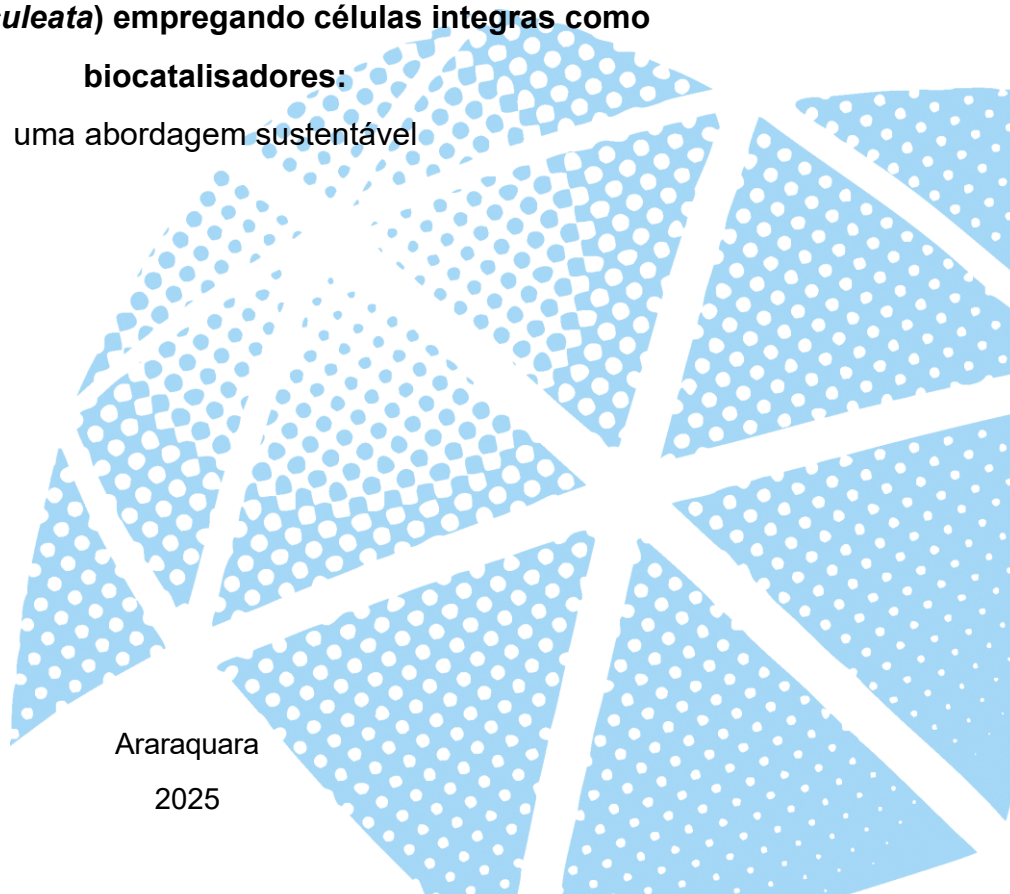
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

LUCAS BUTRICO BARBOSA

Síntese de lipídeos estruturados a partir do óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata*) empregando células integras como biocatalisadores:

uma abordagem sustentável



Araraquara

2025

LUCAS BUTRICO BARBOSA

Síntese de lipídeos estruturados a partir do óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata*) empregando células integras como biocatalisadores:

uma abordagem sustentável

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Coorientador: Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento

Araraquara

2025

Barbosa, Lucas Butrico.
B238s Síntese de lipídeos estruturados a partir do óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata*) empregando células integras como biocatalisadores : uma abordagem sustentável / Lucas Butrico Barbosa. – Araraquara, 2025.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Ariela Veloso de Paula.
Coorientador: Heitor Buzetti Simões Bento.

1. Triacilcliceróis dietéticos. 2. Células integras. 3. Lipases. 4. Óleo de macaúba. I. Paula, Ariela Veloso de, orient. II. Bento, Heitor Buzetti Simões, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese de lipídeos estruturados a partir do óleo da polpa de macaúba (Acrocomia aculeata) empregando células integras como biocatalisadores: uma abordagem sustentável.

AUTOR: LUCAS BUTRICO BARBOSA

ORIENTADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

COORIENTADOR: HEITOR BUZETTI SIMÕES BENTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE (Participaçao Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Prof. Dr. LINDOMAR ALBERTO LERIN (Participaçao Virtual)
Dipartimento di Scienze Chimiche, Farmaceutiche ed Agrarie / Università degli Studi di Ferrara (Itália)

Araraquara, 24 de junho de 2025

Dedico esta dissertação, e todo o trabalho a ela vinculado, à toda minha família, àquela que recebi de Deus e à que escolhi ter ao meu lado ao longo desta trajetória. Sem vocês, essa conquista não teria sido possível.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, por todo o apoio incondicional, incentivo e força nos momentos difíceis. Sem vocês, eu não teria almejado e muito menos conquistado essas realizações.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, por me acolher em seu laboratório e grupo de pesquisa, por toda a orientação profissional e pessoal que me proporcionou, e por sempre acreditar no meu potencial em cada etapa desta jornada acadêmica, desde a graduação até esta etapa da pós-graduação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento, que me acompanha desde antes mesmo do início do mestrado.

Aos meus amigos de infância, Juninho, Secco, Yuri, Everton, Canato, Gabi, Juan e todos os outros, que compartilharam comigo não só os desafios da vida adulta e profissional, mas também os aprendizados e o crescimento que vêm com ela. Muitas vezes, vocês foram meu porto seguro junto à minha família. Obrigado por me apoiarem em todas as minhas decisões, por não abandonarem o meu barco, por me lembrarem quem eu sou e por me fazerem rir quando eu mais precisava. Ter vocês ao meu lado me mantiveram em pé.

Aos amigos da vida acadêmica e do laboratório, Enzo (meu irmão de graduação), Luíza, Lelis, Marianne, Danielle Gonçalves, Daniela Remonatto, João Francisco (meu irmão de laboratório e mestrado), Heloísa Sato, Amanda Noli, Amanda Pichutte, Bianca, Giovana, Gabi e Anna Júlia que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada, me incentivando a continuar e cuidando de mim quando eu não conseguia sozinho. Em especial, à Maria Eduarda Morganti, minha companhia de projeto: espero ter retribuído pelo menos um terço de todo o apoio e ensinamentos que você me deu. Vocês foram apoio, alívio e inspiração. Obrigado por tornar minha vida mais leve nesse período, ao compartilharmos dificuldades, conquistas e aprendizados. A amizade e o companheirismo de vocês tornaram essa experiência ainda mais significativa.

Aos técnicos Ivan, Dri, Ana e Flavio, pelos ensinamentos que não estão nos livros nem nos artigos, pelas pausas para o café e por todo o apoio e suporte que tantas vezes fizeram a diferença.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A conquista deste título não foi fácil, e, por isso, tenho imensa gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos vocês, meu mais profundo agradecimento, respeito e eterno carinho.

Resumo

A busca por uma alimentação mais saudável tem impulsionado o desenvolvimento de processos que resultam em alimentos mais benéficos à saúde, como os lipídeos estruturados, especialmente os triacilgliceróis dietéticos. Esses compostos, como os do tipo MLM, apresentam ácidos graxos de cadeia longa (L) na posição interna e de cadeia média (M) nas posições externas, oferecendo uma fonte rápida de energia e com baixo valor calórico, auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares. Sua síntese enzimática é catalisada por lipases. Uma alternativa para sua produção é o uso de células íntegras de microrganismos contendo essas lipases, o que elimina a necessidade de purificação, reduzindo custos. Além disso, óleos vegetais como o da macaúba, rico em ácidos graxos de cadeia longa, têm se destacado como matéria-prima promissora para essa síntese. Assim, o objetivo do trabalho foi a síntese de triacilgliceróis dietéticos por acidólise enzimática, utilizando o óleo da polpa da macaúba como substrato principal e ácido cáprico como ácido graxo substituinte. Dessa forma, o perfil de ácidos graxos de óleos provenientes da macaúba foi avaliado, além da especificidade de lipases associadas ao micélio de quatro fungos filamentosos. Também realizou-se a otimização das condições das reações de acidólise para a sintese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, empregando células integras como biocatalisadores. Assim, os resultados mostraram que o óleo da polpa de macaúba, rico em ácido oleico, é um substrato ideal para a modificação enzimática. Além disso, três fungos avaliados apresentaram a especificidade adequada para atuar nas reações de acidólise, mas apenas uma das cepas avaliadas (*Aspergillus oryzae*) para a obtenção das células integras biocataliticas foi capaz de catalisar as reações de acidólise. Nesse caso, as células integras desse fungo filamentoso demonstraram um potencial para a sintese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM alcançando 50% de rendimento, reduzindo custos e oferecendo uma alternativa viável para a produção de lipídeos estruturados. Por fim, além do desempenho biocatalítico promissor, os triacilgliceróis modificados apresentaram baixa toxicidade e indícios de atividade antiangiogênica, o que sugere potencial aplicação não apenas na formulação de alimentos funcionais, mas também em abordagens terapêuticas. Esses resultados comprovam a viabilidade do uso de células integrais de *A. oryzae* na produção de lipídeos estruturados, contribuindo para o desenvolvimento de processos sustentáveis e economicamente viáveis na indústria alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Triacilgliceróis Dietéticos; Células Integras; Lipases; Óleo De Macaúba.

Abstract

The pursuit of healthier eating habits has driven the development of processes aimed at producing foods with improved health benefits, such as structured lipids, particularly dietary triacylglycerols. These compounds, such as those of the MLM type, contain long-chain fatty acids (L) in the internal position and medium-chain fatty acids (M) in the external positions, offering a rapid energy source with reduced caloric value and contributing to the prevention of cardiovascular diseases. Their enzymatic synthesis is catalyzed by lipases. An alternative for their production is the use of whole microbial cells containing these lipases, eliminating the need for purification and thereby reducing production costs. Additionally, vegetable oils such as macaúba pulp oil, which is rich in long-chain fatty acids, have emerged as promising raw materials for such synthesis. Thus, the objective of this work was the synthesis of dietary triacylglycerols via enzymatic acidolysis, using macaúba pulp oil as the main substrate and capric acid as the acyl donor. The fatty acid profiles of macaúba-derived oils were evaluated, along with the specificity of lipases associated with the mycelium of four filamentous fungi. Optimization of the acidolysis reaction conditions was also carried out for the synthesis of MLM-type dietary triacylglycerols, employing whole cells as biocatalysts. The results demonstrated that macaúba pulp oil, rich in oleic acid, is an ideal substrate for enzymatic modification. Moreover, three of the evaluated fungi exhibited adequate specificity for acidolysis reactions; however, only one strain (Aspergillus oryzae), when used as a source of whole-cell biocatalysts, was capable of effectively catalyzing the acidolysis reactions. In this case, the whole cells of this filamentous fungus showed potential for the synthesis of MLM-type dietary triacylglycerols, reaching yields of up to 50%, reducing costs, and offering a viable alternative for the production of structured lipids. Finally, in addition to the promising biocatalytic performance, the modified triacylglycerols exhibited low toxicity and signs of antiangiogenic activity, suggesting potential applications not only in the formulation of functional foods but also in therapeutic approaches. These results confirm the feasibility of using whole cells of A. oryzae in the production of structured lipids, contributing to the development of sustainable and economically viable processes in both the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Dietary Triacylglycerols; Whole Cells; Lipases; Macaúba Oil.

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura dos triacilgliceróis dietéticos empregando ácidos graxos de cadeia média (M) e curta (S). 18
Figura 2 - Fluxograma das etapas do projeto completo. 32
Figura 3 - Fluxograma das etapas de tratamento da biomassa. 35
Figura 4 - Composição de ácidos Graxos nos óleos da Polpa e da Amêndoa da macaúba. 44
Figura 5 - Gráfico de Pareto da análise das variáveis do planejamento referente à caracterização do biocatalisador (p<0,05). 55
Figura 6 - A)Superfície 3D de resposta e B) representação 2D para atividade de hidrólise das células íntegras de A. oryzae. 57
Figura 7 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície do micélio de A. oryzae: a) ampliação de 200 x. b) ampliação de 500 x. c) ampliação de 1000 x. d) ampliação de 2000 x. 58
Figura 8 - Gráfico de Pareto da análise das variáveis do planejamento referente as reações de acidólise (p<0,1). 61
Figura 9 - Resultado da avaliação do efeito do tempo na reação de acidólise empregando a LAM-AO como biocatalisadores. 69
Figura 10 - Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise em grau de incorporação relativo. 71
Figura 11 - Linearização dos dados experimentais referentes aos ciclos de reuso da LAM-AO nas reações de acidólise. 72
Figura 12 - (1) Imagens capturadas nos tempos de 0 e 300 segundos, evidenciando as alterações vasculares na membrana corioalantoide (CAM) dos diferentes grupos experimentais; (2) Classificação semiquantitativa da irritação com base na escala HET-CAM; (3) Taxa de sobrevivência embrionária avaliada até 600 segundos após a aplicação dos compostos; (4) Tabela comparativa entre os grupos experimentais, indicando os valores médios da Pontuação de Irritação (SI) e as respectivas classificações visuais segundo a escala HET-CAM. 73
Figura 13 - Avaliação da atividade antiangiogênica no modelo HET-CAM. (1) Imagens representativas da membrana corioalantoide (CAM) de ovos tratados com NaCl 0,9% (controle negativo), doxorrubicina a 30% (controle positivo) e formulação MLM, 48 horas após a aplicação dos tratamentos (volume de 300 µL); (2) Quantificação do número de vasos sanguíneos visíveis em cada grupo experimental. 76

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Artigos publicados com lipases na síntese de triacilgliceróis dietéticos empregando ácidos graxos de cadeia média (M) nos últimos 6 anos. 19
Tabela 2 - Aplicações de células integras com enzimas associadas. 25
Tabela 3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional (Planejamento fatorial 2^2) para avaliação dos efeitos da temperatura e pH. 36
Tabela 4 - Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional (Planejamento fatorial 2^3) para avaliação da influência dos parâmetros na reação de acidólise. 38
Tabela 5 - Comparativo da composição de ácidos Graxos nos óleos da Macaúba (polpa e amêndoa) e outros óleos empregados para reações de acidólise nos 2 últimos anos. 45
Tabela 6 - Comparativo entre o óleo da polpa de Macaúba com o referencial para óleos não refinados definido pela IN N°87 de 2021. 46
Tabela 7 - Dados de massa úmida e de umidade das LAMs de cada um dos 4 fungos filamentosos avaliados na obtenção das LAMs. 48
Tabela 8 - Comparativo entre as atividades hidrolítica e de esterificação das LAMs de cada um dos 4 fungos filamentosos avaliados. 48
Tabela 9 - Comparativo entre o perfil dos principais de ácidos graxos presentes na posição sn-2 (interna) de um óleo hidrolisado por uma enzima comercial 1,3 – especifica (LPP) e pela LAM do Aspergillus tubingensis. 50
Tabela 10 - Comparativo entre o perfil dos principais ácidos graxos presentes na posição sn-2 (interna) de um óleo hidrolisado por uma enzima comercial 1,3 – especifica (LPP) e pela LAM dos demais fungos. 50
Tabela 11 - Comparativo entre o grau de incorporação do ácido cáprico empregando os três biocatalisadores 1,3 – específicos.conferir 51
Tabela 12 - Matriz do Delineamento composto central rotacional fatorial 2^2 mostrando valores codificados e reais (entre parênteses) de cada variável independente (pH e temperatura) e resultados da hidrólise do azeite de oliva catalisada pela LAM – AO após 5 minutos. 54
Tabela 13 - Tabela da analise ANOVA da caracterização do biocatalisador. 56
Tabela 14 - Matriz do Delineamento composto central rotacional fatorial 2^3 mostrando valores codificados e reais (entre parênteses) de cada variável independente (quantidade de biocatalisador, temperatura e razão molar) na reação de síntese dos triacilgliceróis dietéticos (acidólise) catalisada pela LAM – AO após 24 horas. 60

Tabela 15 - Tabela da analise ANOVA do planejamento das reações de acidólise. 64
Tabela 16 - Resultados de grau de incorporação da análise comparativa entre os modos de agitação no reator operando em modo batelada na reação de acidólise. 67
Tabela 17 - Grau de incorporação em cada ciclo de reuso das LAMs nas reações de acidólise (24 horas) 70

SUMÁRIO

1. Introdução 14

2. Revisão bibliográfica 17

2.1. Lipídeos estruturados 17

2.2. Lipases 21

2.3. Células integras 24

2.4. Óleo de Macaúba 26

3. Objetivos 30

3.1. Objetivos específicos 30

4. Materiais e Métodos 31

4.1. Obtenção da matéria-prima e das cepas dos microrganismos 33

4.2. Caracterização da matéria-prima 33

4.3. Produção do biocatalisador 33

4.3.1. Cultivo e obtenção das lipases associadas as células integras 33

4.3.2. Tratamento da biomassa fúngica contendo as lipases 34

4.3.3. Atividade lipolítica e de esterificação 35

4.3.4. Avaliação da regio-especificidade dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios (Sn-2) 35

4.3.5. Caracterização do biocatalisador (pH e temperatura) 36

4.3.6. Análise morfológica da estrutura do biocatalisador através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 37

4.4. Avaliação da síntese dos triacilgliceróis dietéticos empregando as LAMs. 37

4.5. Comparativo entre modos de agitação na reação de acidólise 38

4.6. Análise do efeito do tempo na reação de acidólise (determinação do grau de incorporação máximo) 38

4.7. Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise 39

4.8. Aplicação do Modelo HET CAM na Avaliação da Segurança Vascular (toxicidade) e Potencial Antiangiogênico dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM 39

4.8.1. Toxicidade 40

4.8.2. Potencial Antiangiogênico 41

4.9. Análise dos triacilgliceróis dietéticos 42

4.10. Análise estatística dos dados experimentais 43

5. Resultados e Discussão 44

5.1. Caracterização da matéria-prima 44

5.1.1. Perfil de ácidos graxos 44

5.1.2. Análises físico-químicas (Índices de acidez e peróxido) 46

5.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases 47

5.2.1. Avaliação da capacidade catalítica (Atividade hidrolítica e de esterificação) dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios 47

5.2.2. Avaliação da regio-especificidade dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios 49

5.2.3. Reações Preliminares de acidólise 51

5.3. Caracterização do biocatalisador 53

5.3.1. Avaliação da faixa de pH e temperatura na atividade do biocatalisador 53

5.3.2. Análise morfológica com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 58

5.4. Síntese dos triacilgliceróis dietéticos: análise da influência dos parâmetros e otimização 59

5.5. Teste comparativo entre modos de agitação na reação de acidólise 67

5.6. Avaliação do efeito do tempo na reação de acidólise empregando LAMs como biocatalisadores 68

5.7. Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise 70

5.8. Aplicação do Modelo HET CAM na Avaliação da Segurança Vascular (toxicidade) e Potencial Antiangiogênico dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM 72

5.8.1. Avaliação da toxicidade 73

5.8.2. Avaliação do potencial antiangiogênico 76

6. Conclusão 80

Referências 81

1. Introdução

Com o crescente interesse da população por produtos alimentícios que possuem propriedades benéficas à saúde e apresentam um viés sustentável, fez com que os estudos de modificação desses alimentos, se tornassem cada vez mais relevantes (Zhou *et al.*, 2022). Esses avanços estão ligados a crescente busca por alternativas alimentares que reduzam os impactos negativos associados ao seu consumo excessivo, como por exemplo o de fontes lipídicas, que ingeridos em grandes quantidades, podem resultar em diversos problemas cardiovasculares (Cervantes-Paz; Yahia, 2021).

Nesse contexto, os lipídeos estruturados, em particular os triacilgliceróis (TAGs) dietéticos, vêm ganhando destaque nos últimos anos devido ao seu potencial em promover uma dieta mais equilibrada e auxiliar na prevenção dessas doenças crônicas cardiovasculares, como obesidade e diabetes (Ijaz; Sun, 2024).

Essa capacidade está associada ao fato dos triacilgliceróis dietéticos que, por causa das modificações estruturais sofridas, possuírem novos atributos, mas sem mudar suas propriedades nutracêuticas originais. Para esses TAGs dietéticos, essa modificação consiste na substituição seletiva dos ácidos graxos de cadeia longa originais por ácidos graxos de cadeia média ou curta, conferindo assim, outras propriedades aos triacilgliceróis, como uma metabolização mais rápida, reduzindo o acúmulo no tecido adiposo, além do baixo valor calórico (Lee *et al.*, 2022). O tipo mais sintetizado desses TAGs é o MLM, onde ácidos graxos de cadeia longa (L) são mantidos na posição interna da molécula (sn-2) e ácidos de cadeia média (M) ocupam as posições externas (sn-1 e sn-3) (Remonatto *et al.*, 2023).

A via mais interessante para essa reação de síntese dos MLMs é a enzimática, em que se emprega lipases para catalisar a substituição desses ácidos nessas extremidades. Assim, é possível realizar essa síntese utilizando lipases de três modos diferentes: por interesterificação; esterificação; ou acidólise. No geral, a síntese desses TAGs dietéticos pela reação de acidólise é a mais empregada, utilizando apenas lipases que possuam a regiosseletividade

para atuar nas posições 1 e 3, um ácido de cadeia media e o óleo que será modificado (López-Fernández; Benaiges; Valero, 2020).

No entanto, a produção de TAGs modificados pela acidólise, tem desafios relacionados ao biocatalisador. Como trata-se de um catalisador de alto valor agregado, essas enzimas são frequentemente imobilizadas para aumentar sua estabilidade reacional e permitir sua reutilização, o que resulta em um menor custo da produção, e consequentemente, aumenta a viabilidade dessa síntese (Fukuda *et al.*, 2008).

Assim, uma alternativa nunca explorada como biocatalisador nessas reações de acidólise são as células íntegras biocataliticas, que se destacam por terem suas etapas de produção simplificadas e resultarem em um catalisador com características semelhantes ao de enzimas imobilizadas comercialmente, mas com o custo reduzido (Matias *et al*., 2023). Esse baixo custo se deve a característica do próprio biocatalisador, que emprega as enzimas que estão na membrana celular da biomassa para catalisar as reações de interesse, e não as enzimas secretadas, permitindo que a biomassa atue como um suporte físico dessas enzimas, mas sem a necessidade de etapas de purificação e posterior imobilização, como para enzimas imobilizadas tradicionalmente (Reis *et al*., 2022). Esse tipo de biocatalisador alternativo com lipases associadas já é empregado em estudos de síntese de diversos compostos, como na produção de biodiesel (Adachi *et al.*, 2013; Fukuda *et al.*, 2008; Kutyła *et al*., 2024) e na síntese de ésteres (Tamalampudi *et al.*, 2007), o que demonstra sua aplicabilidade em um gama de reações catalisada por essas enzimas, como no caso da acidólise, mesmo que nunca tenha sido avaliado para tal finalidade.

Outro fator de grande importância na síntese desses triacilgliceróis é a composição de ácidos graxos presentes no triacilglicerol da matéria-prima. Dessa forma, se mostra necessário que o óleo empregado seja rico em triacilgliceróis que contenham ácidos graxos de cadeia longa em sua estrutura, para que se tenha uma maior substituição desses ácidos por outros de cadeias menores, e assim, uma maior formação do produto de interesse (Bassan *et al.*, 2019; Remonatto *et al.*, 2023).

