *Rhizomur miehei*. O objetivo foi produzir lipídios estruturados com igual proporção de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, que apresentassem estabilidade oxidativa e maior qualidade nutricional. Os constituintes minoritários como o orizanol presente no óleo de farelo de arroz e a sesamina (tipo de lignana) presente no óleo de gergelim contribuíram para a produção de lipídios estruturados com maior qualidade nutricional. Os lipídios estruturados apresentaram maior estabilidade oxidativa e a capacidade de reduzir os índices de colesterol sérico e de lipídios no fígado dos ratos tratados.

ZHAO et al. (2013) realizaram a interesterificação enzimática de óleo de soja altamente hidrogenado com óleo de semente de cânfora (*Cinnamomum camphora* (L.) Ness e Eberm) e óleo de perila (planta do gênero botânico da família das mentas) utilizando a lipase Lipozyme TL-IM® à 10% (m/m). A reação ocorreu durante oito horas à 65°C. O óleo de semente de cânfora é rico em ácidos graxos de cadeia média, que possuem uma série de efeitos fisiológicos como a diminuição da deposição de gordura corporal, a redução na secreção de lipoproteínas e atenuação da resposta pós-prandial, já o óleo de perila é rico em ácido α -linoleico (C18:3). O resultado foi um lipídio estruturado zero trans, com característica de gordura plástica e alta qualidade nutricional devido aos altos teores de ácido α -linoleico e da presença de ácidos graxos de cadeia média.

KANJILAL et al. (2013) produziram lipídios estruturados com baixo teor de calorias e com efeito hipocolesterolêmico em ratos e coelhos. Os lipídios estruturados foram produzidos através de reações de interesterificação enzimática entre etil behenato (éster metílico do ácido behenico ou docosanóico) e óleos de soja ou de girassol. Ácidos graxos de cadeia muito longa, como o ácido behenico, apresentam absorção limitada, em parte devido ao fato destes ácidos apresentarem ponto de fusão mais elevado do que a temperatura do corpo e possuírem baixa capacidade para formar emulsões e se solubilizar (HASHIM e BABAYAN, 1978). Os lipídios estruturados apresentaram aproximadamente 29% de ácido behenico e quantidades elevadas do ácido linoleico, apresentando redução no teor de calorias

e também demonstraram capacidade de reduzir os teores de colesterol sérico e o depósito de gordura no fígado de ratos e coelhos, além de reduzir o acúmulo de lipídios nas artérias de coelhos.

MOMENY, VAFAEI e RAMLI (2013), estudaram as propriedades físico-químicas e a atividade antioxidante de um análogo de manteiga de cacau obtido através da interesterificação enzimática de óleo de caroço da manga (*Mangifera indica* Linn.) provindo da Malásia, com a fração média de óleo de palma. A reação de interesterificação foi catalisada pela lipase comercial Lipozyme TL-IM®. O óleo de caroço de manga, possui altos teores de ácido esteárico, oleico e palmitico com baixos teores de ácido linolênico e linoleico e contém fitoesteróis, polifenóis e tocoferóis. Seu consumo foi associado à manutenção da saúde cardiovascular e óssea, à melhora da glicose sanguínea, à diminuição do colesterol LDL e a perda de peso. O lipídio estruturado apresentou características físico-químicas, perfil de ácidos graxos e capacidade antioxidante semelhantes à manteiga de cacau com boa estabilidade oxidativa e composição nutricional desejável para utilização em produtos de confeitaria.

RUAN et al. (2014) produziram margarinas zero trans com melhores propriedades nutricionais a partir da interesterificação enzimática de óleo de semente de camélia (*Cammelia oleifera* Abel.) com estearina de palma e óleo de coco, em diferentes concentrações, utilizando a lipase Lipozyme TL-IM® à 10% (m/m). A reação ocorreu por seis horas à 60°C e os ácidos graxos livres foram removidos após o termino da reação. O óleo de semente de camélia é comumente utilizada na alimentação em países do sudeste da Asia e China e como adjuvante no tratamento de dores de estomago e queimaduras. É um óleo rico em ácidos graxos insaturados com alta capacidade antioxidante. Os lipídios estruturados formados apresentaram modificações substanciais nos TAG quando comparados à mistura física. A interesterificação enzimática ocasionou à perda de tocoferóis, mas o lipídio estruturado zero trans apresentou cerca de 5% de ácidos graxos de cadeia média e características desejáveis para produção de margarinas, como ponto de

fusão de deslizamento à 36,8°C, presença de cristais na forma β' e conteúdo de gordura sólida de 45% à 20°C-40°C.

❖ **Atividade antioxidante**

Durante processos metabólicos normais do nosso organismo, como, por exemplo, a fosforilação oxidativa, reação mitocondrial responsável pela geração de energia, são geradas moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos. Estas moléculas são classificadas como radicais livres (HALLIWEEL, 1994). Porém, as vias metabólicas não são as únicas a gerarem radicais livres, estes compostos podem ter origem exógena, proveniente de fontes físicas e químicas, como cigarro, poluição, radiação solar, exposição ao ozônio, medicamentos e até mesmo alguns tipos de alimentos e bebidas (BIANCHI e ANTUNES, 1999; ROVER JUNIOR et al., 2001; BIRBEN et al., 2012).

Os radicais livres são altamente reativos e ao reagirem com qualquer composto próximo a sua órbita externa, passam a ter função oxidante (reduzora de elétrons). Existem outros agentes reativos, que não necessariamente possuem elétrons desemparelhados e são considerados oxidantes de grande importância biológica. A este grupo de compostos é dado o nome de Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991). A Tabela 3 apresenta as principais ROS.

Tabela 3: Natureza e ação das espécies reativas do oxigênio (ROS).

Ânion Radical superóxido O_2^-	Gerado continuamente por uma série de processos celulares, ou pela redução monoelétrica de O_2 . Desaparece rapidamente em solução aquosa por reação de dismutação.
Peróxido de hidrogênio H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação do O_2^- catalisada pela enzima SOD, pela redução de dois elétrons na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases, localizada nos peroxissomos. É muito difusível dentro e entre as células <i>in vivo</i> . É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor. Em presença de metal de transição, gera $\bullet OH$.
Radical hidroxila $\bullet OH$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, peroxidação lipídica. Âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares).
Radicais peroxila ($RO_2\bullet$) e alcóxila($RO\bullet$)	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.
Oxigênio singlete $^1O_2^-$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídios de membrana, iniciando processos de peroxidação.
Ozônio O_3	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.

Fonte: VASCONCELOS et al., 2007.

A presença de ROS é importante em muitas funções fisiológicas normais como, por exemplo, na fagocitose, onde os radicais livres são produzidos como agentes de defesa necessários ao combate de infecções e na regulação da resposta proliferativa, desencadeada por fatores de crescimento (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

O equilíbrio entre a formação e a remoção de ROS no organismo deve ser regulado de forma que as reações e os processos metabólicos dependentes das mesmas ocorram em nível adequado para manutenção da fisiologia celular. A

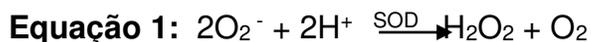
deficiência no processo de regulação pró-oxidante/antioxidante pode induzir ao estresse oxidativo, condição na qual há o aumento de ROS como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e a diminuição da atividade antioxidante, favorecendo a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, resultando, até mesmo, em morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991; BIANCHI e ANTUNES, 1999; FINKEL e HOLBROOK, 2000; FANG, YANG e WU, 2002).

Diante deste cenário, os antioxidantes têm sido extensivamente estudados devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres e/ou quelar metais de transição como ferro e cobre, que estão envolvidos na formação de ROS e sua atuação na prevenção ao estresse oxidativo, ao envelhecimento e às patologias a ele associadas como aterosclerose, câncer, cardiopatias, artrite reumatoide e doenças autoimune (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991).

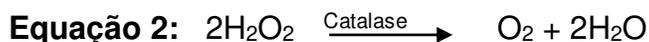
Existem diversas definições para antioxidantes. HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007), definiram como antioxidante qualquer substância que retarde, impeça ou elimine danos oxidativo em uma molécula alvo. Os antioxidantes protegem o organismo inibindo as reações ligadas a formação de ROS, reparando lesões ou impedindo a perda da integridade celular. Diversas substâncias fisiológicas enzimáticas e não enzimáticas são reconhecidas como antioxidantes. O sistema antioxidante enzimático é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase, além de NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione reductase e enzimas de reparo. Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão o α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, flavonoides, selênio, glutathione, clorofilina, L-cisteína e curcumina (SIES, 1993; BIANCHI E ANTUNES, 1999).

A SOD é a enzima capaz de catalisar a conversão do ânion superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma reação que envolve duas etapas. Na primeira etapa o ânion superóxido reage com o grupo prostético da SOD em sua forma oxidada. Nesta etapa há a aquisição de um próton e liberação de oxigênio molecular. A segunda etapa da reação é a ligação da enzima em sua forma reduzida

a um segundo ânion superóxido e um próton, liberando H₂O₂ e retornando a sua forma oxidada (JOHNSON e GIULIVI, 2005). A Equação 1 mostra de forma simplificada a reação de dismutação do ânion superóxido.



A catalase foi a primeira enzima antioxidante a ser caracterizada. Em organismos eucariontes, ela está presente no peroxissomo, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, responsável pela produção de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlet. A catalase também está presente em mitocôndrias do tecido cardíaco. A enzima possui um grupamento heme que é responsável por sua atividade catalítica, convertendo duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em duas moléculas de água (H₂O) e oxigênio, conforme Equação 2. A ação desta enzima procede a da SOD no sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (COURSIN et al., 1985; BARBIOR, 1997; VASCONCELOS et al., 2007).



Uma vez que o estresse oxidativo está associado a várias doenças, reforçar as defesas celulares contra espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, através do aumento da capacidade antioxidante, traria benefícios para a saúde humana (HALLIWELL, 1994). A capacidade de modular a resposta antioxidante endógena através da indução de moléculas e/ou enzimas antioxidantes é um dos possíveis mecanismos pelo qual os antioxidantes não enzimáticos exercem seus efeitos benéficos. Os antioxidantes de natureza dietética são exemplos desta interação, compondo uma rede celular antioxidante integrada, uma vez que estão presentes em número e concentração

maiores que os antioxidantes enzimáticos e distribuídos em ambientes lipofílicos e hidrofílicos (VALKO et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2009).

❖ **Potencial antioxidante em óleos e gorduras**

Óleos e gorduras tem papel fundamental na alimentação humana, fornecendo calorias, agindo como veículo das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, como fontes de ácidos graxos essenciais e contribuindo para a palatabilidade dos alimentos (CLAUSS, 1996).

O potencial antioxidante dos óleos e gorduras é determinado por sua composição físico-química e pela presença de compostos lipofílicos de natureza antioxidante. Os antioxidantes presentes em óleos vegetais atuam protegendo-os contra a ação de radicais livres, que levam a peroxidação lipídica, principal forma de degradação de óleos vegetais. Além da ação protetora ao próprio óleo, estes antioxidantes naturais apresentam bioatividade no organismo humano, com potencial na prevenção de doenças crônicas (SZYDLOWSKA-CZERNIAK et al., 2008; CASTELLO-BRANCO e TORRES, 2011).

Existe uma grande variedade de antioxidantes naturais em óleos e gorduras vegetais, como carotenóides, tocóis (α , β , γ , δ tocoferóis e tocotrienóis), compostos fenólicos e esteróis.

❖ **Carotenóides**

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, sendo responsáveis pela coloração amarela, alaranjada e vermelha dos tecidos vegetais. Do ponto de vista químico, os carotenóides podem ser divididos em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas (QUIRÓS e COSTA, 2006). No organismo humano, os carotenóides tem função de pró-vitamina A, sendo o β -caroteno a molécula mais facilmente convertida em vitamina A, com atividade pró-vitáminica de 100% (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). A vitamina A participa nos processos de visão,

crescimento, diferenciação de tecidos, função imunológica, reprodução e desenvolvimento embrionário (CAMPOS e ROSADA, 2005). A função antioxidante dos carotenos tem papel importante na redução do risco de câncer, catarata, arterosclerose e no processo de envelhecimento (DALMODARAN, KIRK e FENNEMA, 2007).

Diversos frutos e vegetais são ricos em carotenóides, entretanto os frutos de buriti e de palma se destacam como as maiores fontes de carotenos do Brasil. A forma de administração desses alimentos é fundamental no processo de absorção e metabolização de carotenos pelo organismo. Sob a forma de óleo a biodisponibilidade deste micronutriente é aumentada, uma vez que se encontra livre da barreira da matriz vegetal. O enriquecimento de alimento com óleos desses frutos é uma alternativa eficiente no combate à hipovitaminose A (AMBRÓSIO, CAMPOS e FARO, 2006).

Os carotenos protegem os sistemas biológicos atuando como agentes redutores, desativando o oxigênio singlet, de forma mais rápida e efetiva do que outros antioxidantes não enzimáticos, como os tocoferóis, ou ainda, atuando como sequestradores de radicais peróxido, reduzindo a oxidação do DNA e de lipídios. Sua atuação antioxidante se dá em baixos níveis de oxigênio, condição fisiológica ideal à maioria dos tecidos (BARREIROS et al., 2006).

❖ **Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)**

Os óleos vegetais são as principais fontes de tocóis (Vitamina E) na alimentação, sendo os tocoferóis as principais formas de tocol encontrada na maioria dos óleos. Dentre os óleos vegetais comumente consumido pela população brasileira, o óleo de palma apresenta o maior teor de tocotrienol, enquanto o óleo de girassol parece ser o mais rico em α -tocoferol seguido pelos óleos de algodão, palma, canola, amendoim, oliva, milho, soja e coco. O γ -tocoferol é o composto predominante em óleos de soja e de milho (GUINAZI et al., 2009).

Os tocóis são considerados os mais potentes antioxidantes lipossolúveis, desempenhando papéis importantes na reprodução e em mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais e é frequentemente associado a prevenção de doenças neurodegenerativas como aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (FU et al., 2014; WALLERT et al., 2014).

Não existe um consenso sobre qual isômeros de tocoferol é o mais antioxidante. O α -tocoferol é o isômero mais facilmente absorvido e metabolizado, sendo portanto, a forma mais ativa de tocol no organismo humano. O γ -tocoferol é reconhecido como o mais ativo na remoção de espécies reativas de nitrogênio, com atividade anti-inflamatória e possível ação nos mecanismo de inibição da carcinogênese. Alguns trabalhos indicam os isômeros γ e δ como os melhores antioxidantes (FRANKEL, 1996; MASUCHI et al., 2008; JU et al., 2010; GRILO, et al., 2014;).

Os tocoferóis são eficientes antioxidantes, bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas e lipoproteínas e atuando como doadores de hidrogênio para o radical peroxila. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais. Todos os isômeros de tocoferol são capazes de realizar esta reação, porém o α -tocoferol é o isômero mais rápido e mais potente dentre os demais (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

❖ **Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Já foram detectados mais de 8.000 compostos fenólicos, sendo que os principais podem ser classificados em dois grupos: flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Estes compostos agem neutralizando e sequestrando radicais livres e também quelam metais de transição (DREOSTI, 2000; BURNS et al., 2001; MELO e GUERRA, 2002).

Os compostos fenólicos são produzidos através do metabolismo secundário de plantas, como forma de proteção a patógenos e agrotóxicos. Estes compostos exibem uma variedade de ações biológicas, que diferem sensivelmente entre os diferentes compostos devido a suas propriedades antioxidantes (BALASUNDRAM et al., 2006). Os compostos fenólicos apresentam capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Porém, testes *in vitro* demonstram que estes compostos podem agir a favor do estresse oxidativo em determinadas condições, atuando no chamado paradoxo antioxidante, no qual pequenos níveis de estresse oxidativo podem ser benéficos, uma vez que aumentam a produção de enzimas antioxidantes, culminando na rápida desativação ou remoção de espécies ROS (HALLIWEEL, 2000; MOURE et al., 2001).

