

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

e

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR

**Produção de triglicerídeos dietéticos obtidos por acidólise enzimática em reatores
contínuos e avaliação do potencial antineoplásico**

Araraquara/Coimbra
2023

RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR

Produção de triglicerídeos dietéticos obtidos por acidólise enzimática em reatores contínuos e avaliação do potencial antineoplásico

Tese realizada sob o acordo de Doutorado Cotutela, apresentada ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp (Brasil) como requisito para obtenção do título de **Doutor em Biociências** e ao Departamento de Engenharia Química – UC (Portugal) como requisito para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**.

Área de concentração: Engenharia de Bioprocessos.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a. Ariela Veloso. de Paula

Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira

Araraquara/Coimbra
2023

M669p

Miotti Junior, Rodney Helder.

Produção de triglicerídeos dietéticos obtidos por acidólise enzimática em reatores contínuos e avaliação do potencial antineoplásico / Rodney Helder Miotti Junior. – Araraquara; Coimbra, 2023.

IX, 188 f. : il.

Tese (Doutorado com dupla titulação) – Unesp, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ariela Veloso. de Paula (Brasil)

Orientador: Fernando Lucas Primo (Brasil)

Tese (Doutorado em Biociências.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade de Coimbra, UC Departamento de Engenharia Química.

Orientador: Jorge Fernando Brandão Pereira, Coimbra (Portugal).

1. Lipídio estruturado. 2. Ácido cáprico. 3. Lipase. 4. Citotoxicidade. I. Paula, Ariela Veloso de, orient. II. Primo, Fernando Lucas, orient. III. Pereira, Jorge Fernando Brandão, orient. IV. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara



DECLARAÇÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Declaro e comprovo que **Rodney Helder Miotti Junior** solicitou a defesa de tese de doutorado perante à Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Câmpus de Araraquara da UNESP em **17/10/2023**. A solicitação foi aprovada pelo Conselho do Programa de Pós Graduação em Biciências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia em **26/10/2023**.

Declaro ainda que o trabalho foi realizado na **Unesp** - Araraquara (Departamento de Engenharia de Bioprocesso - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara – Jaú, s/n, Campos Ville, 14800-903, Araraquara/SP - Brasil) e na **Universidade de Coimbra** (Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Rua Sílvio Lima, Polo II, 3030-790 Coimbra - Portugal).

Declaro também que a defesa da tese intitulada : Produção de triglicerídeos dietéticos obtidos por acidólise enzimática em reatores contínuos e avaliação do potencial antineoplásico, palavras chaves: Palavras-chave: lipídio estruturado; ácido cáprico; lipase; citotoxicidade , em inglês Production of dietary triglycerides obtained by enzymatic acidolysis in continuous reactors and evaluation of antineoplastic potential, Keywords: structured lipid; capric acid; lipase; cytotoxicity , foi realizada em **23/11/2023 em defesa pública, no Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, composta pela seguinte banca examinadora: Professores Doutores: **Ariela Veloso de Paula** (sexo feminino, professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara, e-mail: ariela.veloso@unesp.br e orientadora na Universidade do Brasil presidente da Banca pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP) , **Jorge Fernando Brandão Pereira** (sexo masculino, professor da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, e-mail: jfbpereira@eq.uc.pt,



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara



orientador na Universidade de Coimbra, presidente da Banca pela Universidade de Coimbra) , **Cleide Mara Faria Soares** (sexo feminino , professora da Universidade Tiradentes, e-mail cleide.mara@souunit.com.br, membro titular) , **Maria da Graça Carvalho** (sexo feminino, professora da Universidade de Coimbra, e-mail: mgcarvalho50@gmail.com, membro titular) e **Marcel Otávio Cerri** (sexo masculino, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara, e-mail: marcel.cerri@unesp.br, membro titular).

Por fim declaro que encontra-se em anexo a ata da defesa conferida com a original entregue na Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Câmpus de Araraquara da UNESP.

Araraquara, 15 de dezembro de 2023.

Seção Técnica de Pós-graduação

DENISE DARÉ
Supervisor Técnico de Seção-Subst.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA.

Aos 23 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR, intitulada **Produção de triglicerídeos dietéticos obtidos por acidólise enzimática em reatores contínuos e avaliação do potencial antineoplásico.** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara, Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Engenharia Química / Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Profa. Dra. CLEIDE MARA FARIA SOARES (Participação Virtual) do(a) Universidade Tiradentes, Profa. Dra. MARIA DA GRAÇA CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Universidade de Coimbra, Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

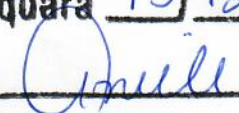
Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA



Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA

CONFERE COM O ORIGINAL

Araraquara 15/12/2023

Nome: 

Seção Técnica de Pós-graduação
Fac. de Ciências Farmacêuticas

Agradecimentos

Inicialmente, quero expressar minha gratidão a Deus por todas as bênçãos que Ele derramou em minha vida, especialmente ao longo do meu doutoramento. Em momentos em que pedi força, o Senhor me desafiou com obstáculos, permitindo-me superá-los e crescer como indivíduo.

Aos meus pais, Inês e Rodney, que sempre lutaram para que fosse possível termos um lar sob nossas cabeças, uma cama quente, comida na barriga e educação. Vocês sempre me incentivaram a estudar e hoje vocês podem dizer que tem um filho doutor.

Ao meu irmão Lucas, agradeço a vida por ter me presenteado você como meu irmão. Tenho em você a certeza de um abraço amigo e uma amizade sólida.

Agradeço à Bruna Fernandes Silva, por ter em você o sentimento de lar e segurança. Você é uma fonte constante de inspiração para mim, estimulando minha dedicação e responsabilidade. O amor que sinto por você transcende os limites desta existência, e sou profundamente grato por tê-la em minha vida. Saiba que meu amor por você é imenso.

Agradeço à Professora Ariela, pela excelência em orientação, amizade, risos e também pelos dias de calorosas discussões sobre a tese. Obrigado pela confiança dada durante o doutoramento para seguir como coorientador em trabalhos de iniciação científica e de conclusão de curso, foram experiências valorosas.

Agradeço o Professor Fernando Lucas Primo, pela dedicação em coorientar meu trabalho de tese. Agradeço por todo o suporte dado ao longo dos ensaios de citotoxicidade e pelas conversas sobre as possibilidades de trabalhos futuros.

Agradeço o Professor Jorge Fernando Brandão Pereira, pela oportunidade em aceitar o papel de coorientador em acordo de cotutela com a Universidade de Coimbra. Obrigado por me receber em seu laboratório durante minha permanência em Portugal, suas ideias sempre inovativas contribuíram para meu melhor desenvolvimento pessoal e profissional.

Meus queridos amigos de Araraquara e de Coimbra, quero expressar o quanto suas amizades são significativas para mim. Cada um de vocês deixou uma marca em minha jornada, e sempre serão lembrados em todas as histórias que compartilho e nas memórias que levo comigo. Suas amizades têm um lugar especial em meu coração, e por isso sou eternamente grato.

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

Resumo

Um grande desafio na modificação de óleos e gorduras para a síntese de lipídios estruturados é a falta de seletividade dos catalisadores químicos quanto às posições dos ácidos graxos a serem substituídos no triacilglicerol, dificultando a formação de triglicerídeos compostos por ácido graxos de cadeias média (M) nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e ácido graxo de cadeia longa (L) na posição *sn*-2 (MLM). Por outro lado, as lipases possuem a capacidade de catalisar posições específicas do grupo funcional da molécula de triacilglicerol. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM em reação de acidólise do óleo de semente de uva com ácido cáprico em diferentes configurações de reatores, os quais foram nanoemulsionados usando um núcleo de óleo inovador, aplicado em ensaios de viabilidade celular com fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™) e células de câncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2), a fim de desenvolver a nanoemulsão como uma nova abordagem terapêutica. As reações foram catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20). Inicialmente foram desenvolvidos os biocatalisadores, sendo selecionado para a imobilização o carregamento de 0,3 gramas de pó enzimático para cada grama de suporte. Os ensaios preliminares para a síntese dos lipídios estruturado foram desenvolvidos em reatores de tanque agitado. Utilizando-se da técnica de planejamento de experimentos, as melhores condições reacionais foram de 1:8 (razão molar entre óleo: ácido cáprico) e 45 °C atingindo o grau de incorporação do ácido cáprico em 56 %GI. Com o intuito de melhorar a eficiência do processo, seja reduzindo temperatura ou reduzindo a quantidade de ácido cáprico, foi utilizado inteligência artificial na forma de redes neurais para melhorar o processo. Assim, a rede foi capaz de aumentar grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol, atingindo valores de 61%GI para as condições reacionais de 41°C e razão molar de 1:6,7. A partir do melhoramento apresentado pela rede neuronal e a busca pela transição de um sistema reacional em batelada para um de sistema contínuo, as condições reacionais foram aplicadas em reatores de leito fixo. O sistema contínuo operou ao longo de 192 horas, com incorporação do ácido cáprico atingindo os 61%GI em seu estado estacionário. Em busca de minimizar os efeitos de perda de pressão, o presente trabalho utilizou reator de leito fluidizado, o qual obteve o grau teórico máximo de incorporação do ácido cáprico (66%GI) quando aplicado as condições reacionais atribuídas pela rede neuronal em reciclo. O máximo teórico foi atingido com vazão de alimentação de 3 mL/min após 48 horas de reação, sendo utilizada o carregamento enzimático de 1,0 grama de pó enzimática para cada grama de suporte. A partir deste alto grau de incorporação, foram realizados testes de viabilidade celular com linhagens de fibroblastos murinos e linhagens de células de adenocarcinoma cervical humano. No que diz respeito aos ensaios de citotoxicidade, a concentração de MLM-SL de 1,75% e 2% v/v foi capaz de induzir a morte celular em 56% e 64% das células de adenocarcinoma, respectivamente. As células de adenocarcinoma cervical humano mostraram maior sensibilidade à indução de morte celular ao usar emulsões com MLM-SL > 1,75% v/v em comparação com emulsões com menor conteúdo, indicando um potencial no combate a células cancerígenas.

Palavras-chave: lipídio estruturado; ácido cáprico; lipase; citotoxicidade

Abstract

A major challenge in modifying oils and fats for structured lipid synthesis is the lack of selectivity of chemical catalysts for the positions of fatty acids to be replaced in triglycerides, complicating the formation of triglycerides composed of medium-chain fatty acids (M) at positions *sn*-1 and *sn*-3 and long-chain fatty acid (L) at position *sn*-2 (MLM). On the other hand, lipases have the ability to catalyze specific positions of the functional group of the triglyceride molecule. Thus, this study aimed to synthesize dietary triglycerides of the MLM type in the acidolysis reaction of grape seed oil with capric acid in different reactor configurations, which were then nanoemulsified using an innovative oil core. The nanoemulsions were applied in cell viability assays with murine embryonic fibroblasts (NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™) and cervical cancer cells (HeLa, ATCC® CCL-2) to develop the nanoemulsion as a new therapeutic approach. The reactions were catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase on styrene-divinylbenzene (Diaion™ HP-20). Initially, biocatalysts were developed, and for immobilization, a loading of 0.3 grams of enzymatic powder per gram of support was selected. Preliminary tests for structured lipid synthesis were conducted in stirred tank reactors. Using experimental design techniques, the best reaction conditions were determined to be 1:8 (molar ratio of oil:capric acid) and 45 °C, achieving a capric acid incorporation degree of 56%GI. To improve process efficiency, either by reducing temperature or reducing the amount of capric acid, artificial intelligence in the form of neural networks was used. The network increased the incorporation degree of capric acid into the triglyceride structure, reaching values of 61%GI for reaction conditions of 41°C and a molar ratio of 1:6.7. Building on the improvement presented by the neural network and the transition from a batch to a continuous system, the reaction conditions were applied in fixed-bed reactors. The continuous system operated over 192 hours, with capric acid incorporation reaching 61%GI at its steady state. To minimize the effects of pressure drop, this study used a fluidized bed reactor, which achieved the maximum theoretical degree of capric acid incorporation (66%GI) when applying the reaction conditions assigned by the neural network in recycle. The theoretical maximum was reached with a feed flow rate of 3 mL/min after 48 hours of reaction, using an enzyme loading of 1.0 gram of enzymatic powder per gram of support. From this high degree of incorporation, cell viability tests were conducted with murine fibroblast strains and human cervical adenocarcinoma cell lines. Regarding cytotoxicity assays, the concentration of MLM-SL of 1.75% and 2% v/v induced cell death in 56% and 64% of adenocarcinoma cells, respectively. Human cervical adenocarcinoma cells showed greater sensitivity to induction of cell death when using emulsions with MLM-SL > 1.75% v/v compared to emulsions with lower content, indicating potential in combating cancer cells.