Assim, um óleo que apresenta esse perfil, além de possuir diversas outras propriedades nutracêuticas, é o óleo da polpa da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.). Trata-se de um óleo rico em ácido oleico (C18:1), um

ácido de cadeia longa que quando inserido na dieta, atua como um bom estabilizante contra o estresse oxidativo no organismo, além da presença de outros compostos bioativos que apresentam benefícios a saúde humana (Sant' Ana *et al.*, 2023). Além disso, novos estudos sobre a extração desse óleo vêm crescendo e apresentam rotas alternativas com processos livres de solventes para a sua obtenção, permitindo a manutenção desses compostos de interesse no óleo (Favaro *et al.*, 2022).

Entretanto, essa composição rica em ácidos de cadeia longa, principalmente o oleico, leva a um acúmulo no organismo, acarretando nas doenças crônicas cardiovasculares já mencionadas (Lee *et al.*, 2022). Assim, a substituição da maior parte desses ácidos, se faz de grande interesse para poder empregar esse óleo na dieta humana. Deste modo, apesar dos avanços, estudos que explorem o emprego do óleo da polpa da macaúba na síntese de triacilgliceróis dietéticos ainda são escassos, também representando uma lacuna na literatura em relação a óleos modificados com propriedades nutracêuticas.

Neste contexto, este trabalho, portanto, visa contribuir para esse campo, avaliando a utilização de células íntegras biocatalíticas com lipases associadas na modificação estrutural desse óleo, com o intuito de sintetizar triacilgliceróis do tipo MLM. Essa abordagem busca não só estabelecer uma via mais economicamente mais viável, como também trazer uma alternativa mais sustentável para sua produção, tanto pelo tipo de biocatalisador empregado, quanto pela própria matéria-prima. E, assim, fomentar o desenvolvimento de produtos que atendam às demandas de um mercado alimentício cada vez mais consciente e exigente.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Lipídeos estruturados

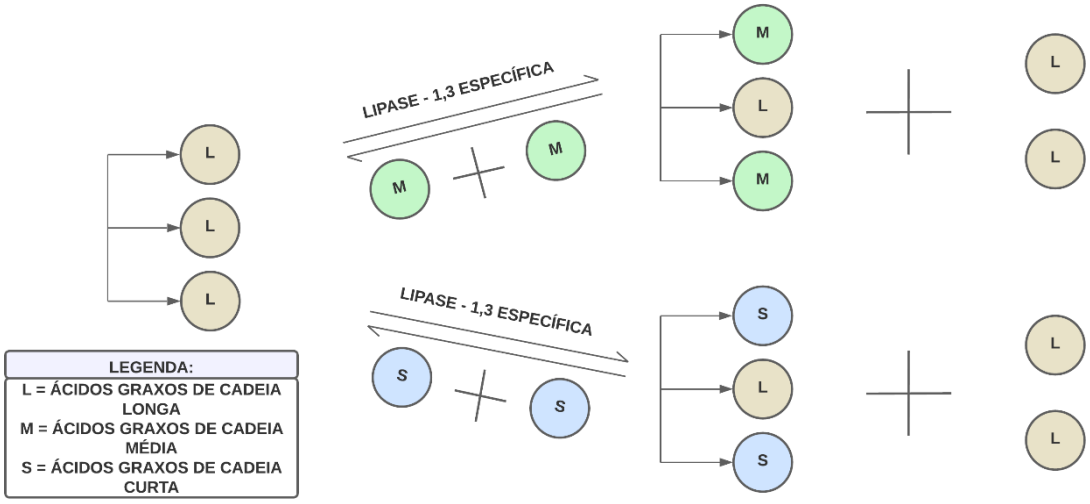
Atualmente, com o crescente número de casos de doenças crônicas cardiovasculares, como obesidade e diabetes, a busca por alternativas para a obtenção de novos produtos, que atendam a uma dieta mais equilibrada, vem recebendo mais atenção no setor alimentício (Abed *et al*., 2020). Isso motivou a procura por processos que durante sua produção ou modificação, resultem em alimentos com características benéficas a saúde humana, e assim, permitam que o consumidor tenha acesso a opções mais saudáveis para compor sua dieta e, consequentemente, reduzir a possibilidade de se desenvolver as doenças mencionadas (Zhou *et al*., 2022; Cervantes-Paz, Yahia, 2021).

Entre os macronutrientes que constituem a alimentação humana, os óleos e gorduras (lipídeos) desempenham um papel importante como uma das fontes mais calóricas de energia e são essenciais para a manutenção de uma dieta equilibrada (Ai *et al*., 2023). No entanto, como estão presentes em grandes quantidades na alimentação humana, seu consumo em excesso acarreta impactos negativos ao organismo, já que devido a esse alto valor calórico, a velocidade do processamento dessas moléculas é menor (Wang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022). Sendo assim, uma alternativa implementada para reduzir o impacto do consumo desses alimentos é realização de modificações na estrutura dos lipídeos para atribuir novas características ou então facilitar sua metabolização no organismo, permitindo que sejam menos prejudiciais à saúde (Cervantes-Paz, Yahia, 2021; Bassan *et al*., 2019).

Existem diversas moléculas provenientes de lipídeos que possuem características interessantes para o controle e a prevenção das doenças cardiovasculares mencionadas, como os ácidos graxos mono e poli-insaturados (MUFA e PUFA). No caso desses ácidos graxos presentes no triacilglicerol, sua presença auxilia na regulação de rotas metabólicas que estão associadas com a prevenção dessas doenças, como alergias, inflamações, diabetes, câncer, entre outras doenças cardiovasculares (Utama *et al.*, 2019). Assim, realizar a modificação desses macronutrientes de forma que se mantenha esses compostos presentes é de vital importância.

Neste contexto, um produto da modificação estrutural desses lipídeos, mais especificamente, dos triacilgliceróis (TAG), vem recebendo mais destaques nos últimos anos, os triacilgliceróis dietéticos. Nesse caso, esses TAGs modificados possuem características como o baixo valor calórico, mas sem perder as propriedades nutracêuticas originais do óleo, tornando-o interessante para o controle de obesidade e outros problemas associados (Ijaz; Sun, 2024; Remonatto *et al.*, 2023). Essa nova propriedade está relacionada a estrutura do "novo" triacilglicerol, que tem seus ácidos graxos originais, e geralmente longos, substituídos por ácidos graxos de tamanhos menores, podendo ser de tamanho curto (S) ou médio (M), como apresentado na figura 1. Assim, essa substituição do ácido graxo original por um ácido com uma cadeia carbônica de tamanho menor reduz o tamanho do TAG, e consequentemente, seu valor calórico. Isso faz com que essa molécula seja uma fonte quase instantânea na síntese de energia, sendo rapidamente clivada no organismo e seus ácidos graxos endereçados para o fígado para a produção de cetonas e não acumulados nos tecidos (Lee *et al.*, 2022).

Figura 1 - Estrutura dos triacilgliceróis dietéticos empregando ácidos graxos de cadeia média (M) e curta (S).



Fonte: Autor, 2024.

Portanto, a modificação de lipídeos, que naturalmente possuem esses ácidos graxos de cadeia longa em suas três posições, em moléculas menores é de grande interesse para manter-se uma dieta de baixa caloria. Sendo assim, diversos tipos de triacilgliceróis dietéticos podem ser sintetizados, uma vez que

é possível realizar diversas combinações entre os três tamanhos de ácidos graxos. Neste caso, um triacilglicerol dietético que se destaca é o do tipo MLM, em que a substituição ocorre nas posições sn-1 e sn-3, do triacilglicerol, mantendo o de cadeia longa (L), na posição interna sn-2 da molécula, como também esquematizado na figura 1 (Ijaz; Sun, 2024; Bornscheuer, 2018; Akoh, 2005; Nunes *et al*., 2011 a, b).

Tal substituição nas posições extremas do TAG está diretamente ligada a forma como a molécula será metabolizada no organismo. Como já mencionado anteriormente, a ingestão de TAGs rico em ácidos graxos de cadeia longa, leva a uma lenta absorção e degradação dessas moléculas (Wang *et al.*, 2022). No entanto, quando ingerido o triacilglicerol dietético do tipo MLM, sua catalise é realizada por lipases presentes no pâncreas que possuem uma regiosseletividade por hidrolisar apenas nas posições sn-1 e sn-3. Essa reação libera os ácidos graxos livres de cadeias menores, que são rapidamente absorvidos pelo organismo, além de um monoacilglicerol. Essa última molécula, por sua vez, agora contém apenas o ácido graxo de cadeia longa na posição interna, e atua em uma nova função fisiológica de captar outros ácidos graxos livres para gerar novos triacilgliceróis, que retornaram para o processo de produção de energia (Lee *et al*., 2022; Utama *et al*., 2019; Souza-Gonçalves *et al*., 2023).

Para isso, o emprego de ácidos graxos de tamanho curto (S) e médio (M) na síntese desse TAGs dietéticos, do tipo MLM e SLS, se faz pelo uso, principalmente, de ácidos graxos que possuam até 12 carbonos em sua cadeia, sendo principalmente utilizado os de cadeia média (C6-C12) (UTAMA *et al*., 2019). Entre esses ácidos de cadeia média, os ácidos cáprico (C10) e caprílico (C8) são os que se encontram em maior uso na literatura atualmente (Tabela 1).

Tabela 1 - Artigos publicados com lipases na síntese de triacilgliceróis dietéticos empregando ácidos graxos de cadeia média (M) nos últimos 6 anos.

Biocatalisador	**Tipo de TAG dietético**	**Referência**
Lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada	MLM	Caicedo-Paz *et al*., 2024
Lipozyme® RM IM	MLM	Simões *et al*., 2021
Lipozyme® RM IM	MLM	Remonatto *et al*., 2023

Lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada	MLM	Pacheco *et al*., 2022
Novozym 40086 lipase	MLM	Yue *et al*., 2020
Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM	MLM	Souza-Gonçalves *et al*., 2023
Lipozyme® 435 (lipase imobilizada recombinante de *Candida antarctica*)	MLM	Liu; Akoh, 2024
Lipase pancreática de porco (LPP)	MMM	Liang *et al*., 2019
Lipozyme® RM IM	MLM	Li *et al*., 2021
Fermase CALB™10000 (lipase-B de *Candida antarctica*)	MLM	Khasgiwale; Waghmare; Gogate, 2025
Lipozyme® TL IM e Lipozyme® RM IM	MLM	Bassan *et al*., 2019
Novozym40086 e Lipozyme® RM IM	MLM	Cao *et al*., 2024
Lipozyme RM IM, Novozyme 40086, Lipozyme TL IM, e Lipozyme 435	MLM	Zou *et al*., 2024

Fonte: Autor, 2024.

Desse modo, nota-se que nos últimos anos, teve um aumento nos estudos referentes a síntese de triacilgliceróis dietéticos ricos em ácidos de cadeia média, principalmente do tipo MLM. Isso se deve justamente por ser relatado que, entre os de cadeia média, são os que mais rapidamente sofrem o processo de beta-oxidação para produção de energia, não se acumulando no tecido adiposo (Lee *et al*., 2022; Wang *et al*., 2022).

Além disso, o ácido cáprico (C:10), obtido principalmente de fontes vegetais como óleo de palma, de coco e outras sementes, se destaca como ácido empregado na síntese desses triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM. Trata-se de um ácido muito empregado como aditivo na indústria alimentícia na produção de alimentos embalados, como sorvetes e sucos de frutas e outros enlatados. No entanto, biologicamente, essa molécula desempenha outras funções como propriedades antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e até capacidade inibir a proliferação de células de linhagens tumorais (Shekhar *et al*., 2023).

Para os triacilgliceróis dietéticos, além de possuírem um menor valor calórico, sabe-se que ao serem ingeridos, como mencionado anteriormente, esses ácidos de cadeia menores (ácido cáprico) são hidrolisados e rapidamente

metabolizados por β-oxidação, resultando no acetil-CoA e, posteriormente, em corpos cetônicos. Essas moléculas, por sua vez, atuam principalmente como uma fonte alternativa de energia para o sistema nervoso. Paralelamente, parte do ácido cáprico induz a glicólise para a formação de lactato, que também atua como fonte energética para as células cerebrais (Shekhar *et al*., 2023; Wang *et al*., 2022).

Assim, considerando todos os benefícios da ingestão do ácido cáprico, reforça-se o interesse da sua incorporação na molécula do triacilglicerol para a sintese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM.

Tendo em vista todas essas propriedades benéficas associadas ao triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, desde o menor valor calórico, até as próprias propriedades do ácido de cadeia media, diversas aplicações em sistemas alimentares vêm sendo exploradas e os efeitos da sua implementação em dietas vem sendo cada vez mais consolidado (Wang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022). No entanto, para esse tipo de lipídio modificado aplicações além da área alimentícia ainda são muito escassas, além de que ainda não há trabalhos que avaliem o potencial farmacológico desses compostos de forma direta, que não apenas pela sua incorporação na dieta para auxiliar na regulação do metabolismo do organismo (Caicedo-Paz *et al.*, 2025).

Sendo assim, essa escassez de estudos demonstram uma lacuna na literatura para outras aplicações para um óleo que teve sua composição modificada em prol de gerar um produto com todos os efeitos benéficos já apresentados, como por exemplo em formulações de fármacos, entre outras. Neste contexto, lipídios são empregados em diversos sistemas que não só o alimentício, como na sintese de nano carreadores, em especial nanoemulsões, para o endereçamento de diversos fármacos (Faria *et al.*, 2024). Com isso, associar os triacilgliceróis dietéticos nessas formulações se monstra uma estratégia interessante de combinar um composto, que possui propriedades que podem maximizar os efeitos esperados, com outros compostos já empregados.

2.2. Lipases

Para a síntese desses lipídeos estruturados, pode-se seguir dois métodos: o químico ou o enzimático. A via química apresenta algumas dificuldades para

ser empregada, já que não há especificidade do produto formado, além de empregar condições mais severas de operação (Wang *et al.*, 2022). No entanto, a via enzimática, que emprega lipases (glicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) para catalisar a reação, é a mais utilizada por não gerar diversos subprodutos (diferentes tipos de TAGs) devido a especificidade do catalisador e poder atuar em condições operacionais mais brandas, como temperaturas menores e, geralmente sem o emprego de solventes (Zhou *et al*., 2022; Wang *et al*., 2022).

Assim, a produção desses lipídeos estruturados catalisada por essas lipases pode ocorrer por interesterificação, esterificação ou acidólise (Lee *et al.*, 2022; Remonatto *et al.*, 2023). No entanto, a reação mais utilizada é a acidólise, em que o triacilglicerol, na presença da lipase, reage com moléculas de ácidos graxos de cadeia média presente no meio reacional, substituindo as cadeias carbônicas longas das suas extremidades por esses ácidos graxos de cadeias menores (Utama *et al.*, 2019). Neste caso, como já mencionado anteriormente, para que a reação de interesse ocorra é de grande importância que a lipase empregada possua uma regiosseletividade para apenas atuar nas posições 1 e 3 do triacilglicerol (López-Fernández; Benaiges; Valero, 2020).

Em relação a esse biocatalisador, seu uso é amplamente avaliado em diferentes áreas. Essa variedade de aplicações pode ser relacionada com a capacidade de realizar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico (Remonatto et al., 2022;Bornscheuer, 2018; Shah et al., 2024). Assim, trata-se de uma enzima capaz de catalisar uma diversidade de reações dependendo das condições do meio reacional e das características da lipase empregada (regiosseletividade e quimioseletividade), como reações de esterificação, alcoólise, acidólise, interesterificação e transesterificação (Remonatto *et al.*, 2022). Isso resulta em uma gama de produtos de interesse para a indústria alimentícia, de cosméticos, petroquímica e farmacêutica, como biocombustíveis, biolubrificantes, emulsificantes e lipídeos estruturados, fazendo com que economicamente as lipases sejam uma das enzimas mais comercializadas no mundo (Qiu; Han; Wang, 2021; Remonatto *et al*., 2022; Shah *et al*., 2024).

Quanto a sua origem, essas enzimas podem ser de diversas fontes: animais, vegetais ou microbianas. Atualmente a sua principal forma de obtenção é a produção por microrganismos (Qiu; Han; Wang, 2021; Shah *et al*., 2024). Isso se dá pelo tempo reduzido para sua obtenção quando comparado as outras

fontes, que necessitam de um tempo muito maior pela complexidade do organismo, além do custo envolvido no processo. Além disso, geralmente durante a produção por via microbiana, as lipases produzidas são extracelulares, ou seja, são excretadas para o meio reacional, o que facilita sua separação e recuperação (Remonatto *et al*., 2022). Também é relatado que suas propriedades são melhores que as provenientes de fontes vegetais e animais, como maior estabilidade térmica e versatilidade catalítica (Salgado *et al*., 2022).

Portanto, há diversas lipases comerciais de origem microbiana, principalmente de origem fúngica, capazes de catalisar tal reação. Essas enzimas são bem estabelecidas quanto as suas propriedades e condições operacionais, o que contribui para seu uso em aplicações industriais, como mencionado anteriormente, permitindo que catalisem uma gama de produtos de diversas áreas. Isso é notável quando se observa, por exemplo, lipases comerciais como a Lipozyme TL IM, a Lipozyme RM IM e a Novozym 435, provenientes da *Thermomyces lanuginosa, Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica,* respectivamente (Remonatto *et al*., 2022; Kim; Hwang; Akoh, 2023), sendo essas destacadas por serem aplicadas na síntese de triacilgliceróis dietéticos, como apontado na tabela 1.

Além dessas, outras lipases provenientes de outras linhagens fúngicas também são amplamente estudadas para serem empregadas em diversas reações, como as obtidas de *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger* e *Aspergillus tubingensis*, demonstrando que cepas do gênero *Aspergillus* apresentam grande potencial na produção dessa classe de enzima (Xu *et al*., 2020; Remonatto *et al*., 2021; Melani; Tambourgi; Silveira, 2020).

Um exemplo do potencial dessas lipases fúngicas são os estudos apresentados na tabela 1, em que todos empregam enzimas comerciais para a síntese de triacilgliceróis dietéticos a partir de diversos óleos de origens diferentes. No entanto, é perceptível que todos esses biocatalisadores apresentados passaram pelo processo de imobilização, para que essas reações se tornassem viáveis. Assim, no geral, é necessário realizar a imobilização dessas proteínas em um suporte físico e insolúvel para facilitar a sua separação do meio reacional, recuperação e reuso para uma diminuição de custos do processo (Zhou *et al*., 2022; Basso; Serban, 2019). Essa etapa é de extrema importância para seu emprego em diversas reações, principalmente na de

acidólise, já que um parte significativa do custo do processo está associada a obtenção desses biocatalisadores. Dessa forma, quando se aplica uma enzima imobilizada em um processo, permite-se que a mesma possa ser “reaproveitada” para mais ciclos da reação até que ocorra uma perda considerável da sua capacidade catalítica e seja necessário à sua substituição por um novo lote (Remonatto *et al.*, 2022).

Como mencionado, a maioria dessas lipases microbianas para serem empregadas necessitam passar por diversas etapas de separação e purificação com solventes e processos cromatográficos. Todo esse processamento, encarece o custo do catalisador, além de que durante o pós-uso, a sua recuperação é de difícil execução, sendo geralmente necessário realizar a imobilização dessas enzimas em suportes físicos para facilitar tal etapa. Essa etapa de imobilização para o reuso das enzimas, permite uma diminuição do custo do processo total, mas também acarreta em um custo maior do catalisador, além de um menor rendimento na sua síntese (Fukuda *et al*., 2008; Qiu; Han; Wang, 2021).

Uma alternativa que integra etapas, economiza custos da sua produção, é o emprego não das enzimas extraídas e imobilizadas e sim das células integras cultivadas contendo esses catalisadores.

2.3. Células integras

Biocatalisadores de células íntegras consistem nas enzimas ligadas a biomassa inativada do microrganismo e não nas que são secretadas ou extraídas dos mesmos. Nesse caso, utiliza-se das enzimas que estão ligadas a parede celular ou em sua membrana e até mesmo no espaço intermembranar dos microrganismos (Matias *et al.*, 2023).

Com isso, a obtenção desse biocatalisador ligado a essa biomassa celular elimina etapas de purificação, já que o produto de interesse está na parte sólida do cultivo, diferentemente das enzimas extracelulares, que necessitam de mais processos para obter somente o biocatalisador, diminuindo o rendimento final e encarecendo a sua produção. Além disso, a matriz celular em que a enzima está associada, atua como um suporte natural, estabilizando a enzima presa e, assim, permitindo minimizar efeitos do próprio meio reacional que poderiam diminuir a

sua capacidade catalítica (Kutyła *et al*., 2024; Matias *et al*., 2023;Reis *et al*., 2022).

Por fim, esse tipo de catalisador, assim como enzimas imobilizadas, permite a sua recuperação, já que por ser uma matriz sólida, após o fim da reação, ela facilmente se separa do meio contendo o produto e pode ser reutilizada por mais ciclos, o que também, diminui os gastos totais do processo em que são aplicadas (Lin; Tao, 2017; Lima *et al*., 2019).

Na literatura encontram-se diversos estudos de produção de células integras associadas a enzimas como biocatalisadores para a produção de diversos compostos. Um exemplo é a aplicação de lipases associadas aos micélios (LAM), ou *mycelium – bound lipases,* em inglês, em que utilizam fungos filamentosos para a síntese de lipases para uma variedade de aplicações. Assim, já é relatado seu emprego na hidrólise de diversos óleos para a liberação de ácidos graxos livres e glicerol com fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e *Penicillium* (Reis *et al*., 2022; de Castro *et al*., 2022). Além disso, também já são relatados estudos empregando essas células integras provenientes de diversos fungos filamentosos na produção de biodiesel (Fukuda *et al*., 2008; Reis *et al*., 2022; Athalye *et al*., 2013; Dobrev *et al*., 2011). No entanto, fungos do gênero *Rhizopus* e *Penicillium* não são os únicos que são empregados para a síntese de células integras com enzimas associadas, como visto na Tabela 2. Também se encontram estudos com células integras com fungos de outros gêneros, como o *Aspergillus* com diversas aplicações, desde o tratamento de efluentes da indústria farmacêuticas utilizando β-lactameses, até na síntese de biodiesel e ésteres de bio-solventes com lipases de *Aspergillus oryzae e Aspergillus niger* (Ji *et al*., 2021; Pan *et al*., 2016; Almyasheva *et al*., 2017; Adachi *et al*., 2013).

Tabela 2 - Aplicações de células integras com enzimas associadas.

Microrganismo	**Aplicação**	**Autor(es)**
Rhizopus oryzae	Produção de Biodiesel empregando células integras associadas a particulas de poliuretano	Ban *et al*., 2001
Aspergillus niger	Degradação de antibioticos por ação de β-lactamases	Ji *et al*., 2021
Aspergillus niger	Síntese de ésteres isopropílicos de biossolventes verdes	Pan *et al*., 2016

Aspergillus oryzae com o gene codificador de lipase de *Candida antarctica*.	Sintese de ésteres orgânicos	Tamalampudi *et al*., 2007
Pichia pastoris com o gene codificador de lipase de *Thermomyces lanuginosus*	Produção de Biodiesel	Yan; Zheng; Li, 2014
Aspergillus niger	Produção de Biodiesel	Almyasheva *et al*., 2017
Rhizopus oryzae	Sintese de ácidos graxos livres poli-insaturados	Reis *et al*., 2021
Aspergillus oryzae	Produção de Biodiesel	Adachi *et al*., 2013
Rhizopus oryzae	Síntese de ácidos graxos livres poli-insaturados	Matias *et al*., 2023
Penicillium purpurogenum	Degradação de ácido láurico em óleos vegetais	de Castro *et al*., 2022
Penicillium citrinum	Síntese de ácidos graxos livres poli-insaturados	Lima *et al*., 2019

Fonte: Autor, 2024.