Os compostos fenólicos são facilmente encontrados em óleos não refinados como o azeite de oliva, que pode conter mais de 30 compostos fenólicos (DEL CARLO, 2004).

❖ **Modelo experimental para avaliação de atividade antioxidante**

As células hepáticas são amplamente utilizadas em estudos de toxicologia dado que o fígado é o primeiro órgão a entrar em contato com o sangue proveniente da passagem pelo intestino, transportando compostos absorvidos pela dieta. Além deste primeiro contato, o fígado ainda exerce uma série de funções metabólicas importantes como a transformação, armazenagem e distribuição de metabólitos e a detoxificação do organismo (PAROLIN, ZAINA e LOPES, 2002).

Vários modelos experimentais, como modelos animais e cultura de células, são utilizados para avaliar a bioatividade de diversos compostos. Nos sistemas de cultura de células existem células de cultura primárias e linhagens celulares (culturas secundárias). As culturas de células primárias correspondem a células provenientes de uma fonte viva e saudável que são mantidas *in vitro*. Estas células apresentam uma elevada similaridade funcional com o respectivo tecido *in vivo*. No entanto, uma das principais desvantagens desse tipo de cultura é o fato das células

apresentarem baixa frequência de divisão, tal como no organismo vivo, o que dificulta a sua utilização por longos períodos de tempo (FRESHNEY, 1994; GUILLOUZO, 1992). As linhagens celulares correspondem a células que inicialmente foram extraídas de tumores. Devido a sua capacidade proliferativa estão em constante divisão, o que permite a sua manutenção *in vitro*. Um dos principais problemas das linhagens celulares é a perda de atividade enzimática ao longo do cultivo celular (UHL et al., 1999).

As células Hep-G2, apresentadas na Figura 4, correspondem a uma linhagem celular isolada a partir de um hepatocarcinoma humano. Estas células conservam ativas suas enzimas, apresentando atividade metabólica similar ou um pouco menor que a atividade de hepatócitos humanos saudáveis. Devido à competência metabólica, a linhagem celular Hep-G2 tem sido utilizada como modelo experimental em muitos estudos, principalmente em ensaios de toxicidade. Esta linhagem celular permite a detecção de efeitos genotóxicos no interior das células onde os metabolitos reativos são formados e podem interagir com lipídios, proteínas e até mesmo com o DNA (KNASMULLER et al., 1998; UHL et al., 1999).

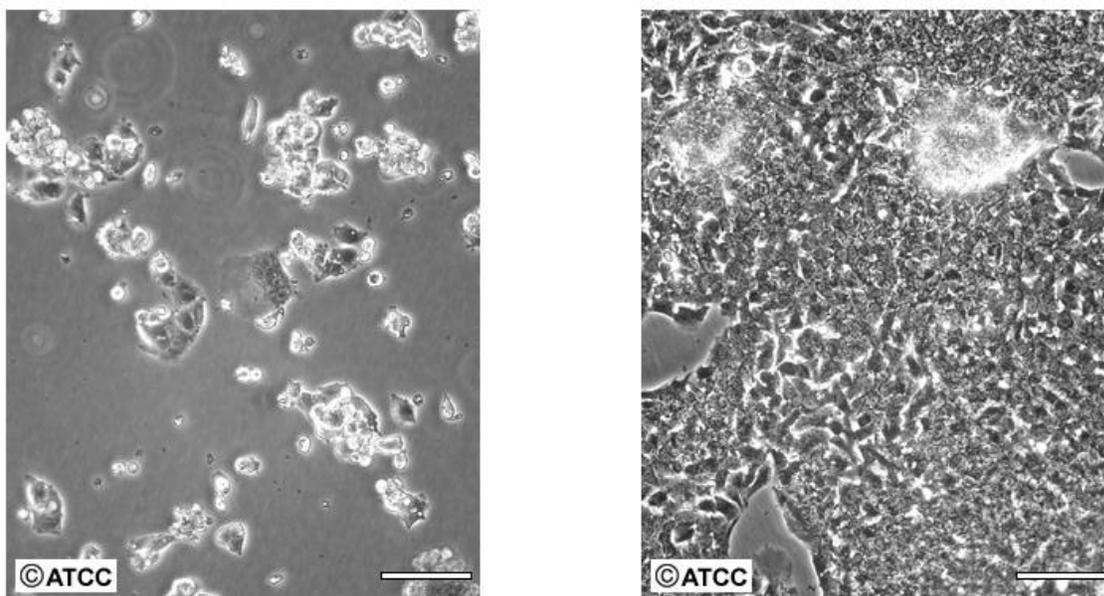


Figura 4: Células de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) vista ao microscópio em dois momentos distintos, baixa confluência à esquerda e confluência máxima à direita. Barra de escala = 100µm. Disponível em: ATCC < <http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 11 de nov. 2014.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Óleo de buriti e gordura de murumuru foram doados pela empresa de cosméticos "Naturais da Amazônia" de Belém do Pará - PA, Brasil. O processo de interesterificação enzimática, assim como a caracterização das propriedades tecnológicas e composição de triacilgliceróis dos óleos e gorduras antes e após este processo foi desenhado e desenvolvido em trabalhos anteriores no laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp, sob supervisão da Prof^a Dr^a Gabriela Alves Macedo. Estes dados encontram-se referenciados no Anexo I. A lipase imobilizada Lipozyme TL-IM® foi gentilmente fornecida pela empresa Novozymes®, Dinamarca. A lipase semipurificada de *Rhizopus* sp. foi produzida através de fermentação em meio sólido pelo laboratório de Bioquímica de Alimentos – Unicamp, conforme MACEDO et al. (2004). A descrição das amostras e dos sistemas enzimáticos utilizados neste estudo encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição das amostras e dos sistemas enzimáticos avaliados.

Sistemas	Composição (m/m)
Óleo puro	Buriti (10/0)
Gordura pura	Murumuru (10/0)
Mistura simples	Buriti/Murumuru (7/3)
Lipídio estruturado produzido com lipase comercial TL-IM® à 2,5% (m/m)	Buriti/Murumuru (7/3)
Lipídio estruturado produzido com lipase de <i>Rhizopus</i> sp. à 2,5% (m/m)	Buriti/Murumuru (7/3)
Lipídio estruturado produzido com lipase comercial TL-IM® à 1,5% (m/m) e lipase de <i>Rhizopus</i> sp. à 1,5% (m/m)	Buriti/Murumuru (7/3)

As reações de interesterificação enzimática, para a produção de amostras, foram realizadas conforme descritas em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (SPERANZA et al., 2015). Brevemente, as reações foram realizadas em banho termostático, com agitação a 180 rpm durante 24h à 40°C. Ao fim da reação, os lipídios estruturados foram imediatamente filtrados (membrana filtrante de 0,45 µm) e nitrogênio gasoso foi adicionado a todas as amostras a fim de evitar a oxidação. As amostras foram congeladas a -18°C para posterior análise.

Todos os reagentes utilizados nestes experimentos foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q® (Merck Millipore, Alemanha).

4.1. Caracterização de compostos minoritários bioativos

4.1.1. Teor de β-Caroteno

O teor de β-caroteno foi determinado por espectrofotometria de acordo com a metodologia descrita por Davies (1985) e adaptada pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp (MAMBRIM, BARRERA-ARELLANO, 1997). Alíquotas de amostra foram diluídas em hexano 100%, na concentração inicial de 4 mg/mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Agilent (Agilent, Alemanha) utilizando cubeta de quartzo de 1 cm, em comprimento de onda de 453 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de β-carotenos foi obtido conforme Equação 3.

$$\text{Equação 3: } \beta \text{ caroteno } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Abs(amostra)} \cdot v \cdot 10.000}{E \cdot m}$$

Onde: v = volume final da amostra (mililitros)
 m =massa da amostra (gramas)
 $E= 2.592$ (Coeficiente de extinção específico para β -caroteno em hexano).

A concentração de óleo, gordura, mistura ou lipídio estruturado na solução de hexano pode variar até que se obtenha valores de absorvância dentro da faixa de 0,5 à 0,8 nm.

4.1.2. Teor de Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)

A análise de tocóis totais foi realizada conforme metodologia da AOCS (2004) e adaptada pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp. Inicialmente as amostras foram diluídas em hexano PA na concentração de 0,1 mg/mL. As amostras diluídas foram então injetadas em cromatógrafo líquido UHPLC Ultimate® 3000 (Dionex, Estados Unidos). A coluna micro particulada de sílica possuía 250 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro interno, com cada partícula medindo aproximadamente 5 μ . O detector de fluorescência foi ajustado em 290 nm com comprimento de onda de emissões de 330 nm. A fase móvel foi composta por hexano grau HPLC (99%) e isopropanol (1%). A composição qualitativa de tocóis se deu pela comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de tocoferóis. A composição quantitativa foi realizada através da normatização da área sob o pico, sendo expressa em μ g/g (PEREIRA et al., 2013). A análise foi realizada em duplicata.

A conversão para unidade de equivalente de α -tocoferol (α -TE) foi obtida através do coeficiente 1 para o α -tocoferol; 0,5 para β -tocoferol; 0,1 para γ -tocoferol e 0,03 para δ -tocoferol, conforme DARNET et al. (2011).

4.1.3. Conteúdo de fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais foi utilizado o método de Follin-Ciocalteu descrito por HRNCIRIKI e FRITSCHÉ (2004). Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico e fosfotungstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul, quantificada por espectrofotometria a 725 nm. Alíquotas de 0,5 g de cada amostra foram dissolvidas em 2 mL de solução (1/1; v/v) hexano/metanol 60%. Após centrifugação, 40 µL da fase metanólica foram coletados e diluídos em água até o volume final de 1 mL. Em seguida adicionou-se 100 µL de reagente Follin-Ciocalteu e, após 3 minutos, 200 µL de carbonato de sódio à 35% foram adicionados. Diluiu-se com água até volume final de 2 mL e manteve-se a solução final ao abrigo de luz por duas horas. As amostras foram alocadas em placas de 96 poços (BMG Labtech, Alemanha) e a leitura realizada em leitor de microplaca ST-360 (KHB, China). O branco foi composto por todos os constituintes da reação, substituindo-se a solução fenólica por água ultrapura. A curva de calibração foi realizada utilizando uma solução padrão de ácido gálico, nas concentrações de 0,01 -0,1 µg/mL. A análise foi realizada em triplicata.

4.2. Avaliação da atividade antioxidante através de ensaios de sequestro de radicais livres.

4.2.1. DPPH

O potencial antioxidante das amostras foi medido através do método colorimétrico de sequestro do radical DPPH (2,2, difenil, 1 picrilhidrazila). Esse método se baseia na capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH, que é observado através do decaimento da absorbância ao longo da reação, de acordo com PESCHEL et al. (2007), adaptado por MACEDO et al. (2011).

Diferentes concentrações, variando de 5 à 100 µg/mL de amostra foram diluídas em acetato de etila 100%. As misturas reacionais continham 50 µL das

amostras oleosas e 150 µL do radical DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) à 0.2 mM em acetato de etila 100%. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (BMG Labtech, Alemanha) e o decaimento da absorção foi acompanhado ao longo de 16 minutos em leitor de placas Fluostar Optimo (BMG LABTECH, Alemanha) com filtro de absorbância ajustado em 520 nm. A leitura foi comparada a um branco controle, onde a amostra oleosa foi substituída por acetato de etila 100%. As análises foram realizadas em triplicata (ESPÍN, SOLER-RIVAS e WICHERS, 2000).

A atividade de sequestro do radical DPPH é equivalente ao decaimento da absorbância e foi expressa em porcentagem, conforme Equação 4, descrita abaixo.

$$\text{Equação 4: Ativ. Seq. Radical (\%)} = \frac{\text{Abs (controle)} - \text{Abs (amostra em 16m)}}{\text{Abs (controle)}} * 100$$

4.2.2. ORAC

Para realização do ensaio ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) foi utilizada uma alíquota de amostra emulsão em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) e Tween 80 (9:1, v/v) na concentração inicial de 80 mg/mL. Esta emulsão foi então diluída em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4) até as concentrações de 4 à 20 µg/mL utilizando dispersor ULTRA-TURRAX® (IKA, Alemanha) por cinco minutos à 4.000 rpm.

O método ORAC proposto, com fluoresceína como “probe de fluorescência”, foi descrito por OU et al. (2002), e adaptado por MACEDO et al. (2011). O método automático de ORAC foi realizado em leitor de placa Fluostar Optimo (BMG LABTECH, Alemanha) com filtros de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. As medidas foram realizadas em placa COSTAR® 96 poços pretas (Corning, Estados Unidos). A reação acontece a 37°C e baseia-se na termo-decomposição do AAPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4) devido a sensibilidade da fluoresceína ao pH. A solução de fluoresceína (70 nM) em tampão fosfato (75 mM,

pH 7,4) foi preparada diariamente e mantida no escuro. A solução do padrão de controle 75 μM Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Acros Organics, Belgica) também foi preparada diariamente, em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4), e diluída para soluções de 1.500-1,5 $\mu\text{mol/L}$ para a curva padrão. Em cada poço, 120 μL de solução de fluoresceína (Ecibra, Brasil) e 20 μL de solução de amostra, ou tampão fosfato no caso do branco, ou ainda solução padrão de Trolox® foram adicionados de 60 μL de AAPH (12 mM). Todo o procedimento foi realizado ao abrigo de luz. A fluorescência foi medida imediatamente após a adição dos componentes da reação, e depois a cada minuto por aproximadamente 90 minutos. As análises foram realizadas em triplicata. Os valores ORAC foram calculados pela diferença entre a área sob a curva de decaimento da fluorescência de cada amostra e do branco (net AUC). As equações de regressão entre net AUC e concentração antioxidante foram calculadas para todas as amostras. Os valores de ORAC foram expressos como μMol de Trolox equivalente por grama de amostra.

4.3. Cultivo celular

A linhagem utilizada para este estudo foi de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) doadas pela Divisão de Farmacologia do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) - UNICAMP, e estabelecidas em nosso laboratório. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar estéril PA 420 (Pachane, Brasil).

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular (Ultra Cruz®, Estados Unidos) de 75 cm^2 , utilizando o meio de cultura Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich®, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (Gibco BRL, Estados Unidos) e 1% de penicilina/estreptomicina (v/v) (Gibco BRL, Estados Unidos), até atingirem confluência máxima, de cerca de 80%. As garrafas de cultivo foram mantidas em incubadora PureCell (NuAire, Estados Unidos) a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 . A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido Primovert (Zeiss, Alemanha).

O repique celular foi realizado sempre que as células atingiam confluência máxima. O procedimento consistia em aspiração do meio, lavagem das células em 5 mL de PBS (Gibco BLR, Estados Unidos) à 36°C, por duas vezes e adição de 1 mL de solução tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich®, Alemanha), por aproximadamente dois minutos. A solução tripsina-EDTA era então inativada pelo soro fetal presente no meio de cultura. Após esse procedimento, as células eram coradas com solução de Trypan Blue (Gibco BLR, Estados Unidos) à 20% em PBS, contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (Fisher Scientific, Estados Unidos) e inoculadas novamente em garrafas de 75 cm², com concentração final de 2x10⁶ células por garrafa.