Keywords: structured lipid; capric acid; lipase; cytotoxicity

Lista de figuras

Figura 2.1 - Exemplos das principais configurações de biorreatores na catálise enzimática.	40
Figura 3. 1 - Mapa mental das etapas experimentais realizadas.	48
Figura 3. 2 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em reator de tanque agitado.	54
Figura 3. 3 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em fluxo contínuo em reator de leito fixo.	55
Figura 3. 4 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em reator de leito fluidizado.	56
Figura 3. 5 - Esquema trivial do sistema reacional da determinação do perfil em ácidos graxos na posição <i>sn</i> -2 do triglicerídeo modificado.	58
Figura 4. 1 - Atividade hidrolítica em função do carregamento enzimático.	75
Figura 4. 2 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da temperatura e ph: a) superfície de resposta ao modelo estatístico; b) curva de nível dos efeitos da temperatura e ph em relação à atividade hidrolítica.	78
Figura 4. 3 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol.	82
Figura 4. 4 - Plano de resposta e curva de nível preditos do modelo linear dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol a partir de um dcc.	86
Figura 4. 5 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol a partir de um dccr.	90
Figura 4. 6 - Ensaio de estabilidade operacional do derivado imobilizado na síntese de lipídios estruturados. ciclos reacionais de 24 horas.	91
Figura 4. 7 - Curvas de inativação térmica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em partículas hidrofóbicas (●) e curva de inativação térmica da lipase de <i>rhizopus oryzae</i> livre (▲) em 35 (a), 45 (b) e 55 °c (c).	92
Figura 5. 1 - Representação dos gráficos de desempenho obtidos durante o treinamento das ANN.	104

Figura 6. 1 - Concentração do traçador em mistura reacional em função da absorbância.	113
Figura 6. 2 - Representação da resposta de um fluxo constante à introdução de um pulso em um reator ideal, onde $e(t)$ é a função da distribuição de tempo de residência.	114
Figura 6. 3 - Distribuição de tempo de residência para o reator de coluna fixo empregado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM.	115
Figura 6. 4 - Foto do experimento para determinação da DTR demonstrando influência de caminho preferencial na redução do tempo de residência para o reator de coluna fixo empregado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM.	116
Figura 6. 5 - Sistema reacional utilizando reator de leito fixo na síntese de lipídio estruturado do tipo mlm em modo contínuo.	117
Figura 7. 1 - Sistema de reator de leito fluidizado operando com reciclo na síntese de lipídios estruturados do tipo mlm em câmara de temperatura controlada.	131
Figura 7. 2 - Perfil cinético da síntese de mlm em função da vazão de alimentação e do tempo em reator de leito fluidizado.	133
Figura 7. 3 - Ajuste linear do tempo necessário para cada vazão atingir 60% de incorporação de ácido cáprico em 100g de meio reacional.	134
Figura 7. 4 - Comparação entre o perfil cinético da síntese de mlm utilizando carregamento enzimático de 0,3 e 0,5 gramas de enzima em reator de leito fluidizado.	138
Figura 7. 5 - Comparação entre o perfil cinético da síntese de mlm utilizando carregamento enzimático de 0,3, 0,5 e 1,0 gramas de enzima em reator de leito fluidizado com vazão de alimentação de 3 ml/min.	140
Figura 7. 6 - Relação entre a produtividade e a vazão de alimentação do reator de leito fluidizado fixado no tempo de 48 horas de tempo reacional.	142
Figura 7. 7 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo e perfil cinético do grau de incorporação ao longo do tempo para o carregamento enzimático de 0,5 gramas.	143
Figura 7. 8 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo na vazão de 3 ml/min em diferentes carregamentos enzimáticos.	145
Figura 7. 9 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo na vazão de 3 ml/min em relação a massa enzimática aplicada.	146
Figura 8. 1 - Cromatograma obtido pela composição em ácido graxos presentes da composição do triacilglicerol do óleo de semente de uva.	154
Figura 8. 2 - Análise termogravimétrica do óleo de semente de uva (TG) e a sua respectiva primeira derivada (DTG).	155

Figura 8. 3 - Cromatograma obtido pela composição em ácidos graxos presente na composição do no lipídio estruturado.....	156
Figura 8. 4 - Folha cromatográfica para identificação dos possíveis compostos formados pela reação de hidrólise dos lipídios estruturado do tipo MLM.	157
Figura 8. 5 - Folha cromatográfica dos compostos formados pela reação de hidrólise dos lipídios estruturado do tipo mlm em luz ultravioleta.	157
Figura 8. 6 - Análise termogravimétrica do novo lipídio estruturado (TG) e a sua respectiva primeira derivada (DTG).	160
Figura 8. 7 - Comparativo entre as análises termogravimétricas do óleo de semente de uva e os lipídios estruturados em diferente %GI.	161
Figura 8. 8 - Espectros FTIR das amostras de lipídio estruturado (66 % GI), óleo de semente de uva e ácido cáprico.	162
 Figura 9. 1 - Perfil da distribuição de diâmetro das nanoemulsões/GSO (preto) e nanoemulsões/MLM-SL (cinza) a partir de análises de dls após 43 dias de síntese.	169
Figura 9. 2 - Teste de citotoxicidade in vitro em fibroblastos embrionários murinos (NIH-3t3 - ATCC® CRL-1658™).	171

Lista de tabelas

Tabela 2. 1 - Acidólise enzimática em diferentes sistemas óleo: ácido empregando lipases.	32
Tabela 2. 2 - Síntese de lipídios estruturados patenteados.	33
Tabela 2. 3 - Exemplos de lipases de acordo com sua regioespecificidade.....	36
Tabela 3. 1 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.	49
Tabela 3. 2 - Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para o suporte e Diaion™ HP-20.....	50
Tabela 3. 3 - Valores utilizados no planejamento experimental para a caracterização da enzima imobilizada.....	52
Tabela 4. 1 - Atividade hidrolítica e teor de umidade dos derivados imobilizados em Diaion™ HP-20 empregando diferentes carregamentos.....	73
Tabela 4. 2 - Matriz do planejamento fatorial realizado para investigar a influência da temperatura e do ph na atividade hidrolítica do derivado imobilizado.	76
Tabela 4. 3 - Matriz do planejamento fatorial realizado para investigar a influência da temperatura e razão molar na síntese de lipídios estruturados utilizando lipase imobilizada em estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20).	79
Tabela 4. 4 - Análise de variância (anova) do modelo que representa o gi empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.....	81
Tabela 4. 5 - Delineamento composto central utilizado na reação de acidólise enzimática do óleo de semente de uva com ácido cáprico com lipase imobilizada em Diaion™ HP-20..	83
Tabela 4. 6 - Análise de variância (anova) do modelo que representa o GI empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20 aplicada ao dcc com 2 níveis.	85
Tabela 4. 7 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) composta por 2 repetições genuínas para a otimização da síntese de lipídios estruturados utilizando lipase imobilizada em estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20).....	87
Tabela 4. 8 - Análise de variância (anova) do modelo que representa a %gi empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20 aplicada ao dccr com 2 níveis.	88
Tabela 5. 1 - Resultados do processo de aprendizagem da ann com teste de arquitetura, utilizando algoritmo de treinamento lm e 6 neurônios na camada intermediária configurados como configurações fixas.....	102

Tabela 5. 2 - Resultados da soma dos erros quadrados (seq) e do coeficiente de correlação de pearson ® obtidos no processo de treinamento das ANN.....	103
Tabela 5. 3 - Resultados normalizados com base na atividade enzimática para o processo de otimização do grau de incorporação (%GI) com temperatura inicial ideal de 41 °c e razão molar de 6,7:1 (ácido:óleo).	107
Tabela 6. 1 - Composição em ácidos graxos (%) do lipídio modificado de óleo de semente de uva na reação de acidólise com ácido cáprico em reator de leito fixo em modo contínuo ao longo de ciclos de 24 horas.	118
Tabela 7. 1 - Altura do leito fluidizado em função do carregamento enzimático e da vazão. ...	127
Tabela 7. 2 - Porosidade do leito fluidizado em função de cada carregamento enzimático e da vazão de alimentação.....	128
Tabela 7. 3 - Valores do coeficiente de expansão (n), velocidade terminal da partícula (v _{tc}), da vazão mínima (q _{mín}) e altura mínima (h _{min}) para cada carregamento enzimático.....	129
Tabela 7. 4 -Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (% GI) em função do tempo de reação e respectivas vazões para o carregamento enzimático de 0,5 gramas. ...	132
Tabela 7. 5 - Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (%GI) em função do tempo de reação e respectivas vazões para o carregamento enzimático de 0,3 gramas. ...	136
Tabela 7. 6 - Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (% GI) em função do tempo de reação na vazão de alimentação de 3 ml/min para o carregamento enzimático de 1,0 gramas.....	139
Tabela 8. 1 - Índices de peróxido e acidez do óleo de semente de uva puro utilizado nas reações de acidólise com ácido cáprico.....	152
Tabela 8. 2 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa do óleo de semente de uva puro utilizado para as reações de acidólise enzimática com ácido cáprico.	153
Tabela 8. 3 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa dos monoacilglicerois obtidos pela hidrólise com lipase pancreática de porco (lpp).	158

Sumário

1. MOTIVAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE	20
1.1 Motivação	21
1.2 Objetivos	24
1.3 Estrutura da tese	25
REFERÊNCIAS	27
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1 Óleos e gorduras como alimentos funcionais.....	30
2.2 Produção dos lipídios estruturados	31
2.3 Lipases	34
2.5 Biorreatores utilizando enzimas imobilizadas	39
REFERÊNCIAS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Lista de equipamentos	49
3.2 Suopрте de imobilização	49
3.3 Outros reagentes.....	50
3.4 Metodologia experimental.....	50
3.4.1 Caracterização da matéria-prima.....	50
3.4.2 Imobilização da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	51
3.4.3 Determinação da atividade hidrolítica	51
3.4.4 Ensaio de carregamento enzimático	51
3.4.5 Caracterização do derivado imobilizado.....	52
3.4.6 Ensaio de estabilidade térmica do derivado imobilizado	52
3.4.7 Ensaio de reutilização do biocatalisador	52
3.4.8 Reações de acidólise em reator descontínuo de tanque agitado	53
3.4.9 Reações de acidólise em reator de leito fixo	54

3.4.10	Reações de acidólise em reator de leito fluidizado	55
3.4.11	Neutralização do meio reacional após reação.....	56
3.4.12	Metilação do triacilglicerol ao final das reações	56
3.4.13	Determinação do grau de incorporação do ácido cáprico.....	57
3.4.14	Determinação da composição em ácido graxo da posição <i>sn</i> -2 do triacilglicerol	57
3.4.15	Cálculos para a determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR).....	58
3.4.16	Curva de calibração do corante	60
3.4.17	Cálculo da densidade da enzima imobilizada.....	60
3.4.18	Cálculo da velocidade mínima de fluidização	61
3.4.19	Preparo das nanoemulsões com lipídios estruturado do tipo e óleo de semente de uva	62
3.4.20	Cultura celular e viabilidade celular <i>in vitro</i>	62
3.4.21	Caracterização Físico-Química por Espalhamento Dinâmico de Luz das nanoemulsões	63
3.4.22	Análise termogravimétrica do lipídio estruturado e óleo de semente de uva.....	63
3.4.23	Análise por FTIR do lipídio estruturado e óleo de semente de uva	63
3.4.24	Construção da Redes Neurais Artificial (ANN).....	64
3.4.25	Variações de funções na construção das arquiteturas ANN	64
3.4.26	Otimização do modelo matemático obtido por ANN	66
	REFERÊNCIAS	67
4.	PRIMEIROS ENSAIOS REACIONAIS DA SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS EM REATORES DE TANQUE AGITADO	70
4.1	Introdução.....	71
4.2	Resultados e discussão.....	72
4.2.1	Carregamento enzimático	72

4.2.2 Determinação das propriedades catalíticas do derivado imobilizado	76
4.2.3 Aplicação do imobilizado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM ...	79
4.2.4 Otimização da síntese de lipídios estruturados do tipo MLM	83
4.2.5 Estabilidade operacional	90
4.2.6 Estabilidade térmica	92
4.3 Conclusões	94
REFERÊNCIAS	95
5. SIMULAÇÃO DA SÍNTESE DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS POR REDES NEURONAIAS.	99
5.1 INTRODUÇÃO	100
5.2 Resultados e discussão.....	101
5.2.1 Desenvolvimento da arquitetura das redes neuronais artificiais	101
5.2.2 Otimização das variáveis simulada pela ANN	106
5.3 Conclusões	108
REFERÊNCIAS	109
6. SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS EM REATOR DE LEITO FIXO	110
6.1 Introdução.....	111
6.2 Resultados e discussão.....	112
6.2.1 Teste traçador do tipo pulso e cálculo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR).....	112
6.2.2 Síntese de lipídios estruturados do em reator de leito fixo	116
6.3 Conclusões	121
REFERÊNCIAS	122
7. SÍNTESE DE LIPÍDIO ESTRUTURADO EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO.	124
7.1 Introdução.....	125
7.2 Resultados e discussão.....	126