Portanto, todos esses estudos empregando biocatalisadores de células integras demonstram o crescimento dessa área da biotecnologia nos últimos anos, sendo necessário avaliar cada vez mais novas aplicações para esses catalisadores além da hidrolise e da esterificação (produção de biodiesel), no caso de lipases. Além disso, observando a tabela 2, biocatalisadores de células integras provenientes de fungos do gênero *Aspergillus* vem se destacando na última década, seja empregando lipases (LAM) ou outras enzimas de interesse (Adachi *et al.*, 2013; Almyasheva *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2016). Sendo assim, como ainda não é relatado nenhum estudo empregando essas enzimas associadas a biomassas fúngicas na síntese dos triacilgliceróis dietéticos por acidólise, destaca-se o potencial, principalmente quando se observa que diversos fungos filamentosos produtores de lipases comerciais com a especificidade para atuar nas posições externas dos TAGs e que já são utilizados para tal (*R. oryzae e A. oryzae*), também vem sendo estudados e empregados para a produção de LAMs, mas para outras aplicações (síntese de biodiesel).

2.4. Óleo de Macaúba

Além do catalisador empregado, para a síntese desses triacilgliceróis dietéticos as características da matéria prima, ou seja, a composição do óleo que será modificado, é um fator crucial para sua escolha. Assim, é desejável que a composição do óleo empregado para a produção dos TAGs dietéticos, seja majoritariamente de ácidos graxos de cadeias longas (LLL), para que durante a sua modificação, tenha-se uma maior substituição por ácidos de cadeias menores e, assim, garantir que se tenha uma maior concentração do produto desejado ao fim da reação (MLM) (Simões *et al*., 2021).

Desta forma, diversas fontes oleaginosas vêm sendo avaliadas para tal aplicação, como óleo de coco, de semente de uva, de algodão, de algas, de peixes, azeite de oliva, entre outros (Bassan *et al*., 2019; Khasgiwale; Waghmare; Gogate, 2025; Li *et al*., 2021; Liang *et al*., 2019). No entanto, um grande obstáculo referente a essa matéria prima é o custo associado à sua obtenção.

Aliado a essa questão do custo, nos últimos anos, a busca por novas fontes oleaginosas, tanto para a aplicação na alimentação, quanto para outros fins como na produção de biocombustíveis, vem crescendo com o intuito de substituir esses óleos tradicionalmente empregados (Colombo *et al.*, 2018). Parte dessa busca está relacionada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) definidos pela ONU, em que foi acordado objetivos em prol de um futuro mais sustentável e igualitário em diversos aspectos socioeconômicos. Entre essas metas, encontram-se tópicos como a erradicação da fome, uma alimentação balanceada e uma agricultura sustentável, favorecendo produtos regionais de grande valor nutricional e incentivando colaborações tanto nacionais, quanto internacionais para alcança-los (Objetivos 2, 3, 8, 9, 12, 13 e 15). Em geral, na pratica, todos esses objetivos visam o desenvolvimento de novas tecnologias, troca de conhecimentos e parcerias para fornecer a sociedade condições mais igualitárias e saudáveis, seja na busca de novos processos ou de novas fontes alimentícias, como no caso de fontes oleaginosas (ONU, 2015).

Neste contexto, a macaúba possui um grande potencial para aplicações industriais com o intuito de gerar produtos mais saudáveis e/ou economicamente mais viáveis. Em relação ao seu óleo, a produção é superior quando comparado a outros óleos vegetais normalmente consumidos, sendo que para um hectare é

possível obter entre 4 e 6 toneladas de óleo, enquanto, por exemplo, o óleo de soja, que é amplamente consumido na dieta humana, alcança apenas um terço desse valor (Raspe *et al*., 2022; Trentini *et al*., 2017). Tal fato, o torna de grande interesse para a substituição de fontes mais tradicionais, como a soja, já mencionada e vai de encontro com alguns dos objetivos de desenvolvimento sustentável, uma vez que se trata de uma planta de origem nacional (cerrado) e amplamente utilizada em regiões como o norte brasileiro (Colombo *et al.*, 2018).

Além disso, sua composição permite que seja empregado em diversas indústrias, como a de cosméticos e na produção de biocombustíveis (biodiesel), no qual já é bem consolidado seu uso (Silva; Cardoso; Pasa, 2016; Carpintero *et al*., 2021).

Entretanto, nos últimos anos, os estudos com os óleos dessa palma vêm ganhando novas proporções. Para o óleo da polpa da macaúba, a partir da análise de sua composição, observa-se a presença de diversos compostos bioativos, como vitamina C, β-carotenos, tocoferóis, fitosteróis e flavonoides (Trentini *et al.*, 2017). No entanto, a característica que mais se destaca é sua constituição lipídica, em que apresenta uma predominância de ácido oleico (C18:1), um ácido graxo essencial que pode atuar como um bom estabilizante contra o estresse oxidativo no corpo humano (Sant' Ana *et al*., 2023; Colombo *et al*., 2018).

Ademais, também é crescente os trabalhos envolvendo novas formas de obtenção desse óleo (Trentini *et al.*, 2017). Porém, seguindo os princípios dos ODS, novos métodos também vêm sendo explorados, como técnicas livres de solventes, empregando sistemas aquosos e a associação de enzimas para sua extração. Essas rotas alternativas diminuem a presença de compostos liberados pelo fruto que possam modificar as características do óleo e invalidar seu emprego na dieta humana (Favaro *et al*., 2022). Desta forma, Favaro e colaboradores (2022) propuseram e validaram uma nova rota empregando um protocolo em condições brandas e livre de solventes para a extração de um óleo de alta qualidade da polpa da macaúba, com baixo nível de acidez e sem uma perda significativa dos compostos anteriormente mencionados. Além disso, tal método também foi capaz de manter seu perfil de ácidos graxos original, com uma porcentagem significativa do ácido oleico.

O resultado desse estudo se mostra ainda mais interessante quando se observa que se trata de autores que atuam como pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), reafirmando os objetivos de desenvolver novas tecnologias e produtos a partir de fontes nacionais e com intuito de serem mais sustentáveis e ricos nutricionalmente. Assim, isso acaba evidenciando ainda mais o potencial crescente do óleo da polpa de macaúba, pois, por possuir tais propriedades benéficas, o torna atrativo para o desenvolvimento de novos produtos com aplicações nutricionais e farmacêuticas.

Com isso, para a síntese dos triacilgliceróis dietéticos, empregar um óleo de origem nacional obtido por uma rota alternativa mais sustentável e com uma composição rica em ácidos graxos de cadeia longa, sendo aproximadamente 70% de ácido oleico (C18:1) se destaca. Pois, como já mencionado, trata-se de um ácido de cadeia longa que possui algumas propriedades medicinais. No entanto, a presença de grandes concentrações dessa molécula, dificulta sua utilização como fonte de energia (Sant' Ana *et al*., 2023). Isso leva a um acúmulo no organismo, o que o torna um óleo não indicado para o consumo diário, por possuir um grande valor calórico.

Porém, tal perfil de ácidos graxos e considerando o contexto mais sustentável de sua obtenção, torna-se um candidato interessante para ser modificado e produzir os triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM. Ainda assim, na literatura não se encontra estudos aplicando este óleo para a produção desses TAGs modificados, evidenciando a lacuna nessa área de estudo de lipídeos estruturados com óleos empregados nacionalmente.

3. Objetivos

O objetivo deste projeto foi a síntese de triacilgliceróis dietéticos por acidólise enzimática utilizando o óleo da macaúba como substrato principal e o ácido cáprico como ácido substituinte. Para a síntese desses compostos, foi empregado o uso de lipases associadas ao micélio de fungos filamentosos, como biocatalisadores alternativos às opções tradicionais, a fim de contribuir para o desenvolvimento de uma rota biotecnológica inovadora e mais econômica na modificação estrutural de óleos vegetais visando à produção de alimentos funcionais e/ou lipídeos estruturados. Também foi realizado uma avaliação inicial da toxicidade desses triacilgliceróis dietéticos e do seu potencial antiangiogênico empregando o modelo HET-CAM.

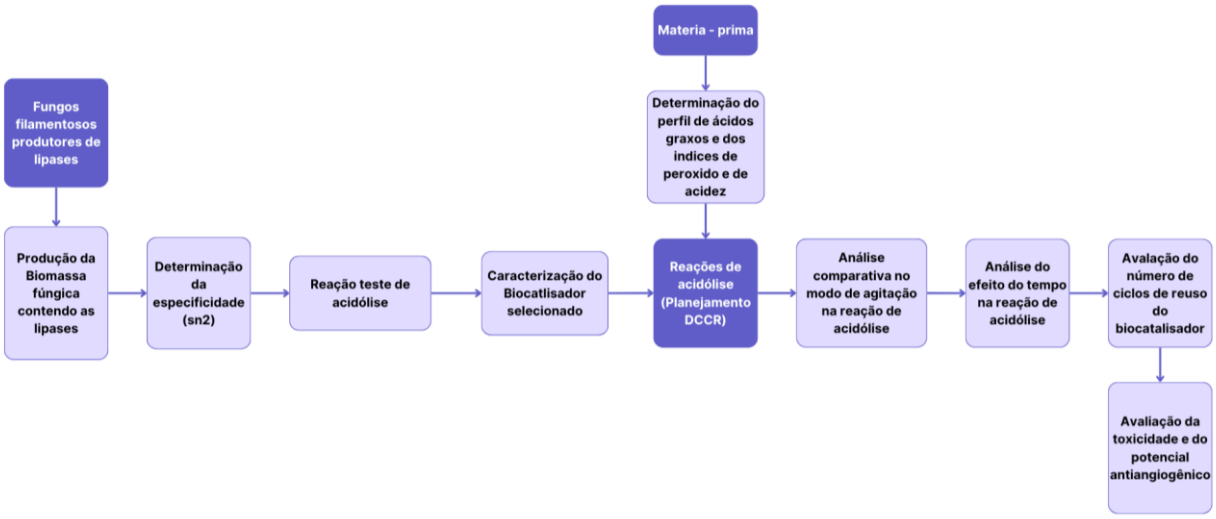
3.1. Objetivos específicos

- ✓ Seleção do microrganismo empregado para a obtenção das células integras;
- ✓ Caracterização do biocatalisador quanto a temperatura, pH e a morfologia;
- ✓ Caracterização da matéria prima quanto ao índice de acidez, peróxido e composição de ácidos graxos;
- ✓ Reações de acidólise para obtenção dos triacilgliceróis dietéticos empregando planejamento experimental: Otimização das melhores condições para a reação (razão molar, quantidade de biocatalisador e temperatura);
- ✓ Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador;
- ✓ Avaliação do número de ciclos de reuso do biocatalisador nas reações de acidólise;
- ✓ Testes de toxicidade e indução a vascularização.

4. Materiais e Métodos

A figura 2 apresenta o fluxograma das etapas a serem desenvolvidas durante o projeto.

Figura 2 - Fluxograma das etapas do projeto completo.



Fonte: Autor, 2024.

4.1. Obtenção da matéria-prima e das cepas dos microrganismos

Neste trabalho, os óleos utilizados foram disponibilizados por meio de uma colaboração com pesquisadores da EMBRAPA (Embrapa Cerrados, Planaltina/DF), que forneceram lotes do óleo da polpa e da amêndoa da macaúba (*Acrocomia aculeata*) em estado bruto e preparados para aplicação direta nas reações. Após a obtenção, os lotes foram armazenados em câmara fria a fim de mantê-los em uma temperatura constante. O ácido graxo incorporado na reação de acidólise foi o ácido cáprico (Sigma).

Para a produção do biocatalisador foram avaliadas cepas dos fungos filamentosos: *Rhizopus arrizhus, e Aspergillus oryzae,* cedidos pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), no campus de Poços de Caldas; *Aspergillus tubingensis (*DPUA 1727*),* cedido pelo acervo de culturas – DPUA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM, AM, Brasil); e *Rhizomucor miehei* (ATCC 26282), adquirido da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello.

4.2. Caracterização da matéria-prima

O óleo vegetal foi caracterizado quanto aos índices de acidez (método Ca 5a-40), peróxido (método Cd 8b-90) e composição em ácidos graxos (método Ce 2-66), de acordo com os métodos oficiais da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2004).

4.3. Produção do biocatalisador

4.3.1. Cultivo e obtenção das lipases associadas as células integras

As cepas dos microrganismos selecionados (item 4.1) foram conservadas em geladeira (1°C) em meio BDA (Batata Dextrose Agar Difco). Para a ativação das células, os tubos contendo os microrganismos foram mantidos por um período de no mínimo 72h até atingir seu melhor estado de esporulação em uma estufa (Estufa de Cultura Modelo 002 CB, Fanem LTDA). Para cada cepa avaliada empregou-se uma temperatura: *R. arrizhus (30°C), A. oryzae (30°C), A.*

tubingensis (37°C) e R. miehei (28°C) (Adamczak; Bednarski, 2004; Freitas *et al.*, 2024; Kirdi *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2022).

Em seguida foi feita a contagem das células (esporos) utilizando uma câmara de Neubauer, em que incialmente foi realizada uma lavagem com água destilada estéril até desprendimento dos esporos do meio de cultura, obtendo assim, uma suspensão de esporos em condições assépticas. A concentração da suspensão de esporos foi ajustada para a faixa de 10^8 esporos/mL, a fim de padronizar a quantidade de inóculo utilizada nas etapas do cultivo e obtenção dos biocatalisadores.

Dessa forma, após a preparação da suspensão de esporos, foi conduzido o cultivo para a produção da biomassa fúngica empregando o azeite de oliva como fonte indutora de lipase. Todo o processo de síntese do catalisador foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL do meio de cultivo contendo: Peptona 70g/L; Glicose 1g/L; KH_2PO_4 1g/L; Mg_2SO_4 0,5 g/L; e $NaNO_3$ 1 g/L (Andrade *et al*., 2014 adaptado). Todos os cultivos foram realizados a 180 rpm, mas, assim como na etapa de ativação, novamente para cada cepa, no cultivo foi empregado a temperatura ótima de crescimento previamente selecionada.

Por fim, após o período de 7 dias de cultivo, a biomassa celular foi filtrada utilizando um funil de *buchner*, papel filtro e um sistema de bomba a vácuo para a separação do caldo fermentado e lavada com uma mistura de água, etanol e acetona (1:1:1).

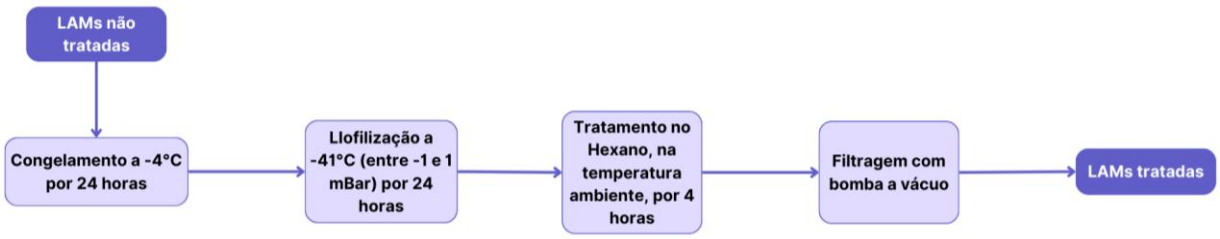
4.3.2. Tratamento da biomassa fúngica contendo as lipases

A biomassa resultante foi submetida por um processo de pós tratamento a fim de retirar a umidade, bem como o óleo residual do cultivo, maximizando a atividade do biocatalisador (esquema apresentado na figura 3). Inicialmente, a biomassa foi cortada em tamanhos menores e congelada por 24 horas. Posteriormente, esse material congelado foi liofilizado por 24 horas (Modelo *ModulyoD Freeze Dryer, Thermo Electro Corporation*) e depois foi adicionado em um recipiente com hexano, em uma proporção de 1 grama de biomassa para cada 4 mL de hexano, por 4 horas sob agitação leve na cama de rolos (*roll mixer*

da Quimis®). Ao fim do tempo a biomassa foi filtrada utilizando um funil de *buchner*, papel filtro e um sistema de bomba a vácuo.

Por fim, foi realizada a determinação da umidade de cada lote empregando uma balança de infravermelho (SHIMADZU – MOC63u) e todos os lotes de biomassas fúngicas foram armazenadas em recipientes a 4°C até seu uso.

Figura 3 - Fluxograma das etapas de tratamento da biomassa.



Fonte: Autor, 2024.

4.3.3. Atividade lipolítica e de esterificação

A atividade lipolítica da biomassa fúngica tratada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (Andrade *et al*, 2014), considerando a umidade da biomassa previamente determinada (item 4.3.2.). A atividade hidrolítica foi definida pela quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições de ensaio.

Em relação à atividade de esterificação, foi determinada pela reação entre o ácido oleico e o álcool etílico catalisada pela lipase (Remonatto *et al.*, 2023). A atividade de esterificação foi definida pela quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol de ácido oleico por minuto.

4.3.4. Avaliação da regio-especificidade dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios (Sn-2)

Foram testadas linhagens de microrganismos identificadas na literatura como promissoras produtoras de lipases ligadas ao micélio disponíveis no laboratório de enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e por aquisição da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello (Campi

nas/SP/Brazil). Assim, como mencionando anteriormente, quatro fungos foram avaliados: *R. arrhizus, A. tubingensis, R. miehei e A. oryzae.*

Para esta etapa, após a realização dos cultivos para a produção da lipase associada ao micélio, foi realizada a determinação da especificidade de atuação desses catalisadores. Assim, para isso, foi empregado o método para a determinação do perfil composicional na posição Sn-2 em óleos e gorduras (Caballero *et al*., 2014).

4.3.5. Caracterização do biocatalisador (pH e temperatura)

Após a escolha da linhagem, foi realizada a caracterização das lipases associadas ao micélio empregando como ferramenta estratégica o planejamento de experimentos. Para isso, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Planejamento Fatorial 2^2 - com triplicata de cada experimento e três repetições do ponto central. Experimentalmente foi utilizado a performance do biocatalisador na hidrólise do azeite de oliva para avaliar seu comportamento na faixa de pH e temperatura proposta, seguindo o item 4.3.3 (Andrade *et al*, 2014). A análise estatística dos efeitos das variáveis codificadas sobre a variável independente do planejamento estudado foi realizada com auxílio do *software* Protimiza Experimental Design ($p<0,05$) (http://experimentaldesign.protimiza.com.br/).

Tabela 3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional (Planejamento fatorial 2^2) para avaliação dos efeitos da temperatura e pH.

Variáveis independentes	**Níveis**				
	-1,41	**-1**	**0**	**+1**	**+1,41**
Temperatura (°C)	25,8	30	40	50	54,1
pH	4,38	5	6,5	8	8,62

Fonte: Autor, 2024.

4.3.6. Análise morfológica da estrutura do biocatalisador através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como última etapa da caracterização do biocatalisador, foi realizada a analise morfológica da estrutura do micélio por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isso, ao fim do tratamento da biomassa catalítica (item 4.3.2.), o biocatalisador já previamente desidratado (próximo a 10%), foi analisado sem fixação química prévia usando um microscópio eletrônico de alta resolução (Jeol modelo JSM7500F, Instituto de Quimica, Unesp, SP).

4.4. Avaliação da síntese dos triacilgliceróis dietéticos empregando as LAMs

Em seguida, foi avaliada a influência da temperatura, razão molar (óleo:ácido) e concentração de biocatalisador (m/m %), empregando-se como ferramenta estratégica o planejamento de experimentos. Também foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Planejamento Fatorial 2^3 - com duplicata de cada experimento e três repetições do ponto central. As reações foram conduzidas em meio livre de solventes, em reatores cilíndricos de vidro (parede dupla), com uma capacidade de 30 cm^3, sob agitação magnética (400 PRM). A análise estatística dos efeitos das variáveis sobre as respostas do DCCR estudado foram realizadas com auxílio do Protimiza Experimental Design ($p<0,1$)
(http://experimentaldesign.protimiza.com.br/).

Tabela 4 - Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional (Planejamento fatorial 2^3) para avaliação da influência dos parâmetros na reação de acidólise.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	**-1**	**0**	**+1**	**+1,68**
Temperatura (°C)	33,1	40	50	60	66,8
Quantidade de biocatalisador (% m/m)	1,63	3	5	7	8,36
Razão molar (óleo:ácido)	1:2,29	1:4	1:6,5	1:9	1:10,70

Fonte: Autor, 2024.

4.5. Comparativo entre modos de agitação na reação de acidólise

Após a determinação das melhores condições reacionais (item 4.4), foi realizado um teste comparativo entre dois modos de agitação no reator: agitação magnética e agitação mecânica. Nessa etapa, a reação de acidólise foi conduzida na melhor condição determinada no item 4.4. em dois sistemas reacionais: um sistema empregando um agitador magnético, em que a agitação foi realizada com uma barra magnética; e um sistema utilizando um agitador mecânico com um impelidor. Em ambos os sistemas, a agitação foi definida próximo a 400 RPM.

4.6. Análise do efeito do tempo na reação de acidólise (determinação do grau de incorporação máximo)

Com as melhores condições de temperatura, quantidade de biocatalisador e razão molar e o modo de agitação já definidos, a etapa seguinte foi determinar o tempo necessário para a obtenção do grau de incorporação máximo. Para isso, foi realizada a reação de acidólise (condições da reação determinadas anteriormente – itens 4.4. e 4.5.), por um período de 48 horas, com alíquotas do meio reacional sendo retiradas nos seguintes tempos: 10 horas, 24 horas, 34 horas e 48 horas.

4.7. Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise

Em seguida, com todas as condições já definidas, a última etapa foi a avaliação do reuso do biocatalisador (LAMs) nas reações de acidólise. Assim, ciclos da reação de acidólise foram realizados reutilizando o mesmo biocatalisador até a perda da capacidade de catalisar a reação de acidólise. Entre cada ciclo, a biomassa catalítica foi separada do meio reacional do ciclo anterior e passou por etapas de lavagens com hexano até a remoção total do meio reacional anterior e secagem do biocatalisador. Em seguida, com o biocatalisador seco novamente, um novo meio reacional foi preparado e adicionado a enzima.

Além disso, determinado a constante de desativação. Para isso, foi empregado a equação 1.

$$GI_t = GI_0 * e^{-k_d * t} \quad (1)$$

Em que GI_n é o grau de incorporação no tempo t (horas), GI_0 é o grau de incorporação no ciclo 0, ou seja, antes do reuso, k_d é a constante de desativação e t é o tempo em horas.

Para determinar o tempo de meia vida, foi empregado uma variação da equação 1, apresentada na equação 2.

$$t_{meia\ vida} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (2)$$

4.8. Aplicação do Modelo HET CAM na Avaliação da Segurança Vascular (toxicidade) e Potencial Antiangiogênico dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM

Após estabelecer todas as principais condições e parâmetros para a sintese dos TAGs dietéticos, a etapa seguinte foi a avaliação da toxicidade e do potencial angiogênico do óleo modificado empregando o modelo HET CAM (Hen’s Egg Test on the Chorioallantoic Membrane).