Para os ensaios celulares, assim como o ensaio ORAC as amostras foram emulsionadas, utilizando uma alíquota de amostra em DMSO:Tween 80 (9:1, v/v) na concentração inicial de 80 mg/mL, que foi então diluída em meio de cultura MEM até as concentrações utilizadas nos ensaios, com o auxílio do dispersor ULTRA-TURRAX® (IKA, Alemanha), à 4.000 rpm durante 5 minutos. As células foram incubadas em presença de amostras emulsionadas pelo período de 5 horas antes dos ensaios. Garantiu-se, através de testes, que as emulsões eram estáveis durante o período de tempo determinado para o ensaio.

Todas as soluções utilizadas no cultivo celular foram esterilizadas em filtro de seringa com membrana estéril de polietilsulfona de 0,2 µm (GVS, Itália).

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade das amostras por ensaio de MTT

Uma possível ação citotóxica das amostras emulsionadas foi monitorada através do ensaio de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. O ensaio colorimétrico consiste na redução do sal de tetrazólio, de coloração amarela em meio aquoso a sal de formazan, composto insolúvel em meio aquoso de coloração violeta, descrito por MOSMANN (1983). É utilizado para medir toxicidade, proliferação e ativação celular. A redução do MTT se dá através da ação das enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes em células ativas que leva à

formação de sal de formazan. Neste ensaio, perdas de viabilidade celular de até 15% em relação ao controle, são aceitáveis e consideradas como variações da taxa metabólica celular.

As células Hep-G2 em confluência foram transferidas na densidade de 1×10^6 cél/mL para placas de 96 poços (Ultra Cruz®, Estados Unidos) e cultivadas em incubadora por 24 horas em condições ótimas de crescimento (37°C , 5% CO_2) antes de receberem as amostras. Após a adição das amostras emulsionadas em diferentes concentrações, a placa foi incubada pelo período de 5 horas e, por fim, submetida ao ensaio de MTT. As amostras emulsionadas foram descartadas e as alíquotas de células receberam 10 μL de solução de MTT (Sigma-Aldrich®, Alemanha) em PBS (5 mg/mL) e foram mantidas em incubadora por 3 horas (37°C , 5% CO_2). Em seguida foram adicionados 100 μL de sulfato dodecil de sódio (SDS) 10% em ácido clorídrico (HCl) à 0,01 M. A placa foi incubada novamente por 18 horas, a 37°C , 5% de CO_2 . Após este período, a absorbância das amostras foi lida em 540 nm, usando leitor de microplaca ST-360 (KHB, China). Controles positivos de viabilidade celular também foram avaliados, nos quais só havia células e meio de cultura MEM. Um controle da citotoxicidade dos solventes utilizados na emulsão também foi avaliado, substituindo o óleo da emulsão por água.

4.3.2. Avaliação da modulação de enzimas em hepatócitos humanos

4.3.2.1. Preparo do extrato bruto enzimático

Para os ensaios de avaliação das enzimas antioxidantes, as células não tratadas foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro (TPP, Suíça), na concentração inicial de 8×10^5 células por placa, suplementadas com meio de cultura MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora, em condições ótimas de crescimento até atingirem confluência de cerca de 80%. Após esta etapa, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se as amostras emulsificadas. A placa retornou a incubadora pelo período de 5 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas com PBS

gelado (4°C) por duas vezes. Com o auxílio de um raspador de células Cell Scraper 5 (TPP, Suíça) as células foram cuidadosamente removidas da placa e alocadas em tubos estéreis, tipo falcon (Ultra Cruz®, Estados Unidos), em banho de gelo. Esse procedimento de remoção celular foi realizado três vezes para cada placa. Os tubos foram então centrifugados à 4°C, 1.300 rpm durante 10 minutos em centrífuga Hereaus Megafuge® 16 (Thermo Scientific, Estados Unidos). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 200 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) suplementado com 0,1% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich®, Alemanha). Em seguida, os tubos foram levados ao banho ultrassônico (Thornton, Brasil) e sonicados em banho de gelo, durante 5 minutos à 20 volts.

4.3.2.2. Dosagem de proteínas

A partir do extrato enzimático bruto, seguiu-se a determinação de proteínas, pelo método colorimétrico de proteínas totais de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina para a curva padrão, em concentrações variando de 0,6 à 0,01 mg/mL. Para o volume final de 200 µL, adicionou-se 10µL de extrato enzimático bruto e 190 µL de reagente de Bradford e após 5 minutos em agitação constante no agitador multifuncional VDLR TS-2000A (Biomixer, Estados Unidos) verificou-se a absorvância à 630 nm no leitor de microplacas ST360 (KHB, China). As análises foram realizadas em triplicata.

O extrato enzimático bruto foi adequado para a concentração proteica de 2 mg/mL através da diluição com tampão fosfato de potássio (50 mM; ph 7,0) suplementado com 0,1% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich®, Alemanha). Em todos os experimentos, utilizou-se extratos enzimáticos bruto frescos preparados no dia do ensaio e mantidos em banho de gelo até o momento de seu uso e descartados logo após.

4.3.2.3. Determinação da atividade enzimática de Superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada através do SOD Determination Kit - 19160 (Sigma-Aldrich®, Alemanha), um ensaio colorimétrico indireto, cujo princípio baseia-se na redução do sal de tetrazólio WST (WST-1 (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfófenil)- 2 H tetrazólio) a uma espécie de sal de formazan, solúvel em água, através do ânion superóxido liberado pela enzima xantina oxidase. A atividade de dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD é diretamente relacionada a redução do sal de formazan. A reação foi realizada em placas estéreis de 96 poços (Ultra Cruz®, Estados Unidos) e iniciou-se com a adição de 20 µL de extrato enzimático bruto à 200 µL de solução de sal WST e 20 µL de solução enzimática. Três brancos foram adicionados à placa, sendo o branco 1 composto por todos os reagentes, exceto o extrato enzimático - que foi substituído por água; o branco 2, para controle da cor dos compostos, que possuía todos os reagentes exceto a solução de enzimas - que foi substituída por tampão de diluição e por fim, branco 3 onde havia apenas 20 µL de água, 200 µL de solução de sal WST e 20 µL de tampão de diluição. A curva padrão foi realizada pela diluição da enzima SOD Cu-Zn de eritrócitos bovino S2515 (Sigma Aldrich®, Alemanha), nas concentrações de 0,01 à 10 U/mL. Após o plaqueamento, a placa foi levada à estufa de cultura 002 CB (Fanem, Brasil) por 20 minutos à 37°C. Todas as amostras foram testadas em triplicata e a leitura foi realizada em leitor de microplacas ST360 (KHB, China) à 450 nm. A atividade de SOD foi mensurada em U/mL através da interpolação de pontos de absorbância versus unidades de enzima.

4.3.2.4. Determinação da atividade enzimática de Catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo Catalase Assay Kit – CAT 100 (Sigma-Aldrich®, Alemanha), cujo princípio baseia-se na mensuração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) restante após a reação da catalase. Utilizou-se H₂O₂ para a curva padrão, nas concentrações de 0,0125 – 0,075 µmol/mL. A reação iniciou-se

com a adição de 5 µL de extrato bruto enzimático à 70 µL de tampão fosfato de potássio (500 mM; pH 7,0) e 25 µL de H₂O₂ à 200 mM, então, através da via catalítica, ocorre a conversão do H₂O₂ em oxigênio e água. Após três minutos a reação foi interrompida pela adição 900 µL de solução de azida de sódio (15 mM). Uma alíquota dessa reação foi diluída dez vezes no reagente de cor contendo 0,1% de solução de peroxidase. O branco foi composto de todos os reagentes, exceto extrato enzimático bruto que foi substituído por tampão fosfato de potássio (500 mM; pH 7,0). A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Agilent (Agilent, Alemanha) à 520 nm utilizando cubeta de quartzo de 1 cm. As análises foram realizadas em triplicata e a atividade de catalase foi obtida através da Equação 5.

$$\text{Equação 5: Atividade } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}) = \frac{\Delta\mu\text{mol (H}_2\text{O}_2) * d * 100}{V * t}$$

Onde: $\Delta\mu\text{mol(H}_2\text{O}_2)$ = Diferença entre a quantidade de H₂O₂ do branco e da amostra.

d = Diluição da amostra original para a reação de catalase.

t = Tempo de duração da reação (em minutos).

v = Volume da amostra na reação de catalase (em mililitros).

100 = Diluição da alíquota da reação de catalase na reação colorimétrica.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos com a média das análises e o desvio padrão das médias. A significância estatística das diferenças entre a média analisada foi medida através da análise de variância ANOVA seguida do teste de Tuckey. Foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo software GraphPad Prism 5.0®.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização dos compostos minoritários bioativos

6.1.1. Teor de β -carotenos

Os carotenos são considerados antioxidantes naturais, assim como os tocóis. Quando presentes em óleos, estes compostos atuam na proteção contra o processo de peroxidação lipídica, agindo sobre os radicais livres. Além desta proteção, os antioxidantes naturais também apresentam bioatividade no organismo humano, com potencial na prevenção de doenças crônicas. Dentre todas as formas de carotenos conhecidas, o β -caroteno é o mais importante para o organismo humano, pois tem função como precursor de vitamina A (ALBUQUERQUE et al., 2003; CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011).

Os resultados obtidos para os teores de β -carotenos das amostras avaliadas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Teor de β -caroteno do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados.

Amostras	β caroteno ($\mu\text{g/g}$)
Óleo de buriti	781,63 ^a \pm 67,32
Gordura de murumuru	21,78 ^b \pm 1,58
Mistura simples	643,10 ^a \pm 61,82
Lipídio estruturado produzido com TL-IM®	688,61 ^a \pm 91,71
Lipídio estruturado produzido com <i>Rhizopus</i> sp.	666,32 ^a \pm 26,69
Lipídio estruturado produzido com TL-IM® e <i>Rhizopus</i> sp.	668,01 ^a \pm 24,66

Resultados apresentados com a média \pm desvio padrão da média de três análises independentes. Valores com letras iguais, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$.

A polpa do buriti é considerada uma excelente fonte natural de pró vitamina A, devido, principalmente, ao seu alto teor de β -caroteno, responsável, também, pela coloração vermelho-alaranjada intensa de seu óleo. A concentração de pigmentos nos óleos vegetais é um parâmetro de qualidade importante pois está intimamente relacionado à auto-oxidação e foto-oxidação dos mesmos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; HERNÁNDEZ, FREGAPANE e MOYA 2009).

O óleo de buriti, como esperado, apresentou o maior teor de β -caroteno dentre as amostras testadas, com 781,63 $\mu\text{g/g}$. A gordura de murumuru não é uma boa fonte de carotenóides, apresentando valor de 21,78 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno apenas. A mistura simples e os lipídios estruturados tiveram uma pequena redução no teor de β -caroteno quando comparadas ao óleo de buriti, provável efeito da diluição com a gordura de murumuru. A menor redução foi observada no lipídio estruturado produzido com a lipase comercial TL-IM® e a maior na mistura simples. Porém, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

O teor de β -caroteno na gordura de murumuru obtido neste estudo é superior ao apresentado por MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO (1997), que avaliaram óleos de palmeiras da região amazônica do Brasil e utilizando a metodologia de DAVIES (1976), a mesma utilizada neste estudo e obtiveram apenas 5 $\mu\text{g/g}$ de carotenos totais.

O resultado obtido neste estudo para o óleo de buriti é superior ao estudo de SILVA et al. (2009), no qual amostras de óleo de buriti industriais apresentavam valores de carotenos totais variando de 225 à 664 $\mu\text{g/g}$ enquanto amostras obtidas de mercados locais através de processos de extração artesanal apresentavam valores mais elevados, variando de 1.661 à 1.890 $\mu\text{g/g}$ e também bastante próximo ao estudo de AQUINO et al. (2012b) com óleo de buriti artesanal e refinado com conteúdo de β -caroteno de $911,4 \pm 2,4$ e $792,1 \pm 4,54$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estes resultados demonstram que a amostra de óleo de buriti avaliada provavelmente sofreu um processo de refino brando.

ALBUQUERQUE et al. (2005), extraiu óleo de buriti em laboratório sem uso de solventes e obteve 1.707 µg/g de carotenóides na amostra avaliada através de técnica de espectroscopia de absorção e emissão, sendo 672±10 µg/g apenas de trans-β-caroteno. Estudos indicam que diferentes de processo de extração do óleo podem resultar em teores de carotenóides muito distintos. RIBEIRO et al. (2010), ao estudar a extração de carotenoides em polpa de buriti, constatou que este óleo, quando submetido ao processo de refinamento, sofre degradação, principalmente de β-caroteno, que é convertido em apocarotenos, o que explica a redução no teor de carotenóides dos óleos refinados.

A interesterificação enzimática é um processo que ocorre em condições brandas maximizando a retenção de compostos minoritários quando comparada ao processo de interesterificação química, o que pode ser observado através de nossos resultados, nos quais todas os lipídios estruturados mantiveram o alto teor de β-caroteno do óleo de buriti. Estudos utilizando a lipase comercial TL-IM® mostram resultados semelhantes, nos quais ocorrem apenas pequenas reduções no teor de carotenóides em amostras submetidas ao processo biotecnológico de interesterificação (RESHMA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2010; KHATOON, KHAN e JEYARANI, 2012).

6.1.2. Teor de Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)

Dentre os antioxidantes naturais, o mais utilizado em óleos vegetais comestíveis é o tocoferol. A atividade antioxidante dos tocoferóis nos óleos se dá pela capacidade de doar hidrogênios do grupo fenólico aos radicais livres lipídicos, interrompendo cadeia de peroxidação lipídica (RAMALHO e JORGE, 2006). Estudos anteriores apontam a polpa e o óleo de buriti como excelentes fontes de tocoferóis (DARNET et al., 2011; SANTOS, ALVES e RUÍZ-MENDES, 2013).

Todas as amostras foram testadas quanto ao seu teor de tocoferóis e tocotrienóis. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Teor de tocoferóis do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados.

Amostras	α -T ($\mu\text{g/g}$)	β -T ($\mu\text{g/g}$)	γ -T ($\mu\text{g/g}$)	δ -T ($\mu\text{g/g}$)	α -TE ($\mu\text{g/g}$)
Óleo de buriti	112,55 ^a ± 3,91	7,13 ^a ± 0,01	107,40 ^a ± 3,43	9,38 ^a ± 0,54	127,13 ^a ± 4,27
Gordura de murumuru	ND	ND	ND	ND	ND
Mistura simples	74,64 ^b ± 0,73	1,90 ^b ± 0,16	50,11 ^b ± 0,34	8,26 ^a ± 0,24	80,85 ^b ± 0,85
Lipídio estruturado produzido com TL-IM®	76,01 ^b ± 4,10	0,31 ^c ± 0,43	69,06 ^c ± 3,95	3,51 ^b ± 0,10	83,18 ^b ± 4,71
Lipídio estruturado produzido com Rhizopus sp.	69,24 ^b ± 2,98	ND	63,26 ^c ± 2,75	2,85 ^b ± 0,39	75,65 ^b ± 3,27
Lipídio estruturado produzido com TL-IM® e Rhizopus sp.	73,25 ^b ± 0,30	1,89 ^b ± 0,09	68,12 ^c ± 0,03	3,87 ^b ± 0,79	81,12 ^b ± 0,25

Resultados apresentados com a média ± desvio padrão da média de duas análises independentes. Valores na mesma coluna, com letras iguais, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$. T (tocoferol), α -TE (Equivalente de α -tocoferol), ND (não detectado).

A técnica utilizada não detectou tocotrienóis nas amostras testadas, assim como não detectou tocoferóis na gordura de murumuru. A amostra de óleo de buriti apresentou valor mais altos quando comparada as demais amostras em todas as frações de tocoferóis. Para todas as amostras, os isômeros α e γ -tocoferol foram predominantes, seguidos dos isômeros β e δ que ocorrem em quantidades menos expressivas.