7.2.1 Ensaio de expansão do leito em reator fluidizado utilizando lipase imobilizada em Diaion™ HP-20	126
7.2.2 Ensaio cinético da síntese dos lipídios estruturados em reator de leito fluidizado.....	131
7.2.3 Efeito do carregamento enzimático na síntese de MLM em reator de leito fluidizado.....	135
7.2.4 Análise da produtividade dos lipídios estruturado do tipo MLM em reator de leito fluidizado.	141
7.3 Conclusões	147
REFERÊNCIAS	148
8. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E DO LIPÍDIO ESTRUTURADO DO TIPO MLM	150
8.1 Introdução.....	151
8.2 Resultados e Discussão.....	152
8.2.1 Caracterização do óleo de semente de uva	152
8.2.2 Caracterização dos lipídios estruturados do tipo MLM	155
8.3 Conclusões	163
REFERÊNCIAS	164
9. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE APLICADOS AO LIPÍDIO ESTRUTURADO E ÓLEO DE EMENTE DE UVA.	166
9.1 Introdução.....	167
9.2 Resultados e discussão.....	168
9.2.1 Análise dos parâmetros físico-químicos ao longo do tempo das nanoemulsões.....	168
9.2.2 Ensaios de citotoxicidade in vitro utilizando nanoemulsão/MLM-SL e nanoemulsão/GSO	170
9.3 Conclusões	173
REFERÊNCIAS	174
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS	177

10.1 Considerações finais	178
10.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	181
LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	182
Artigos publicados	183
Publicações em periódicos científicos internacionais com revisão por pares.....	183
Manuscritos submetidos	183
Manuscritos em preparação.....	183
APÊNDICE	184

1. MOTIVAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

1.1 Motivação

A motivação do presente trabalho de tese vem da necessidade crescente de alimentos funcionais, mais saudáveis, menos calóricos e/ou que desempenham funções fisiológicas básicas no auxílio do controle ou combate de doenças (Bassan et al., 2019; Martínez-Galán et al., 2021; Atsakou et al., 2023). Adicionalmente existe o desafio crucial na indústria de alimentos e biotecnologia: a síntese de lipídios estruturados, mais especificamente, os triacilgliceróis do tipo MLM. Esses compostos têm grande relevância nutricional e propriedades promissoras na prevenção de doenças metabólicas (Rehman et al., 2017).

O principal desafio é a falta de seletividade dos catalisadores químicos, que dificultam a formação precisa desses lipídios estruturados. Para superar esse problema, este trabalho se concentrou no uso de lipases de *Rhizopus oryzae*, enzimas altamente seletivas que podem catalisar posições específicas nas moléculas de triacilgliceróis. Adicionalmente, é importante observar que essa categoria de lipídios estruturados apresenta valor calórico inferior, variando entre 5 e 7 kcal/g, quando comparada aos óleos e gorduras convencionais que têm valor de 9 kcal/g (Basan et al., 2019).

Essa característica é de grande interesse, especialmente em um contexto de preocupação com a obesidade e o controle de peso. Nesse sentido, Martínez-Galán e colaboradores (2021) realizaram pesquisas notáveis, abordando o controle da obesidade. Eles conduziram estudos com camundongos que foram alimentados com dietas pré-fabricadas contendo lipídios estruturados do tipo MLM. Os resultados dessas investigações apontaram para uma diminuição significativa no ganho de peso corporal desses animais, juntamente com reduções notáveis nas quantidades de tecido adiposo branco. A redução no peso corporal e no tecido adiposo branco está atribuída, em grande parte, à composição dos lipídios estruturados, conforme mencionado pelos autores.

Os lipídios do tipo MLM são caracterizados pela presença de ácidos graxos de cadeia longa nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do glicerol. Essa configuração particular aumenta a solubilidade e, o que é ainda mais significativo, acelera o metabolismo. Isso ocorre porque eles são metabolizados de maneira mais eficiente, em comparação com os ácidos graxos de cadeia longa tradicionalmente encontrados nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos

triacilgliceróis. A rápida metabolização dos lipídios estruturados do tipo MLM impede que sejam armazenados como gordura no corpo, o que contribui para as reduções no ganho de peso corporal e nas quantidades de tecido adiposo branco observadas nos estudos de Martínez-Galán e colaboradores (2021). Portanto, esse tipo de lipídio estruturado possui um grande potencial no contexto do controle de peso e da prevenção da obesidade.

Deste modo, a escolha do óleo de semente de uva como matéria-prima neste estudo é fundamentada no fato de que esse óleo é um subproduto industrial frequentemente descartado pelas indústrias de vinho e suco, e, ao utilizá-lo, é possível agregar valor a esse resíduo. Além desse aspecto, o óleo de semente de uva se destaca por suas qualidades nutricionais, incluindo um alto teor de ácidos graxos insaturados, particularmente o ácido linoleico, que compreende de 58% a 78% da composição dos triacilgliceróis presentes na posição *sn*-2. Isso se traduz em uma proporção mais elevada em comparação com óleos de milho e soja, que variam de 34% a 65,6% e de 48% a 59%, respectivamente. Além disso, estudos anteriores ressaltaram os benefícios potenciais do óleo de semente de uva para a saúde, devido à presença de antioxidantes notáveis, como a vitamina E e tocotrienóis, como descrito na literatura (Yang et al., 2021; Gitea et al., 2023; Martin et al., 2020). Além disso, o extrato de semente de uva demonstrou ter potencial na prevenção de doenças cardiovasculares, conforme evidenciado por Khaki e colaboradores (2023) e Gupta e colaboradores (2019).

Há outros benefícios associados ao óleo de semente de uva que derivam da sua composição química rica em ácidos graxos essenciais, notadamente ácidos graxos ω -3 e ω -6. Evidências substanciais apresentadas na literatura sugerem que ácidos graxos poli-insaturados, como os encontrados no óleo de semente de uva, têm o potencial de reduzir o processo inflamatório em células (Martin et al., 2020; Calder, 2015; Valden, 2012). Além disso, esses ácidos graxos essenciais demonstraram capacidade de combater células cancerígenas, desencadeando a apoptose celular, um mecanismo importante de morte celular programada (Valden, 2012, Miccadei et al., 2016). Essas descobertas ressaltam o valor do óleo de semente de uva na promoção da saúde e na pesquisa médica.

Essa nova geração de lipídios dietéticos apresenta uma série de vantagens notáveis. Além de possuir um valor calórico inferior em comparação com os lipídios

convencionais, sua rápida taxa metabólica reduz significativamente a probabilidade de armazenamento no corpo como gordura. A escolha do ácido cáprico, com seu grupo doador de acila, para reestruturar o perfil de ácidos graxos do óleo de semente de uva é baseada em sua capacidade de modificar o metabolismo do corpo, proporcionando uma fonte rápida de energia. Adicionalmente, o ácido cáprico combinado com seus efeitos benéficos na saúde intestinal, incluindo a redução da inflamação intestinal e a correção da disbiose, mostra potencial para impactar positivamente diversas doenças neurológicas. Isso envolve a redução da inflamação e do estresse oxidativo, tornando-se uma opção terapêutica promissora no tratamento de distúrbios do desenvolvimento, doenças neurodegenerativas, distúrbios do humor e doenças autoimunes, como a esclerose múltipla. Esse tratamento não apenas melhora a qualidade de vida dos pacientes, mas também atrasa a progressão da doença (Shekhar et al., 2023).

As aplicações clínicas do óleo de semente de uva têm sido empregadas como facilitadoras de nanocarreadores. Esses nanocarreadores oferecem maior controle, biocompatibilidade, liberação direcionada, redução de toxicidade e efeitos colaterais, especialmente quando associados a compostos químicos que, quando administrados *in vivo* de forma convencional, apresentam limitações (Garavaglia et al., 2016; do Amaral et al, 2022; Davidov-Pardo, G., & McClement, 2015; Lacatusu et al., 2015). Nesse contexto, este trabalho de tese se propõe a otimizar a produção de lipídios estruturados do tipo MLM a partir do óleo de semente de uva. Buscamos alcançar um elevado grau de incorporação de ácido cáprico, com a catalise da lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae*. Estes lipídios foram posteriormente nanoemulsionados, fazendo uso de uma estrutura inovadora de núcleo de óleo. Essas nanoemulsões foram aplicadas em ensaios de viabilidade celular, utilizando fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™) e células de câncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2) com o objetivo principal de desenvolver nanoemulsões como uma nova abordagem terapêutica.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi produzir um novo lipídio estruturado de potencial característica dietética e antineoplásicas utilizando como matéria prima lipídica o coproduto da indústria de alimentos. Este coproduto trata-se do óleo de semente de uva, rico em ácidos graxos polinsaturados que, com o auxílio da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada por adsorção física em partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20), foi empregado em reações de acidólise com ácido cáprico. Para alcançar esse objetivo, as reações foram otimizadas em reatores de tanque agitado e as melhores condições de produção foram aplicadas em reator de leito fixo e reator de leito fluidizado.

Para atingir este objetivo geral, foram estabelecidos objetivos específicos, a saber:

- Selecionar o melhor carregamento enzimático para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* visando obter um derivado ativo, estável e compatível para utilização em reator de tanque agitado, de leito fixo e de leito fluidizado;
- Realizar o planejamento de experimentos do tipo Delineamento composto central (DCC), Delineamento composto central rotacional (DCCR) e por Redes Neurais Artificial (ANN) para identificar os melhores parâmetros para produção dos lipídios estruturados em reatores de tanque agitado; posteriormente utilizar as melhores condições e aplicá-las em reator de leito fixo e leito fluidizado;
- Montagem do biorreator de leito fixo e fluidizado com suas respectivas caracterizações quanto à hidrodinâmica do sistema operacional;
- Caracterizar os lipídios formados por análises cromatográficas, termogravimétricas e espectroscópicas na região do infravermelho;
- Realizar testes de citotoxicidade referentes ao uso dos lipídios estruturados ao combate de células neoplásicas.

1.3 Estrutura da tese

De modo a contextualizar, é importante mencionar que este trabalho de tese foi realizado sob acordo de cotutela entre a Universidade Estadual Paulista (Unesp) e a Universidade de Coimbra (UC) e, portanto, sendo desenvolvido trabalhos experimentais por 3 anos na Unesp e 1 ano na UC. Os frutos da parceria entre as duas universidades estão organizados e apresentados. A estruturação do presente trabalho de tese segue organizado em 10 capítulos. No primeiro Capítulo encontram-se as motivações para o desenvolvimento do trabalho de tese, incluindo os objetivos gerais e específicos.

No segundo Capítulo são apresentadas informações gerais para formação base de conhecimento ao leitor sobre o tema a ser apresentado e discutido na tese. As informações são referentes a contextualização do que são óleos e gorduras como alimentos funcionais e como são denominados e produzidos os lipídios estruturados do tipo MLM. São abordadas ainda informações sobre as lipases como catalisadores enzimáticos, métodos de imobilização e os tipos de reatores em que podem ser aplicadas.

Na apresentação do terceiro Capítulo estão dispostas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento dos ensaios experimentais e das análises realizadas. Nos Capítulos 4 ao 9 são apresentados os resultados em cada etapa desenvolvida neste trabalho de tese, juntamente com suas discussões.

De modo breve, o Capítulo 4 apresenta o início de todo o trabalho científico, sendo destaque a elaboração do biocatalisador com sua respectiva caracterização quanto à temperatura e pH ótimos de atuação. Adicionalmente, são apresentados os ensaios com planejamento de experimentos e posterior síntese dos lipídios estruturados em reatores de tanque agitado.

O Capítulo 5 é a apresentação dos resultados obtidos pelo planejamento de experimento reavaliados por redes neurais, os quais demonstram melhora no grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol. Os Capítulos 6 e 7 são respectivamente os ensaios da produção do lipídio estruturado em reator de leito fixo e fluidizado, aos quais foram aplicadas as melhorias da composição do meio reacional e da temperatura provenientes das análises das redes neurais.

No Capítulo 8 são apresentadas as análises de caracterização do óleo de semente de uva em comparação ao lipídio estruturado. Foram utilizados ensaios cromatográficos (GC), termogravimétrico (TG e DTG) e espectroscopia por infravermelho (FTIR).