Tais testes representam uma etapa essencial no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas. Assim, o teste HET-CAM oferece uma alternativa eficiente, ética e sensível à experimentação animal tradicional para triagem inicial de toxicidade de compostos que possuem um potencial para as aplicações anteriormente mencionadas (Hartung, 2017; Ji *et al*., 2024).

4.8.1. Toxicidade

Inicialmente avaliou-se o potencial irritativo de diferentes formulações contendo extratos vegetais aplicados diretamente sobre a membrana corioalantoide embrionária. Ovos embrionados de galinha (raça Leghorn) foram incubados horizontalmente em incubadora automatizada por seis dias, sob temperatura de 37,5 ± 0,5 °C e umidade relativa entre 55% e 65%. No terceiro dia, realizou-se ovoscopia para descarte de ovos inviáveis. No quarto dia, uma janela oval foi aberta na casca e vedada com Parafilm®, mantendo-se assim até o momento do ensaio.

No sexto dia de incubação, o Parafilm® foi removido cuidadosamente e os ovos foram posicionados sob estereoscópio. A membrana corioalantoide (CAM) foi registrada fotograficamente antes da aplicação dos tratamentos. Foram testados cinco grupos experimentais (n = 4): controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 0,1 M), formulação branca (éter), formulação MLM (contendo o óleo da polpa da macaúba modificado preparado em uma concentração de 0,05% em éter) e formulação contendo o óleo da polpa de macaúba sem a modificação, também preparada em uma concentração de 0,05% em éter. Cada substância foi aplicada em volume único de 300 µL diretamente sobre a membrana.

As respostas vasculares (hemorragia, lise e coagulação) foram monitoradas individualmente por até 300 segundos. Ao término da observação, uma nova imagem foi registrada para comparação morfológica. O índice de irritação (Score de Irritação, SI) foi calculado com base nos tempos de início das alterações vasculares, conforme descrito por Batista-Duharte *et al*. (2016) (equação 3):

$$Pontuação\ de\ Irritação = [(301 - H)\ X\ 5/300\ ] + [(301 - L)\ X\ 7/300\ ] + [(301 - C)\ X\ 9/300\ ] \quad (3)$$

Onde:

H = tempo de início de hemorragia (s)

L = tempo de início de lise vascular (s)

C = tempo de início de coagulação (s)

Além disso, foi aplicada uma escala semiquantitativa de pontuação visual adaptada de McKenzie *et al*. (2015), classificando as alterações em quatro categorias:

0 (–): ausência de alterações visíveis

1 (+): alterações discretas

2 (++): alterações moderadas

3 (+++): reações severas (lise, hemorragia e/ou coagulação evidentes)

A viabilidade embrionária foi acompanhada até 600 segundos após a aplicação.

4.8.2. Potencial Antiangiogênico

A etapa seguinte foi a investigação do potencial antiangiogênico das formulações conduzida utilizando o mesmo modelo HET-CAM previamente descrito (item 4.8.1.). Após 48 horas da aplicação das substâncias, foram adquiridas imagens atualizadas da membrana corioalantoide (CAM) com auxílio de estereomicroscópio digital. Três grupos experimentais foram analisados (n = 4): NaCl 0,9% (controle negativo), doxorrubicina a 30% (controle positivo) e formulação MLM (modificação da formulação com extrato de macaúba) (do Amaral *et al*., 2025). Cada tratamento foi previamente preparado em solução aquosa e aplicado diretamente sobre a CAM (300 µL). Após o período de exposição, as membranas foram fotografadas com estereomicroscópio acoplado a sistema de captura digital, e o número total de vasos sanguíneos visíveis foi contado manualmente a partir das imagens obtidas. A contagem considerou todos os vasos irradiando a partir do ponto de aplicação, dentro do campo central da imagem.

4.9. Análise dos triacilgliceróis dietéticos

Ao fim de todas as reações, as amostras do meio reacional foram separadas do biocatalisador e neutralizadas para a remoção de ácidos graxos presentes no meio reacional empregando a metodologia de Miotti *et al*., 2024, com modificações. Para isso, 500 µL de cada reação foram misturados com 3 mL de uma solução de Hidróxido de Potássio hidroalcóolico (KOH) 0,8 M e 4 mL de hexano P.A, homogeneizados com o auxílio de um vórtex e deixado em repouso para a separação das fases. Após a separação, a fase superior (fase contendo os triacilgliceróis solubilizados no hexano) foi coletada.

Em seguida, essas amostras neutralizadas (fase coletada) foram submetidas ao processo de metilação (Wang *et al*., 2012), para posterior análise, no cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2014 equipado com um auto injetor AOC-20i), do perfil de ácidos graxos.

Para análise foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida (DB – FastFAME – fase cianopropílica) de 20 m de comprimento x 0,18 mm de diâmetro interno x 0.20 µm filme de espessura) e um detector de ionização de chama. O programa de temperatura começou em 80 °C, mantido por 0,5 min, seguido por um aumento para 175 °C (65 °C/min), depois para 185 °C (10 °C/min), mantido por 0,5 min, e posteriormente aumentado para 230 °C (10 °C/min), mantido por 1 min. O tempo total de análise foi de 10,89 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C. O volume de injeção foi de 1 µL no modo split (1:50). O nitrogênio foi usado como gás de arraste a uma pressão de 193,1 kPa.

Após a análise no cromatógrafo gasoso (CG - FID), foi determinado o grau de incorporação do ácido cáprico (C10:0) nos triacilgliceróis seguindo a equação 3.

$$GI\ (mol\%) = \frac{M_{fa}}{T_{fa}} * 100 \qquad (3)$$

Em que GI corresponde ao Grau de incorporação de ácido cáprico, em porcentagem, M_{fa} é a quantidade em moles do ácido cáprico e o T_{fa} a quantidade total em moles de ácidos graxos presentes na amostra após a reação de incorporação nos triacilgliceróis.

Além do grau de incorporação foi determinado o rendimento empregando a equação 4.

$$Rendimento\ (\%) = \frac{100 * GI}{66{,}67} \quad (4)$$

4.10. Análise estatística dos dados experimentais

As análises estatísticas referentes aos planejamentos experimentais foram realizadas com o auxílio do Protimiza Experimental Design (http://experimentaldesign.protimiza.com.br/).

Em relação aos resultados obtidos para a avaliação da regio-especificidade dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios (item 4.3.4), a análise estatística foi realizada empregando o teste de Tukey e com o auxílio do software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, MA-USA).

Já para os resultados obtidos na avaliação da toxicidade e do potencial antigiogenico (item X), as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2, aplicando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Diferenças com $p < 0{,}05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

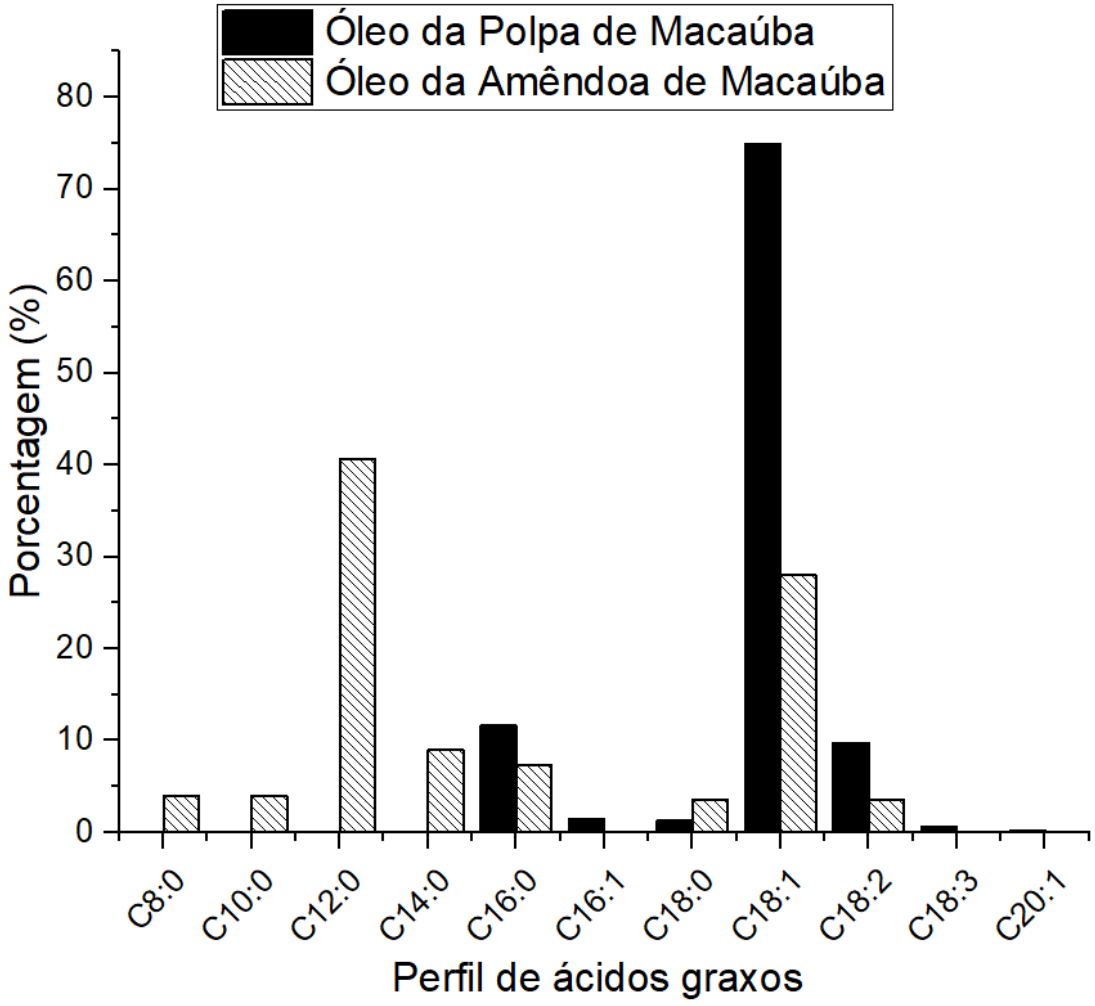
5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da matéria-prima

5.1.1. Perfil de ácidos graxos

Inicialmente, para a síntese dos triacilgliceróis dietéticos, foi avaliado o perfil de ácidos graxos do óleo da polpa da macaúba (OPM) e do óleo da amêndoa da macaúba (OAM). Tanto na figura 4, quanto na tabela 5, observa-se a composição de ácidos graxos presentes em ambos os óleos avaliados e de outros óleos já aplicados para reações de acidólise. No entanto, nota-se uma composição bem distribuída entre ácidos de cadeia média e longa no OAM, com uma maior porcentagem de ácidos de cadeia média (57,5% a mais em relação a porcentagem de ácidos de cadeia longa).

Figura 4 - Composição de ácidos Graxos nos óleos da Polpa e da Amêndoa da macaúba.



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 5 - Comparativo da composição de ácidos Graxos nos óleos da Macaúba (polpa e amêndoa) e outros óleos empregados para reações de acidólise nos 2 últimos anos.

Ácido graxo	**Óleo de polpa da macaúba (OPM) (%)**	**Óleo da amêndoa da macaúba (OAM) (%)**	**Óleo de semente de peônia (%)** (Cao *et al.*, 2024)	**Óleo de semente de algodão (%)** (Remonatto *et al.*, 2023)	**Óleo de peixe (%)** (Zou *et al.*, 2024)
C8	ND*	3,96	ND*	ND*	ND*
C10	ND*	3,95	ND*	ND*	ND*
C12	ND*	40,60	ND*	ND*	ND*
C14	0,12	8,99	0,1	ND*	8,51
C16	11,61	7,35	6,6	11,27	19,65
C16:1	1,52	ND*	0,1	ND*	10,08
C17	ND*	ND*	0,1	ND*	3,08
C18	1,31	3,6	2,0	4,83	9,66
C18:1	74,87	28,03	22,7	26,94	3,36
C18:2	9,73	3,52	26,1	50,24	ND*
C18:3	0,65	ND*	41,6	4,28	3,68
C20:1	0,18	ND*	0,2	ND*	ND*
C20:05	ND*	ND*	ND*	ND*	23,58

Fonte: Autor, 2024. *ND representa não detectado.

Em relação ao OPM, o perfil apresentado se difere do OAM, com uma composição rica em ácidos de cadeia longa presente (mais de 99% do perfil é composto de ácidos de cadeia longa), com a predominância do ácido oleico (C18:1). Esse resultado é esperado para óleos provenientes do fruto da macaúba, em que se encontra uma porção majoritária de ácido oleico (dos Santos Ribeiro *et al*., 2017; SANT' ANA *et al*., 2023), como já mencionado anteriormente.

Assim, quando se compara os dois perfis de ácidos graxos, o óleo proveniente da amêndoa da macaúba não se destaca para a aplicação em reações de síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM. Diferentemente do OPM, uma vez que, como também já mencionado, por possuir uma composição rica em ácidos graxos de cadeia longa, torna-o um substrato ideal para a modificação de triacilgliceróis. A presença majoritária de 12% de ácido palmítico (C16), 10% de ácido linoleico (C18:2) e 75% de ácido oleico (C18:1) indica que durante a reação de acidólise, ocorrerá uma maior substituição deles pelo ácido

cáprico (C10), e assim, um maior rendimento na produção de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM (Remonatto *et al.*, 2023).

Tal conclusão é reforçada quando se compara os perfis de ambos os óleos com os perfis de óleos empregados para a síntese de TAGs dietéticos em outros trabalhos (Tabela 1). Desta forma, quando se observa as constituições desses óleos já empregados, todos possuem a mesma característica do óleo da polpa, uma composição majoritária de ácidos de cadeia longa e uma presença mínima de ácidos menores, ou nenhuma, como no óleo da semente de algodão (Cao *et al*., 2024; Remonatto *et al*., 2023; Zou *et al*., 2024).

Com isso, a partir dos perfis de ácidos graxos apresentados por ambos os óleos avaliados (OPM e OAM), o óleo da polpa da macaúba (OPM) foi selecionado para as etapas seguintes.

5.1.2. Análises físico-químicas (Índices de acidez e peróxido)

Além do perfil de ácido graxos, outros fatores importantes da composição do óleo são a sua acidez e a quantidade de peroxido. Nesse caso, esses índices estão diretamente relacionados a ingestão desse óleo, seja na alimentação, ou em outra aplicação, indicando a quantidade de ácidos graxos livres no óleo e sua oxidação, respectivamente (Remonatto *et al.*, 2023).

Assim, após a definição de qual óleo seria empregado nas reações de acidólise, a etapa seguinte foi a determinação dos índices de acidez e peroxido do OPM e um comparativo com o referencial definido pela IN N°87 de 2021 (BRASIL, 2021, IN n°87) (tabela 6).

Tabela 6 - Comparativo entre o óleo da polpa de Macaúba com o referencial para óleos não refinados definido pela IN N°87 de 2021.

Índices	Óleo da polpa da macaúba	Referencial (IN N°87 de 2021)
Acidez (mg KOH/g)*	4,8	4
Peróxido (meq/Kg)**	14,1	15

Fonte: Autor, 2024. *mg KOH/g representa o número de mg de KOH necessário para neutralizar os ácidos graxos livres (AGL) não esterificados presentes em 1 grama de amostra. ** meq/Kg

representa a quantidade de peroxido de oxigênio por quilograma de amostra, onde a quantidade de peroxido é relatada em miliequivalentes.

Assim, nota-se que para óleos não refinados, o valor máximo permitido para o índice de peróxido é de 15 meq/Kg de amostra, com o OPM apresentando um valor dentro dessa faixa permitida, como já esperado.

Em relação ao índice de acidez, o OPM apresentou um valor acima do permitido pela Instrução Normativa, alcançando um valor 20% maior do que o referencial máximo. Assim, para o OPM, o resultado apresentado acima do referencial, determina que seu consumo não seria indicado para uma ingestão direta.

Para a reação de acidólise, esse valor de acidez, também não é uma problemática, pois essa quantidade de ácido graxos livres presentes no óleo não resultam em uma competição com o ácido que se tem interesse de incorporar. Pois, durante a etapa das reações, emprega-se grandes quantidades do ácido que se deseja incorporar, o que favorece a substituição pela molécula de desejo (ácido cáprico). Além disso, ressalta-se que, para a síntese dos TAGs dietéticos, trabalhar com esse excesso do ácido cáprico, faz necessário uma etapa posterior de separação dos triacilgliceróis e dos ácidos graxos livres que não foram incorporados, reduzindo o valor desse índice para zero. Com isso, o produto final torna-se apito para consumo.

5.2. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases

5.2.1. Avaliação da capacidade catalítica (Atividade hidrolítica e de esterificação) dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios

Após a caracterização do óleo, a etapa seguinte foi a síntese das células integras provenientes de fungos filamentosos produtores de lipases (LAMs) para a seleção do melhor biocatalisador que foi empregado nas reações posteriores de acidólise. Neste contexto, foram avaliadas 4 linhagens diferentes de fungos filamentosos conhecidos pela produção de lipases: *Rhizopus arrhizus, Aspergillus tubingensis, Rizomucor miehei e Aspergillus oryzae* (Sharma *et al.*, 2018; Souza-Gonçalves *et al.*, 2023; Tamalampudi *et al.*, 2007). Para todos os microrganismos testados foram realizados os cultivos submersos, o tratamento

das biomassas, como apresentado nos itens 4.3.1. e 4.3.2., medida sua massa após o cultivo e determinado tanto sua umidade, quanto sua atividade hidrolítica e de esterificação (Tabela 7 e 8).

Desta forma, observa-se que os cultivos de todas as linhagens avaliadas foram bem sucedidos na síntese da biomassa catalítica, rendendo entre 6 e 12 gramas de biomassa úmida para cada 100 mL de meio de cultivo, e após o tratamento (item 4.3.2.) todos alcançaram uma umidade inferior a 15% (tabela 7).

Tabela 7 - Dados de massa úmida e de umidade das LAMs de cada um dos 4 fungos filamentosos avaliados na obtenção das LAMs.

	LAMs de fungos filamentosos produtores de lipases			
	***Aspergillus tubingensis* (LAM – AT)**	***Rhizopus arrhizus* (LAM – RA)**	***Rhizomucor miehei* (LAM – RM)**	***Aspergillus oryzae* (LAM – AO)**
Massa úmida (g/100 mL de meio de cultivo)	6,5 ± 1,02	10,8 ± 2,5	12,01 ± 1,3	8,9 ± 3,6
Umidade (%)	14,6	11,8	11,03	11,36

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 8 - Comparativo entre as atividades hidrolítica e de esterificação das LAMs de cada um dos 4 fungos filamentosos avaliados.

	LAMs de fungos filamentosos produtores de lipases			
	***Aspergillus tubingensis* (LAM – AT)**	***Rhizopus arrhizus* (LAM – RA)**	***Rhizomucor miehei* (LAM – RM)**	***Aspergillus oryzae* (LAM – AO)**
Atividade hidrolítica (U/g)	955,73 ± 31,65	451,95 ± 20,82	120,16 ± 12,48	540,19 ± 40,44
Atividade de esterificação (U/g)	989,08 ± 30,33	332,17 ± 59,81	238,74 ± 9,57	792,86 ± 28,3

Fonte: Autor, 2024.

Além disso, os biocatalisadores provenientes de todas as linhagens avaliadas apresentaram capacidade de hidrolisar triacilgliceróis e de sintetizar ésteres. Assim, nota-se que o biocatalisador proveniente do *R. miehei* (LAM-RM), detém os menores valores de atividade, indicando uma menor produção da lipase intracelular que está ligada na membrana ou na parede celular do microrganismo.

No entanto, para as LAMs produzidas empregando os fungos do gênero *Aspergillus*, *o A. tubingensis* (LAM-AT) e *A. oryzae* (LAM-AO), apresentaram tanto os maiores valores de atividade hidrolítica quanto de esterificação. Tais resultados se demonstram interessantes e alinhados com os trabalhos que exploraram esse gênero de fungo filamentoso para a produção desse tipo de biocatalisador para a síntese de diferentes ésteres, desde biosolventes até na produção de biodiesel (Adachi *et al.*, 2013; Almyasheva *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2016; Tamalampudi *et al.*, 2007; Tamborini *et al.*, 2013). Em especial, Kirdi e colaboradores (2017) já haviam demonstrado o potencial das lipases associadas aos micélios de *Aspergillus oryzae* na produção do acetato de cis-3-hexen-1-ila, um éster amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, alcançando 98% de rendimento após 24 horas, e assim, evidenciando sua capacidade para a síntese de compostos em meios orgânicos.

5.2.2. Avaliação da regio-especificidade dos diferentes biocatalisadores associados aos micélios

Outro fator crucial, como mencionado anteriormente, para a síntese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, é necessidade de a lipase possuir a especificidade para atuar apenas nas posições externas dos TAGs. No entanto, por mais que a maioria dos trabalhos de aplicação de LAMs utilize fungos filamentosos produtores de lipases 1,3 – especificas, ainda não há na literatura estudos realizando essa análise para os biocatalisadores provenientes desses fungos (Adachi *et al.*, 2013; Athalye *et al.*, 2013; Ban *et al.*, 2001; Kirdi *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2022; Tamalampudi *et al.*, 2007; Tamborini *et al.*, 2013). Para determinar essa especificidade, empregou-se o método para a determinação do perfil composicional na posição Sn-2 em óleos e gorduras (Caballero *et al*., 2014) (item 4.3.4). Tal método utiliza de uma enzima com especificidade conhecida para atuar apenas nas posições externas, a lipase pancreática de porco (LPP), permitindo ter apenas o perfil de ácidos graxos presentes na posição 2 (Sn-2). Assim, ao realizar o mesmo procedimento com uma lipase que não possui sua especificidade conhecida e comparar com o perfil dos principais ácidos graxos apresentado pela LPP (maior que 1%), é possível determinar se esse outro

catalisador possui a mesma característica de hidrolisar apenas nas posições mais externas do triacilglicerol (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Comparativo entre o perfil dos principais de ácidos graxos presentes na posição sn-2 (interna) de um óleo hidrolisado por uma enzima comercial 1,3 – especifica (LPP) e pela LAM do Aspergillus tubingensis.

Biocatalisadores	***Ácidos Graxos do óleo de oliva após a Sn-2 (%)***		
	C16	**C18:1**	**C18:2**
Lipase pancreática do porco (LPP)	$0,9 \pm 0,3^{a}$	$57,32 \pm 1,5^{b}$	$38,90 \pm 1,33^{c}$
Aspergillus tubingensis	$0,77 \pm 0,12^{a}$	$58,62 \pm 2,68^{b}$	$39,67 \pm 1,74^{c}$

Fonte: Autor, 2024. * A repetição das letras indica que os dados não possuem diferença estatística significativa de acordo com teste de Tukey (p<0,05) (OriginPro 2016).

Tabela 10 - Comparativo entre o perfil dos principais ácidos graxos presentes na posição sn-2 (interna) de um óleo hidrolisado por uma enzima comercial 1,3 – especifica (LPP) e pela LAM dos demais fungos.