O óleo de buriti puro apresentou valores de 112,55 e 127,13 $\mu\text{g/g}$ de α -tocoferol e α -TE respectivamente. Estes valores são inferiores aos resultados encontrados na literatura. COSTA et al. (2010), utilizando frutos obtidos do norte e nordeste do Brasil, obtiveram 346,74 $\mu\text{g/g}$ α -TE no óleo de buriti. Valores ainda mais altos desta fração foram descritos nos estudos de SANTOS et al. (2013) que detectaram 1.567 ± 205 $\mu\text{g/g}$ de tocoferóis totais, apenas com as frações de α e β tocoferol do óleo de buriti extraído de frutos coletados no Amapá; de SILVA et al. (2011) que utilizando polpa do fruto de buriti comprada em mercado local de Abaetuba (PA, Brasil) chegaram a valores de $1.491,00 \pm 22,57$ mg/L de tocóis no óleo e de DARNET et al. (2011) que obtiveram 641 $\mu\text{g/g}$ de equivalente de α -tocoferol da matéria seca dos frutos da região de Belém (PA, Brasil).

O baixo teor de tocoferóis no óleo de buriti utilizado neste estudo pode ser relacionado à um possível processo de refino. O conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais é diretamente relacionado com o tipo de processamento aplicado. Óleos refinados contém um teor de tocóis reduzido em até 80% de acordo com as condições empregadas. A queda no teor de tocoferóis em óleos vegetais após o processo de refino pode ser de até 33 % (MIRALIAKBARI e SHAHIDI, 2008; GUINAZI et al, 2009; TEICHERT e AKON, 2011). SILVA et al. (2009) caracterizaram alguns óleos comerciais de buriti da região amazônica, comparando amostras de fornecedores industriais e artesanais. Os valores de α -tocoferol variavam de 329 ± 7 à 1.343 ± 6 $\mu\text{g/g}$. Os maiores valores estão associados a óleos extraídos artesanalmente, mostrando uma grande queda no teor de tocoferóis devido ao processo de industrialização dos óleos, que muitas vezes conta com etapas como refino, branqueamento e desodorização.

Observando as frações de tocoferóis podemos observar que: estatisticamente, a amostra de mistura e os lipídios estruturados não apresentaram diferenças entre si no teor de α -tocoferol. Em γ -tocoferol os lipídios estruturados apresentam valores estaticamente iguais entre si e um pouco superior à mistura simples. Houve a diminuição do teor de δ -tocoferol nos lipídios estruturados quando comparados à mistura simples, independente da lipase utilizada no processo. A lipase comercial TL-IM®, quando utilizada sozinha, mostrou ainda, uma queda no teor de β -tocoferol. Estes resultados apontam a possível ocorrência de interconversão dos isômeros de tocoferol nos óleos interesterificados. Esse é um resultado inesperado, RESHMA et al. (2008), relatou não haver influência da interesterificação enzimática sobre a mudança no conteúdo de nenhum isômero de tocoferol em particular e não há respaldo na literatura sobre a atuação de enzimas hidrolases sobre esses compostos. Trata-se de uma questão que necessita de mais investigações.

Dados acerca de óleos e gorduras que passaram pelo processo de interesterificação utilizando a lipase comercial TL-IM®, variando de 3 à 10 % (m/m), apontam uma queda no teor de tocoferóis em todas as frações, independentemente do tempo de reação e das matérias primas envolvidas (KHATOON, KHAN e JEYARANI, 2012, TANG et al., 2012; ZHAO et al., 2013, PANDE, 2013; RUAN et al., 2014). Foi observado pequeno aumento nas frações de tocoferol, não ultrapassando 2,5% do total de tocoferóis e tocotrienóis, no estudo de REENA e LOKESH (2007), utilizando porém, a enzima comercial IM-RM® (Novozymes) a 1% (m/m).

De forma geral, nossos óleos possuem valores compatíveis de tocoferóis comparado com os óleos comerciais. Todas as misturas sofreram diluições com a adição da gordura e, por isso, apresentam menores teores de tocoferóis quando comparadas ao óleo de buriti puro. Porém, ao olhar para o conteúdo de α -tocoferol podemos perceber que a reação de interesterificação não causou perdas do teor deste isômero que é de grande importância biológica.

6.1.3. Conteúdo de fenólicos totais

Os compostos fenólicos são considerados os metabólitos de plantas com maior atividade antioxidante. Eles possuem habilidade de doar hidrogênios ou elétrons para formar radicais estáveis. A palmeira de buriti é uma fonte rica em compostos fenólicos, variando de 86 à 378 mg de equivalente de ácido gálico (EAG) a cada 100 gramas de extrato de fruto, casca e folhas (KOOLEN et al., 2013).

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para as amostras testadas.

Tabela 7: Teor de fenólicos totais do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados.

Amostras	EAG (µg/g)
Óleo de buriti	107,00 ^a ± 1,25
Gordura de murumuru	16,17 ^b ± 0,72
Mistura simples	80,75 ^c ± 1,44
Lipídio estruturado produzido com TL-IM®	85,33 ^c ± 3,15
Lipídio estruturado produzido com <i>Rhizopus</i> sp.	70,33 ^c ± 0,72
Lipídio estruturado produzido com TL-IM® e <i>Rhizopus</i> sp.	80,75 ^c ± 2,17

Resultados apresentados com a média ± desvio padrão da média de três análises independentes. Valores com letras iguais, não apresentam diferença significativa à P<0,05. EAG: Equivalente de ácido gálico.

Dados da literatura sobre o teor de fenólicos do óleo de buriti são escassos e controversos. O óleo de buriti analisado neste estudo apresentou concentração de 107 µg/g de EAG. Quando comparado aos dados do fruto de buriti apresentados por KOOLEN et al. (2013) há uma grande redução no teor de compostos fenólicos. Porém, é compatível aos valores de fenólicos totais apresentado por MIRALIAKBARI E SHAHIDI (2008) para óleos de diferentes oleaginosas como noz

(210 µg/g de EAG), amêndoa (124 µg/g de EAG), avelã (159 µg/g de EAG) e castanho do Brasil (153 µg/g de EAG). HERNÁNDEZ, FREGPANE e MOYA (2009), estudaram compostos bioativos e atividade antioxidante do óleo artesanal de patauá produzido por comunidades indígenas na Venezuela e obtiveram, através do método de Follin-Ciocalteu, mesma técnica descrita neste estudo, valores inferiores de compostos fenólicos, variando de 31,6 à 64,0 µg/g de EAG.

A gordura de murumuru mostrou-se pobre em compostos fenólicos, apresentando apenas 16,17 µg/g de EAG. Não há dados na literatura sobre valores de fenólicos da gordura de murumuru.

O óleo de buriti apresentou valor de fenólicos totais bastante superior ao da gordura de murumuru. Esta diferença ocasionou uma queda de cerca de 20% no teor de fenólicos totais da mistura simples e dos lipídios estruturados. A comparação do teor de fenólicos totais nos lipídios estruturados e na mistura simples evidencia, mais uma vez, a segurança do processo de interesterificação enzimática na retenção de compostos minoritários bioativos. Dentre as diferentes lipases utilizadas na reação, a lipase de *Rhizopus* sp. parece ter a menor eficiência na retenção de fenólicos, enquanto a lipase TL-IM® apresentou maior eficiência, porém, não há diferenças estatísticas entre estes resultados.

A retenção de fenólicos totais também foi descrita no estudo de NAGARAJU e BELUR (2008), na reação de interesterificação de óleo de coco e azeite de oliva, catalisada pela lipase comercial IM-60® (Novo Nordisk – Danbury, CT). Utilizando também a metodologia de Folin-Ciocalteu, obtiveram 112 e 115 µg/g de fenólicos totais para a mistura e para o lipídio estruturado, respectivamente. Em contrapartida, PANDE et al. (2013) constataram através de análise por HPLC-DAD, a perda total de compostos fenólicos em lipídios estruturados após duas reação de interesterificação com a lipases comerciais Novozym 435® e TL-IM® respectivamente.

Óleos refinados apresentam menores concentrações de compostos fenólicos devido à baixa estabilidade destes compostos aos processos de refino,

neutralização e desodorização (SZYDLOWSKA-CZERNIAK et al., 2008). Esta observação se faz válida frente aos baixos teores de fenólicos totais obtidos neste estudo. Porém, mesmo com baixos teores de fenólicos totais, é importante ressaltar que as amostras de óleo de buriti, lipídios estruturados e de mistura apresentam valores de EAG compatíveis a outros óleos vegetais, como pode ser observado no estudo de MIRALIAKBARI e SHAHIDI (2008) apresentado anteriormente.

6.2. Avaliação da Atividade antioxidante através de ensaios de sequestro de radicais livres

A capacidade antioxidante das amostras estudadas foi testada com os óleos integrais, sem separação de frações, por duas metodologias diferentes, DPPH e ORAC, ambos adaptados para amostras lipofílicas.

6.2.1. DPPH

O ensaio DPPH vem sendo amplamente utilizado para determinar a capacidade antioxidante em óleos vegetais. Trata-se de um ensaio qualitativo, no qual é possível ranquear as amostras quanto à capacidade antioxidante das mesmas (CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011). O ensaio foi acompanhado ao longo de 16 minutos, utilizando diferentes concentrações de amostra. A Figura 5 mostra a atividade de sequestro do radical DPPH nas diferentes concentrações de amostra, após 16 minutos de ensaio.

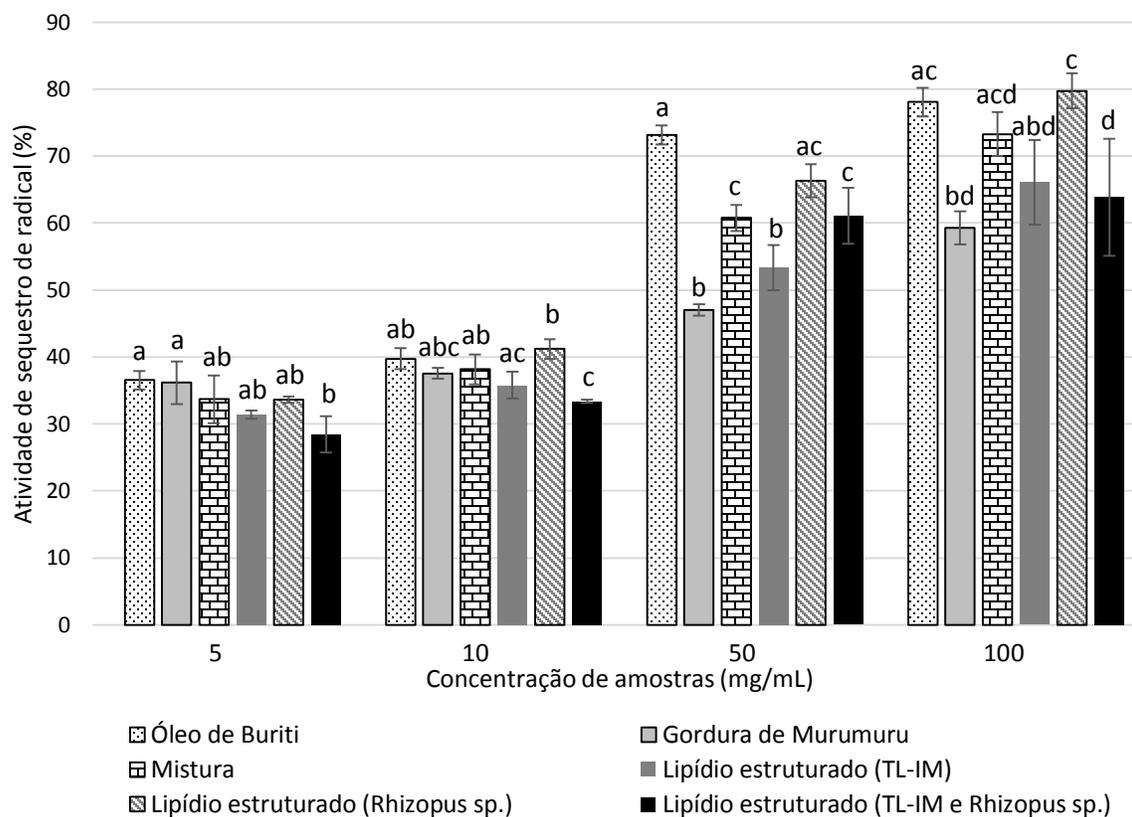


Figura 5: Atividade de sequestro do radical DPPH (%). Resultados apresentados com a média de três análises independentes e desvio padrão da média representado pela barra de erros. Valores com letras iguais, na mesma concentração, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$.

Pode-se observar que a capacidade de sequestro do radical está intimamente relacionada à concentração das amostras no ensaio. As menores concentrações, 5 e 10 mg/mL tiveram atividade de sequestro de radical em torno de 40% em qualquer amostra analisada. Quando a concentração das amostra aumenta para 50 mg/mL torna-se possível distinguir a atividade de sequestro de radical nas diferentes amostras. Mesmo nas maiores concentrações, de 50 e 100 mg/mL, a gordura de murumuru apresenta as menores taxas de sequestro do radical DPPH dentre as demais. O destaque do óleo de buriti já pode ser observado na concentração de 50 mg/mL, sendo comparado apenas ao lipídio estruturado produzido com a lipase de *Rhizopus sp.*

Entre a mistura simples e os lipídios estruturados, os valores parecem muito semelhantes, porém há uma tendência clara para a redução da atividade de sequestro do radical no lipídio estruturado produzido com a lipase TL-IM® e um aumento na atividade de sequestro de radical do lipídio estruturado produzido com a lipase de *Rhizopus* sp., que pode ser comparado a atividade do óleo de buriti puro.

A literatura não costuma indicar que o processo de interesterificação enzimática afete significativamente a capacidade antioxidante dos óleos. MOMENY, VAFAEI e RAMLI (2013), formularam um equivalente de manteiga de cacau a partir da reação de interesterificação do óleo de caroço de manga com a fração média do óleo de palma (50:50), utilizando a lipase comercial TL-IM®. Seus resultados apontam um produto com capacidade antioxidante equivalente tanto à manteiga de cacau, quanto ao óleo de caroço de manga que foi utilizado em sua formulação, demonstrando que o processo enzimático não levou à perda da capacidade antioxidante do óleo original.

Existe uma grande dificuldade em comparar os dados obtidos neste estudo com a literatura. Estudos de atividade antioxidante com óleos podem apresentar grandes variações a depender da metodologia utilizada e da forma de análise de dados (ESPÍN, SOLER-RIVAS e WICHERS, 2000). Os estudos a seguir apresentam seus resultados de DPPH em EC₅₀ – concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, onde maiores valores de EC₅₀ indicam menores capacidades antioxidantes. O fruto de buriti, ainda verde, foi analisado através da técnica de DPPH utilizando extratos metanólicos e apresentou EC₅₀ 19,50±0,064 mg/mL. Um estudo anterior, analisando o óleo artesanal de buriti, utilizando como solvente o clorofórmio, havia apresentado capacidade antioxidante superior ao fruto, com EC₅₀ 7,7±0,6 mg/mL. A dificuldade em comparar os dados encontra-se principalmente na utilização de diferentes solventes e frações dos óleos (FERREIRA et al., 2011; CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011; KOOLEN et al., 2013;).