Os ensaios de citotoxicidade estão apresentados no Capítulo 9. Esse Capítulo apresenta o uso do lipídio estruturado nanoemulsionado nos ensaios de viabilidade celular de linhagens de fibroblasto de murino e em células imortalizadas de adenocarcinoma humano (HeLa). Ensaios de estabilidade operacional das nanoemulsões também foram apresentadas neste Capítulo. As considerações finais do trabalho de tese são apresentadas no Capítulo 10.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, S.R.; AMANTINO, C.F.; DE ANNUNZIO, S.R.; DE PAULA, A. V.; FONTANA, C. R.; PRIMO, F. L. Advanced methylene blue nanoemulsions for in vitro photodynamic therapy on oral and cervical human carcinoma. **Lasers Med Sci**, v. 37, p. 3443–3450, 2022, doi: 10.1007/s10103-022-03603-2.
- ATSAKOU, A.E.; REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R.H.; PAZ-CEDENO, F. R.; MASARIN, F.; ANDRADE, G. S. S.; GATTAS, E. A. L.; DE PAULA, A. V. Synthesis of dietary lipids from pumpkin (*Cucurbita pepo*. L) oil obtained by enzymatic extraction: a sustainable approach. **3 Biotech**, v. 13, n. 358, 2023, doi:10.1007/s13205-023-03781-y.
- CALDER, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, (1_suppl), p. 18S–32S, 2015, doi:10.1177/0148607115595980.
- DAVIDOV-PARDO, G. AND MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.082.
- GARAVAGLIA, J.; MARKOSKI, M. M.; OLIVEIRA, A.; MARCADENTI, A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, NMI.S32910, 2016, doi:10.4137/nmi.s3291010.4137/NMI.
- GITEA, M. A.; BUNGAU, S. G.; GITEA, D.; PASCA, B. M.; PURZA, A. L.; RADU, A-F. Evaluation of the Phytochemistry–Therapeutic Activity Relationship for Grape Seeds Oil. **Life**, v. 13, n. 1, p. 178, 2023, doi:10.3390/life13010178.
- GUPTA, M.; DEY, S.; MARBANIANG, D.; PAL, P.; RAY, S.; MAZUMDER, B. Grape seed extract: having a potential health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1205-1215, 2019, doi:10.1007/s13197-019-04113-w.
- KHAKI, E.; DEHKODI, K. J.; TAGHIAN, F.; HOSSEINI, S. Interactive Effect of Grape Seed Nanoparticle Extract and Resistance Training on Antioxidant System Function in Myocardial Infarction Rat Model. **Gene Cell Tissue**, v. 10, n. 1, p. e123703, 2023, doi:10.5812/get-123703.
- LACATUSU, I.; BADEA, N.; BADEA, G.; OPREA, O.; MIHAILA, M. A.; KAYA, D. A.; MEGHEA, A. Lipid nanocarriers based on natural oils with high activity against oxygen free radicals and tumor cell proliferation. **Materials Science and Engineering**, v. 56, p. 88–94, 2015, doi:10.1016/j.msec.2015.06.019.
- MARTIN, M. E.; GRAO-CRUCES, E.; MILLAN-LINARES, M. C. DE LA PAZ, S. M. Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil: A Functional Food from the Winemaking Industry. **MDPI Foods**, v. 9, n. 10, p. 1360, 2020, doi:10.3390/foods9101360.

MICCADEI, S.; MASELLA, R.; MILEO, A. M.; GESSANI, S. ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids as Immunomodulators in Colorectal Cancer: New Potential Role in Adjuvant Therapies. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 486, 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00486.

VANDEN HEUVEL, J. P. Nutrigenomics and Nutrigenetics of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Recent Advances in Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 108, p. 75–112, 2012, doi:10.1016/b978-0-12-398397-8.00004-6.

YANG, C.; SHANG, K.; LI, C.; WANG, C.; SHI, X.; WANG, H.; LI, H. Processing technologies, phytochemical constituents, and biological activities of grape seed oil (GSO): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p.1074–1083, 2021.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Óleos e gorduras como alimentos funcionais

Os óleos e as gorduras são componentes essenciais que devem estar incorporados na dieta de forma equilibrada, uma vez que estes auxiliam no fornecimento de energia e no transporte de agentes químicos orgânicos solúveis, por exemplo, ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico (LA, C 18:2, ω -6) e o ácido α -linolênico (ALA, C 18:3, ω -3) que representam duas classes de precursores para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (Rios et al., 2014; Huerta-Yépez et al., 2016).

Como citado na literatura, tanto o LA quanto o ALA apresentam finalidades estruturais e funcionais na membrana da célula, exercendo também o papel de mediadores na síntese de ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos no caso do ácido linoleico e a formação de ácido eicosapentanoico (EPA, C 20:3, ω -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C 22:6, ω -3) tendo como substrato o alfa linolênico, estes compostos estão envolvidos em processos anti-inflamatórios, imunogênicos entre outras respostas imunológicas (Huerta-Yépez et al., 2016), demonstrando capacidade de combater células cancerígenas, baseados em estudos *in vitro* e *in vivo*. (Eltweri et al., 2017; Fuentes et al., 2018).

No entanto, algumas vezes torna-se necessário promover alguma mudança na estrutura de um triglicerídeo, com o intuito de conferir propriedades físicas, químicas ou nutricionais específicas. Logo, a matéria prima deve ser submetida a processos de modificação, dando origem aos lipídios estruturados.

Dentre estes, destacam-se os triglicerídeos dietéticos, que apresentam menor valor calórico do que os óleos e gorduras convencionais (Ferreira-Dias et al., 2013). Projetada principalmente para aplicações nutricionais especiais, visando atender à necessidade crescente de alimentos mais saudáveis (Cao et al., 2013), o qual complementa com a vantagem em tamanho reduzido, viabilizando maior solubilidade em relação ao ácido graxo de cadeia longa, assim os ácidos graxos de cadeias curtas e médias são transportados diretamente para o fígado, proporcionando uma rápida fonte de energia (Lee et al., 2012).

Uma molécula de triacilglicerol contém três moléculas de ácido graxo e de acordo com a posição destes ácidos, *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, é possível obter respostas distintas do

metabolismo humano (Nunes et al., 2012; Kanda et al., 2010). Com isso, os triglicerídeos de baixa caloria podem se organizar de diferentes maneiras: (i) SLS, um TAG com ácidos graxos de cadeia curta (S) nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa (L) na posição interna; (ii) MLM, um TAG com ácidos graxos de cadeia média (M) nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e de cadeia longa na posição interna; e (iii) MMM, um TAG com ácidos graxos de cadeia média em todas as posições do da cadeia de TAG (Ferreira-Dias et al., 2013).

Adicionalmente, os monoglicerídeos restantes, com ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn*-2, são facilmente absorvidos através da via linfática, sendo incorporados a diferentes tecidos, sendo também utilizados como precursores na formação de PUFA's (Feltet et al., 2009; Wang et al., 2012; Huerta-Yépez, et al., 2016).

2.2 Produção dos lipídios estruturados

Os lipídios estruturados podem ser sintetizados por via química ou enzimática. Dependendo do tipo de substrato disponível, os seguintes métodos podem ser usados para produção: (i) modificados pela incorporação de novos ácidos graxos (FAs), (ii) reestruturados para alterar as posições dos ácidos graxos ou o perfil de FAs, em relação ao estado natural, ou (iii) sintetizados para produzir novos TAGs (ou fosfolipídios (Ferreira-Dias et al., 2018). A síntese enzimática é normalmente catalisada por lipases 1,3 específicas para obter uma estrutura do tipo MLM. A reação de acidólise tem sido empregada para introduzir determinados ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-3 de diferentes óleos vegetais (Ferreira-Dias et al., 2013). A Tabela 2.1 apresenta exemplos de trabalhos aos quais utilizam a acidólise enzimática para a produção de lipídios estruturados.

A análise da Tabela 2.1 demonstra trabalhos que empregaram reatores do tipo tanque agitado em modo descontínuo em sua maioria. Além disso, fazem uso de lipases imobilizadas comerciais para catalisar a referida síntese. Ademais, foi realizada uma busca em bancos de dados de patentes e os resultados são apresentados na Tabela 2.2.

A produção dos lipídios estruturados apresentados tanto pela Tabela 2.1 quanto na Tabela 2.2 tem como principal modo de síntese os reatores descontínuos utilizando lipases comerciais. Pouco é reportado na literatura à utilização de reatores operando em modo contínuo, seja tubular de leito fixo ou fluidizado. Assim, o presente trabalho busca

preencher as lacunas deixadas na literatura com a produção dos lipídios estruturados de maneira contínua em reator de leito fixo e fluidizado, deste modo utilizando como biocatalisador a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte hidrofóbico.

Tabela 2. 1 -Acidólise enzimática em diferentes sistemas óleo: ácido empregando lipases.

Lipase	Configuração do reator	Óleo:ácido	Referências
Lipozyme TL IM	BSTR	Óleo de semente de abóbora:C10:0	CAMPOS, 2013
Lipase 2 (YLL2) (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	BSTR	Azeite de oliva:C8:0 Azeite de oliva:C10:0	CASAS-GODOY et al., 2013
Lipozyme RM IM Lipozyme TL IM	BSTR	Óleo de abacate:C8:0	CABALLERO et al., 2014
Novozym 435 Lipozyme IM RM	BSTR	Óleo de sardinha: C10	Morales-Medina, R., Munio, M., Guadix, A., & Guadix, E. M. 2017
Lipozyme RM IM Lipozyme TL IM Novozym 435 Lipozyme 435	BSTR	Óleo microbiano: C10	ABED et al., 2018
Lipase CRL, Lipase TL100 Lipase RML, Lipase CAL-A Lipozyme RMIM	BSTR	Óleo de palma: C18:2	XIA et al., 2019
Lipase (<i>Rhizopus oryzae</i>)	BSTR	Óleo de bagaço de azeitona: C10	MOTA et al., 2020
Lipozyme TL IM	BSTR	Óleo de oliva: C22:0	MOREIRA, et al., 2020
Lipozyme TL IM®, Lipozyme RM IM® e Novozym 435®	BSTR	Óleo de semente de uva: C10	Bassan et al., 2019

Tabela 2. 2 - Síntese de lipídios estruturados patenteados.

Nº da publicação	Título	Catalisador utilizado	Métodos de produção dos lipídios	Estrutura
US 6,369,252 B1	Structured lipids	Lipases 1,3 específica	Transesterificação entre triacilgliceróis: trioleína + tricaprina; Acidólise: trioleína + ácido cáprico + ácido butílico.	SLS
US 2004/0086621 A1	Reduced calorie fat	Via química e/ou enzimática em duas etapas	Produção do 1,3 diacilglicerol. Posteriormente adição do ácido graxo de cadeia curta na posição central do triacilglicerol.	LSL
US 2008/0268094A1	Mixtures of fatty acid glycerdes from C ₁ to C ₂₂ to improve zootechnical performances and/or the health of the intestine of animals	Lipases comerciais e/ou catalisadores químicos.	Acidolise: Glicerol + ácido graxos (C ₁ até C ₂₂). Transesterificação entre mono, di e triglicerídeos	Conjuntos de lipídios estruturados
EP 2 057 902 A1	Structured lipid compositions and methods of formulation thereof	Lipase 1,3 específica	Transesterificação em etapas: SSS + MMM, posteriormente o produto da reação é transesterificado com LLL	LMS

Dentro das possibilidades de se sintetizar os lipídios estruturados do tipo MLM, a acidólise é a que utiliza de ácidos graxos livres e o triacilglicerol como substratos (Zhou et al., 2022; Utama et al., 2018). O trabalho apresentado por Bassan e colaboradores (2019) utilizaram do óleo de semente de uva e ácido cáprico como substrato para a catálise enzimática das lipases comercialmente imobilizadas de Lipozyme TL IM® (*Thermomyces lanuginosa* lipase), Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei* lipase) e Novozym 435® (*Candida antarctica* lipase B). Os resultados apresentados pelos autores demonstraram variação de incorporação do ácido cáprico de $23,62 \pm 1,34$ a $34,53 \pm 0,05$ mol%, após 24 horas de reação a 45 °C, utilizando razão molar entre óleo: ácido de 2:1.

Martínez-Galán e colaboradores (2021), na busca sintetizar os lipídios estruturados do tipo MLM por incorporar o ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol

do óleo de semente de uva, os autores utilizaram da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada covalentemente em suporte de baixo custo (pó de sabugo de milho). Os resultados demonstraram uma incorporação de 38,8% de ácidos graxos de cadeia média com 5 reutilizações do derivado enzimático.