Ácidos Graxos do óleo de macaúba após a Sn-2 (%)				
Composição	**Lipase pancreática do porco (LPP)**	***Rhizopus arrhizus***	***Rhizomucor miehei***	***Aspergillus oryzae***
C16	$3,52 \pm 0,7^{c}$	$12,6 \pm 2,66^{d}$	$4,77 \pm 1,46^{c}$	$2,73 \pm 0,47^{c}$
C18:1	$79,78 \pm 1,63^{e}$	$77,02 \pm 1,8^{e}$	$78,42 \pm 1,94^{e}$	$78,84 \pm 0,46^{e}$
C18:2	$13,66 \pm 1,2^{f}$	$10,25 \pm 1,71^{f}$	$11,88 \pm 2,13^{f}$	$15,88 \pm 1,18^{f}$

Fonte: Autor, 2024. * A repetição das letras indica que os dados não possuem diferença estatística significativa de acordo com teste de Tukey (p<0,05) (OriginPro 2016).

Inicialmente, a primeira LAM que teve sua especificidade avaliada foi a proveniente do *A. tubingensis* (LAM - AT) devido aos maiores valores de atividade hidrolítica e de esterificação apresentados na tabela 8, o que poderia indicar um maior potencial para sua aplicação em outras reações, como a de acidólise. Com isso, a partir do comparativo entre o perfil de ácidos graxos presentes na posição interna (sn-2) do óleo de oliva hidrolisado pela lipase pancreática do porco (LPP) e pela LAM – AT, é perceptível a semelhança entre os perfis, indicando que o biocatalisador de interesse possui a mesma especificidade que a lipase comercial 1,3 – especifica (LPP). Desse modo, como a lipase associada ao micélio de *A. tubingensis* possui a especificidade para atuar nas posições extremas, torna-se um possível candidato para o emprego nas reações de acidólise.

Já na tabela 10, é apresentado o comparativo entre o perfil de ácidos graxos presentes na posição interna (sn-2) do óleo de macaúba hidrolisado pela lipase pancreática do porco (LPP) e pelas outras LAMs testadas (LAM – RA, LAM – RM e LAM - AO). Desse modo, inicialmente, a LAM de *R. arrhizus*, não apresentou o mesmo perfil de hidrolise do óleo que a enzima comercial com a especificidade conhecida (diferença na quantidade de C16:0), indicando que esse catalisador não poderia ser empregado para a síntese de TAG dietético do tipo MLM por não possuir a especificidade necessária para a síntese desse tipo de TAG modificado, mesmo apresentando valores consideráveis de atividade hidrolítica e de esterificação.

No entanto, para as biomassas fúngicas com atividade lipolítica provenientes do *R. miehei e A. oryzae,* o perfil de hidrolise do óleo foi semelhante ao apresentado pela enzima comercial com a especificidade conhecida, indicando que suas lipases também poderiam ser empregadas para a síntese de TAG dietético do tipo MLM, assim como o biocatalisador proveniente do *A. tubingensis*.

5.2.3. Reações Preliminares de acidólise

Para definir com qual catalisador seria empregado nas próximas etapas, foi realizado uma reação teste de acidólise do óleo da polpa da macaúba, empregando o ácido cáprico como substituinte em uma razão molar 1:6 (óleo: ácido) (m/m), a 45°C por 24 horas (Bassan *et al.*, 2019) (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparativo entre o grau de incorporação do ácido cáprico empregando os três biocatalisadores 1,3 – específicos.conferir

Bicatalisadores	Grau de incorporação do ácido cáprico (mol%)
LAM - AT	0,34 ± 0,12
LAM - RM	0,71 ± 0,41
LAM - AO	14,3 ± 1,9

Fonte: Autor, 2024.

Assim, com a tabela 8, evidencia-se que por mais que as biomassas fúngicas provenientes do *A. tubingensis* e do *R. miehei* possuam atividade hidrolítica e de esterificação superior ao de outras lipases associadas a micélios

encontrados em outros trabalhos e sejam 1,3 – especificas, não são capazes de fazer a substituição dos ácidos graxos originais pelo ácido cáprico. Como não se encontram trabalhos aplicando esse tipo de catalisador nas reações de acidólise, não é possível realizar um comparativo direto com a literatura.

No entanto, como já apresentado anteriormente, diversos trabalhos empregando lipases comerciais de *R. miehei* demonstram sua capacidade de incorporar o ácido desejado nas moléculas de triacilglicerol (Bassan *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2024; Remonatto *et al.*, 2023; Simões *et al.*, 2021; Souza-Gonçalves *et al.*, 2023; Zou *et al.*, 2024). Isso faz com que seja esperado que a LAM – RM também fosse capaz de realizar tal modificação, demonstrando uma discrepância em relação a esse resultado. Porém, uma hipótese que pode auxiliar na justificativa dos resultados é a própria estrutura do biocatalisador, já que para a reação de acidólise, empregou-se apenas as matérias-primas (óleo e ácido cáprico) e a biomassa contendo as lipases associadas, sem o emprego de nenhum solvente. Assim, a disponibilidade e o acesso das lipases, presentes nesses biocatalisadores, ao óleo é dificultado, acarretando em problemas de transferência de massa dentro do reator e, consequentemente, em um menor grau de incorporação, já que para alcançar a enzima dentro do suporte o substrato precisa permear por toda a biomassa fúngica. Tal problemática já é de conhecimento quando se emprega biocatalisadores de células integras no geral, não somente para enzimas associadas a micélios fúngicos, em que é necessário muitas vezes melhorar o acesso da enzima pelo substrato para ter um maior rendimento na sintese de interesse (Lin; Tao, 2017).

Outro fator que pode explicar a falta de especificidade da LAM-RM, que é observada na lipase comercial do *R. miehei*, é a possibilidade de que a enzima comercial tenha sofrido alteração na sua conformação durante seu processamento e/ou durante a etapa de imobilização, levando a modificação da especificidade do biocatalisador. Essa afirmação é reforçada pelo fato de que enzimas comerciais, nesse caso as lipases, podem sofrer modificações que resultam em melhorias nas propriedades desse biocatalisadores, mas que possam acabar resultando na modificação de outras propriedades (Xu *et al.*, 2025)

Da mesma forma que o *R. miehei*, *o A. oryzae* também produz lipases comerciais empregadas em reações de acidólise (Cao *et al.*, 2024; Yue *et al.*,

2020; Zou *et al.*, 2024). No entanto, apenas a LAM – AO apresentou capacidade para ser aplicada em reações de acidólise ao conseguir incorporar com sucesso 14,3 mol% de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol.

Assim, considerando o tipo de triacilglicerol dietético que é o objetivo do trabalho (MLM), é possível obter até 66,6 mol% de incorporação do ácido cáprico, já que na posição interna do triacilglicerol, deve-se manter o ácido original. Logo, considerando esse contexto, é possível afirmar que as lipases associadas aso micélios *de A. oryzae* obtiveram um rendimento de 21,45%.

Ademais, como ainda não há estudos prévios de aplicação desse tipo de biocatalisador (LAM) para reações de acidólise, esses resultados obtidos demonstram o potencial que essas enzimas possuem para aplicação na área de lipídeos estruturados. Uma vez que foi empregado um biocatalisador natural, ou seja, sem qualquer modificação genética do microrganismo para intensificar sua atividade, e, por isso, traz ao processo um caráter mais sustentável e economicamente viável. Pois, como já mencionado, grande parte dos custos de bioprocessos está relacionada ao custo do biocatalisadores empregados, principalmente nas etapas de purificação e imobilização das enzimas (Kutyła *et al*., 2024; Matias *et al*., 2023;Reis *et al*., 2022; Zhou *et al*., 2022).

Nesse contexto, foi selecionada para dar continuidade das próximas etapas as lipases associadas aos micélios do *Aspergillus oryzae* (LAM - AO) como biocatalisador das reações de acidólise.

5.3. Caracterização do biocatalisador

5.3.1. Avaliação da faixa de pH e temperatura na atividade do biocatalisador

Após a seleção da biomassa fúngica com especificidade e capacidade de realizar as reações de acidólise, foi feita uma caracterização do biocatalisador para avaliar sua performance. Para isso, um DCCR (2^2) foi aplicado para uma possível descrição, por um modelo matemático, da forma com que os parâmetros selecionados se relacionam com a performance do biocatalisador, sendo que para o caso foi avaliado a relação do pH e da temperatura nas faixas propostas (variáveis independentes) (item 4.3.5). A variável resposta foi a atividade hidrolítica (4.3.3.). A matriz do DCCR e os resultados experimentais estão

apresentados na Tabela 12 e a análise da influência de cada variável independente na figura 5 (gráfico de Pareto).

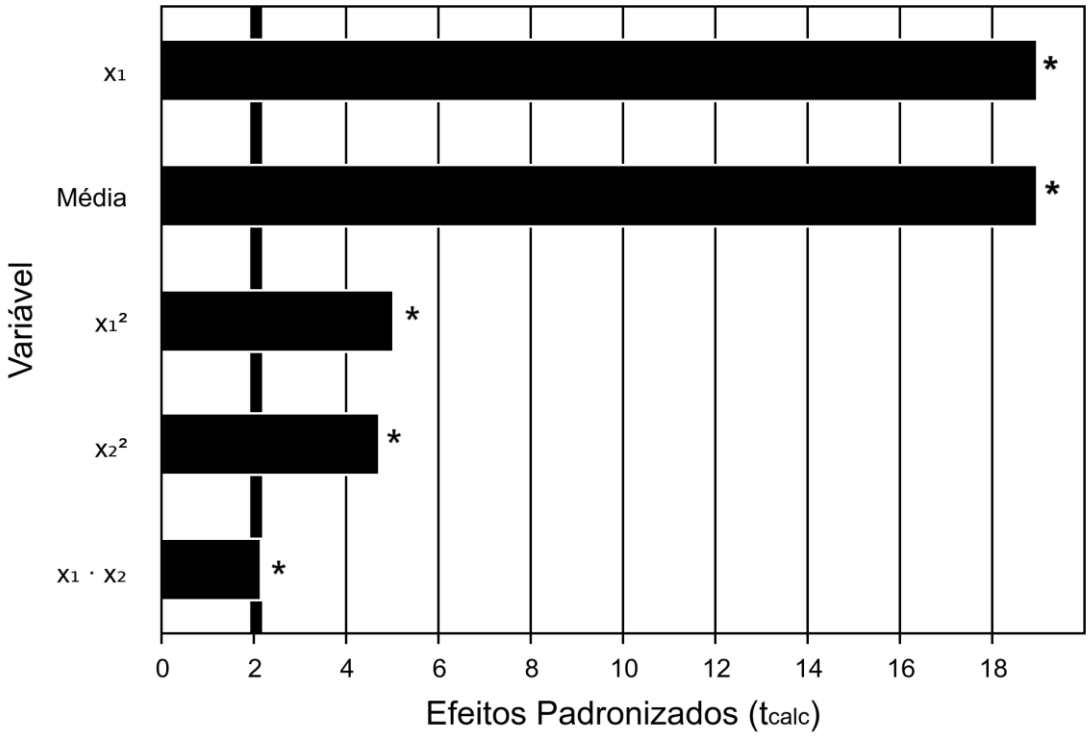
Tabela 12 - Matriz do Delineamento composto central rotacional fatorial 2^2 mostrando valores codificados e reais (entre parênteses) de cada variável independente (pH e temperatura) e resultados da hidrólise do azeite de oliva catalisada pela LAM – AO após 5 minutos.

Número de experimentos	**pH**	**Temperatura (°C)**	**Atividade hidrolítica (U/g)**
	X_1	**X_2**	**Y**
I	-1 (5)	-1 (30)	22,89
II	-1 (5)	-1 (30)	15,51
III	-1 (5)	-1 (30)	22,1
IV	1 (8)	-1 (30)	112,83
V	1 (8)	-1 (30)	118,45
VI	1 (8)	-1 (30)	112,27
VII	-1(5)	1 (50)	37,06
VIII	-1(5)	1 (50)	38,65
IX	-1(5)	1 (50)	38,21
X	1(8)	1 (50)	99,03
XI	1(8)	1 (50)	115,38
XII	1(8)	1 (50)	115,01
XIII	-1,41 (4,38)	0 (40)	27,1
XIV	-1,41 (4,38)	0 (40)	34,62
XV	-1,41 (4,38)	0 (40)	19,16
XVI	1,41(8,62)	0 (40)	103,68
XVII	1,41(8,62)	0 (40)	104,53
XVIII	1,41(8,62)	0 (40)	119,43
XIX	0 (6,5)	-1,41 (25,86)	73,76
XX	0 (6,5)	-1,41 (25,86)	65,85
XXI	0 (6,5)	-1,41 (25,86)	73
XXII	0 (6,5)	1,41 (54,14)	70,04
XXIII	0 (6,5)	1,41 (54,14)	70,14
XXIV	0 (6,5)	1,41 (54,14)	66,82
XXV	0 (6,5)	0 (40)	88,61

XXVI	0 (6,5)	0 (40)	106,5
XXVII	0 (6,5)	0 (40)	104,18

Fonte: Autor, 2024.

Figura 5 – Gráfico de Pareto da análise das variáveis do planejamento referente à caracterização do biocatalisador (p<0,05).



Fonte: Autor, 2024. * Variáveis significativas.

A partir da análise estatística dos dados experimentais (Protimiza®) (Figura 5), obteve-se que ambas variáveis apresentam influência significativa na atividade da enzima, sendo que o pH (X_1) apresentou um efeito positivo sobre o catalisador. Já em relação a temperatura (X_2), apenas o termo quadrático apresentou um efeito significativo na atividade do biocatalisador. O termo linear de X_2 não demonstra ter um efeito significativo na atividade hidrolítica na faixa estudada.

Em seguida, utilizando os dados experimentais, foram estimados os coeficientes de regressão e construído um modelo de segunda ordem para detalhar o efeito de cada variável independente (item 4.3.5). Assim, o modelo matemático descreve a atividade hidrolítica do biocatalisador (Y) em função do pH (x_1) e da temperatura (x_2) (Equação 5) e apresentou um coeficiente de regressão de 94,84%.

$$Y = 99,76 + 35,31\ x_1 - 15,44\ x_1^2 - 14,51\ x_2^2 - 5,63\ x_1\ x_2 \qquad (5)$$

Dessa forma, para a construção do modelo (Equação 4), foram considerados apenas parâmetros significativos ($p < 0,05$). Neste caso, os parâmetros foram: os termos lineares do pH (X_1) e os termos quadráticos de ambas as variáveis e a interação entre elas.

A partir da ANOVA (tabela 13), também feita pelo software (Protimiza®), foi avaliado a adequação do modelo. Com isso, a análise obteve valor de F (77,1) maior que o valor crítico de F (2,68), indicando que o modelo polinomial descreveu adequadamente a influência da temperatura e do pH na capacidade de hidrolisar do biocatalisador.

Tabela 13 - Tabela da analise ANOVA da caracterização do biocatalisador.

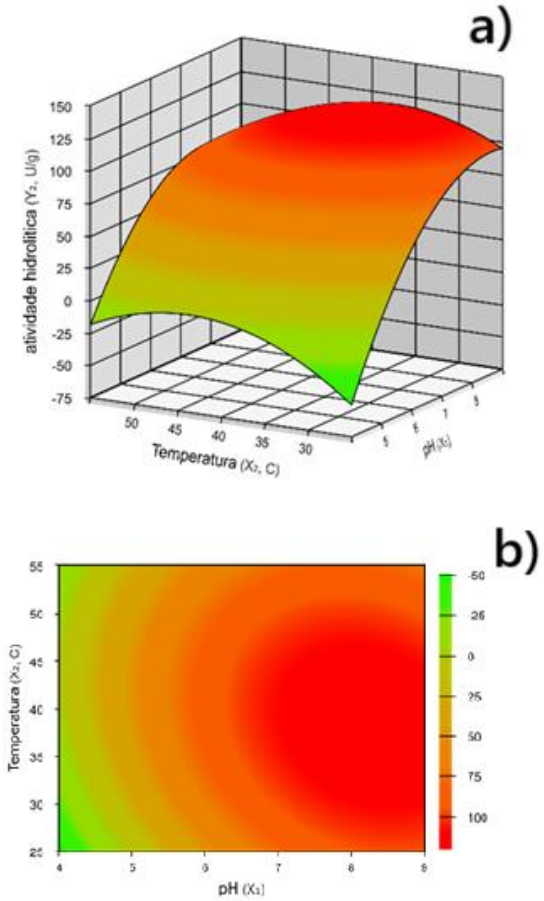
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F_{calc}	p-valor
Regressão	32711,35	4	8177,83	98,61	$1,02*10^{-13}$
Resíduos	1824,38	22	82,9		
Falta de Ajuste	1081,58	4	270,39	6,55	0,0019
Erro Puro	742,81	18	41,27		
Total	34535,74	26			

Fonte: Autor, 2024.

Por fim, a partir deste modelo matemático obtido, foi gerado superfícies de resposta, que tomam forma de acordo com os parâmetros significativos (figura 6). Assim, nota-se curvaturas nos eixos de X_1 e X_2 (parábolas), que estão vinculadas aos termos quadráticos das variáveis independentes apresentados no modelo (Eq (2)), indicando um ponto que representa a atividade máxima do catalisador nessas condições e uma diminuição conforme se afasta desse ponto. Esse perfil parabólico é característico para enzimas, que por serem moléculas biológicas, apresentam um perfil com uma faixa ou apenas um ponto ótimo de parâmetros como temperatura e pH, e um decréscimo de sua atividade conforme se afasta dessa condição ótima (Zhang, Hua Wei *et al.*, 2024). Além disso, a superfície 3D de resposta demonstra visualmente de forma eficiente os efeitos das variáveis independentes avaliadas, indicando um efeito maior na atividade

hidrolítica do biocatalisador quando se emprega condições mais alcalinas (pH entre 7 e 9) e na faixa de 25°C a 50°C.

Figura 6 - A)Superfície 3D de resposta e B) representação 2D para atividade de hidrólise das células íntegras de A. oryzae.



Fonte: Protimiza Experimental Design, 2024.

Por fim, observa-se que a combinação de um meio mais alcalino e temperaturas mais brandas demonstraram uma maior atividade para a LAM - AO (pH 8 e a 30°C), com um decaimento importante da atividade hidrolítica quando a variável x_1 (pH) diminuía. Esse comportamento pode estar relacionado com os problemas de transferência de massa e energia já relatados para esse tipo de catalisador (Lin; Tao, 2017). Pois, pelo fato de as enzimas de interesse estarem associadas na biomassa do fungo filamentoso inativado, seu comportamento se assemelha ao de uma enzima imobilizada em suporte físicos, o que pode impedir uma influência direta de parâmetros reacionais como a temperatura,

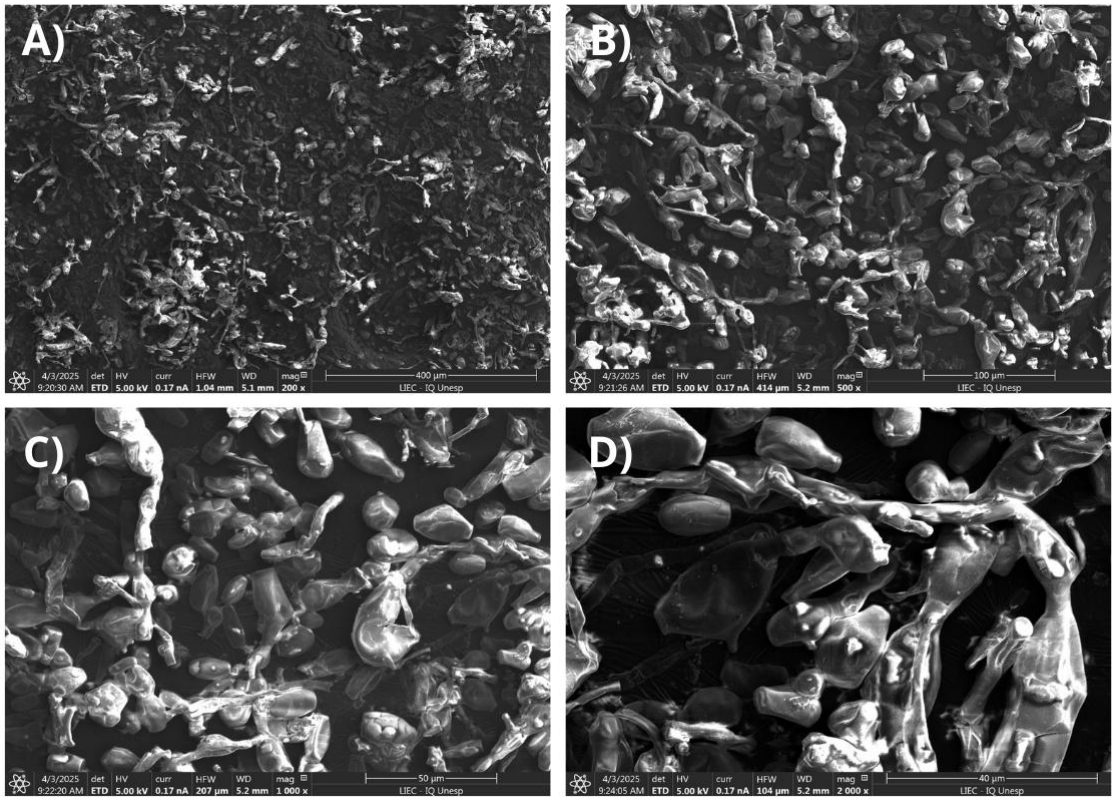
principalmente quando considera-se o tempo de reação, que neste caso, é curto (10 min).

Entretanto, esse efeito não foi observado para o pH, que como mencionado anteriormente, quanto maior, maior a atividade também. Neste caso, esse comportamento pode ser associado a estrutura do próprio biocatalisador, que desempenha uma maior capacidade lipolítica em condições mais alcalinas. Esse comportamento vai de encontro com o relatado na literatura, em que a atividade da lipase do *A. oryzae* alcança seus valores máximos na faixa entre 30 e 40°C e pH entre 7 e 8 (Zhang, Hua Wei *et al.*, 2024).

5.3.2. Análise morfológica com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a caracterização das lipases associadas ao micélio de *A. oryzae* quanto ao pH e a temperatura já realizado, a etapa seguinte foi a analise morfológica da estrutura do biocatalisador por microscopia eletrônica de varredura (figura 7).

Figura 7 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície do micélio de A. oryzae: a) ampliação de 200 x. b) ampliação de 500 x. c) ampliação de 1000 x. d) ampliação de 2000 x.



Fonte: Autor, 2024.

Assim, nas figuras 7-A (ampliação de 200 x) e 7 – B (ampliação de 500 x) já é possível ver ao fundo as estruturas presentes na superfície do biocatalisador, como as ramificações das hifas que mantem a estrutura do micélio, com uma distribuição uniforme ao longo da biomassa fúngica. Além disso, nas figuras 7 – C e 7 – D (ampliações de 1000 x e 2000 x), é possível observar com uma melhor resolução essas estruturas presentes na biomassa, como a distribuição das hifas que mantém o micélio unido e estável, fornecendo rigidez ao biocatalisador. Essa disposição das hifas e a presença dessas estruturas globulares e/ou alongadas, são características e observadas para micélios de fungos do gênero *Aspergillus* (Cesário *et al.*, 2021).

Além disso, tal resultado vai de encontro com algumas observações experimentais, como a manutenção da estrutura do biocatalisador em reações com agitações constantes por longos períodos (24 horas e 48 horas). Nesse caso, após a reação, tanto a integridade da biomassa era mantida, quanto sua recuperação era de fácil execução, indicando que mesmo após os tratamentos dos cultivos (item 4.3.2. - Corte, congelamento, liofilização e tratamento com hexano), os pedaços da biomassa fúngica contendo as enzimas de interesse, ainda mantiveram sua estrutura integra, diferentemente do observado experimentalmente com outras LAMs de outros fungos filamentosos.