AQUINO et al. (2012b) comparou a atividade antioxidante do óleo de buriti artesanal da cidade de Picos – PI, antes e após o processo de refino. Seus

resultados mostram uma queda acentuada na atividade antioxidante de cerca de 50%. O processo de refino de óleos vegetais diminui a capacidade antioxidante, mesmo que altere de forma pouco significativa o teor de fenólicos e/ou tocoferóis. Entretanto, estudos apontam que a manutenção da atividade antioxidante de óleos vegetais refinados pode estar relacionada à concentração de alguns isômeros de tocoferol, predominantes γ e δ -tocoferol (VALAVANIDIS et al., 2004, CASTELLO-BRANCO e TORRES, 2011). Esta relação parece ser sustentada pelos resultados aqui apresentados, onde a gordura de murumuru, que não apresentou teores detectáveis de tocoferóis e apenas um pequeno teor de compostos fenólicos, apresentou a menor atividade antioxidante quando comparada às demais amostras, que apresentaram valores relativamente altos de γ -tocoferol e presença de δ -tocoferol.

6.2.2. ORAC

O ensaio ORAC mede a habilidade de um antioxidante em sequestrar radicais livres através da doação do átomo de hidrogênio. Trata-se de um ensaio bastante relevante, pois serve como modelo da ação antioxidante em alimentos e também em sistemas fisiológicos (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005). O método foi adaptado, utilizando-se uma emulsão das amostras com 80 mg/mL de óleo, gordura ou lipídio estruturado em DMSO: Tween 80 (9:1) e posteriormente diluída em tampão fosfato.

Os resultados do ensaio de ORAC para as amostras oleosas apresentam-se na Tabela 8.

Tabela 8: Capacidade antioxidante do óleo e gordura amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados através de ensaio ORAC.

Amostras	Equivalente de trolox ($\mu\text{mol/g}$ óleo)	Concentração (g/L)	Slope	Intercept	R²
Óleo de buriti	95,34 \pm 11,89 ^A	4-20	75,7	178,9	0,99
Gordura de murumuru	61,19 \pm 15,78 ^B	4-20	34,6	241,6	0,98
Mistura simples	77,40 \pm 4,34 ^{AB}	4-20	71,6	53,8	0,99
Lipídio estruturado produzido com TL-IM®	104,40 \pm 19,23 ^A	4-20	69,6	320,9	0,97
Lipídio estruturado produzido com <i>Rhizopus</i> sp.	97,50 \pm 13,44 ^A	4-20	74,8	217,4	0,98
Lipídio estruturado produzido com TL-IM® e <i>Rhizopus</i> sp.	77,68 \pm 26,59 ^{AB}	4-20	35,6	377,8	0,93

Resultados apresentados com a média \pm desvio padrão da média de três análises independentes. Valores com letras iguais, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$.

A utilização de um sistema de emulsão possibilitou esta análise, porém causou grande variabilidade nas respostas, devido à provável instabilidade microscópica da emulsão ao longo do tempo de exposição.

A capacidade antioxidante das amostras mostrou-se maior para os lipídios estruturados que foram produzidos com a lipase de TL-IM® e com a lipase de *Rhizopus* sp., respectivamente, seguidos do óleo de buriti puro. A gordura de murumuru, assim como nos outros ensaios antioxidantes, mostrou-se com menor capacidade antioxidante, contudo, foi estatisticamente semelhante a mistura

simples e ao lipídio estruturado produzido utilizando-se as duas lipases TL-IM® e *Rhizopus* sp., concomitantemente. A grande variabilidade experimental dos resultados do ORAC com os sistemas emulsificados nos permite apenas observar tendências nos resultados, com os lipídios estruturados apresentando valores comparáveis aos do óleo de buriti puro, a gordura de murumuru apresentando a menor capacidade antioxidante e a mistura simples em posição intermediária.

A gordura de murumuru apresentou a menor capacidade antioxidante neste ensaio, assim como no ensaio de DPPH, o que já era pressuposto, uma vez que essa gordura tem se mostrado pobre em compostos minoritários com potencial antioxidante, porém apresenta algum teor de compostos fenólicos. O ensaio de ORAC tem boa correlação com o teor de compostos fenólicos, quanto maior a concentração destes compostos, maior a capacidade antioxidante das amostras (SANCHES et al., 2007; CASTELLO-BRANCO e TORRES, 2011; BATAGLION et al., 2014; HAN et al., 2014). A mesma correlação não ocorre com os tocoferóis, devido principalmente a diferença na polaridade destes compostos (NINFALI et al., 2002; HAY et al., 2006; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2008). É importante ressaltar que a contribuição de carotenos como antioxidantes não pode ser observada no ensaio ORAC uma vez que estes atuam no sequestro do oxigênio singlet, seguindo um mecanismo de atuação diferente do avaliado neste ensaio (HUANG et al., 2002).

Outro ponto a ser ressaltado é a semelhança nos resultados dos dois ensaios antioxidantes. O lipídio estruturado produzido com lipase de *Rhizopus* sp. teve destaque como uma das amostras com maior poder antioxidante no ensaio de DPPH e também aparece no ensaio de ORAC como uma das maiores atividades antioxidantes, estatisticamente semelhante à amostra de óleo de buriti. Já o lipídio estruturado produzido com a utilização das duas lipases concomitantemente aparece nos dois ensaios com baixa capacidade antioxidante, estatisticamente semelhante à gordura de murumuru e à mistura simples.

6.3. Cultivo celular

6.3.1. Avaliação da citotoxicidade das amostras por MTT

O ensaio de MTT é uma técnica simples e confiável, que quantifica, através de ensaio colorimétrico, a possível citotoxicidade das amostras de interesse (MOSMANN, 1983). A linhagem celular Hep-G2 de hepatocarcinoma humano foi escolhida devido a sua aplicação no estudo da função hepática.

Os resultados da viabilidade celular da linhagem celular Hep-G2 após exposição às diferentes concentrações de amostras estão ilustradas na Figura 6.

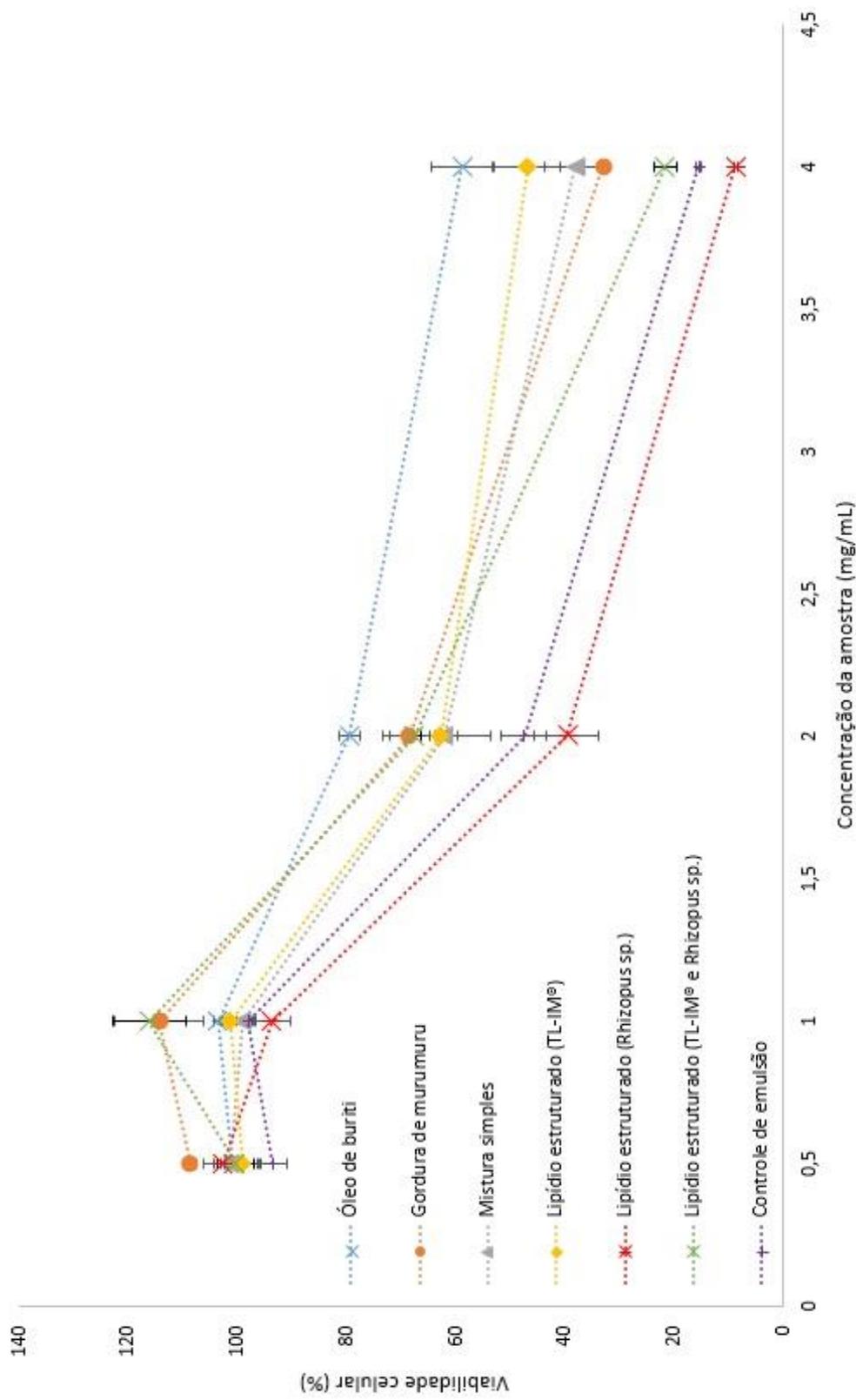


Figura 6: Viabilidade da linhagem celular Hep-G2 (%) após exposição das amostras por 5 horas de ensaio. Resultados apresentados com a média de duas análises independentes e desvio padrão da média representado pela barra de erros.

Observando a Figura 6, pode-se perceber claramente que o efeito citotóxico é dose dependente, onde as menores concentrações de amostras 0,5 e 1,0 mg/mL mantêm a viabilidade celular em torno de 100% e observa-se uma queda acentuada na viabilidade celular, em todas as amostras testadas, a partir da transição de 1 à 2 mg/mL. A diminuição da viabilidade celular se mantém em todas as amostras até a concentração de 4,0 mg/mL. A viabilidade celular foi expressa em relação a um controle positivo, no qual as células foram expostas, pelo mesmo período de tempo do ensaio ao meio de cultura MEM, sem suplementação. A média dos resultados deste controle positivo de viabilidade foi considerada como 100% de viabilidade celular.

No mesmo ensaio, foi também avaliada a toxicidade dos agentes emulsionantes utilizados. A emulsão foi preparada com até 4,5% (v/v) de solvente dimetil sulfóxido (DMSO) e até 0,5% (v/v) do agente tensoativo Tween® 80, dois reagentes comumente utilizados em ensaios celulares. Assim como nas demais amostras, houve uma queda acentuada da viabilidade celular a partir da transição de 1 para 2 mg/mL, que se manteve até a maior concentração testada de 4,0 mg/mL. Acredita-se que esta queda tenha sido ocasionada pela adição destes solventes no sistema de emulsão. O reagente DMSO tem ampla utilização em ensaio de MTT como solvente e sua utilização é comum em baixas concentrações, cerca de 1% (m/v) (MANOSROY, DHUMTANOM, MANOSROY, 2006; BAYALA et al., 2014; LAN et al., 2014; SALEH et al., 2014; METUGE et al., 2014; GOLFAKHRABADI et al., 2015). Porém, existem controvérsias a respeito da toxicidade deste solvente quando em concentrações de cerca de 10% (SANTOS et al., 2006; YAN et al., 2009).

A partir da avaliação da citotoxicidade das amostras, foram escolhidas as menores concentrações, 0,5 e 1,0 mg/mL para os ensaios celulares, pois estas mantêm a viabilidade celular em torno de 100%, não apresentando sinais de toxicidade por parte das amostras ou dos agentes emulsionantes.

6.3.2. Avaliação da produção de enzimas antioxidantes em hepatócitos humanos

Oxidantes são gerados através do metabolismo normal em organelas como mitocôndrias e peroxissomos e também através da ação catalítica de uma série de enzimas citosólicas, além das fontes exógenas de oxidantes. O aumento da concentração de oxidantes culmina com o estresse oxidativo, no qual há o aumento de espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e a diminuição de antioxidantes, resultando em dano e até mesmo morte celular. Há uma busca contínua pelo controle da homeostase oxidativa através da neutralização de radicais livres por mecanismos endógenos de defesa antioxidante (BIANCHI e ANTUNES, 1999; FANG, YANG e WU, 2002). A ação das amostras nestes mecanismos foram avaliados pela atividade das enzimas superóxido dismutase (EC 1.12.1.1) e catalase (EC 1.11.1.6) em hepatócitos humanos.

❖ Superóxido dismutase (SOD)

Existem diferentes enzimas SOD no organismo humano, mas todas possuem função de auxiliar na prevenção a danos oxidativos às células, causados através do acúmulo de radicais superóxidos. A enzima SOD-CuZn, tem localização citoplasmática, enquanto a enzima SOD-Mg atua exclusivamente no interior da mitocôndria e a SOD-EC, apenas no líquido extra celular (ZELCO, MARIANI e FOLZ, 2002).

Os resultados obtidos para a modulação da atividade de SOD frente as diferentes concentrações das emulsões dos óleos amazônicos, da mistura e dos lipídios estruturados estão demonstrados na Figura 7.

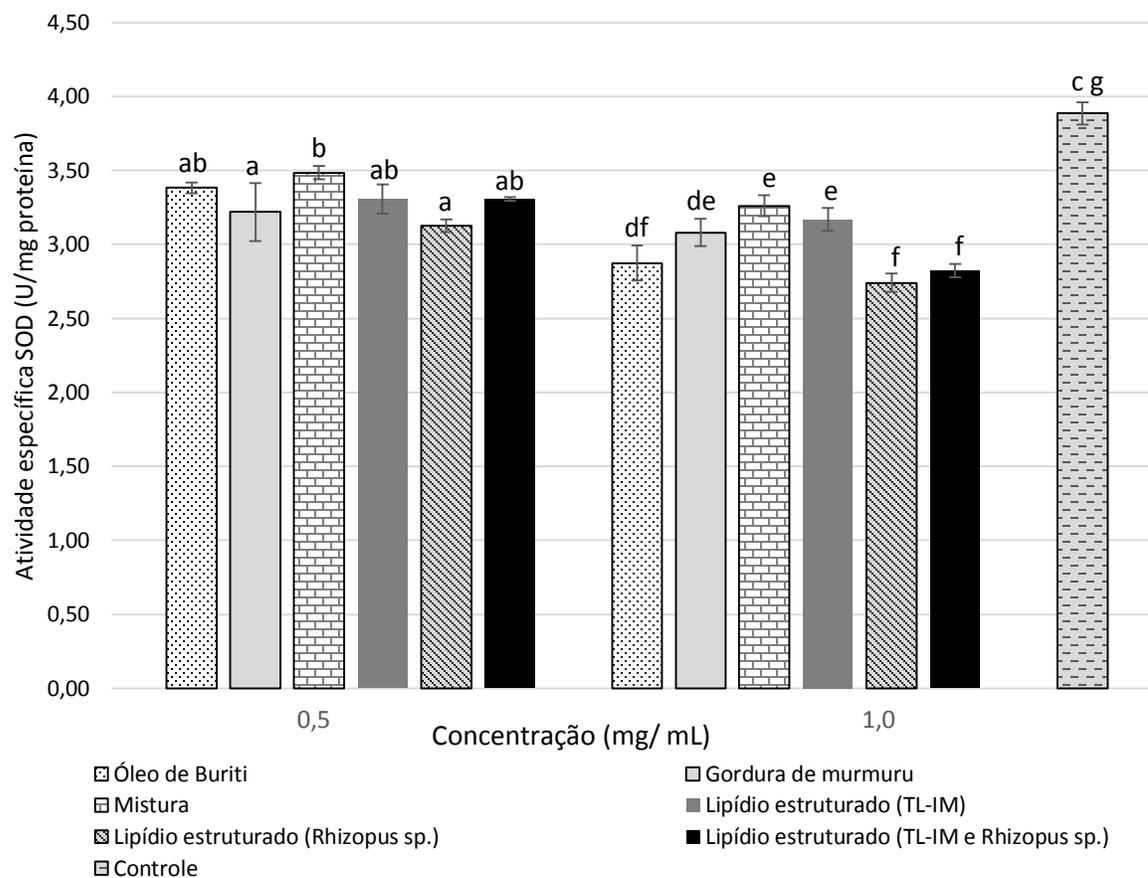


Figura 7: Atividade específica *in vitro* da enzima superóxido dismutase citosólica (SOD-CuZn) em linhagem celular Hep-G2, após exposição das amostras por 5h, em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL. Resultados apresentados com a média de três análises independentes e desvio padrão da média representado pela barra de erros. Valores com letras iguais, na mesma concentração, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$. Controle: apenas meio de cultura MEM.