Em alternativa ao processo de acidólise, a transesterificação e interesterificação surgem com a substituição de dois grupamentos acil entre dois moléculas de ésteres ou triacilglicerol (TAG) (Zhou et al., 2022; Utama et al., 2018) tornando possível a remodelagem do perfil em ácidos graxos do TAG. Deste modo, o trabalho apresentado por Huang e colaboradores (2023) utilizou do óleo de *Camellia* catalisada por meio de combinações de lipases. Os autores obtiveram altos rendimentos de MLM ($52,71\% \pm 0,53$). Tian e colaboradores (2024) estudaram os efeitos da interesterificação dos óleos de semente de *Cinnamomum camphora*, estearina de *Pangasius bocourti* e óleo de semente de perilla catalisadas por lipase comercialmente imobilizada (Lipozyme TL IM). Os resultados mostraram elevada modificação no perfil em ácidos graxos das amostras de triacilglicerol,

2.3 Lipases

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que apresentam capacidade de clivar triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis, na presença de água. São também, capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação em meio reacional restrito de água (Castro et al., 2004; Bon et al., 2008). A versatilidade em conduzir reações em sentidos diferentes, dependendo do substrato inicial, é a característica mais importante que permite sua ampla aplicação industrial (Castro et al., 2004; Bon et al., 2008; Amini et al., 2017; Chandra et al., 2020).

São comumente encontradas na natureza, tendo como fontes células animais, vegetais e microbianas. Com avanços na tecnologia genômica e nos estudos da biotecnologia enzimática, atualmente, é possível produzir lipases com atividade mais elevada a custos de produção mais baixos. Os microrganismos são as principais fontes produtoras de lipases como catalisadores devido à sua facilidade de manipulação genética, rápido crescimento e maior estabilidade, podendo apresentar massa molecular

entre 20 a 75 KDa, pH ótimo próximo ao neutro (4 a 9) e temperatura de atuação desde a temperatura ambiente até 70 °C (Chandra et al., 2020; Ali et al., 2023; Kumar et al., 2023; Hasan et al., 2006; Castro et al., 2004; Castro et al., 2010; Bharathi & Rajalakshmi, 2019).

A região do sítio ativo pertencentes às lipases apresentam uma complexa formação estrutural ao redor do seu sítio ativo. As quais podem variar entre lipases de fontes produtoras diferentes, apresentando uma tríade catalítica em um dobramento estrutural de entrelaçamento α/β hidrolase (Jaeger et al., 1994; Rodrigues et al., 2019).

A partir das estruturas tridimensionais nota-se que a tríade de aminoácidos é normalmente protegida por uma superfície polipeptídica hidrofóbica em forma de α -hélice chamada de tampa ou lide. Em meio aquoso, na ausência de seu substrato natural, a lipase apresenta uma conformação fechada e inativa, na qual o sítio ativo está isolado do meio reacional e recoberto pela cadeia polipeptídica. A conformação enzimática em estado fechado coexiste parcialmente com uma conformação aberta e ativa. Quando um substrato hidrofóbico está presente, uma região conhecida como 'tampa' se move, induzindo uma transformação na estrutura da enzima e revelando uma área hidrofóbica que interage com a porção lipídica, levando-a a uma configuração mais ativa denominada 'conformação aberta' (Palomo et al., 2004; Castro et al., 2004; Fernandez-Lafuente, 2010; Rodrigues et al., 2019).

Distinguindo-se de um catalisador químico, não apenas por atuar em condições mais brandas de reação, a lipase apresenta uma característica diferenciada que é especificidade ao substrato. Esta característica é influenciada pelas propriedades moleculares da enzima, pela estrutura do substrato e pelas interações que afetam a ligação entre a enzima e o substrato. (Remonatto et al., 2022; Kumar et al., 2023).

As lipases do tipo ácido-graxo específicas têm preferência por cadeias carbônicas e/ou um número de insaturações específicas. As lipases enantiosseletivas, apresentam a capacidade de diferenciar enantiômeros em uma mistura racêmica de substrato. Por fim, as lipases com características regioseletivas possuem a capacidade de catalisar diferentes posições do grupo funcional da molécula de substrato, sendo subdivididas conforme apresentadas pelo Quadro 1.

Quadro 1: Diferentes especificidades das lipases.

- a) **Lipase 1,3 específicas:** catalisam especificamente ligações ésteres no posicionamento *sn*-1 e *sn*-3 das moléculas do acilglicerol;
- b) **Lipase 2 específicas:** catalisam especificamente ligações ésteres na posição *sn*-2 do acilglicerol;
- c) **Lipases não específicas:** catalisam acil gliceróis e ácidos graxos livres de modo aleatório, não apresentando especificidade com relação aos grupos acila ou o posicionamento onde ele se encontra.
- d) **Lipase ácido graxo específicas:** preferência por cadeias carbônicas e/ou número de insaturações específicas.

A Tabela 2.3 apresenta alguns exemplos de lipases que possuem regioesletividade distintas.

Tabela 2.3 - Exemplos de regioespecificidade pertencentes ao grupo das lipases.

Lipase	Atuação	Exemplos
Catálise não específica	Capacidade em hidrolisar os TAGs de modo randômico.	<i>Candida rugosa</i> , <i>Penicilium cyclopium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>acnes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Catálise <i>sn</i> -2-específicas	Apresentam a capacidade específica em hidrolisar preferencialmente a posição <i>sn</i> -2.	<i>Candida antarctica A</i>
Catálise <i>sn</i> -1,3-específicas	Apresentam a capacidade de catalisar prioritariamente as posições <i>sn</i> -1 prioritariamente as posições <i>sn</i> -1,3 dos TAGs.	<i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> Lipase pancreática <i>Penicillium roquefortii</i>
Catálise ácido graxo específico	Apresentam a capacidade de catalisar grupamentos específicos de ácidos graxos	<i>Geotrichum candidum</i>

A escolha da lipase de *Rhizopus oryzae* para o desenvolvimento do presente trabalho foi subsidiada por resultados já obtidos no grupo de pesquisa (Bassan et al., 2019). Entretanto, sua aplicação direta na indústria é restringida devido alguns fatores: custo elevado; baixa estabilidade em elevadas condições reacionais e dificuldade em recuperação e reutilização em novos ciclos. Uma estratégia empregada para mitigar essas limitações é a técnica de imobilização. A imobilização pode proporcionar maior estabilidade, prolongar a vida útil do biocatalisador e a recuperação do meio reacional. (Amini et al., 2017; Remonatto et al., 2022). Portanto, a escolha do suporte é uma etapa crucial no processo de desenvolvimento de um sistema reacional que utiliza biocatalisadores imobilizados."

2.4 Imobilização de enzimas por adsorção física

A técnica de imobilização de enzimas tem como uma das finalidades é torna-las insolúveis ao meio reacional, facilitando sua remoção e possibilitando reutilização em bioprocessos. Além disso, a imobilização, muitas vezes, adiciona vantagens ao imobilizado, como aumento na estabilidade térmica, no tempo de meia-vida e tolerância a solventes orgânicos, proporcionando melhor aproveitamento da atividade catalítica (Amini et al., 2017; Zhao et al., 2015).

De acordo com Monteiro e colaboradores (2021), para uma imobilização eficaz, três fatores devem ser escolhidos adequadamente: o suporte, os grupos ativos do suporte e da enzima e o protocolo de imobilização. Uma estratégia simples, vantajosa e peculiar de imobilização é a ativação interfacial da lipase em suportes hidrofóbicos com baixa força iônica (Monteiro et al., 2021). Como relatado em estudos recentes (Monteiro et al., 2021; Rodrigues et al., 2019; Remonatto et al., 2022), a grande maioria dos protocolos de imobilização de lipases envolve adsorção em suportes hidrofóbicos. A adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos pode ser atribuída ao mecanismo de interação entre lipase e suporte que ocorre via ativação interfacial.

A imobilização da lipase via adsorção física em suportes hidrofóbicos pelo mecanismo de ativação interfacial tem muitas vantagens; este protocolo simples e rápido pode promover a estabilização enzimática e, em alguns casos, a hiperativação, uma vez que a imobilização promove uma maior exposição do sítio ativo (Zdarta et al., 2018;

Yadav et al., 2018; Rodrigues et al., 2019). A melhoria da estabilidade é atribuída ao fato de que a lipase se torna mais estável no equilíbrio conformacional (Monteiro et al., 2021; Kumar et al., 2020; Bilal et al., 2019). O protocolo também pode ser explorado como um método de purificação de lipases em meio contendo outras proteínas, pois, em baixa força iônica e meio aquoso, as lipases são as únicas proteínas capazes de serem imobilizadas em suportes hidrofóbicos (Fernandes et al., 2020; Gupta et al., 2020).

A escolha do suporte mais adequada deve ser baseada nas seguintes características: estabilidade química e térmica, possibilidade de reutilização, ampla disponibilidade, acessibilidade, insolubilidade nos meios reacionais, alta afinidade com a enzima, biocompatibilidade e presença de grupos funcionais reativos (Meyer et al., 2017). Um caráter hidrofóbico, por exemplo, permite a formação de interações fortes que fixam as lipases no suporte (Costa e Silva et al., 2016; Peng et al., 2020; Yuan et al., 2020). Em outros casos, o suporte pode conter grupos funcionais como aminas, epóxidos, bases carboxílicas, aldeídos e tióis que se ligam a resíduos de aminoácidos da enzima (Meyer et al., 2017; Vafaei et al., 2020; Fernandes et al., 2020; Gupta et al., 2020; Costa e Silva et al., 2016)

Suportes com diferentes características, como diferentes superfícies (tipo ou densidade de certos grupos funcionais) ou morfologias (textura, tamanho e volume de poros), podem modular as propriedades dos biocatalisadores (Silveiras et al., 2019). A imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) em diferentes suportes hidrofóbicos, por exemplo, proporciona biocatalisadores com diferentes propriedades funcionais (Ortiz et al., 2019; Waghmare et al., 2020). Em um estudo conduzido por Silveira e colaboradores (2019), a imobilização da TLL foi explorado em relação a três suportes diferentes, todos caracterizados por sua hidrofobicidade. Os suportes utilizados foram: Purolite C-18 e o Sepabeads C-18, ambos polímeros funcionalizados com grupos octadecil, e o Lewatit VP OC 1600, o qual consistia em frações hidrofóbicas de grupos divinilbenzeno. A TLL imobilizada em suportes octadecil (C-18) por adsorção interfacial perdeu sua 1,3-regioseletividade, proporcionando 99% de conversão em éster etílico na etanólise do óleo de girassol. Devido ao maior diâmetro de poro do Purolite C18 (macroporoso), a lipase imobilizada neste suporte foi 10 vezes mais ativa do que a lipase imobilizada em Sepabeads C18 (mesoporoso).

Assim, este trabalho de tese utilizou a lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em partículas mesoporosas e hidrofóbicas de estireno-divilbenzeno (Diaion™ HP-20) pela técnica de adsorção física. Com o objetivo de desenvolver um biocatalisador ativo, insolúvel em meio reacional orgânico e robusto, proporcionando a reutilização em novos ciclos reacionais.

2.5 Biorreatores utilizando enzimas imobilizadas

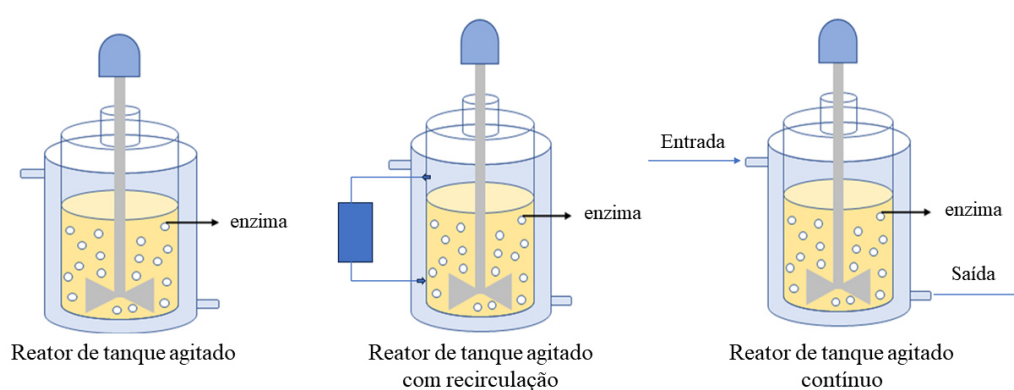
A escolha da configuração do biorreator adequado é dependente dos parâmetros do bioprocesso, tais como a transferência de massa, a cinética de conversão enzimática, condições reacionais e forma como o biocatalisador é aplicado. Outros fatores que influenciam na escolha são os custos para a construção do biorreator, envolvendo sua forma geométrica, características hidrodinâmicas e as condições operacionais, além dos gastos com energia elétrica, manutenção do equipamento e o modo de operação (descontínuo ou contínuo) (Poppe et al., 2015; Remonatto et al., 2022).