5.4. Síntese dos triacilgliceróis dietéticos: análise da influência dos parâmetros e otimização

Com o biocatalisador e a matéria prima selecionados e caracterizados, a etapa posterior foi a avaliação da influência dos parâmetros da reação de síntese dos triacilgliceróis dietéticos (acidólise): quantidade de biocatalisador, temperatura e a razão molar de ácido cáprico e óleo, durante 24 horas. Tais parâmetros foram selecionados por serem apontados em diversos trabalhos como alguns dos principais fatores que impactam reações de acidólise pela via enzimática (Bassan *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Jadhav; Annapure, 2021; Lin; Tao, 2017; Reyes-Reyes; Valero Barranco; Sandoval, 2022)

Para isso, um DCCR (2^3) foi aplicado para uma possível descrição, por um modelo matemático, da forma com que as variáveis independentes

selecionadas (quantidade de biocatalisador, temperatura e razão molar) se relacionam com a performance do biocatalisador nas reações de acidólise, para a síntese dos triacilgliceróis dietéticos na faixa proposta. A variável resposta foi o grau de incorporação de ácido cáprico. A matriz DCCR e os resultados experimentais são apresentados na Tabela 14.

A análise estatística da influência separada de cada variável independente (teste t) é apresentada na figura 8 (gráfico de Pareto).

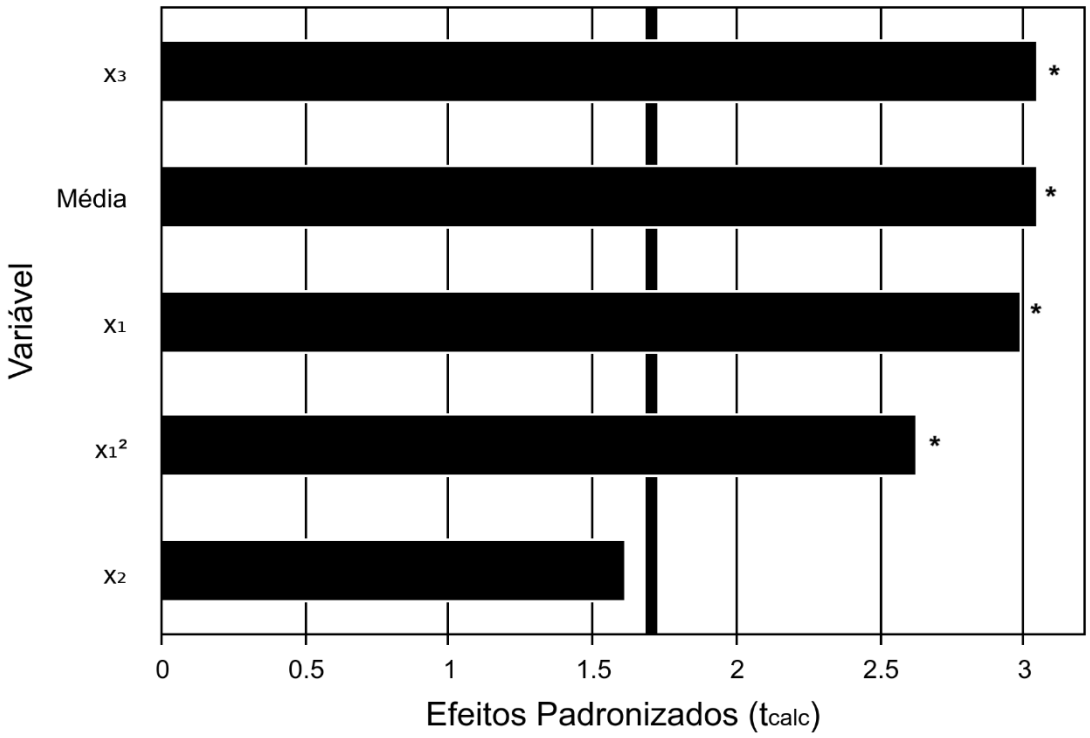
Tabela 14 - Matriz do Delineamento composto central rotacional fatorial 2³ mostrando valores codificados e reais (entre parênteses) de cada variável independente (quantidade de biocatalisador, temperatura e razão molar) na reação de síntese dos triacilgliceróis dietéticos (acidólise) catalisada pela LAM – AO após 24 horas.

Número de Experimentos	**Quantidade de biocatalisador (% m:m)**	**Temperatura (°C)**	**Razão molar (óleo: ácido)**	**Grau de incorporação (mol%)**
	X_1	**X_2**	**X_3**	**Y**
I	-1 (3)	-1 (40)	-1 (1:4)	1,29
II	-1 (3)	-1 (40)	-1 (1:4)	1,43
III	1 (7)	-1 (40)	-1 (1:4)	3,58
IV	1 (7)	-1 (40)	-1 (1:4)	3,25
V	-1 (3)	1 (60)	-1 (1:4)	0,77
VI	-1 (3)	1 (60)	-1 (1:4)	0,76
VII	1 (7)	1 (60)	-1 (1:4)	1,18
VIII	1 (7)	1 (60)	-1 (1:4)	1,56
IX	-1 (3)	-1 (40)	1 (1:9)	5,57
X	-1 (3)	-1 (40)	1 (1:9)	5,12
XI	1 (7)	-1 (40)	1 (1:9)	12,10
XII	1 (7)	-1 (40)	1 (1:9)	15,21
XIII	-1 (3)	1 (60)	1 (1:9)	24,12
XIV	-1 (3)	1 (60)	1 (1:9)	25,90
XV	1 (7)	1 (60)	1 (1:9)	8,17
XVI	1 (7)	1 (60)	1 (1:9)	8,10
XVII	-1,68 (1,63)	0 (50)	0 (1:6,5)	34,45
XVIII	-1,68 (1,63)	0 (50)	0 (1:6,5)	31,85
XIX	1,68 (8,36)	0 (50)	0 (1:6,5)	4,03
XX	1,68 (8,36)	0 (50)	0 (1:6,5)	4,19
XXI	0 (5)	-1,68 (33,18)	0 (1:6,5)	6,21
XXII	0 (5)	-1,68 (33,18)	0 (1:6,5)	7,63
XXIII	0 (5)	1,68 (66,81)	0 (1:6,5)	15,43
XXIV	0 (5)	1,68 (66,81)	0 (1:6,5)	19,92
XXV	0 (5)	0 (50)	-1,68 (1:2,29)	3,23
XXVI	0 (5)	0 (50)	-1,68 (1:2,29)	2,13

XXVII	0 (5)	0 (50)	1,68 (1:10,70)	8,98
XXVIII	0 (5)	0 (50)	1,68 (1:10,70)	8,96
XXIX	0 (5)	0 (50)	0 (1:6,5)	2,09
XXX	0 (5)	0 (50)	0 (1:6,5)	1,81
XXXI	0 (5)	0 (50)	0 (1:6,5)	2,06

Fonte: Autor, 2024.

Figura 8 - Gráfico de Pareto da análise das variáveis do planejamento referente as reações de acidólise (p<0,1).



Fonte: Autor, 2024. * Variáveis significativas.

A partir da análise estatística dos dados experimentais teste t, realizado com o auxílio do software Protimiza® (Figura 8), verificou-se que tanto as variáveis X_1 (Quantidade de biocatalisador) e X_3 (Razão molar) apresentaram efeitos significativos na síntese dos triacilgliceróis dietéticos empregando a LAM-AO, quando comparados com a X_2 (Temperatura).

Observou-se que a quantidade de biocatalisador influenciou a reação tanto de forma linear quanto quadrática, indicando que concentrações muito baixas ou excessivamente altas podem comprometer sua eficiência. Em concentrações mais baixas, especialmente em torno de 3% ou menos, foi obtido um maior grau de incorporação. No entanto, à medida que a quantidade de

biocatalisador no reator aumentava, esse desempenho diminuía. Experimentalmente, verificou-se que o uso de concentrações elevadas resultava em sobrecarga do reator, com excesso de biomassa. Esse excesso comprometia a homogeneidade da mistura, tornando o sistema visualmente menos eficiente e possivelmente reduzindo o rendimento da reação. Dessa forma, os valores obtidos nessas condições podem ter sido subestimados devido à limitação física do sistema.

Nesse caso, observou-se que a quantidade de biocatalisador apresentou tanto um efeito linear, quanto um efeito quadrático, indicando que tanto concentrações mais baixas quanto elevadas podem impactar a eficiência da reação. Em menores concentrações, como 3% ou menos, o grau de incorporação foi maior, diminuindo conforme a porcentagem de biocatalisador no reator aumentava. Essa afirmação é reforçada quando observou-se experimentalmente que o uso de concentrações elevadas resultava em sobrecarga do reator, com excesso de biomassa. Esse excesso comprometia a homogeneidade da mistura, já que visualmente era perceptível que no sistema, a mistura não era tão eficaz, reduzindo o rendimento da reação. Dessa forma, os valores obtidos nessas condições podem ter sido subestimados devido à limitação física do sistema.

No entanto, concentrações mais elevadas de biocatalisador (como 7%, nos experimentos XI e XII) também apresentaram bons resultados, possivelmente devido à maior disponibilidade de sítios catalíticos, o que pode ter compensado os problemas de transferência de massa nessas condições (experimentos XI e XII). Nesse caso, essa maior disponibilidade de sítios catalíticos compensando a problemática da dificuldade do substrato de acessar as enzimas já é de conhecimento para enzimas imobilizadas (Zhou *et al.*, 2022). Assim, uma opção que vai de encontro com o que foi observado nessas condições é o emprego de outros modelos de reatores, como um reator de leito fixo, em que ocorre o aprisionamento do biocatalisador no reator e é feita a passagem do meio reacional ao longo do reator. Essa configuração permite que o substrato tenha sua passagem forçada pela enzima, o que permite diminuir esses efeitos de transferência de massa que resultam em resultados subestimados (Remonatto *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022).

Para a razão molar, o efeito foi o oposto (positivo), já que quanto maior era a proporção de ácido cáprico para a de óleo, também era maior o grau de incorporação (Experimentos V, VI e XIII, XIV, por exemplo). Ademais, ao comparar esses resultados obtidos com outros trabalhos de síntese de triacilgliceróis dietéticos, observa-se um comportamento semelhante quando se aumenta a razão molar (óleo: ácido), causando um deslocamento da reação para a formação de mais produto (Bassan *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2024; Miotti *et al.*, 2024), reforçando essa interpretação dos resultados.

Já em relação a temperatura, na faixa avaliada não foi observado uma influência nas reações de acidólise. Tal fato vai de encontro com o observado na literatura, em que já é relatado a estabilidade térmica desse biocatalisadores, ou seja, o efeito da temperatura acaba sendo menor devido as características morfológicas da própria biomassa fúngica (Lin; Tao, 2017). Desse modo, como as lipases estão associadas na própria estrutura do micélio, essa estrutura acaba preservando as enzimas de efeitos do meio reacional, como a temperatura, fazendo com que seja necessário empregar faixas maiores de temperatura para observar o impacto dessa variável. Isso é observado no trabalho de Kirdi e colaboradores (2017), em que empregando LAMs de *Aspergillus oryzae* na síntese de acetato de cis-3-hexen-1-ila, obtiveram os melhores rendimentos em uma faixa acima de 50°C, com o melhor resultado obtido a 70°C, indicando a necessidade de empregar esse tipo de biocatalisador em temperaturas maiores.

Em seguida, utilizando os dados experimentais, foram estimados os coeficientes de regressão e construído um modelo de segunda ordem (Eq. 6) para detalhar o efeito de cada variável independente utilizando o software Protimiza Experimental Design (item 4.4).

$$Y_1 = 5{,}43 - 4{,}01\, x_1 + 3{,}76\, x_1^2 + 2{,}17\, x_2 + 4{,}09\, x_3 \qquad (6)$$

Ademais, a partir da ANOVA (tabela 15), também feita pelo software Protimiza®, com $p < 0{,}1$, foi avaliado a adequação do modelo. Assim, por mais que de $F_{regressaõ/resíduos}$ do modelo (6,9) seja maior que o valor de $F_{tabelado}$ (2,17), o que indicaria que o modelo ainda é adequado para a descrição da influência das variáveis, nota-se que no teste F de falta de ajuste, o valor de $F_{de\ falta\ de\ ajuste}$

$_{\text{do modelo}}$ (91,8) é maior que o valor de F_{tabelado} (2,03), o que indica que o modelo não representa com precisão a variância apresentada nos dados experimentais.

Essa falta de ajuste do modelo aos dados experimentais, mesmo empregando um nível de significância maior (10%), pode ser associado a grande variabilidade apresentada em sistemas envolvendo catalisadores biológicos, como no caso de reações enzimáticas (Rodrigues; Iemma, 2014).

Essa variabilidade observada pode estar relacionada ao tipo de biocatalisador utilizado. Como se trata de um processo de “imobilização natural das enzimas”, sem controle preciso sobre sua organização, é possível que as lipases se distribuam de forma aleatória ao longo do micélio. Isso pode gerar diferenças de desempenho até mesmo entre lotes distintos do mesmo biocatalisador. Isso é perceptível neste caso, já que essa falta de ajuste pela variabilidade apresentada, pode ser relacionada ao tipo de biocatalisador empregado. Como se trata de um processo de “imobilização natural das enzimas”, sem controle preciso sobre sua organização, é possível que as lipases se distribuam de forma aleatória ao longo do micélio, fazendo com que se tenha uma variação até mesmo dentro do próprio lote de biocatalisador produzido. Além disso, como a própria biomassa (o micélio) atua como um suporte, o seu formato não uniforme também impacta no acesso do próprio substrato ao sitio catalítico ao longo dos pedaços do bioatalisador, fazendo com que cada porção de biomassa possa apresentar valores distintos, resultando nas variações observadas e dificultando uma análise mais precisa do seu comportamento nas condições empregadas (Lin; Tao, 2017).

Tabela 15 - Tabela da analise ANOVA do planejamento das reações de acidólise.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	Fcalc	p-valor
Regressão	1362,12	4	340,53	6,94	0,00061
Resíduos	1274,08	26	49,01		
Falta de Ajuste	1252,26	10	125,22	91,83	$3{,}44*10^{-12}$
Erro Puro	21,81	16	1,36		
Total	2636,21	30			

Fonte: Autor, 2024.

Portanto, mesmo que o primeiro teste F ($F_{\text{regressaõ/resíduos}}$) tenha sido satisfatório, o segundo teste ($F_{\text{de falta de ajuste do modelo}}$) demonstrou que o modelo

não descreve com precisão a variância apresentada nos dados experimentais. Ademais, o modelo (Eq. 6) apresentou um coeficiente de determinação de apenas 51,67%. Esse valor indica que o modelo é capaz de representar apenas parte da variação observada nos dados experimentais. Em outras palavras, 49% dos efeitos observados experimentalmente, não podem ser explicados pelo modelo matemático construído.

Essa capacidade limitada do modelo gerado pode estar relacionada a alguns fatores, como a própria variabilidade dos dados não pode ser explicada adequadamente por limitações do sistema reacional ou do próprio biocatalisador (Rodrigues; Iemma, 2014; Baş; Dudak; Boyaci, 2007; Do Nascimento *et al*., 2024).

Portanto, considerando esses fatores, também fica evidente a necessidade de maiores estudos referentes a esses biocatalisadores, avaliando também outras variáveis, como a própria homogeneização do meio (agitação), para entender melhor quais apresentam impactos maiores nas reações estudadas.

Nesse caso, como já mencionado, foi observado visualmente durante a execução dos experimentos de algumas das reações de acidólise, que a agitação foi um fator bem limitante para um sistema com uma boa homogeneização do biocatalisador no meio reacional (Germec; Turhan, 2023). Isso resultou não só em uma grande variabilidade dos resultados, como possivelmente um resultado subestimado, já que para esse tipo de biocatalisador, as problemáticas relacionadas a transferência de massa dentro do “suporte natural”, não só são relatadas, mas como também se mostram de grande impacto nas reações em que se empregam as LAMs (Lin; Tao, 2017).

Além da agitação, ainda em relação a estrutura do biocatalisador, outro fator que pode ter afetado foi a faixa de temperatura avaliada. Por mais que essa variável não teve um impacto direto nas reações de acidólise, em parte pode ser relacionado a faixa escolhida (33,2°C a 66,8°C), já que por tratar-se de uma reação com um substrato viscoso, empregar um biocatalisador tenha essas problemáticas relacionadas a transferência de massa, empregar maiores temperaturas pode resultar em uma melhora nos resultados obtidos. Isso é observado no estudo de de Kirdi e colaboradores (2017), em que empregando LAMs de *A. oryzae* obteve os melhores resultados em faixas maiores de

temperatura, como já mencionado. No entanto, para a reação de acidólise, essa variável também é um fator limitante, já que por ser uma reação que ocorre por um período longo (pelo menos 24 horas), outros efeitos podem ser observados no produto final, como uma possível oxidação do óleo, ou até mesmo efeitos de acil migração que já são relatados (Zhang, Youfeng *et al.*, 2024).

Ainda assim, o planejamento empregado também retornou resultados interessantes quanto ao grau de incorporação, demonstrando a importância de mais estudos referentes ao emprego desses biocatalisadores, para que seja possível entender quais são os parâmetros que realmente tem efeitos significativos e de forma mais precisa e otimizada. Dessa forma, a partir dos resultados apresentados na tabela 14, nota-se que que a LAM – AO alcançou um valor máximo de 33,15 mol% de incorporação do ácido cáprico nos triacilgliceróis do OPM nas condições de 1,63% de enzima, 50°C e uma razão molar (óleo: ácido) de 1:6,5. Esse valor de 33,15 mol%, representa 50% de rendimento da síntese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, uma vez que 66,67 mol% seria o máximo de incorporação (100% de rendimento).

Este resultado se mostra promissor visto que com uma menor concentração de biocatalisador e uma razão molar média foi alcançado o maior grau de incorporação. Outra condição empregando uma concentração menor de catalisador e uma razão molar maior (3% de catalisador, 60°C e razão molar de 1:9) também demonstrou um resultado expressivo de 25% de incorporação do C10:0, quando comparado às outras condições do planejamento.

Dese modo, considerando esses valores de graus de incorporação de ácido cáprico alcançados, principalmente nas duas condições mencionadas, para o tipo de biocatalisador empregado (LAM), os resultados obtidos se mostram satisfatórios. O emprego de um biocatalisador alternativo, obtido sem a necessidade de diversas etapas como de imobilização em suportes físicos e com um custo de produção menor associado, forneceu resultados similares aos apresentados em trabalhos empregando enzimas imobilizadas comerciais (Bassan *et al.*, 2019; Liu; Akoh, 2024; Miotti *et al.*, 2024). Por exemplo, Bassan (2019) e colaboradores, utilizando a Lipozyme® RM IM, alcançaram 34,53 mol% de incorporação, e Liu e Akoh (2024), que obtiveram até 47 mol% de incorporação nas posições 1 e 3 dos TAGs modificados, com o mesmo

catalisador (Lipozyme® RM IM) mas empregando outros óleos como matéria-prima.

Com isso, nota-se que o emprego das células integras biocataliticas não só forneceu resultados satisfatórios, como atingiu valores próximos ao de lipases comerciais, como a Lipozyme® RM IM, que é amplamente empregada para reações de acidólise (Bassan *et al*., 2019; Cozentino *et al*., 2022; Liu; Akoh, 2024).

5.5. Teste comparativo entre modos de agitação na reação de acidólise

Com os parâmetros de maior grau de incorporação, na faixa avaliada, definidos, foi realizado um teste comparativo entre dois modos de agitação no reator operando em modo batelada, a fim de determinar qual permitiria um maior grau de incorporação de ácido cáprico nos triacilgliceróis presentes no óleo da polpa da macaúba. Isso se deve ao fato que parâmetros como a agitação são essenciais para uma melhora na transferência de calor e massa no reator, como mencionado no item anterior (item 5.4), e consequentemente, atingir uma maior homogeneização dentro do sistema (Germec; Turhan, 2023).

Para essa etapa é importante ressaltar que foi empregado uma agitação próxima a 400 RPM, já que foi observado que foi a menor velocidade em que obteve-se uma homogeneização completa do biocatalisador. Os resultados foram apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Resultados de grau de incorporação da análise comparativa entre os modos de agitação no reator operando em modo batelada na reação de acidólise.

Tipo de agitação	Grau de incorporação (mol%)
Magnética	24,40 ± 2,66
Mecânica	20,73 ± 1,05

Fonte: Autor, 2024.

Assim, observa-se que a reação conduzida empregando a agitação magnética, obteve um maior grau de incorporação, sendo 15% maior do que a reação que utilizou a agitação mecânica. Esse resultado indica que o sistema

empregando a agitação magnética propiciou uma maior homogeneização do meio reacional, mesmo empregando velocidades similares (400 RPM).

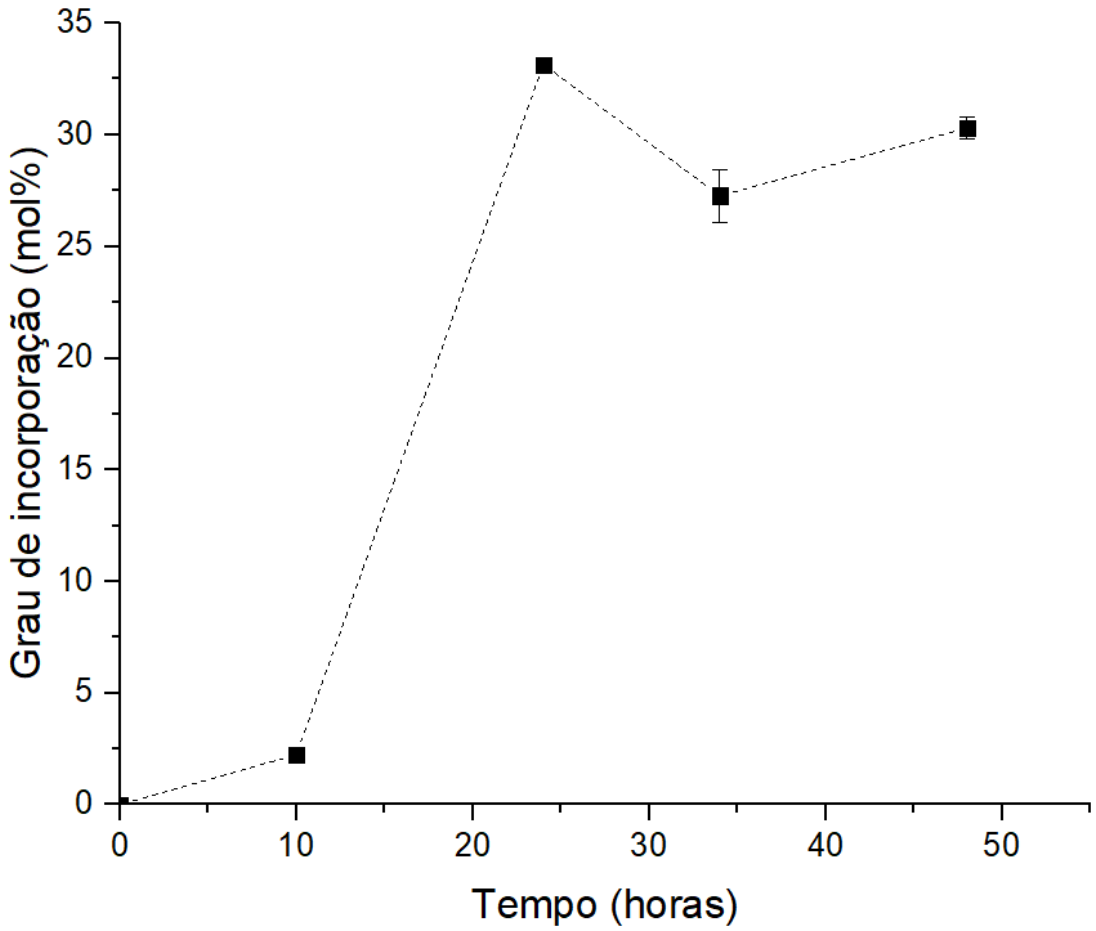
Dessa forma, a partir desses resultados, foi definido que para as próximas etapas foi empregado o sistema com a agitação magnética.