A adição das amostras de óleos e gorduras da Amazônia, mistura e lipídeos estruturados durante cinco horas em células de hepatócito humano resultou em menor ativação da enzima SOD-CuZn, quando comparado ao controle (apenas meio de cultura MEM).

A atividade da enzima SOD-CuZn foi bastante homogênea para todas as amostras, principalmente na concentração de 0,5 mg/mL. Na concentração de 1,0 mg/mL observa-se menor atividade enzimática de SOD nas amostras dos lipídios estruturados produzidos com a lipase de *Rhizopus* sp. e com as duas lipases TL-IM® e *Rhizopus* sp. concomitantemente; seguidos, do óleo de buriti puro.

A diminuição da ação da SOD observada neste estudo pode ser explicada pelo longo período de exposição das células frente às amostras emulsionadas antes da medição da atividade de SOD. A peroxidação lipídica é uma das principais características do estresse oxidativo e culmina com a formação de ânions superóxido. A enzima superóxido dismutase atua na primeira etapa da via antioxidante, sendo a enzima responsável pela detoxificação do ânion superóxido, liberando peróxido de hidrogênio e oxigênio (MOURE et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; VÁZQUEZ et al., 2011). Esta reação enzimática ocorre tão logo se formam os radicais superóxido. Por isso, após 5 horas de exposição, relativamente pouca atividade enzimática pode ser detectada, indicando que provavelmente a enzima tenha sido utilizada em momentos anteriores.

❖ **Catalase**

Estudos sobre a atividade da enzima catalase em células hepáticas mostram a sua importância na prevenção da citotoxicidade e da morte celular induzidas por estresse oxidativo através da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BAI et al., 1999; YANG et al., 2005).

Os resultados referentes à atividade da enzima catalase em células Hep-G2, quando expostas a amostras emulsificadas pelo período de 5 horas estão representadas na Figura 8.

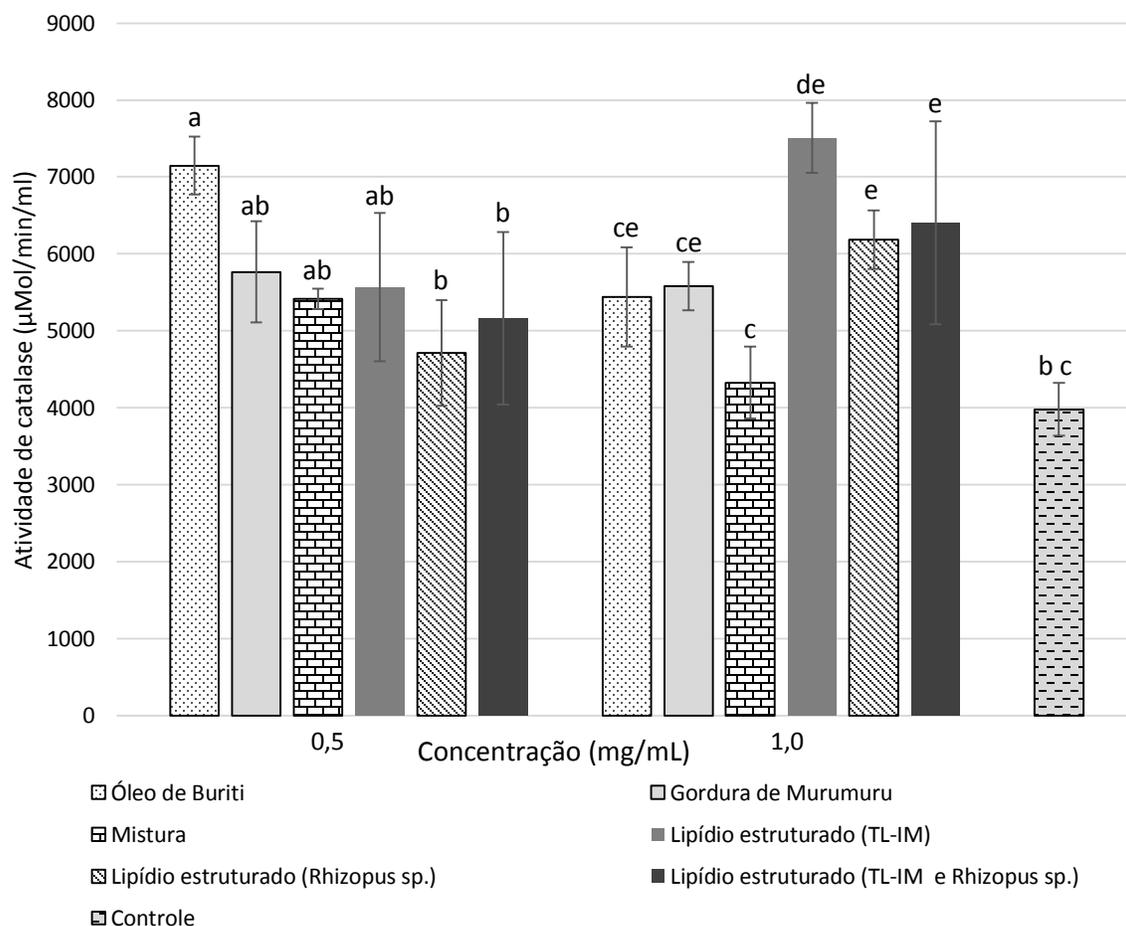


Figura 8: Atividade *in vitro* da enzima catalase em linhagem celular Hep-G2 após exposição das amostras por 5h de ensaio, em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL. Resultados apresentados com a média de três análises independentes e desvio padrão da média representado pela barra de erros. Valores com letras iguais, na mesma concentração, não apresentam diferença significativa à $P < 0,05$. Controle: apenas meio de cultura MEM.

A atividade de catalase não apresentou um padrão dose dependente homogêneo para todas as amostras. Nossos resultados mostram o óleo de buriti puro, na concentração de 0,5 mg/mL, como a única amostra, estatisticamente diferente do controle e que leva ao aumento da atividade de catalase. No entanto, vemos uma expressiva perda da atividade de catalase para esta mesma amostra quando a concentração de óleo aumenta para 1,0 mg/mL. A gordura de murumuru

não demonstrou diferença estatística do controle em nenhuma das concentrações. Assim como o óleo de buriti, a mistura simples apresentou perda da atividade com o aumento da concentração de amostra. Porém mostrou-se estatisticamente igual ao controle nas duas concentrações.

As amostras que passaram pelo processo biotecnológico de interesterificação mostraram perfil dose dependente, aumentando a atividade de catalase juntamente com o aumento da concentração de óleo. A análise isolada da concentração de 1,0 mg/mL sugere que os lipídios estruturados aumentam de forma mais significativa, a atividade de catalase, principalmente quando comparados a mistura simples, que não passou pelo processo de interesterificação enzimática. O lipídio estruturado produzido com a lipase comercial TL-IM® foi o mais responsivo, seguido do lipídio estruturado produzido pelas duas lipases concomitantemente e, por fim, pelo lipídio estruturado produzido pela lipase bruta de *Rhizopus* sp.

Apesar da semelhança no teor de compostos minoritários entre a mistura simples e os lipídios estruturados apresentados neste trabalho, os resultados apresentados nos ensaios *in vitro* são bastante distintos. Uma das possíveis causas dessa diferença está na alteração da composição de TAG ocasionados pela interesterificação enzimática (Anexo I). Alimentos com potencial antioxidante, como o caso do óleo de buriti e dos lipídios estruturados apresentados neste estudo, são matrizes complexas. Enquanto os lipídios estruturados se apresentaram como ativadores deste sistema antioxidante, a mistura e mesmo o óleo de buriti apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre o sistema enzimático (MELO-SILVEIRA et al., 2014).

Estudos de óleos vegetais comestíveis com avaliação de enzimas antioxidantes são raros e a utilização de processos biotecnológicos como a interesterificação enzimática ainda mostram-se pouco estudados, trazendo dificuldade em correlacionar nossos dados com a literatura. Contudo, em um estudo de NAGARAJU e BELUR (2008), foram desenvolvidos lipídios estruturados e misturas simples de óleo de coco com óleo de amendoim ou azeite de oliva com a utilização da lipase IM-60® como catalisadora do processo. A atividade enzimática

foi avaliada em fígado de ratos alimentados com a mistura de óleos ou com o lipídio estruturado e seus resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas na ativação das enzimas SOD, catalase, glutationala peroxidase e glutationala transferase para os diferentes processos biotecnológicos.

A adição de óleos em um sistema biológico pode gerar reações β -oxidação, que aumentam a atividade de catalase para compensar a geração de peróxidos (OLIVERAS-LÓPEZ et al., 2014). Estudos consideram que o aumento da atividade basal de catalase é relacionado a um efeito protetor, de ativação da enzima para rápida metabolização e eliminação de agentes oxidantes (YANG et al., 2005; CHANG et al., 2008). Todavia, quando a taxa de aumento desta atividade supera em muitas vezes o valor de atividade basal pode culminar com morte celular e é indício de condições patológicas ou depleção de outros componentes do sistema antioxidante endógeno (BAI et al., 1999). Este tipo de resposta exacerbada não foi observado neste estudo.

Além da ativação da catalase, que auxilia na remoção de ROS, demonstradas pelos lipídios estruturados, essas amostras, assim como o óleo de buriti e a mistura simples apresentaram teores de antioxidantes exógenos como o β -caroteno e os tocoferóis que podem atuar no nível celular através de mecanismos não enzimáticos, prevenindo o estresse oxidativo.

OLIVERAS-LOPÉZ et al. (2014), analisaram os efeitos benéficos do consumo de azeite de oliva extra virgem em adultos saudáveis. Seus resultados se mostraram muito semelhantes aos descritos neste estudo, com aumento significativo na atividade antioxidante plasmática, aumento na atividade de catalase e diminuição na atividade de SOD, após o consumo do azeite, o que indicou, segundo os autores, que os compostos minoritários polares e os tocoferóis, contidos na amostra de azeite estudado, diminuíram o estresse oxidativo em adultos saudáveis.

O estresse oxidativo é uma das causas de uma série de doenças, principalmente aquelas ligadas ao envelhecimento. A busca por fontes naturais

capazes de modular a resposta antioxidante endógena visa reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo, através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Este tipo de resposta foi observado principalmente nos lipídios estruturados. O óleo de buriti e a gordura de murumuru, assim como a mistura simples, não foram capazes de alterar de forma significativa a atividade dessas enzimas.

Analisando conjuntamente os resultados das enzimas antioxidantes, temos a diminuição da atividade de SOD e manutenção e/ou aumento da atividade de catalase nas diferentes amostras testadas. A hipótese que levantamos para a redução da ação da enzima SOD relaciona-se com o tempo de exposição das células às amostras. Sendo a SOD a primeira barreira antioxidante endógena, esta pode ter sido consumida durante o tempo de exposição, liberando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que é o substrato utilizado pela enzima catalase, e demonstrando assim menor atividade quando comparado ao controle. A enzima catalase estava ativa no momento da medição, o que ficou evidente quando comparamos as células que receberam as amostras, frente às células controle.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que:

O óleo de buriti é uma excelente fonte natural de antioxidantes, com altas concentrações de β -carotenos e tocoferóis. Este óleo, mesmo após sofrer a diluição com a gordura de murumuru, ainda apresentou resultados satisfatórios em todas as análises.

A gordura de murumuru é pobre em compostos minoritários, porém apresentou atividade antioxidante quando submetida a ensaios de DPPH e ORAC. A emulsão de gordura de murumuru manteve estável a atividade *in vitro* da enzima catalase em células Hep-G2.

A reação de interesterificação enzimática não levou à perda dos compostos minoritários analisados neste estudo em nenhum dos três sistemas estudados. Em geral, os lipídios estruturados e a mistura sofreram perdas de compostos bioativos e de capacidade antioxidante quando comparadas ao óleo de buriti, mas essa queda deve-se a sua diluição com gordura de murumuru.

A utilização das duas enzimas concomitantemente na reação de interesterificação gerou resultados intermediários entre as amostras que utilizaram as enzimas separadamente, não apresentando sinergismo positivo da ação das duas enzimas.

Nenhuma das amostras no sistema de emulsificação utilizado apresentou efeitos citotóxicos *in vitro*, até a concentração de 1 mg/mL em células de hepatócitos humanos.

A atividade da enzima antioxidante SOD apresentou diminuição após a exposição prolongada à emulsão de amostras enquanto a atividade da enzima catalase foi mantida, ou levemente aumentada, após o tratamento com as emulsões. A diminuição da atividade enzimática de SOD pode ser explicada pelo seu consumo anterior ao momento da medição, com liberação de peróxido de hidrogênio, que levou a uma pequena ativação da catalase frente aos lipídios

estruturados. Essas alterações brandas indicam que as amostras não induzem ao estresse oxidativo e parecem atuar a favor da homeostase oxidativa.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dentre as sugestões para trabalhos futuros, aconselha-se inicialmente buscar alternativas para a emulsificação dos óleos amazônicos e seus lipídios estruturados, a fim de obter uma emulsão mais duradoura e mais fisiológica, que apresente baixa citotoxicidade, mesmo em maiores concentrações.

Sugere-se também estudos mais aprofundado dos sistemas enzimáticos de SOD e catalase, realizando ensaios *in vitro* com adição de componente agressor às células, como o peróxido de hidrogênio, por exemplo, a fim de observar a modulação da atividade antioxidante frente aos compostos testados. Para a enzima SOD recomenda-se ainda a realização de estudo cinético da atividade enzimática, a fim de obter sua máxima atividade. Um outro ponto importante consiste na análise da forma mitocondrial da enzima, a SOD-Mg, que tem sua atividade aumentada perante o estresse oxidativo sendo portanto, um marcador celular.

Para uma avaliação mais completa e aprofundada do sistema antioxidante endógeno, recomenda-se a avaliação da atividade enzimática da glutathione peroxidase e também da glutathione reductase.

Por fim, confirmando a segurança dos sistemas analisados, um próximo passo seria a avaliação dos óleos e gorduras amazônicos e seus lipídios estruturados em modelos animais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKAR, P; ZHU, XM; GAUTAM, A; SHIN JA; HU JN; LEE JH; AKOH CC; LEE KT. Scale-up production of zero-trans margarine fat using pine nut oil and palm stearin. *Food Chemistry*; 119: 1332-1338, 2010.

ALBUQUERQUE, MLS; GUEDES, I; ALCANTARA, P; MOREIRA SGC. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy* 33: 127–131, 2003.

ALBUQUERQUE, MLS; GUEDES, I; ALCANTARA, P; MOREIRA, SGC; NETO, NMB; CORREA, DS; ZILIO, SC. Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. *Journal of Brazilian Chemical Society*; 16: 1113-1117, 2005.