Os principais biorreatores utilizados em reações catalisadas por enzimas são os de tanque agitado (STR), reator de leito fixo (PBR) e o reator de leito fluidizado (FBR), sendo apresentados como eficientes na utilização de enzimática livre e imobilizadas (Amini et al., 2017; Remonatto et al., 2022), permitindo a possibilidade em serem utilizados em diferentes configurações e métodos de operação. Em processos enzimáticos heterogêneos, é comum operar sistemas nos modos de batelada, batelada alimentada e contínuo. A Figura 2.1 ilustra uma representação dos principais biorreatores.

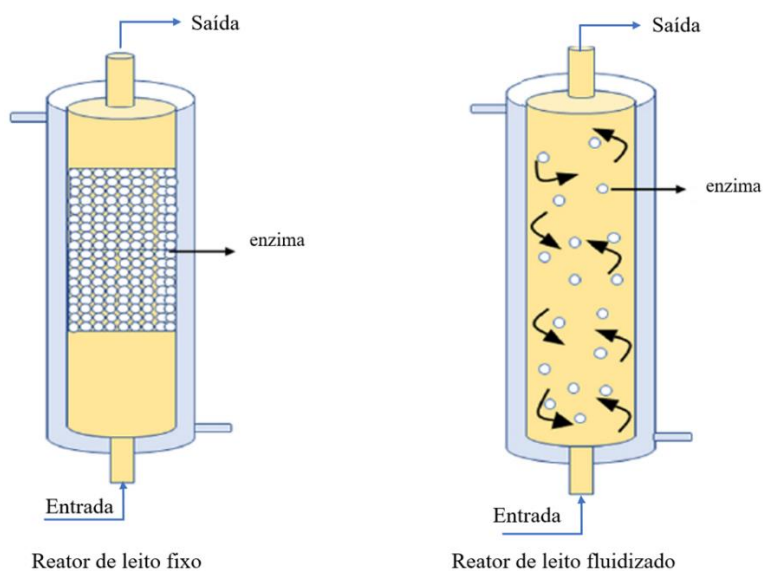
O reator de tanque agitado (STR) é comumente empregado em bioprocessos utilizando tanto enzimas livres quanto imobilizadas, priorizando o uso com enzimas imobilizadas pela facilidade em removê-las ao final da reação. O funcionamento desse tipo de reator oferece vantagens operacionais tais como, elevado grau de dispersão do biocatalisador no meio reacional, sendo agitado mecanicamente por hélice ou pá, podendo ser operado em regime descontínuo (BSTR), descontínuo com recirculação, e contínuo (CSTR) com a adição de todos os componentes no início da reação ou em alguns casos, recomenda-se a adição do substrato por etapas (da Rós et al., 2010; Dantas et al., 2013).

O STR é indicado para meios reacionais que possuam viscosidade mais elevada e enzimas imobilizadas que sejam mais resistentes aos efeitos de cisalhamento e desativação por agitação física (Christopher; Humar; Zambare, 2014; Remonato et al., 2022). A etapa envolvida para separar as fases sólida e líquida após o término da reação ocorre por filtração, centrifugação ou decantação para obtenção dos produtos e recuperação das enzimas imobilizadas.

Reatores de tanque agitado



Reatores em coluna



Fonte: Adaptado de REMONATTO et al., 2022

Figura 2.1 - Exemplos das principais configurações de biorreatores na catálise enzimática.

Contudo, o reator STR em sistema descontínuo apresenta elevado tempo de volume morto devido à necessidade de descarregar o produto, manutenção para nova carga e recarga, para assim dar início ao novo ciclo, o que desfavorece sua implementação em um cenário industrial (Christopher; Humar; Zambare, 2014; Tan et al., 2010; Remonatto et al., 2022).

Uma alternativa para aplicação em larga escala seria a utilização de biorreatores tubulares em regime contínuo. O reator de leito fixo (PBR) é usualmente empregado em regime contínuo com fluxo ascendente, evitando assim a compressão do leito catalítico e sua obstrução (Zhao et al., 2015; Christopher; Kumar; Zambare, 2014), apresentando vantagens diretas e indiretas quando comparado com o sistema descontínuo, tais como: alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção e operação, menor tensão de cisalhamento nas enzimas imobilizadas, além de poder obter uma área superficial de reação maior por unidade de volume (Poppe et al., 2015; Zhao et al., 2015; Amini et al., 2017). O sistema é composto basicamente por uma coluna cilíndrica empacotada pelo conjunto de partículas de biocatalisadores retidos, formando o leito fixo. O meio reacional é bombeado através da coluna por uma vazão específica e conforme o substrato passa pelo leito o material é convertido em produto. Esse reator, no entanto, apresenta algumas desvantagens como a ineficiência na transferência de massa e calor, obstrução do leito catalítico, surgimento de caminhos preferenciais e a dificuldade de manter o sistema operando por um longo período de tempo (Fogler, 2009).

Outra opção aos reatores agitados é o reator de leito fluidizado (FBR), sendo basicamente uma variação do reator de leito fixo. No entanto, para o FBR, a alimentação é realizada somente com fluxo ascendente, em que a vazão de alimentação seja suficientemente alta, fornecendo movimento livre para as partículas de enzima imobilizadas dentro do reator. A fluidização pode ser realizada pelo substrato ou por ar, proporciona melhor transferência de calor e de massa causada pela homogeneização do meio e pela movimentação dos biocatalisadores. Além disso, não apresenta queda de pressão e caminhos preferenciais. No entanto, para ocorrer a fluidização de forma eficiente, são utilizadas quantidades menores de enzima imobilizada por unidade de volume, reduzindo a eficiência global do reator (Poppe et al., 2015).

Como apresentado na literatura, a produção do MLM é realizada em sistemas descontínuos utilizando lipase imobilizadas comerciais (Bassan et al., 2019; Morales-Medina et al., 2017; He et al., 2018; Nunes, P.A.; Pires-Cabral, P.; Ferreira-Dias, S., 2011). Em termos práticos, a produção dos MLM envolvendo enzimas imobilizadas deve ser preferivelmente conduzida de forma contínua. Este sistema, quando comparado com o processo em batelada, apresenta inúmeras vantagens técnicas, principalmente por possibilitar o controle automático, facilidade em conduzir o bioprocessamento e favorecer o controle de qualidade do produto (Ferreira-Dias et al., 2018).

Desta forma, o presente trabalho apresentou como premissa o diferencial em preparar os biocatalisadores a partir da lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20) a fim de aplicá-las na síntese de lipídios estruturados do tipo MLM. Em reator de tanque agitado, em sistema batelada, foi efetuada a otimização dos parâmetros reacionais como temperatura e razão molar (ácido: óleo). Adicionalmente, os parâmetros otimizados foram reavaliados por redes neurais e posteriormente utilizados em reatores de leito fixo e de leito fluidizado operando em sistema contínuo para a produção de MLM, visto que esses reatores possibilitam ganho em produtividade e são pouco abordados pela literatura neste tipo de síntese.

REFERÊNCIAS

ALI, S.; KHAN, S.A.; HAMAYUN, M.; LEE, I.-J. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. **Microorganisms**, v. 11, c. 2, n. 510, doi: 10.3390/microorganisms11020510.

AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG, H. C.; MAZAHARI, H.; CHEN, W. H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339-353, 2017.

BASSAN, N.; RODRIGUES, R. H.; MONTI, R.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PAULA, A. V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in batch reactor. **LWT – Food Science and Technology**, v. 99, p. 600-606, 2019.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial Lipases: An Overview of Screening, Production and Purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101-368, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101368

BON, E. P.S.; PEREIRA, J.R.N.; GOTTSCHALK, L.M.F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M.A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. **Interciência**, v.1, p. 95-116, 2008.

CABALLERO, E.; SOTO, C.; OLIVARES, A.; ALTAMIRANO, C. Potential use of avocado oil on Structured lipids MLM type production catalysed by commercial immobilised lipases. **PLoS One**, v. 9, p. 1–7, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0107749.

CAO, Y.; QI, S.; ZHANG, Y.; WANG, X.; YANG, B.; WANG, Y. Synthesis of structured lipids by Lipase-Catalyzed interesterification of triacetin with camellia oil methyl esters and preliminary evaluation of their plasma lipid-lowering effect in mice. **Molecules**, v. 18, p. 3733 – 3744, 2013.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicações**, v. 1, p. 275-337, 2010.

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

CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, P.S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, Cap. 6, p. 123-147, 2008.

CHANDRA, P.; ENESPA, R. S.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial

applications: a comprehensive review. **Microb Cell Fact**, v. 19, n. 169, 2020, doi: 10.1186/s12934-020-01428-8

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ. EPUB, 2008.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508–5516, 2010.

DANTAS, J. H.; PARIS, L. D.; BARÃO, C. E.; ARROYO, P. A.; SOARES, C. M. F.; VISENTAINER, J. V.; FARIA, F.; ZANIN, G. M. Influence of alcohol: oil molar ratio on the production of ethyl esters by enzymatic transesterification of canola oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 50, p. 6968-6979, 2013.

ELTWERI, A. M.; THOMAS, A. L.; CALDER, P. C.; DENNISON, A. R.; BOWREY, D. J. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 65-78, 2017.

FELTES, M. M. C.; DE OLIVEIRA PITOL, L.; GOMES CORREIA, J. F.; GRIMALDI, R.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil by chemical and enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197-212, 2010.

FERREIRA-DIAS, S.; OSÓRIO, N. M.; RODRIGUES, J.; TECELÃO, C. Structured Lipids for Foods. **Reference Module in Food Science**, p. 357-369, 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21766-6.

FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 1-38, 2013.

FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 1-38, 2013.

FUENTES, N. R.; KIM, E.; FAN, Y.Y.; CHAPKIN, R. S.; Omega-3 fatty acids, membrane remodeling and cancer prevention. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 64, p. 79-91, 2018.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in

synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

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

HUANG, C.; ZHOU, Y.; LI, L.; LIN, L.; LI, C.; YE, Y. Insight into the medium-long-medium structured lipids made from *Camellia* oil: Composition–structure relationship. **Journal of Food Science**, v. 88, c. 8, p. 3384-3397, 2023, doi: 10.1111/1750-3841.16677

HUERTA-YÉPEZ, S.; TIRADO-RODRIGUEZ, A. B.; HANKISON, O. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 73, n. 6, p. 446-456, 2016.

KARL-ERICH, J.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, c.1, p. 29–63, 1994, doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x

KANDA, A.; NAMIKI, F.; HARA, S. Enzymatic preparation of structured oils containing short-chain fatty acids. **Journal of oleo science**, v. 59, n. 12, p. 641-645, 2010.

KUMAR, A.; VERMA, V.; DUBEY, V.K.; SRIVASTAVA, A.; GARG, S.K.; SINGH, V.P.; ARORA, P.K. Industrial applications of fungal lipases: a review. **Front. Microbiol.**, v. 14, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1142536.

LEE, Y.Y.; TANG, T.K.; LAI, O.M. Health benefits, enzyme production and application of medium-chain triglycerides and long (MLCT) in food industry: a review. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. 137-144, 2012.

NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 7, p. 1287-1295, 2012.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTES, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Journal of Chromatographic A**, v. 1038, n. 1-2, p. 267-273, 2004.

REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A.V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022, doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.

RIOS, V. R.; PESSANHA, F. D. M.; ALMEIDA, F. P.; VIANA, L. C.; LANNES, S. C. C. Application of fats in some food products. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 3-15, 2014.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, A.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-

LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 746-770, 2019.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia aplicada à agro & indústria**, v. 4, p 529-568, 2016.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 628-634, 2010.

TIAN, W.; YAN, X.; ZENG, Z.; XIA, J.; ZHAO, J.; ZENG, G.; YU, P.; WEN, X.; GONG, D. Enzymatic interesterification improves the lipid composition, physicochemical properties and rheological behavior of *Cinnamomum camphora* seed kernel oil, *Pangasius bocourti* stearin and perilla seed oil blends. **Food Chemistry**, v. 430, n. 137026, ISSN 0308-8146, 2024, doi:10.1016/j.foodchem.2023.137026.

WANG, Y.; XIA, L.; XU, X.; XIE, L.; DUAN, Z. 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.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalized process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o foco no seguimento metodológico para o desenvolvimento das etapas do presente trabalho de tese, a Figura 3.1 representa as sequências envolvidas desde os estudos preliminares de carregamento de imobilização enzimática até os ensaios de citotoxicidade utilizando os lipídios estruturados nanoemulsionados.