5.6. Avaliação do efeito do tempo na reação de acidólise empregando LAMs como biocatalisadores

Com a melhor condição de temperatura, razão molar (óleo: acido) e quantidade de biocatalisador definida, a próxima etapa foi a avaliação do efeito do tempo na reação de acidólise (figura 9).

Assim, após 48 horas de reação foi alcançado um grau de incorporação de 30,3 mol%, indicando que para esse lote de LAM-AO, esse é o máximo de incorporação possível dentro do período avaliado (o dobro do tempo relatado na literatura). No entanto, nota-se que após as primeiras 24 horas de reação (período de tempo padrão para reações de acidólise na literatura), obteve-se 33,15 mol% de incorporação, correspondendo ao grau de incorporação máximo.

Figura 9 - Resultado da avaliação do efeito do tempo na reação de acidólise empregando a LAM-AO como biocatalisadores.



Fonte: Autor, 2024.

Com isso, é perceptível que mesmo dobrando o tempo da reação, não há aumento no grau de incorporação de ácido cáprico no triacilglicerol, indicando que com apenas 24 horas alcança-se o grau de incorporação máximo.

Além disso, quando se compara tais valores de grau de incorporação com os observados na literatura com enzimas comerciais, nota-se que para reações de acidólise de 24 horas, em diversos trabalhos é obtido valores entre 20 e 30 mol%, como no trabalho de Caballero e colaboradores (2014), que empregando a Lipozyme TL IM, após 24 horas, obteve 29 mol% de incorporação e Nunes e colaboradores (2011), utilizando a Novozyme 435, alcançou 25 mol%, também após 24 horas (Lee *et al.*, 2022).

Dessa forma, esse comparativo reforça o potencial do biocatalisador avaliado, pois como mencionado anteriormente, as características referentes a esse tipo de catalisador (enzima imobilizada naturalmente na estrutura da

biomassa fúngica), como problemas difusionais, em geral, acabam fazendo com que seja necessário maiores tempos de reação para a obtenção de rendimentos próximos ao de enzimas comerciais. No entanto, neste caso, tais resultados foram obtidos no mesmo tempo (24 horas) que o obtido por enzimas comerciais (Lee *et al.*, 2022).

5.7. Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise

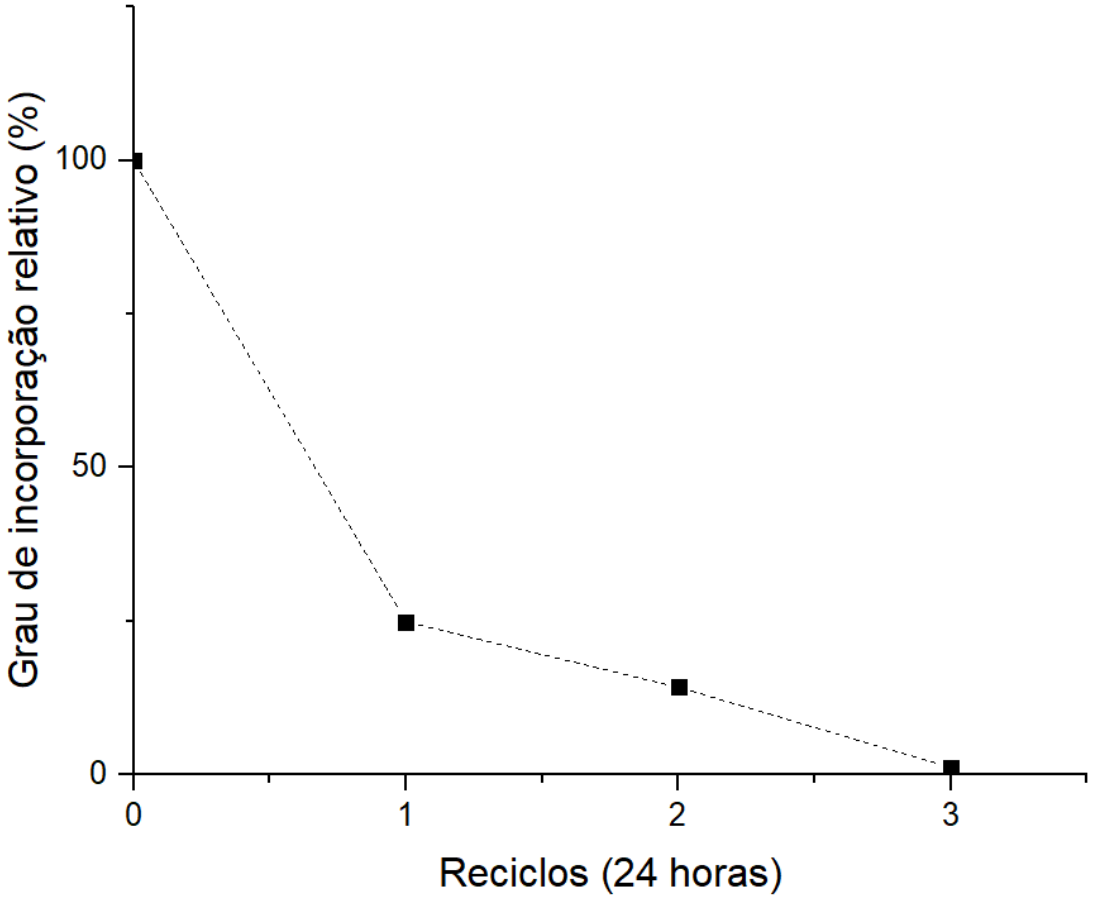
Assim, referente a otimização da sintese dos triacilgliceróis dietéticos, por último foi avaliado o número de ciclos de reuso (reciclos) das LAMs de *Aspergillus oryzae* na reação de acidólise com o óleo da polpa de macaúba (Tabela 17 e figura 10).

Tabela 17 - Grau de incorporação em cada ciclo de reuso das LAMs nas reações de acidólise (24 horas).

Reciclos (24h)	Grau de incorporação relativo (%)
0	100
1	24,93
2	14,30
3	1,23

Fonte: Autor, 2024.

Figura 10 - Avaliação do número de ciclos de reuso das LAMs nas reações de acidólise em grau de incorporação relativo.

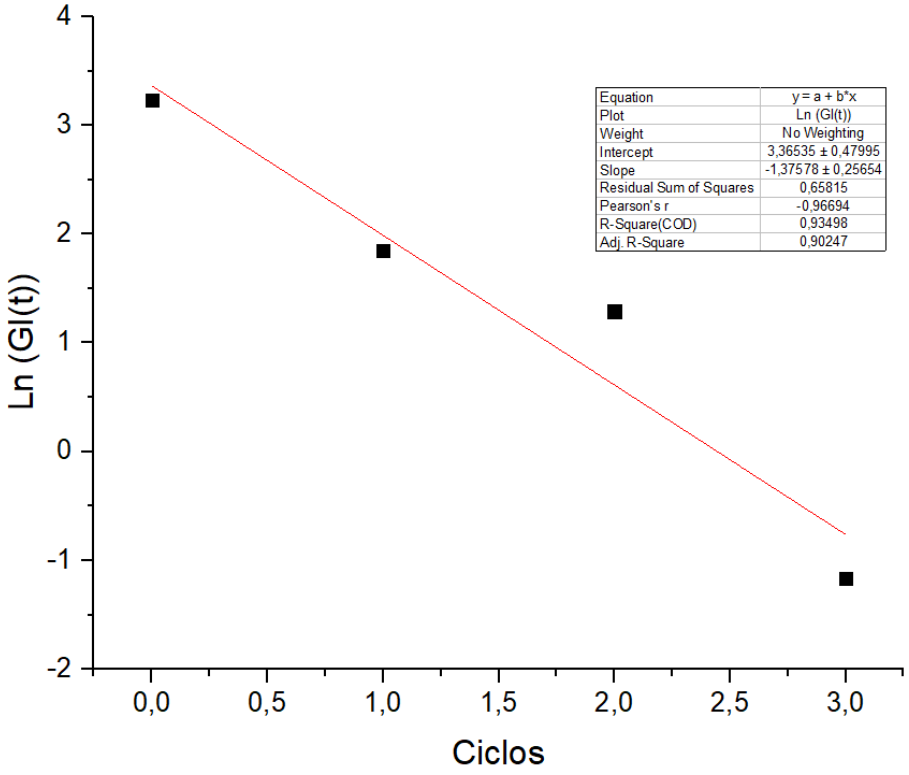


Fonte: Autor, 2024.

Sendo assim, observa-se que após 3 ciclos o biocatalisador acaba perdendo consideravelmente a sua capacidade de catalisar a reação de acidólise ao atingir valores próximos ao zero de grau de incorporação. Além disso, após um único ciclo de reuso, a LAM-AO tem uma queda de quase 75% do grau de incorporação do ácido cáprico.

Ademais, a partir dos valores de grau de incorporação obtidos em cada ciclo, foi possível determinar a constante de desativação (k_d) e, consequentemente, o tempo de meia vida do biocatalisador nas reações de acidólise (figura 11).

Figura 11 - Linearização dos dados experimentais referentes aos ciclos de reuso da LAM-AO nas reações de acidólise.



Fonte: Autor, 2024.

Assim, seguindo a equação 1 (item 4.6.), foi realizada a linearização para a determinação de constante de desativação (figura 11), obtendo um k_d de 1,38 ciclo^{-1}. A partir desse valor, empregando a equação 2 (variação da equação 1), também foi possível determinar o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), obtendo-se um valor de 0,50 ciclo.

Contudo, é importante ressaltar que não se encontram trabalhos que avaliam o reuso desse tipo de biocatalisador, mesmo que se trate de um biocatalisador que possui características semelhantes ao de enzimas imobilizadas.

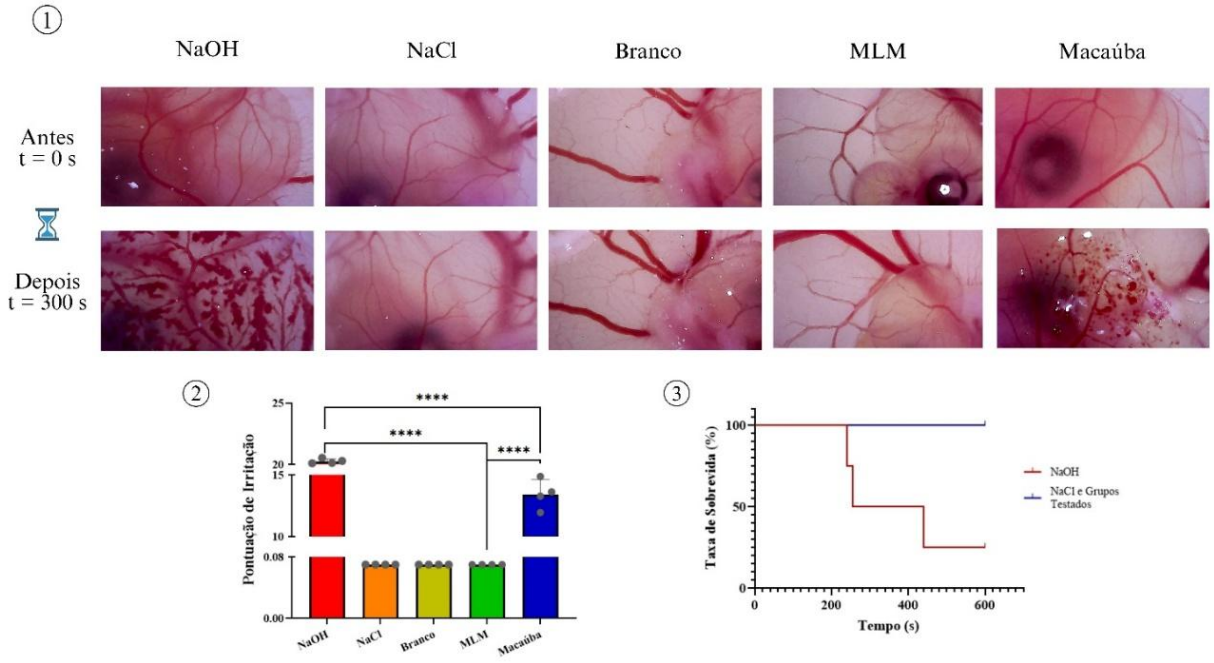
5.8. Aplicação do Modelo HET CAM na Avaliação da Segurança Vascular (toxicidade) e Potencial Antiangiogênico dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM

Após a determinação das melhores condições para a sintese do triacilgliceróis dietéticos, a última etapa do projeto foi a avaliação da toxicidade e do potencial antigiogenico do OPM modifcado.

5.8.1. Avaliação da toxicidade

Incialmente foi avaliada a toxicidade do óleo modificado e os resultados são apresentados na figura 12.

Figura 12 - (1) Imagens capturadas nos tempos de 0 e 300 segundos, evidenciando as alterações vasculares na membrana corioalantoide (CAM) dos diferentes grupos experimentais; (2) Classificação semiquantitativa da irritação com base na escala HET-CAM; (3) Taxa de sobrevivência embrionária avaliada até 600 segundos após a aplicação dos compostos; (4) Tabela comparativa entre os grupos experimentais, indicando os valores médios da Pontuação de Irritação (SI) e as respectivas classificações visuais segundo a escala HET-CAM.



④

	NaOH	NaCl	Branco	MLM	Macaúba
Pontuação de Irritação	20,27 ±0,19	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	13,44 ± 1,20
Pontuação de HET-CAM	+++	–	–	–	+++

Fonte: Autor, 2025. Imagem elaborada com BioRender.com.

Assim, a aplicação de 300 µL de NaOH 0,1 M sobre a membrana corioalantoide (CAM) resultou em resposta irritativa severa (pontuação HET-

CAM = +++), caracterizada por lise vascular precoce, seguida por hemorragia intensa e coagulação visível. O índice de irritação médio observado para o grupo NaOH foi de 20,27 ± 0,20, confirmando sua utilização como controle positivo de toxicidade no ensaio. Em contraste, os grupos controle negativo (NaCl 0,9%) e branco (éter) apresentaram ausência de alterações vasculares significativas, com valores médios de 0,07 ± 0,00, compatíveis com classificação negativa (–) para irritação ocular, como também esperado.

Já as formulações contendo o OPM sem modificações provocaram alterações vasculares compatíveis com irritação severa (pontuação HET-CAM = +++), apresentando pontuação média de 13,44 ± 1,20. As reações incluíram lise, hemorragia e coagulação em tempos inferiores aos 300 segundos. Enquanto as formulações contendo o óleo modificado (OPM – MLM), por sua vez, não induziram alterações na integridade vascular da CAM, resultando em pontuação SI = 0,07 ± 0,00, sem sinais de hemorragia, lise ou coagulação (classificação HET-CAM = –).

Além disso, a análise estatística revelou diferença significativa entre o grupo tratado com NaOH e todos os demais grupos ($p < 0,0001$), confirmando a reprodutibilidade do teste e a formulação do OPM original também apresentou diferença significativa em relação aos grupos NaCl, Branco (éter) e o OPM - MLM ($p < 0,0001$), indicando potencial irritativo relevante da amostra.

A viabilidade embrionária foi mantida em todos os grupos, com exceção do NaOH, em que houve perda de viabilidade em dois dos quatro embriões avaliados após 600 segundos (Figura 12).

Desse modo, pelo OPM – MLM não apresentar toxicidade ao modelo avaliado, pode ser um indicativo do potencial de aplicações, tanto para o consumo direto, quanto para formulações visando diferentes aplicações, como farmacêuticas (Caicedo-Paz *et al.*, 2025; Guo *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022).

Entretanto, para o óleo da polpa da macaúba sem modificações, o potencial toxico apresentado pode ser associado a alguns fatores, como suas características físico-quimicas (índice de acidez e peroxido).

Em relação a esse fator mencionado, uma hipótese que pode corroborar esse resultado, é o fato de que o OPM apresentou um valor acima do permitido para a acidez e um valor próximo ao limite do índice de peroxido, como observado no item 5.1.1. (Análises físico-químicas (Índices de acidez e peróxido)). Isso pode ter acarretado nos processos de lise e hemorragia observado durante a execução do ensaio, uma vez que já é relatado que valores elevados desses índices podem levar a formação de compostos reativos, como produtos secundários (aldeídos, cetonas ou dímeros e polímeros de triacilglieróis). Esses compostos, por sua vez, dependendo da concentração, podem levar a uma toxicidade no organismo (Álvarez Graña *et al.*, 2025). Como tal efeito de toxicidade não é observado no OPM – MLM, que após a modificação do óleo original e, consequentemente, a remoção dos ácidos graxos em excesso (processo de neutralização), esse óleo apresenta um valor de acidez igual a zero. E, assim, não se tem a formação desses compostos reativos mencionados, não resultando na mesma toxicidade apresentada pelo óleo original.

Um ponto já apresentado que pode impactar o resultado alcançado é que o óleo empregado é obtido por um processo alternativo, empregando sistemas aquosos e assistido por enzimas para que tenha-se um produto de maior qualidade e sem o emprego de solventes comumente empregados nesses processos de extração (Favaro *et al.*, 2022). No entanto, por tratar-se de um processo recente, não tem-se muitos estudos aprofundados sobre as características do óleo obtido por essa via, como a própria toxicidade e outros fatores, resultando em uma lacuna sobre suas possíveis aplicações. Ainda assim, é importante mencionar que por mais que o resultado obtido indique que o óleo extraído da polpa apresente essa toxicidade, já é bastante fundamentado que tanto o fruto da macaúba, quanto a sua polpa já são empregados popularmente para o consumo humano, seja alimentício, cosmético ou farmacêutico (Silva *et al.*, 2025; Traesel *et al.*, 2014).

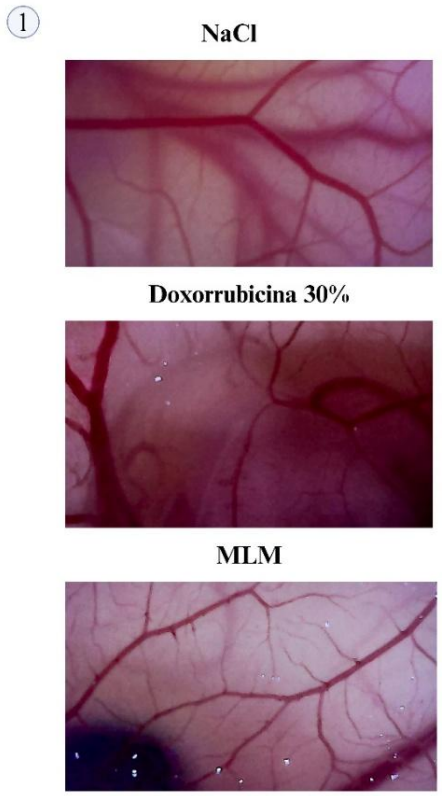
Ademais, tais resultados se mostram bastante promissores, já que por mais que o óleo original apresente uma toxicidade, o modificado (OPM – MLM) não apresentou. Isso pode indicar que o processamento a qual ele foi submetido (etapas de acidólise e de remoção dos ácidos graxos) não só foi eficaz para a

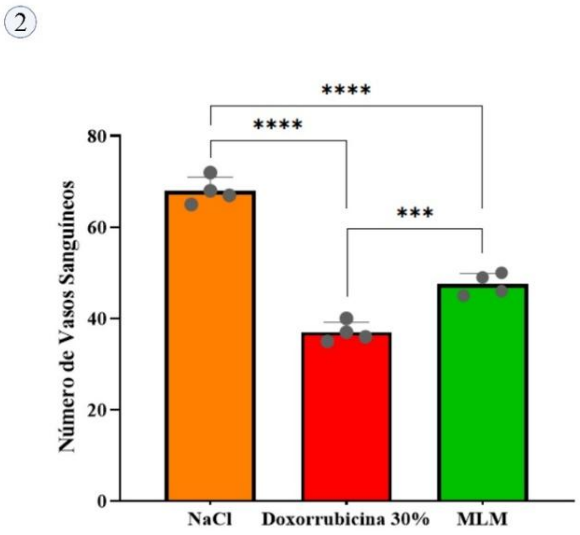
produção dos triacilgliceróis dietéticos, como também, mudou essa característica e permitir seu consumo.

5.8.2. Avaliação do potencial antiangiogênico

Após a determinação da toxicidade dos óleos, a etapa seguinte foi avaliação do potencial antiangiogênico do OPM -MLM (apenas o óleo que não apresentou toxicidade ao organismo). Os resultados estão apresentados na figura 13

Figura 13 - Avaliação da atividade antiangiogênica no modelo HET-CAM. (1) Imagens representativas da membrana corioalantoide (CAM) de ovos tratados com NaCl 0,9% (controle negativo), doxorrubicina a 30% (controle positivo) e formulação MLM, 48 horas após a aplicação dos tratamentos (volume de 300 µL); (2) Quantificação do número de vasos sanguíneos visíveis em cada grupo experimental.





3

	NaCl	Doxorrubicina 30%	MLM
Número de vasos sanguíneos	68,00 ± 2,94	37,00 ± 2,16	47,50 ± 2,38

Fonte: Autor, 2025. Imagem elaborada com BioRender.com.

Assim, a análise do número de vasos sanguíneos na membrana corioalantoide (CAM) revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados.

O grupo tratado com NaCl 0,9% apresentou intensa vascularização, com média de 68,0 ± 2,94 vasos, compatível com o padrão fisiológico de angiogênese embrionária (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014; Ribatti, 2017). Em contraste, a doxorrubicina a 30% promoveu uma redução significativa na formação de vasos, resultando em média de 37,0 ± 2,16 vasos (****p < 0,0001 vs. NaCl), correspondendo a uma diminuição absoluta de 31 vasos em relação ao controle negativo.

Já a formulação do OPM – MLM também demonstrou atividade inibitória, com média de 47,5 ± 2,38 vasos, o que representa uma redução de 20,5 vasos comparada ao NaCl (****p < 0,0001). Além disso, observou-se diferença significativa entre a MLM e a doxorrubicina (***p = 0,0006), com 10,5 vasos a mais no grupo tratado com a formulação oleaginosa (Figura 13).

Esses dados reforçam a aplicabilidade do modelo HET-CAM como ferramenta eficiente para triagem preliminar de compostos bioativos com possível efeito modulador sobre a angiogênese. Além disso, também indicam que, embora a formulação do OPM – MLM apresente efeito antiangiogênico inferior ao da doxorrubicina, sua atividade foi estatisticamente relevante frente ao controle, sugerindo um potencial moderado na inibição da angiogênese.