AMBRÓSIO, CLB; CAMPOS, FACS; FARO, ZP. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminosa A. *Revista Nutrição*, 19(2): 233-243, 2006.

ANGELO, PM; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1): 1-9, 2007.

AQUINO, JS; OLIVEIRA, CEV; CAVALHEIRO, JMO; STAMFORD, TLM. Making cookies with Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) an alternative source of dietary vitamin A in school meals. *Revista de Nutrição*, 25 (6): 765-774, 2012a.

AQUINO, JS; PASSOS, DCNP; ARAÚJO, KLG; EPAMINONDAS, OS; SCHULER, ARP; SOUZA, AG; STAMFORD, TLM. Retining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the brasilian cerrado; physicochemical, termal-oxidative and nutritional implications. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23 (2): 212-219, 2012b.

BAI, J; RODRIGUEZ, AM; MELENDEZ, JA; CEDERBAUN, AI. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects hepG2 cells against oxidative injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (87): 26217-26224, 1999.

BALASUNDRAM N; SUNDRAM K; SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99:191-203, 2006.

BALLIC, MJ. Amazonian oil palms of promise: a survey. *Economy Botany*, 33 (1): 11-28, 1979.

BALLIC, MJ; GERSHOFF, SN. Nutritional evaluation of the *Jessenia batauá* Palm: Source of high quality protein and oil from tropical America. *Economic Botany*, 35 (3): 261-271, 1981.

BARBIOR, BM. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 30: 141-155, 1997.

BARREIROS, ALBS; DAVID, JM; DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29 (1): 113-123, 2006.

BATAGLION, GA; SILVA, FMA; SANTOS, JM; SANTOS, FN; BARCIA, MT; LOURENÇO, CC; SALVADOR, MJ; EBERLIN, MN; KOOLEN, HHF. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. *Food Research International*, 64: 472-481, 2014.

BATISTA, JS; OLINDA, RG; MEDEIROS, VB; RODRIGUES, CMF; OLIVEIRA, AF; PAIVA, ES; FREITAS, CIA; MEDEIROS, AC. Atividade antibacteriana e cicatrizantes de óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*, 42 (1): 136-141, 2012.

BAYALA, B; BASSOLE, IHN; GNOULA, C; NEBIE, R; YONLI, A; MOREL, L; FIGUEREDO, G; NIKIEMA, JB; LOBACCARO, JMA; SIMPORE, J. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *Plos One*, 9 (3): 1-11, 2014.

BEZERRA, VS. Considerações sobre a palmeira murumuruzeiro (*Astrocarium murumuru* Mart.) In: Comunicado técnico Embrapa. Amapá, 2012.

BIANCHI, MLP; ANTUNES, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*, 12 (2): 123-130, 1999.

BIRBEN, E; SAHINER, UM; SACKESEN, C; ERZURUM, S; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5: 9–19, 2012.

BORHAN, RH; SAID, M; SAHRI, MM. Enzymatic interesterification of palm products for producing low calories cocoa butter substitutes. *Journal of Applied Sciences*, 11: 3750-3754, 2011.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

BURNS, J; GARDNER, PT; MATTHEWS, D; DUTHIE, GG; LEAN, MEJ; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49: 5797-5808, 2001.

CAMPOS, FM; ROSADO, GP. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(3): 571-578, 2005.

CARVALHO, PO; CAMPOS, PRB; NOFFS, MD; OLIVEIRA, JG; SHIMIZU, MT; SILVA DM. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, 26 (1): 75-80, 2003.

CASTELO-BRANCO, VN; TORRES, AG. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista Nutrição*, 24 (1): 173-187, 2011.

CASTRO, HF; MENDES, AA; SANTOS, JC. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27(1): 146-156, 2004.

CHANG, JC; LIN, CC; WU, SJ; LIN, DL; WANG, SS; MIAW, CL; NG, LT. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Physalis peruviana* extract against

acetaminophen-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical Biology*, 46 (10-11): 724-731, 2008.

CLAUSS, J. Interesterificação de óleo de palma. *Óleos e Grãos*, 5(28): 31-37, 1996.

COHEN, G; KIM, M; OGWU, V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 67: 53-56, 1996.

CORREIA, AMP. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 339p, 1926.

COSTA, PA; BALLUS, CA; TEIXEIRA-FILHO, J; GODOY, HT. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of brazilian fruits. *Food Research International*, 43: 1603-1606, 2010.

COURSIN, DB; CIHLA, HP; WILL, JA; McCREARY, JL. Adaptation to chronic hyperoxia. Biochemical effects and the response to subsequent lethal hyperoxia. *American review of respiratory disease*, 135: 1002-1006, 1985.

CRIADO, M; HERNÁNDEZ-MARTÍN, E; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, A; OTERO, C. Enzymatic interesterification of olive oil with fully hydrogenated palm oil: Characterization of fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 110: 714-724, 2008.

D'AGOSTINI, D; GIOIELLI, LA. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 38(3): 345-354, 2002.

DAMODARAN, S., KIRK L. P., FENNEMA, O. R.: Tradução Adriano Brandelli et al. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 900p, 2010.

DARNET, SH; SILVA, LHM; RODRIGUES, AMC; LINS, RT. Nutritional composition, fatty acid and tocoferol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa

(*Oenocarpus batawa*) fruit pulp from the amazon region. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2): 488-491, 2011.

DAVIES, BH. Carotenoids: In: *Chemistry and biochemistry of plants pigments*. Academic press, London, p.38-75. 1985.

DEBNATH, S; PRAKASH, M; LOKESH, BR; Lipase mediated interesterification of oils for improving rheological, heat transfer properties and stability during deep-fat frying. *Food Bioprocess Technology*, 5: 1630-1641, 2012.

DEL CARLO, M; SACCHETTI, G; DI MATTIA, C; COMPAGNONE, D; MASTROCOLA, D; LIBERATORE, L. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4072-79. 2004.

DREOSTI, IE. Antioxidant, polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition*, 16(7-8): 692-694, 2000.

ESPÍN, JC; SOLER-RIVAS, C; WICHERS, HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fraction using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3): 648-656, 2000.

FANG, YZ; YANG, S; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879, 2002.

FASCIOLI, NL; GONÇALVES, LAG. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). *Química Nova*, 21(1): 16-19, 1998.

FERREIRA, BS; ALMEIDA, CG; FAZA, LP; ALMEIDA, A; DINIZ, CG; SILVA, VL; GRAZUL, RM; HYARIC, M. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, 16: 5875-5885, 2011.

FINKEL, T; HOLBROOK NJ. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. *Nature*, 408: 239-247, 2000.

FRANKEL, EN. Antioxidants in lipid foods and their impacts on food quality. *Food Chemistry*, 57(1): 51-55, 1996.

FRESHNEY, RI. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Second Edition, Oxford University Press, New York, 1994.

FU, J; CHE, H; TAN, DM; TENG, K. Bioavailability of tocotrienols: evidence in human studies. *Nutrition and Metabolism*, 11 (5): 1-10, 2014.

GOLFAKHRABADI, F; KHANAVI, M; OSTAD, SN; SAEIDNIA, S; VATANDOOST, H; ABAI, MR; HAFIZI, M; YOUSEFBEYK, F; RAD, YR; BAGHENEGADIAN, A; ARDEKANI, MRS. Biological Activities and Composition of *Ferulago carduchorum* Essential Oil. *Journal of Arthropode-Borne Disease*, 9(1): 104-115, 2015.

GRILO, EC; COSTA, PN; GURGEL, CSS; BESERRA, AFL; ALMEIDA, FNS; DIMENSTEIN, R. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology*, 34 (2): 379-385, 2014.

GUILLOUZO, A. *In Vitro Toxicity Testing: Applications to Safety Evaluation*. Marcel Dekker Inc, New York, 1992.

GUINAZI, M; MILAGRES, RCRM; PINHEIRO-SANT'ANA, HM; CHAVES, JBP. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, 32 (8): 2098-2103, 2009.

HALLIWEEL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52 (8): 253-265, 1994.

HALLIWEEL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, 355(9210): 1179-1180, 2000.

HALLIWEEL, B; GUTTERIDGE, JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 4^a edição. Cleredon Press, Oxford, 2007. In HALLIWEEL B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35 (5): 1147-1150, 2007.

HALLIWEEL, B; GUTTERIDGE, JMC. *Free radicals in biology and medicine*, Claredon Press, Oxford, 1991, p543.

HAN, JH; LEE, HJ; CHO, MR; CHANG, N; KIM, Y; OH, SY; KANG, MH. Total antioxidant capacity of the Korean diet. *Nutrition Research and Practice*, 8 (2): 183-191, 2014.

HASHIM, SA; BABAYAN, VK. Studies in man of partially absorbed dietary fats. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 31: 273-276, 1978.

HAY, KX; WAISUNDARA, VY; TIMMINS, M; OU, B; PAPPALARDO, K; MCHALE, N; HUANG, D. High-throughput quantitation of peroxy radical scavenging capacity in bulk oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5299-5305, 2006.

HERNÁNDEZ, PBN; FREGANAPE, G; MOYA, MDS. Bioactive compounds, volatiles and antioxidant activity of virgin oils (*Jessenia bataua*) from the Amazonas. *Journal of Food Lipids*, 16: 629-644, 2009.

HRNCIRIK, K.; FRITSCHÉ, S. Comparability and reability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 540-549, 2004.

HUANG, D; OU, B; HAMPSCH-WOODIL, M; FLANAGAM, JA; DEEMER, EK. Development an validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using ramdonly methylated β -ciclodextrin as the solubility enhancer. *Journal or agricultural and food chemistry*, 50: 1815-1821, 2002.

IWASAKI, Y; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 129-140, 2000.

JOHNSON, F; GIULIVI, C. Superoxide dismutase and their impact upon human helth. *Molecular aspects of medicine*, 26, 346-352, 2005.

JU, J; PICINICH, SC; YANG, Z; ZHAO, Y., SUH, N; KONG, AN; YANG, CS. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*, 31 (4): 533-542, 2010.

KANJILAL, S; KAKI, SS; RAO, BVSK; SUGASINI, D; RAO, YP; PRASAD, RBN; LOKESH, BR. Hypocholesterolemic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. *Food Chemistry*, 136:259-265, 2013.

KHATOON, S; KHAN, MI; JEYARANI, T. Enzymatic interesterification of palm and coconut stearin blends. *International Journal of Food Science & Technology*, 47: 2259-2265, 2012.

KNASMULLER, S; PARZEFALL, W; SANYAL, R; ECKER, S; SCHWAB, C; UHL, M; MERSH-SUNDERMANN, V; WILLIAMSON, G; HIETSCH, G; LANGER, L; DARROUDI, F; NATARAJAN, AT. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, 402: 185-202, 1998.

KOOLEN, HHF; SILVA, FMA; GOZZO, FC; SOUZA, AQL; SOUZA, ADL. Antioxidant, antimicrobial and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) by uplc-esi-ms/ms. *Food Research International*, 51: 467-473, 2013.

LAN, Y; WU, Q; MAO, Y; WANG, Q; AN, J; CHEN, Y; WANG, W; ZHAO, B; LIU, N; ZHANG, Y. Cytotoxicity and enhancement activity of essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. As a natural transdermal penetration enhancer. *Journal of Zhejiang University*, 15(2): 153-164, 2014.

LIMA, MCC. *Atividade de Vitamina A do Doce de Buriti e Seu Efeito no Tratamento e Prevenção da Hipovitaminose em crianças*. 125f. Dissertação (mestrado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1987.

LOPES, JPN; CORRÊA, NCF; FRANÇA, LF. Transesterificação do óleo de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para a produção de biodiesel. *In: Congresso da rede brasileira de biodiesel*. Brasília, DF. 2, 2007.

MACEDO GA, PASTORE GM, RODRIGUES MI. Optimizing the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*, 39(6), 687-692, 2004.

MACEDO, JA; BATTESTIN, V; RIBEIRO, ML; MACEDO, GA. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126: 491-497, 2011.

MALHÃES, LRT; SABAA-SRUR, AUO. Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Pará. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 31 (4): 856-863, 2011

MAMBRIM, MCT; BARRERA-ARELLANO, D. Caracterización de aceites de frutos de palmeiras de la región amazónica del Brasil. *Grasas y aceites*, 48 (3): 154-158, 1997.

MANOSROI, J; DHUMTANOM, P; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer letters*, 235: 114-120, 2006.

MARIATH JGR, LIMA MCC, SANTOS LMP. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49: 894-853, 1989.

MASUCHI, M. H., CELEGHINI, R. M. S., GONÇALVES, L. A. G., e. GRIMALDI, R., Quantification of TBHQ (tert butyl hydroquinone) and oxidative stability evaluation of commercial sunflower oils. *Química Nova*, 31, (5), 1053-1057, 2008.

MELO, EA; GUERRA, NB. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim SBCTA*, 36(1): 1-11, 2002.

MELO-SILVEIRA, RF; FIDELIS, GP; VIANA, RLS; SOEIRO, VC; SILVA, RA; MACHADO, D; COSTA, LS; FERREIRA, CV; ROCHA, HAO. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural: corn cobs. *Molecules*, 19: 5360-5378, 2014.

MENEZES, BP. *Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e composição bromatológica da torra de murumuru (Astrocaryum murumuru var. murumuru Mart.), na alimentação de ruminantes*. 63p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento, 2012.

METUGE, JA; NYONGBELA, KD; MBAH, JA; SAMJE, M; FOTSO, G; BABIAKA, SB; CHO-NGWA, F. Anti-Onchocerca activity and phytochemical analysis of an essential oil from *Cyperus articulatus* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(223): 1-10, 2014.

MIRALIAKBARI, H; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111: 421-427, 2008.

MOMENY, E; VAFAEI, N; RAMLI, N. Physicochemical properties and antioxidant activity of a synthetic cocoa butter equivalent obtained through modification of mango seed oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 48: 1549-1555, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.

MOURE, A; CRUZ, JM, FRANCO, D; DOMINGUEZ, JM, SINEIRO, J; DOMINGUEZ, H; NUNEZ, MJ; PARAJÓ, JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2): 145-171, 2001.

NAGARAJU, A; BELUR, LR. Rats fed blended oils containing coconut oil with groundnut oil or olive oil showed an enhanced activity of hepatic antioxidant enzymes and a reduction in LDL oxidation. *Food Chemistry*, 108: 950-957, 2008.

NINFALI, P; BACCHIOCCA, M; BIAGIOTTI, E; SERVILI, M; MONTEDORO, G. Validation of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Parameter as a New Index of Quality and Stability of Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil and Chemists Society*, 79(10): 997-982, 2002.

NUNES, GFM; PAULA, AV; CASTRO, HF; SANTOS, JC. Compositional and textural properties of milk-soybean oil blends following enzymatic interesterification. *Food Chemistry*; 125: 133-138, 2011.

O'BRIEN, RD. *Fats and Oils: Formulating and Process for Applications*. 3^a ed. Nova York: CRC Press, 2009.

OLIVEIRA, AC; VALENTIM, IB; GOULART, MOF; SILVA, CA; BECHARA, EJH; TREVISAM, MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32 (3): 689-702, 2009.

OLIVEIRA, MSP; RIOS, SA. Potencial econômico de algumas palmeiras nativas da Amazônia. In *VI Encontro amazônico de agrárias*. Amazônia: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2014.

OLIVERAS-LÓPEZ, M-J; BERNÁ, G; JURADO-RUIZ, E; SERRANA, HL-G; MARTÍN, F. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, 10: 475-484, 2014.

OU, B; HUANG, D; HAMPSCH-WOODILL, M; FLANAGAN, JA; DEEMER, EK. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 3122-3128, 2002.