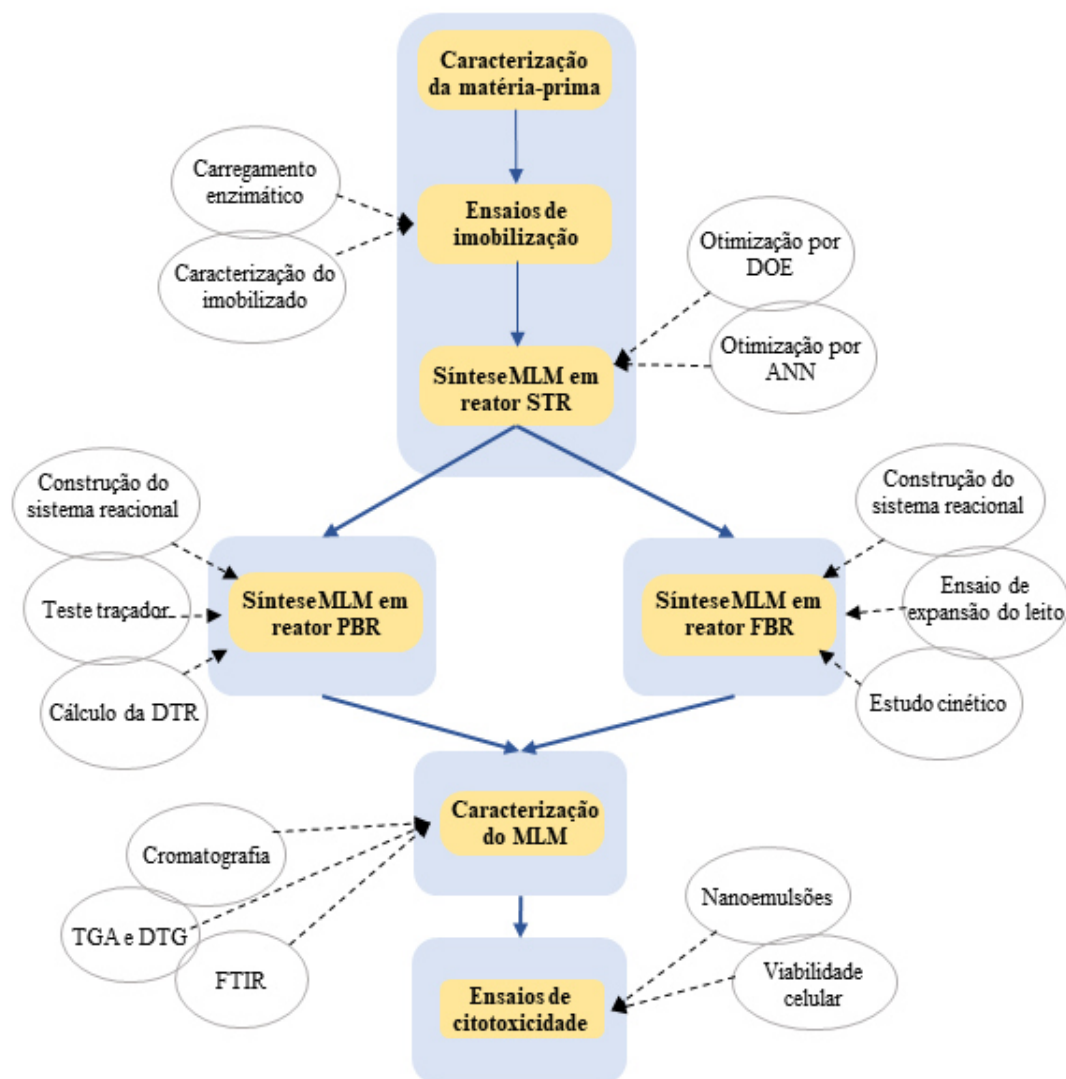


Figura 3. 1 - Mapa mental das etapas experimentais realizadas.

3.1 Lista de equipamentos

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento experimental presente neste trabalho de tese estão dispostos na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Equipamento	Fabricante / Modelo
Balança analítica	Shimadzu, Modelo AUX 220
pHmetro	TECNAL, Modelo TEC 2
Balança determinadora de umidade	Shimadzu, Modelo MOC-63U
Autoclave	Phoenix-Luferco®, Modelo AV-75
Estufa de secagem	Quimis, Modelo Q317M-42
Agitador magnético	TECNAL, TE-0851
Rotaevaporador	BÜCHI, Modelo R-124
Bomba peristáltica	SOLAB, Modelo SL-64
Bomba à vácuo	Primatec, Modelo 121
Espectrofotômetro	GENESYS™ (Thermo Fisher Scientific), Modelo 10S UV-Vis
Cromatógrafo a gás	Shimadzu, Modelo CG-2014
Termogravimétrico	TA Instruments (modelo Q500)
FTIR	Spectrum Two FT-IR da Perkin Elmer
Zeta Size	Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK)
Leitor de microplacas EnSpire	EnSpir (PerkinElmer, USA)

3.2 Suporte de imobilização

No decorrer deste estudo, foi utilizada a lipase de *Rhizopus oryzae* de grau alimentício, gentilmente doada pela empresa PROZYN® (São Paulo, Brasil). Assim, no processo de imobilização foi empregado a resina polimérica comercial Diaion™ HP-20, que é produzida a partir de um copolímero de estireno-divinilbenzeno (98%, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA). As propriedades texturais desses suportes estão detalhadas na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 - Superfície específica, volume de poros e tamanho médio dos poros para ambos o suporte e Diaion™ HP-20.

Suporte	Área superficial específica (m ² g ⁻¹)	Volume específico dos poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro médio dos poros (Å)
Diaion™ HP-20	590,00	1,3	290,00

Fabricante Product Diaion™ HP-20.

3.3 Outros reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha), azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local), hidróxido de potássio (min. 85%), álcool etílico (95%) , hexano adquiridos da Cromoline (São Paulo), goma arábica em pó pura (Synth), Lipoid S100 (lecitina de soja fosfatidilcolina 0,75% (v/v)), Pluronic P-68 0.75% (w/v), soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, Brasil) e solução de antibiótico Penicilina-Estreptomicina (10.000 U/mL) a 1% (Vitrocell, Campinas, Brasil).. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.4 Metodologia experimental

3.4.1 Caracterização da matéria-prima

Para a caracterização do óleo de semente de uva foram realizados os ensaios de índice de peróxido (método Cd 8b-90) e índice de acidez (método Ca 5^a-40) conforme os métodos oficiais da American Oil Chemist's Society (AOCS).

O perfil da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa foi determinado segundo a ISO 12966 (2014) com adaptações, substituindo-se o gás hélio pelo gás nitrogênio. Para estabelecimento do método de determinação de perfil de ácidos graxos (C4 à C24) e alguns ésteres de ácidos graxos, foram injetados padrões separadamente dos ácidos graxos presentes no óleo de semente de uva, bem como o mix de padrões de ésteres de ácidos graxos (mix de FAMES, Supelco®). Os testes foram realizados em um cromatógrafo a gás (Shimatzu®, modelo GC-2014) utilizando injetor Split, detector de ionização por chama (DIC) e coluna SH-Stabilwax-DA (L x I.D. 30 m x 0,25 µm, df 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, sendo

o modo de injeção Split (1:10) e o nitrogênio utilizado como gás de arraste, na vazão de 0,55 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, atingindo 210°C (taxa de aquecimento de 20°C/min), permanecendo em 210°C por 7 minutos. Após, a temperatura foi elevada a 250 °C (20°C/min), sendo mantida por 14 minutos, resultando em 21 minutos de tempo total de análise. Em seguida, as áreas dos picos obtidos foram relacionadas determinando-se o grau de incorporação (%GI).

3.4.2 Imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae*

O suporte polimérico Diaion™ HP-20 foi inicialmente seco em estufa a 60 °C por 12 horas e posteriormente incubado em 10 mL de hexano (1g de suporte: 10 mL de hexano) e 300 mg do pó enzimático foram adicionados aos poucos sob agitação. O imobilizado foi mantido em repouso sob refrigeração a 4 °C por 12 h, seguindo o trabalho de Miotti Jr. e colaboradores (2022).

3.4.3 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase foi avaliada usando o método de hidrólise do azeite de oliva, com base em uma modificação do procedimento descrito por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados durante a hidrólise foram titulados com uma solução previamente padronizada de KOH (0,02 mol L⁻¹) na presença de fenolftaleína como indicador. A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que liberava 1 µmol de ácido graxo por minuto sob as condições do ensaio. As atividades foram calculadas conforme a Equação 1 e expressas em termos de µmol g⁻¹ min⁻¹ (U g⁻¹).

$$\text{Atividade hidrolítica } (\mu \frac{\text{mol}}{\text{g.mim}}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (1)$$

Em que: V_a= volume de KOH gasto na titulação da amostra em mL, V_b= volume do KOH gasto na titulação do branco em mL, M= molaridade da solução de KOH em mol/L, t= tempo de reação em min, m= massa em gramas.

3.4.4 Ensaios de carregamento enzimático

Utilizando 1 g do suporte e seguindo os procedimentos de imobilização descritos no tópico 4.2.1 foram preparados 5 carregamentos enzimáticos em diferentes dosagens,

sendo elas 0,15; 0,30; 0,50; 0,75 e 1 g de pó enzimático adicionados a cada grama de suporte. Após o procedimento de imobilização, os derivados imobilizados foram secos por filtração a vácuo até atingir valores de umidade entre 5-10% e realizada a dosagem da atividade hidrolítica de cada carregamento.

3.4.5 Caracterização do derivado imobilizado

Para a caracterização da enzima imobilizada foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para definir temperatura e pH ótimos utilizando o software Protimiza Experimental Design®. A Tabela 3.3 mostra os valores dos níveis para cada fator utilizado.

Tabela 3.3 - Valores utilizados no planejamento experimental para a caracterização da enzima imobilizada.

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	5,4	6	7,5	9	9,6
Temperatura (°C)	33	35	40	45	47

Os ensaios foram realizados de acordo com o tópico 4.2.2 para determinar a atividade hidrolítica, diferenciados pela temperatura do banho de incubação e pH da solução tampão utilizada.

3.4.6 Ensaios de estabilidade térmica do derivado imobilizado

A enzima imobilizada (1,0 g) foi incubada em tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 (10 mL) em um banho termostático a temperaturas variando de 35 a 55 °C com incrementos de 10 °C. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo específicos e imediatamente resfriadas em um banho de gelo para interromper a reação de inativação. A atividade residual foi determinada através da hidrólise de emulsão de azeite de oliva, conforme mencionado no tópico 3.4.3.

3.4.7 Ensaios de reutilização do biocatalisador

A fim de estudar a capacidade de reutilização de biocatalisadores em meio orgânico, o biocatalisador foi preparado utilizando 0,3 gramas de pó enzimático por grama de suporte, e 0,8 gramas (massa seca) de biocatalisador foram incubados com 8

gramas de óleo de semente de uva e 12 gramas de ácido cárpico por um período máximo de 24 horas a 41°C sob agitação magnética. Ao final de cada lote, o biocatalisador foi removido do meio reacional e lavado com hexano frio em excesso para remover qualquer substrato e produto retidos em seu microambiente. Em seguida, o biocatalisador foi introduzido em um novo meio reacional e as reações foram periodicamente monitoradas avaliando a porcentagem de conversão usando o teste de Tukey. Adicionalmente foram realizados os cálculos da constante de desativação (k_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) por meio das equações (2) e (3).

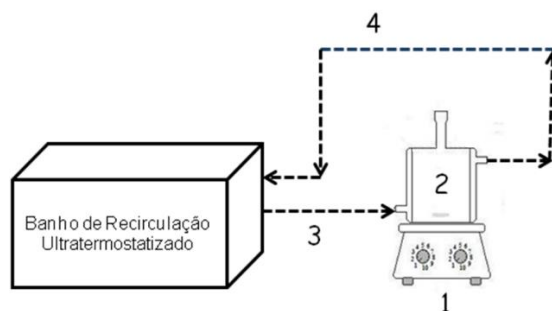
$$\ln(A_t) = \ln(A_0) - k_d \cdot t \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (3)$$

Em que: A_t = atividade hidrolítica final; A_0 = atividade hidrolítica inicial; k_d = constante de desativação; $t_{1/2}$ = tempo de meia vida.