Desse modo, o óleo da polpa da macaúba, contendo os triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, além de não apresentarem uma toxicidade aos vasos sanguíneos (item anterior), como também apresentam uma possível capacidade inibitória na sua formação. Tais resultados demostram o potencial para uma gama de aplicações desse óleo, desde algumas já mencionadas como na alimentação para controle da obesidade ou na má absorção de lipídios no organismo, entre outras disfunções metabólicas, devido as propriedades naturalmente associadas aos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM (Zhou *et al.*, 2022), mas como outras aplicações na área farmacêutica e médica, como um composto bioativo com propriedades terapêuticas. Isso se deve ao fato de que compostos com esse potencial podem ser empregados na regulação de processos inflamatórios ou até mesmo na inibição da formação de tumores no organismo (Majima *et al.*, 2023; Nomura *et al.*, 2016; Rodríguez-Mortera *et al.*, 2025; Yan *et al.*, 2024).

Uma hipótese que pode auxiliar na explicação dessa capacidade inibitória do OPM – MLM pode estar relacionada com a modulação das vias metabólicas de transporte e sinalização de lipídios nas células endoteliais, como as mediadas por proteínas ligadoras de ácidos graxos. Nesse caso, a presença dessas proteínas nas células endoteliais, induzidas pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), permite que os ácidos graxos obtidos sejam empregados na formação de novos vasos(Majima *et al.*, 2023; Nomura *et al.*, 2016; Ultimo *et al.*, 2025; Yan *et al.*, 2024).

Assim, com esses novos vasos sendo formados, ocorre a estimulação da produção do VEGF, que por sua vez, induz a produção de mais proteínas ligadoras de ácidos graxos, realimentando o ciclo do processo de angiogênese (Majima *et al.*, 2023; Yan *et al.*, 2024). Dessa forma, o óleo modificado pode estar interferindo no processo de captação, de transporte intracelular ou então de sinalização dos ácidos graxos nas células endoteliais, o que acaba resultando em uma menor atividade das proteínas ligadoras de ácidos graxos e na não indução da formação de novos vasos sanguíneos.

Já em relação aos processos inflamatórios, o processo de angiogênese, que inicialmente ocorre para melhorar a resposta no tecido infectado ou danificado, pode fazer com que a inflamação se perpetue por um tempo maior, acarretando em edemas inflamatórios (Majima *et al.*, 2023). Com isso, semelhante ao apresentado para o processo de formação tumoral, compostos que tenham a capacidade de atuar modulando a angiogênese, podem minimizar a probabilidade de uma resposta descontrolado desse processo e evitar a formação dos edemas anteriormente mencionados (Majima *et al.*, 2023; Rodríguez-Mortera *et al.*, 2025).

No entanto, nos últimos anos, para intensificar o potencial desses compostos na regulação do processo de angiogênese, tem-se combinado diferentes estratégias, pois já é relatado que apenas a administração com o composto antiangiogênico não é suficiente para causar efeitos significativos no tratamento de pacientes (Ultimo *et al.*, 2025).

Assim, uma das estratégias que vem ganhando mais atenção são as formulações empregando nano carreadores para realizar uma entrega mais

direcionada do fármaco. Nesse caso, esse nano carreadores, em destaque os lipídicos como nanoemulsões, por exemplo, não só apresentam uma boa biocompatibilidade, como também permitem um direcionado e uma modulagem da liberação dos compostos de interesse no alvo, aumentando a eficácia do próprio tratamento(Faria *et al.*, 2024; Ultimo *et al.*, 2025). Nessa perspectiva, o óleo modificado (OPM – MLM) não apenas apresenta o potencial para aplicação nos tratamentos terapêuticos para a regulação do processo de angiogênese, como também se destaca pela possibilidade de ser incorporado em formulações de nanocarreadores, conferindo ao sistema uma dupla funcionalidade por poder atuar tanto como agente bioativo, quanto como componente estrutural da nanopartícula.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que o óleo da polpa de macaúba possui um perfil de ácidos graxos adequado para reações de acidólise, com mais de 70% de ácidos de cadeia longa, especialmente ácido oleico. Em contraste, o óleo da amêndoa é rico em ácidos graxos de cadeia curta, o que o torna indicado para a síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM. Em relação as lipases associadas ao micélio dos fungos avaliados, apenas três tiveram a especificidade para atuar nas posições externas do triacilglicerol, mas apenas as lipases associadas aos micélios fúngicos de *Aspergillus oryzae* (LAM – AO), apresentaram a especificidade necessária para a síntese dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM. Também foi possível determinar pelo menos uma condição com um grau de incorporação interessante na faixa avaliada (50% de rendimento - empregando menores concentrações desses biocatalisadores e maiores razões molares (ácido: óleo), obteve-se resultados próximos ao de biocatalisadores comerciais) e analisar a influência de alguns parâmetros sobre as reações de acidólise empregando a LAM-AO*,* em que foi observado uma influência tanto da razão molar, quanto da quantidade de biocatalisador empregado, sendo que, no caso desse último parâmetro, foi possível determinar outros fatores que impactam no rendimento de reações que utilizam esse tipo de biocatalisador, como a própria agitação. Ademais, a partir desses resultados, também foi possível concluir que empregando agitação magnética, o tempo de 24 horas foi o suficiente para a obtenção dos triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, mas que o seu reuso em outros lotes de reações de acidólise, não seria viável, já que tem-se uma queda 80% no rendimento após o primeiro uso. Por fim, foi avaliado a toxicidade tanto do óleo original, quanto do óleo modificado, sendo que este último não só não apresentou toxicidade mas como também demonstra um potencial antiangiogênico, ampliando as perspectivas de aplicação desse composto para além do uso em sistemas alimentícios.

Referências Bibliográficas

ABED, S. M. *et al*. Screening of lipases for production of novel structured lipids from single cell oils. **Process Biochemistry**, v.91, p.181-188, 2020.

ADACHI, D. *et al*. A robust whole-cell biocatalyst that introduces a thermo- and solvent-tolerant lipase into Aspergillus oryzae cells: Characterization and application to enzymatic biodiesel production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 6-7, p. 331-335, 10 maio 2013.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from Rhizomucor miehei and Yarrowia lipolytica by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1347-1361, 2004.

AI, H. *et al*. Structured lipids produced from palm-olein oil by interesterification: A controllable lipase-catalyzed approach in a solvent-free system. **Food Chemistry**, v. 412, 30 jun. 2023.

AKOH, C. C. Structured and Specialty Lipids. **Healthful Lipids**. United States of America: AOSC PRESS. 762 p., 2005.

ALMYASHEVA, N. R. *et al*. Biodiesel fuel production by Aspergillus niger whole-cell biocatalyst in optimized medium. **Mycoscience**, v. 59, n. 2, p. 147-152, 1 mar. 2018.

ÁLVAREZ GRAÑA, S. *et al*. Behaviour of sunflower (Helianthus annuus L.) oil and high oleic sunflower oil during the frying of churros. **Food Chemistry Advances**, [s. l.], v. 6, 2025.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5. ed. Urbana: AOCS Press, 2004.

ANDRADE, G. S. S. *et al*. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyll esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 2539-2548 2014.

ATHALYE, S. *et al*. Producing biodiesel from cottonseed oil using Rhizopus oryzae ATCC #34612 whole cell biocatalysts: Culture media and cultivation period optimization. **Energy for Sustainable Development**, v. 17, n. 4, p. 331–336, 2013.

BAN, K. *et al*. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles**.** **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.39-43, 2001.

BAŞ, D.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization IV: Investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 4, p. 1152–1158, abr. 2007.

BASSAN, N. *et al*. Enzymatic modification of grapeseed (Vitis vinifera L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. **LWT**, v. 99, p. 600-606, 1 jan. 2019.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes-A review. **Molecular Catalysis**, 2019.

BATISTA-DUHARTE, A. *et al*. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. **International Journal of Toxicology**, v.35, n.6, p.627- 633, 2016.

BORNSCHEUER, U. T. Enzymes in Lipid Modification. **Annual. Review. Food Science. Technology**., v. 9, p.85-103, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 87, de 15 de março de 2021. Estabelece listas de constituintes, limites de uso, alegações e rotulagem de suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 16 mar. 2021.

CABALLERO, E. *et al*. Potential use of avocado oil on structured Lipids MLM type production catalysed by commercial immobilised lípases. **Plos one**, v. 9, 2014.

CAICEDO-PAZ, A. *et al*. Protective effects of capric acid-rich medium-long-medium chain type structured lipids against metabolic abnormalities in mice fed a high-fat diet. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 66, 2025.

CAO, X. *et al*. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of medium-long-medium (MLM) type structured triacylglycerols from peony seed oil. **LWT,** v. 205, 1 ago. 2024.

CARPINTERO, R. *et al*., Acrocomia spp.: neglected crop, ballyhooed multipurpose palm or fit for the bioeconomy? A review. **Agronomy for Sustainable Development**, p.41-75, 2021.

CERVANTES-PAZ, B.; YAHIA, E. M. Avocado oil: Production and market demand, bioactive components, implications in health, and tendencies and potential uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food** SafetyBlackwell Publishing Inc., , 1 jul. 2021.

CÉSAR, A. *et al*. The prospects of using Acrocomia aculeata (macaúba) anon-edible biodiesel feedstock in Brazil. Renewable and Sustainable Energy **Reviews**, v. 49, p. 1213-1220, 2015.

CESÁRIO, L. M. *et al*. Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 1, 2021.

COLOMBO, C. A. *et al*. Macauba: A promising tropical palm for the production of vegetable oil. OCL - Oilseeds and fats, **Crops and Lipids**, v. 25, n. 1, 1 jan. 2018.

COZENTINO, I. DE S. C. *et al*. Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (Vitis vinifera L.) oil in associated packed bed reactors. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 101-109, 1 fev. 2022.

DE CASTRO, T. F. *et al*. Biotechnological valorization of mycelium-bound lipase of Penicillium purpurogenum in hydrolysis of high content lauric acid vegetable oils. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 161, p. 498-505, 1 maio 2022.

DO AMARAL, S. R. *et al*. Ex Vivo Biosafety and Efficacy Assessment of Advanced Chlorin e6 Nanoemulsions as a Drug Delivery System for Photodynamic Antitumoral Application. **Molecules,** v. 30, n.3, p.544, 2025.

DO NASCIMENTO, J. F. C. *et al*. Comparing a polynomial DOE model and an ANN model for enhanced geranyl cinnamate biosynthesis with Novozym® 435 lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103240, 1 jun. 2024.

DOBREV, G. *et al*. Characterization of Crude Lipase from *Rhizopus Arrhizus* and Purification of Multiplicity Forms of the Enzyme, Biotechnology & **Biotechnological Equipment**, v. 25, n.1, p.2295-2300, 2011.

DOS REIS, B. D. *et al*. Assessment of artificial neural networks to predict red colorant production by Talaromyces amestolkiae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 1, p. 147-156, 1 jan. 2023.

DOS SANTOS RIBEIRO, J. *et al*. Efficiency of heterogeneous catalysts in interesterification reaction from macaw oil (Acrocomia aculeata) and methyl acetate**. Fuel,** v. 200, p. 499-505, 2017.

FARIA, M. J. *et al*. Recent advances and strategies for nanocarrier-mediated topical therapy and theranostic for posterior eye disease. **Advance Drug Delivery Reviews**., v. 210, 2024.

FAVARO, S. P. *et al*. Aqueous extraction to high yield and quality of macauba (Acrocomia aculeata) pulp oil. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, 1 jun. 2022.

FREITAS, A. N. *et al*. Adsorption of extracellular lipase in a packed-bed reactor: an alternative immobilization approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** [s. l.], v. 47, n. 10, p. 1735-1749, 2024.

FUKUDA, H. *et al*. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 12, 2008.

GERMEC, M.; TURHAN, I. Effect of pH control and aeration on inulinase production from sugarbeet molasses in a bench-scale bioreactor. **Biomass Conversion and Biorefinery.** [s. l.], v. 13, p. 4727- 4739, 2023.

GUO, Y. *et al*. **Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids**: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food SafetyBlackwell Publishing Inc., , 1 mar. 2020.

HARTUNG, T. Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing. **ALTEX**: alternatives to animal experimentation., v.34, n.2, p.193-200, 2017. p.193-200, 2017.

IJAZ, H.; SUN, S. A review on preparation and application of low-calorie structured lipids in food system. **Food Science and Biotechnology,** v. 34, n.1, p.49-64**,** 2024.

JADHAV, H. B.; ANNAPURE, U. Designer lipids -synthesis and application – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 884-902, 1 out. 2021.

JI, J. *et al*. Using Aspergillus niger whole-cell biocatalyst mycelial aerobic granular sludge to treat pharmaceutical wastewater containing β-lactam antibiotics. **Chemical Engineering Journal**, v. 412, 15 maio 2021.

JI, Y. *et al*. Beyond the promise: exploring the complex interactions of nanoparticles within biological systems. **Journal of Hazardous Materials**, v.468, 2024.

KHASGIWALE, V. N.; WAGHMARE, J. T.; GOGATE, P. R. Intensified synthesis of olive oil-based structured lipids based on enzymatic acidolysis using multi-frequency ultrasound. **Chemical Engineering Science**, v. 302, 5 fev. 2025.

KIM, B.; HWANG, J.; AKOH, C. Liquid microbial lipase — recent applications and expanded use through immobilization**. Food Science,** v. 50, 100987, 2023.

KIRDI, R. *et al*. Mycelium-bound lipase from Aspergillus oryzae as efficient biocatalyst for cis-3-hexen-1-yl acetate synthesis in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 13–19, 1 abr. 2017.

KUTYŁA, M. *et al*. Mycelium-bound lipases of fungi as biocatalysts for biodiesel synthesis – A proposal to use FTIR as a rapid screening method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 204, 1 abr. 2024.

LEE, Y. Y. *et al*. Medium chain triglyceride and medium-and long chain triglyceride: metabolism, production, health impacts and its applications–a review. **Critical Reviews in Food Science and NutritionTaylor and Francis Ltd**., , 2022.

LI, Y. *et al*. Synthesis of medium and long-chain triacylglycerols by enzymatic acidolysis of algal oil and lauric acid. **LWT**, v. 136, 1 jan. 2021.

LI, Yang *et al*. Synthesis of medium and long-chain triacylglycerols by enzymatic acidolysis of algal oil and lauric acid. **LWT**, [s. l.], v. 136, 2021.

LIANG, S. *et al*. Preparation of structured lipid enriched with medium chain triacylglycerol by chemical catalyzed acidolysis of coconut oil: Optimized by response surface methodology. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 12, p. 1175–1185, 2019.

LIMA, R. T. *et al*. Mycelium-bound lipase from Penicillium citrinum as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 1 nov. 2019.

LIN, B.; TAO, Y. Whole-cell biocatalysts by design. Microbial Cell FactoriesBioMed Central Ltd., 13 jun. 2017.

LIU, X.; AKOH, C. C. Enzymatic Synthesis and Characterization of MLM-type Structured Lipid Using Grapeseed Oil and Capric Acid. **Journal of Oleo Science**, v. 73, n. 7, p. 977-990, 2024.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. Rhizopus oryzae lipase, a promising industrial enzyme: Biochemical characteristics, production and biocatalytic applications. **CatalystsMDPI**, 1 nov. 2020.

MAJIMA, M. *et al*. **A biologically active lipid, thromboxane, as a regulator of angiogenesis and lymphangiogenesis**. [S. l.]: Elsevier Masson s.r.l., 2023.

MARTÍNEZ-GALÁN, J. P. *et al*. Enzymatic synthesis of capric acid-rich structured lipids and their effects on mice with high-fat diet-induced obesity. **Food Research International**, v. 148, 110602, 2021.

MATIAS, A. B. *et al*. Mycelium-bound lipase as skillful biocatalysts: production of fatty acid concentrates from waste oils for the food industry. **Catalysis Communications**, v. 184, 1 nov. 2023.

MCKENZIE, B. *et al*. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, v.490, n. 1-2, 1-8, 2015.

MELANI, N.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143-158, 2020.

MIOTTI, R. H. *et al*. Enzymatic production process of capric acid-rich structured lipids: Development of formulation as a new therapeutic approach. International **Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, 1 fev. 2024.

NOMURA, S. *et al*. Inhibition of VEGF-dependent angiogenesis by the anti-CD82 monoclonal antibody 4F9 through regulation of lipid raft microdomains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 474, n. 1, p. 111-117, 2016.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v.17, n.4, p.779-804, 2014.

NUNES, P. A. *et al*. Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal American Oil Chemistry Society,** v. 88, p.473-480, 2011-b.

NUNES, P. A.; PIRES-CABRAL, P.; FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 993-998, 2011-a.

PAN, Z. *et al*. Biocatalytic behavior of a new Aspergillus Niger whole-cell biocatalyst with high operational stability during the synthesis of green biosolvent isopropyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B**: Enzymatic, v. 131, p. 10-17, 1 set. 2016.

QIU J, HAN, R.; WANG, C. Microbial halophilic lipases: A review. J Basic Microbiol. v. 61, p. 594-602., 2021.

RASPE, D. T. *et al*. Obtaining hydrolysate from macauba oil and its application in the production of methyl esters. **Grasas Aceites**, v.4, p.73, 2022.

REIS, W. S. M. *et al*. Production and Characterization of Whole-Cell Rhizopus oryzae CCT3759 to be Applied as Biocatalyst in Vegetable Oils Hydrolysis. **Catalysis Letters**, v. 152, n. 1, 1 jan. 2022.

REMONATTO, D. *et al*. **Utilization of Clay Materials as Support for *Aspergillus japonicus* Lipase**: An Eco-Friendly Approach. Catalysts, v. 11, 1173, 2021.

REMONATTO, D. *et al*. **Applications of immobilized lipases in enzymatic** reactors: A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

REMONATTO, D. *et al*. Solvent-Free Enzymatic Synthesis of Dietary Triacylglycerols from Cottonseed Oil in a Fluidized Bed Reactor. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 14, 2023.

REYES-REYES, A. L.; VALERO BARRANCO, F.; SANDOVAL, G. Recent Advances in Lipases and Their Applications in the Food and Nutraceutical Industry**. Catalysts**, v.12, n.9, 2022.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Estrategia experimental para fatoriais fracionados e DCCR. In: RODRIGUES, M. I. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas, SP: Cárita, 2014, p.135 – 232.

RODRÍGUEZ-MORTERA, R. *et al*. Non-enzymatic modification of aminophospholipids induces angiogenesis, inflammation, and insulin signaling dysregulation in human renal glomerular endothelial cells in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 235, p. 15-24, 2025.

SALGADO, C. *et al*. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, v.45, 101509, 2022.

SANT' ANA, C. T. *et al*. Macauba (Acrocomia aculeata) Pulp Oil Prevents Adipogenesis, Inflammation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 15, n. 5, 1 mar. 2023.

SHAH, H. *et al*. Comprehensive Insights into Microbial Lipases: Unveiling Structural Dynamics, Catalytic Mechanism, and Versatile Applications. **Current Microbiology**, 1 nov. 2024.

SHARMA, R. K. *et al*. Synthesis of Rhizopus arrhizus Lipase Nanoparticles for Biodiesel Production. **ACS Omega**, v. 3, n. 12, p. 18203-18213, 24 dez. 2018.

SHEKHAR, N. *et al*. **Potential of Capric Acid in Neurological Disorders**: An Overview. [S. l.]: Springer, 2023.

SILVA, J. T. *et al*. Chemical composition, antiparasitic activity, and cytotoxicity of fixed oils from Attalea speciosa Mart., Syagrus cearensis Noblick, and Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex R.Keith. **Pharmacological Research - Natural Products,** v. 6, p. 100166, 2025. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2950199725000266. Aesso em: 25 jul. 2025.

SILVA, L.; CARDOSO, C.; PASA, V. Synthesis and characterization of esters from different alcohols using Macauba almond oil to substitute diesel oil and jet fuel. **Fuel**, v.166, p.453-460, 2016.

SIMÕES, T. *et al*. Argan oil as a rich source of linoleic fatty acid for dietetic structured lipids production. **Life,** v. 11, n. 11, 1 nov. 2021.

SOUZA-GONÇALVES, J. *et al*. Continuous Production of Dietetic Structured Lipids Using Crude Acidic Olive Pomace Oils. **Molecules,** v. 28, n. 6, 1 mar. 2023.

TAMALAMPUDI, S. *et al*. Immobilized recombinant Aspergillus oryzae expressing heterologous lipase: An efficient whole-cell biocatalyst for enantioselective transesterification in non-aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B:** Enzymatic, v. 48, n. 1–2, p. 33–37, 3 set. 2007.

TAMBORINI, L. *et al*. Biotransformation with whole microbial systems in a continuous flow reactor: Resolution of (RS)-flurbiprofen using Aspergillus oryzae by direct esterification with ethanol in organic solvent. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 45, p. 6090-6093, 6 nov. 2013.

TRAESEL, G. K. *et al*. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from Acrocomia aculeata pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology,** [s. l.], v. 74, p. 320–325, 2014.

TRENTINI, C. P. *et al*. Oil extraction from macauba pulp using compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 126, p. 72–78, 2017.

ULTIMO, A. *et al*. **Nanotherapeutic** Formulations for the Delivery of Cancer Antiangiogenics. [S. l.]: American Chemical Society, 2025.

UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development.** Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015. Disponível em: https://www.un.org/sustainabledevelopment/. Acesso em: 1 jan. 2025.

UTAMA, Q. D. *et al*. Lipase-Catalyzed Interesterification for the Synthesis of Medium-Long-Medium (MLM) Structured Lipids – A Review. **Food Technol. Biotechnol.** v. 57, n. 3, p. 305-318, 2019.

WANG *et al*. Reviews of medium- and long-chain triglyceride with respect to nutritional benefits and digestion and absorption behavior. **Food Research International**, v. 155, 111058, 2022.

WANG, Y. *et al*. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 707-712, 2012.

XU, C. *et al*. Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential Chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. **Phytochemistry,** v.176, 112399, 2020.

XU, L. *et al*. **Biological modification and industrial applications of microbial lipases:** A general review. [S. l.]: Elsevier B.V., 2025.

YAN, J.; ZHENG, X.; LI, S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast Whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.151, p.43-48, 2014.

YAN, S. *et al*. **Advances in endothelial cell lipid metabolism and tumor angiogenesis.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2024.

YANG, C. T. *et al*. Big data and machine learning driven bioprocessing – Recent trends and critical analysis. **Bioresource Technology**, v. 372, 1 mar. 2023.

YU, X. W.; XU, Y.; XIAO, R. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 57–68, 2016.

YUE, C. *et al*. Medium-, long- And medium-chain-type structured lipids ameliorate high-fat diet-induced atherosclerosis by regulating inflammation, adipogenesis, and gut microbiota in ApoE-/-mice. **Food and Function**, v. 11, n. 6, p. 5142–5155, 1 jun. 2020.

ZHANG, H. W. *et al*. Fabrication of Aspergillus oryzae lipase-immobilized magnetic Cu3(PO4)2·3H2O nanoflowers for efficient synthesis of structured phospholipids. **Food Bioscience**, v. 62, 1 dez. 2024.

ZHOU, J. *et al*. Future of Structured Lipids: Enzymatic Synthesis and Their New Applications in Food Systems**. FoodsMDPI**, 1 ago. 2022.

ZOU, X. *et al*. Preparation of medium- and long-chain triacylglycerols rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by bio-imprinted lipase-catalyzed interesterification. **Food Chemistry**, v. 455, 15 out. 2024.