PANDE, G; SABIR, JSM; BAESHEN, NA; AKOH CC. Enzymatic synthesis of extra virgin olive based infant formula fat analogues containing ARA and DHA: one-stage

and two-stage syntheses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10590-10598, 2013.

PARDAUIL JJR; SOUZA LKC; MOLFETTA FA; ZAMIAN JR; ROCHA FILHO GN; COSTA CEF. Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. *BioresourceTechnology*, 102: 5873–5877, 2011.

PAROLIN, MB; ZAINA, FE; LOPES, RW. Terapia nutricional no transplante hepático. *Arquivo de gastroenterologia*, 39 (2): 114-122, 2002.

PEREIRA GG, MARMESAT S, BARRERA-ARELLANO D, DOBARGANES MC. Evolution of oxidation in soybean oil and its biodiesel under the conditions of the oxidation stability test. *Grasas y Aceites*, 64 (5), 482-488, 2013.

PESCE, C; *Oleaginosas da Amazônia*. Pará: Oficina Gráfica da Revista Veterinária, 128p; 1941.

PRIOR, RL; WU, X; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302, 2005.

QUIRÓS, AR; COSTA HC. Analysis of carotenoids in vegetables and plasma samples: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 97:111, 2006.

RAMALHO, VC; JORGE. N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quimica Nova*, 29 (4), 755-760, 2006.

REENA, MB; LOKESH, BR. Effect of blending and lipase catalyzed interesterification reaction on the cholesterol lowering properties of palm oil with rice bran oil in rats. *International Journal of Food Science and Technology*; 47: 203-209, 2012.

REENA, MB; LOKESH, BR. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55:10461–10469, 2007.

RESHMA, MV; SARITHA, SS; BALACHANDRAN, C; ARUMUGHAN. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. *Bioresource Technology*; 99: 5011-5019, 2008.

RIBEIRO, BD; NASCIMENTO, RF; BARRETO, DW; COELHO, MAS, FREITAS, SP. An ethanol-based process to simultaneously extract and fractionate carotenoids from *Mauritia flexuosa* l. pulp. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3): 657-663, 2010.

RODRIGUES, AMC; DARNET, S; SILVA, LHM. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenacarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximilian maripa*) fruits. *Journal of Brazilian Chemical Society*; 21, 2000-2004, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, DB. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI (International Life Sciences Institute), 1999.

ROVER JUNIOR, L; HOEHR, NF; VELLASCO, AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química nova*, 24 (1): 112-119, 2001.

RUAN, X; ZHU, X-M; XIONG, H; WANG, S-Q, BAI, C-Q; ZHAO, Q. Characterization of zero-trans margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. *International Journal of Food Science & Technology*, 49: 91-97, 2014.

SALEH, A; ALJADA, A; RIZVI, SAA; NASR, A; ALASKAR, AS; WILLIAMS JD. In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(226): 1-15, 2014.

SAMPAIO, MB; CARRAZA, LR. *Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto e da folha de Buriti (Mauritia flexuosa)*. 1ª edição, Brasília, ISPN, 76p. 2012.

SÁNCHEZ, CS; GONZÁLEZ, AMT; GARCÍA-PARRILLA, MC; GRANADOS, JJQ; SERRANA, HLG; MARTÍNEZ, MCL. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593: 103-107, 2007.

SANTOS, MFG; ALVES, RE; RUÍZ-MÉNDEZ, MV. Minor components in oils obtained from Amazonian palm fruits. *Grasas y Aceites*, 64(5): 531-536, 2013.

SANTOS, MFG; MARMESAT, S; BRITO, ES; ALVES, RE; DOBARGANES, MC. Major components in oils obtained from amazonian palm fruits. *Grasas y Aceites*, 64 (3): 328-334, 2013.

SANTOS, RR; RODRIGUES, SHF; COSTA, MHT; SILVA, JRV; CELESTINO, JJH; MARTINS, FS; SARAIVA, MVA; MELO, MAP FIGUEIREDO, JR. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. *Brazilian Journal of veterinary Research and Animal Science*, 43(2), 250-255, 2006.

SHIN, JA; AKOH, CC; LEE, KT. Physicochemical properties of lipase-catalyzed interesterification fat containing α -linolenic acid. *Journal of American Oil Chemistry Society*; 87: 647-657, 2010.

SIES, H. Strategies of antioxidants defenses. *European Journal of Biochemistry*, 215 (2): 213-219, 1993.

SILVA, SM; ROCCO, SA; SAMPAIO, KA; TAHAM, T; SILVA, LHM; CERIANI, R; MEIRELLES, AJA. Validation of a method for simultaneous quantification of total carotenes and tocopherols in vegetable oils by HPLC. *Food Chemistry*; 129: 1874-1881, 2011.

SILVA, SM; SAMPAIO, KA; TAHAM, T; ROCCO, SA; CERIANI, R; MEIRELLES, AJA. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian amazon region. *Journal of American Oil Chemist Society*; 86:611–616, 2009.

- SILVA, SP. *Frutas no Brasil*. São Paulo: Empresa das Artes, 233p. 1996.
- SOUZA, JA; RAPOSO, A; SOUZA MMM; MIRANDA EM; SILVA JMM; MAGALHÃES VB. Manejo de murumuru (*Astrocaryum* spp.) para a produção de frutos. Rio Branco, AC: Secretaria de extrativismo e produção familiar, 30p. 2004.
- SPERANZA, P. *Produção de lipídios especiais por interesterificação enzimática de óleos da Amazônia e influência na atividade biológica*. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, 2014.
- SPERANZA, P; MACEDO, GA. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 47: 1699-1706, 2012.
- SPERANZA, P; RIBEIRO, APB; CUNHA, RL; MACEDO, JA; MACEDO, GA. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial activity of interesterified Amazon Oils. *LWT – Food Science and Technology*, 60: 207-212, 2015.
- SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A; KARLOVITS, G; DIANOCZKI, C; RECSEG, K; SZLYK, E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 85: 141-149, 2008.
- TANG, L; HU, JN; ZHU, XM; LUO, LP; LEI, L; DENG, ZY; LEE, KT. Enzymatic interesterification of palm stearin with *Cinnamomum camphora* seed oil to produce zero-trans medium-chain triacylglycerols-enriched plastic fat. *Journal of Food Science*; 77: 454-460, 2012.
- TEICHERT, SA; AKOH, CC. Modifications of stearidonic acid soybean oil by enzymatic acidolysis for the production of human milk fat analogues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (24): 13300-13310, 2011.
- UHL, M; HELMA, C; KNASMULLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research*, 441: 215- 224, 1999.

VALAVANIDIS, A; NISIOTOU, C; PAPAGEORGIOU, Y; KREMLI, I; SATRAVELAS, N; ZINIERIS, N; ZYGALAKI, H. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2358-2365, 2004.

VALKO, M; RHODES. CJ; MONCOL, J; IZACOVIK, M; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40, 2006.

VASCONCELOS, SML; GOULART, MOF; MOURA, JBF; MANFREDINI, V; BENFATO, MS; KUBOTA, LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova*, 30 (5): 1323-1338, 2007.

VÁZQUEZ, MR; EL-BACHÁ, RS; SOUZA, CO; MACHADO, TLB; SILVA, RS; VICENTE, JGV; RODRIGUES, LEA. Relações da dieta ovo-lácteo-vegetariana com o exercício físico e as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. *Revista Nutrição*, 24 (3): 439-448, 2011.

WALLERT, M; SCHMOLZ, L; GALLI, F; BIRRRINGER, M; LORKOWSKI, S. Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. *Redox Biology*, 2: 495-503, 2014.

WILLS, W; MARANGONI, AG. *Enzymatic interesterification In Food Lipids 2^a ed*: Ed. Akoh CC and Min DB, 2002.

YAN, R; YANG, Y; ZENG, Y; ZOU, G. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 451-455, 2009.

YANG, LY; LIN, JW; LEE, SF; LEE, CC; HUNG, TI; WEI, YH; SHIH, CM. Differential expression of antioxidant enzymes in various hepatocellular carcinoma cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96: 622-631, 2005.

ZANATTA, CF; MITJANS, M; URGATONDO, V; ROCHA-FILHO, PA; VINARDELL, MP. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 70-75, 2010.

ZANATTA, CF; UGARTONDO, V; MITJANS, M; ROCHA-FILHO, PA; VINARDELL, MP. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2776–2781, 2008.

ZELCO, IN; MARIANI, TJ; FOLZ, RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3): 337-349, 2002.

ZHAO, ML; TANG, L; ZHU, XM; HU, JN; LI, HY; LUO, LP; LEI, L; DENG, ZY. Enzymatic production of zero-trans plastic fat rich in ω -linolenic acid and médium-chain fatty acids from highly hydrogenated soybean oil, *cinnamomum camphora* seed oil and perilla oil by lipozyme tl im. *Journal of Agricultural and Food Cheminstry*, 61: 1189-1195, 2013.

ZHAO, X; WANG, J; YANG, Y; BU, D; CUI, H; SUN, Y; XU, X; ZHOU, L. Effects of different fat mixtures on milk fatty acid composition and oxidative stability of milk fat. *Animal Feed Science and Technology*, 185: 35-42, 2013.

ANEXO I

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS POR INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS DA AMAZÔNIA

Em trabalho anterior, nosso grupo de pesquisa caracterizou as amostras de óleo de buriti e gordura de murumuru, antes e após a reação de interesterificação enzimática, utilizando as mesmas lipases comerciais e não comerciais utilizada neste trabalho. Os resultados obtidos por SPERANZA et al., (2015) estão resumidamente apresentados nesta seção.

1. Reação de interesterificação enzimática

As reações de interesterificação foram catalisadas por duas lipases em três sistemas enzimáticos diferentes: lipase comercial Lipozyme TL-IM® (Novozymes), lipase semi-purificada do microrganismo *Rhizopus* sp. e a mistura de ambas as enzimas (comercial + *Rhizopus* sp.). A reação ocorreu durante 24 horas em banho termostatizado à 40°C e 150 rpm.

2. Caracterização das lipases utilizadas

A lipases utilizadas foram caracterizadas quanto a sua atividade lipolítica e sua especificidade para com o substrato. A lipase comercial, purificada e imobilizada em sílica mostrou atividade lipolítica específica de 12,7 U/g, enquanto a lipase bruta, obtida do fungo de *Rhizopus* sp. apresentou atividade lipolítica específica menor de 8,0 U/g. A mistura das duas enzimas exibiu atividade lipolítica intermediária, de 10,3 U/g. Quanto à especificidade, através da análise de distribuição regioespecífica, a lipase de *Rhizopus* sp. mostrou especificidade pelas posições sn-1,3 do triacilglicerol e foi específica também para o tipo de ácido graxo (insaturado). A lipase comercial foi específica apenas para o tipo de ácido graxo (insaturado), enquanto que a utilização de ambas as enzimas não apresentou efeito sinérgico

(SPERANZA, 2014). Estas enzimas que apresentam diferentes atividades e especificidade, produziram lipídios reestruturados com diferentes características físico químicas, como pode ser observado abaixo.

3. Composição em ácidos graxos dos óleos

A composição de ácidos graxos do óleo de buriti, gordura de murumuru e mistura estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Composição em ácidos graxos (%) do óleo de buriti, da gordura de murumuru e da mistura.

Ácidos graxos	Óleo de buriti	Gordura de murumuru	Mistura*
Ácido caprílico (C8:0)	-	2.2 ± 0.00	0.7
Ácido capríco (C10:0)	-	1.7 ± 0.00	0.5
Ácido laurico (C12:0)	-	49.6 ± 0.00	14.9
Ácido mirístico(C14:0)	0.5 ± 0.00	26.7 ± 0.00	8.4
Ácido palmítico (C16:0)	19.2 ± 0.03	6.3 ± 0.01	15.3
Ácido esteárico (C18:0)	1.3 ± 0.00	2.4 ± 0.00	1.6
Ácido oleico (C18:1)	65.6 ± 0.0	7.5 ± 0.00	48.2
Ácido linoleico (C18:2)	4.9 ± 0.05	3.7 ± 0.00	4.5
Ácido linolenico (C18:3)	8.2 ± 0.01	-	5.7
Σ Saturado	21.0	88.8	41.3
Σ Monoinsaturado	65.6	7.5	48.2
Σ Poliinsaturado	13.2	3.7	10.3

*Composição: 70% de óleo de buriti e 30% de gordura de murumuru.

O óleo de buriti continha 78,8% de ácidos graxos insaturados totais, enquanto a gordura de murumuru continha 88,8% de ácidos graxos saturados. No óleo de buriti, a maior contribuição de ácidos graxos foi de ácido oleico (65,6%), enquanto na gordura de murumuru foram o ácido láurico com 49,6% e ácido mirístico com 26,7%, respectivamente. A mistura de óleo de buriti com gordura de murumuru apresenta concentrações de ácidos graxos saturadas de 41,3% e de monoinsaturados de 48,2%, indicando que a mistura não-interesterificada é composta principalmente por ácido oleico e os ácidos graxos de cadeia média láurico e mirístico.

Os poucos estudos anteriores que abordam a composição de ácidos graxos do óleo de buriti e da gordura de murumuru apresentam dados consistentes ao encontrado neste estudo. O ácido oleico monoinsaturado é o principal ácido graxo no óleo buriti (61 a 74%) (PARDAUIL et al., 2011; SPERANZA e MACEDO, 2012). Na gordura de murumuru os principais ácidos graxos são o ácido láurico (52%), seguido pelo ácido mirístico (26%) (MAMBRIM e BARRERA-ARELLANO, 1997).

4. Composição em triacilgliceróis do óleo de buriti, da gordura de murumuru e dos lipídios estruturados formados

A composição em TAG do óleo de buriti, da gordura de murumuru, da mistura e dos lipídios estruturados (lipase de *Rhizopus* sp., lipase comercial + lipase de *Rhizopus* sp. e lipase comercial) estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Classe de triacilgliceróis no óleo de buriti, gordura de murumuru, mistura e lipídios estruturados catalisados por diferentes sistemas enzimáticos.

Amostras	Classe de TAG (%)			
	SSS	S ₂ U	SU ₂	UUU
Óleo de buriti	0,9	9,8	39,3	50,0
Gordura de murumuru	69,7	25,6	4,3	0,5
Mistura*	21,5	14,4	28,5	35,3
Lipídio estruturado* interesterificado com 2,5% <i>Rhizopus</i> sp.	6,0	28,6	43,7	21,7
Lipídio estruturado* interesterificado com 2,5% TL-IM®	2,0	23,5	47,7	26,7
Lipídio estruturado* interesterificado com 1,4% TL-IM® e 1,5% <i>Rhizopus</i> sp.	4,7	25,6	44,6	25,1

*Composição: 70% de óleo de buriti e 30% de gordura de murumuru.

Os resultados mostram mudanças substanciais na classe de TAG ocorrida após a reação de interesterificação enzimática. No óleo de buriti, as principais classes de TAG eram 50,0% tri-insaturados (UUU) seguido por 39,3% de di-insaturado-monoin saturado (SUU). Na gordura de murumuru 69,7% era tri-saturados (SSS) e 25,6% monoin saturados-di-saturados (SSU). Na mistura todas as classes de TAG estavam presentes em concentração elevada, predominantemente UUU (35,3%) e SUU (28,8%). Após a interesterificação, em comparação com a mistura, todos os lipídios estruturados produzidos com os três sistemas enzimáticos indicam reduções nas classes SSS e UUU de TAG e aumentos de SSU e classe SUU de TAG. Estes lipídeos estruturados têm um perfil bastante semelhante de TAG, com predomínio de TAG SUU e uma quantidade muito baixa de TAG SSS. Esta mudança na classe TAG está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas desses lipídios, podendo, assim, influenciar as suas propriedades biológicas.