3.4.8 Reações de acidólise em reator descontínuo de tanque agitado

O meio contendo o óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10) foi preparado para uma quantidade final de 20 g para as proporções utilizadas e adicionada em reator de tanque agitado com 6 cm de altura e 3 cm de diâmetro, barra magnética cilíndrica, 30 x 8 mm para homogeneização do meio em banho termostático e operando em modo batelada. As reações foram mantidas por 24 horas. Ao fim, a agitação foi encerrada e com a sedimentação dos biocatalisadores o meio reacional foi recolhido com pipeta de Pasteur. Um esquema do sistema reacional é apresentado pela Figura 3.2

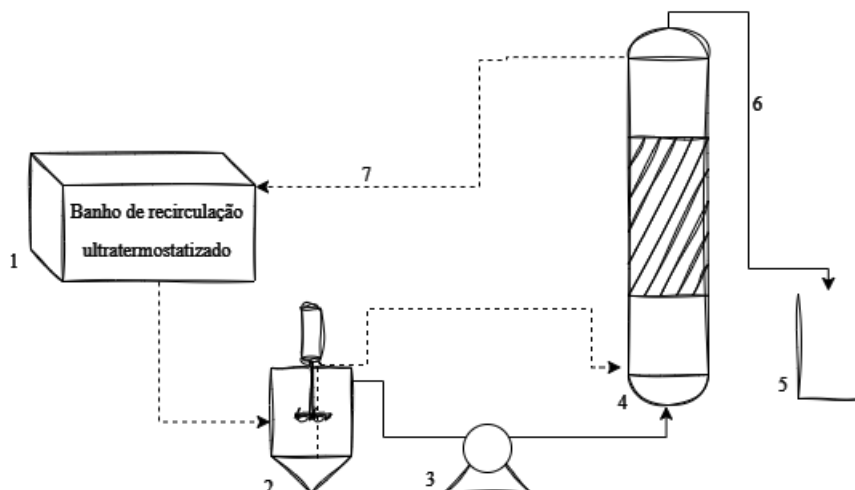


- (1) agitador magnético; (2) reator de tanque agitado com meio reacional; (3) entrada da água de recirculação; (4) saída da água de recirculação.

Figura 3.2 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em reator de tanque agitado.

3.4.9 Reações de acidólise em reator de leito fixo

O sistema reacional consistiu em uma coluna de vidro (altura de 210 mm, diâmetro interno de 14 mm e volume total de 32 cm³) (Figura 3.3). A coluna foi preenchida com lipases imobilizadas em Diaion™ HP-20 (15 g). Uma mistura de óleo de semente de uva e ácido cáprico em proporções de 1:6,7 mols foi mantida a 41°C, otimizada por sistema de redes neurais artificiais, foi mantida em um tanque de alimentação sob agitação magnética (150 rpm). O substrato foi bombeado por uma bomba peristáltica (Bomba SJ-1211, Atto Bioscience & Biotechnology, Tóquio, Japão) para a coluna preenchida correspondendo a tempos de residência de 24 horas. Amostras foram coletadas diariamente na saída do reator e as análises de grau de incorporação do ácido cáprico foram realizadas em cromatógrafo gasoso.

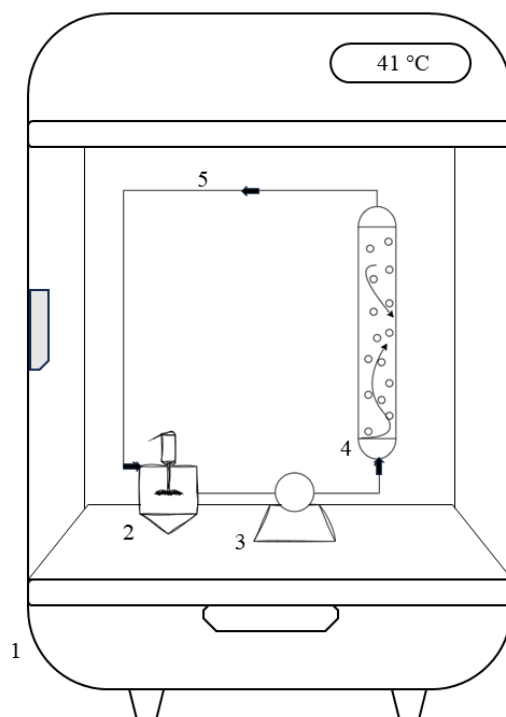


(1)banho de recirculação ultratermostatzado; (2) tanque de mistura; (3) bomba peristáltica; (4) reator de leito fixo; (5) tanque de armazenamento do produto; (6) linha de alimentação; (7) linha de aquecimento.

Figura 3.3 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em fluxo contínuo em reator de leito fixo.

3.4.10 Reações de acidólise em reator de leito fluidizado

Inicialmente, foi desenvolvido um sistema fechado com a capacidade de manter a temperatura interna. Para isso, a estrutura de um refrigerador foi utilizada e modificada de modo a trabalhar como uma estufa, mantendo a temperatura de 41 °C. O sistema reacional consistiu em uma coluna de vidro (altura de 210 mm, diâmetro interno de 14 mm e volume total de 32 cm³) (Figura 3.4). A coluna foi preenchida com lipases imobilizadas em Diaion™ HP-20 (5 g). A mistura de óleo de semente de uva e ácido cáprico em proporções de 1:6,7 mols foi mantida a 41°C, otimizada por sistema de Redes Neurais Artificiais, foi mantida em um tanque de alimentação sob agitação magnética (150 rpm). O substrato foi bombeado por uma bomba peristáltica (Bomba SJ-1211, Atto Bioscience & Biotechnology, Tóquio, Japão) para a coluna preenchida correspondendo a vazões necessárias para manter o leito catalítico fluidizado. Amostras foram coletadas diariamente na saída do reator e as análises de grau de incorporação do ácido cáprico foram realizadas em cromatógrafo gasoso seguindo as metodologias descritas pelos tópicos 3.4.1, 3.4.11, 3.4.12 e 3.4.13.



(1) refrigerador modificado; (2) tanque de alimentação; (3) bomba peristáltica; (4) reator de leito fluidizado; (5) linha de alimentação.

Figura 3. 4 - Esquema trivial do sistema reacional da síntese de lipídios estruturados em reator de leito fluidizado.

3.4.11 Neutralização do meio reacional após reação

Após o término da reação, foi removido o biocatalisador e o meio reacional foi adicionado em funil de separação de 150 mL e diluído em 30 mL de n-hexano. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução de 0,8 mol/L de KOH hidroalcóolico (30% etanol). Agitando-se vigorosamente a mistura, ocorreu a separação de fases: uma hidroalcóolica contendo os ácidos graxos livres e uma fase orgânica contendo os triglicerídeos (TAG). Recolhida a fase orgânica contendo os TAG, foi realizada novamente o processo de extração com o acréscimo de 10 mL de hexano. A fase recuperada contendo hexano foi submetida a rotaevaporador a 40°C pelo tempo necessário para que o solvente fosse evaporado (Wang et al., 2012).

3.4.12 Metilação do triacilglicerol ao final das reações

A metilação foi realizada de acordo com a ISO 12966-2 (2014) com adaptações. Aproximadamente 250 mg da amostra lipídica previamente submetidos ao processo de

neutralização (tópico 3.4.11) foram pesados em um vial de 20 mL. 4 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 M) foram adicionados e a mistura foi aquecida em banho de glicerina (80°C, 15 minutos), sob agitação. Após, 4 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1M) foram adicionados ao vial. A amostra foi novamente submetida a esquecimento em banho de glicerina (80°C, 15 minutos), sob agitação, e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Por fim, 3 mL de hexano e aproximadamente 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio foram adicionados. A mistura foi agitada e em seguida mantida em repouso para separação de fases. A fase superior (orgânica) foi transferida para um novo vial de 20 mL. O hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e o éster metílico obtido foi submetido à análise em cromatografia gasosa conforme descrita pelo tópico 3.4.1.

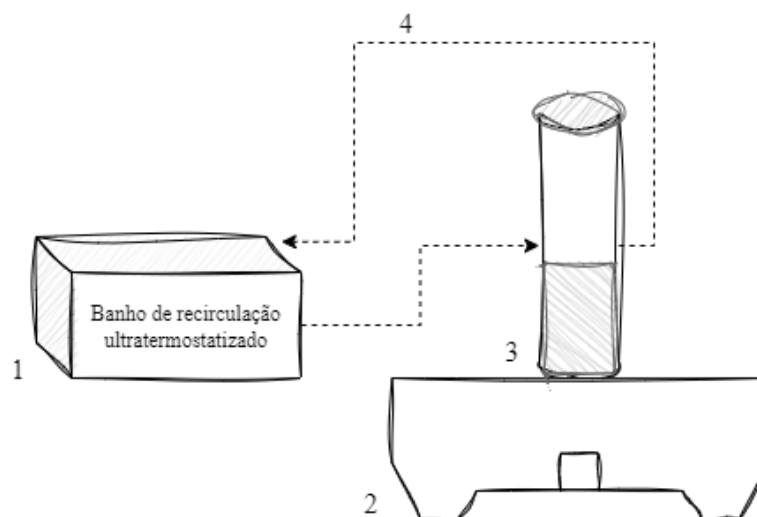
3.4.13 Determinação do grau de incorporação do ácido cáprico

O grau de incorporação (% GI) será calculado de acordo com a equação 4 (Casas-Godoy et al., 2013), na qual MFA é o número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C10:0) no triglicerídeo e MT é o número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo.

$$GI (\%) = \frac{MFA}{MT} \cdot 100 \quad (4)$$

3.4.14 Determinação da composição em ácido graxo da posição *sn*-2 do triacilglicerol

A análise da composição do perfil em ácidos graxos na posição *sn*-2 do triglicerídeo modificados foram realizadas com base no método descrito por Caballero e colaboradores (2014). Para conduzir o procedimento, foi utilizado reator de vidro encamisado em forma de tubo de centrífuga. Foram adicionados aproximadamente 100 mg de amostra, 1 mL de tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8), 250 µL de sal biliar (0,05 % m/v), 100 µL de cloreto de cálcio (2,2 % m/v) e 100 mg de lipase pancreática de porco (LPP), conforme ilustrado na Figura 3.5.



(1) banho de recirculação; (2) placa de agitação magnética; (3) reator em formato de tubo; (4) linha de aquecimento.

Figura 3. 5 - Esquema trivial do sistema reacional da determinação do perfil em ácidos graxos na posição *sn*-2 do triglicerídeo modificado.

A mistura foi mantida a uma temperatura constante de 40 °C, com agitação contínua, por 30 minutos. Após o período, a ação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido clorídrico 6 M. Em seguida, os glicerídeos foram extraídos utilizando 3 mL de éter etílico, e a mistura foi submetida à centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, a fase orgânica foi aplicada a uma placa cromatográfica de sílica gel suportada em alumínio. A placa foi submetida a uma mistura composta por hexano, éter etílico e ácido acético nas proporções de 70:30:1 (v/v/v). Após a corrida cromatográfica, a placa foi revelada através da aplicação de 2,7-diclorofluoresceína a 0,2 % m/v. A banda correspondente aos monoglicerídeos foi cuidadosamente coletada por raspagem e submetida a uma extração utilizando 2 mL de éter etílico. Posteriormente, o solvente foi evaporado, possibilitando a coleta da amostra para a determinação do perfil composicional.

3.4.15 Cálculos para a determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

A determinação do tempo de residência do reator de leito fixo foi realizada a partir da determinação da dispersão axial, conforme descrita por Zanin e colaboradores (2004). O desvio do comportamento ideal do escoamento do fluido no reator foi

determinado através da curva de distribuição de concentração no fluxo de saída usando o teste de traçador tipo pulso. O traçador utilizado foi uma solução de corante lipossolúvel (corante azul, grau alimentício da marca MIX®, São Bernardo do Campo, Brasil) em óleo de semente de uva. O teste realizado no reator foi conduzido com auxílio de banho termostático à temperatura de 41°C, mesma utilizada nas reações de acidólise enzimática. O reator foi fixado com 15 gramas do derivado imobilizado. O óleo foi alimentado em fluxo ascendente para vazões ajustadas para o tempo espacial de 24 horas. O reator operou até que as condições de temperatura, vazão e altura do leito fossem estabilizadas. Em seguida, o pulso de traçador foi aplicado na linha da corrente de alimentação do reator, com auxílio de uma seringa contendo 1 mL de solução concentrada de corante.

Para o ensaio de tempo espacial foram coletadas alíquotas a cada 60 min em um total de 2880 min de tempo operacional. Em seguida a leitura da absorbância das amostras foram efetuadas em espectrofotômetro, a 545 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em concentração de traçador.

A fim de determinar o volume útil do reator, foi utilizada a equação 5:

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{enz}} \quad (5)$$

Na qual, V_{reator} é o volume total de reator e V_{enz} é o volume ocupado pela enzima (mL). O tempo espacial, τ (min), foi calculado com auxílio da equação 6:

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (6)$$

Sendo, $V_{\text{útil}}$ o volume útil de reator (mL), Q a vazão da bomba (mL.min⁻¹) e τ o tempo espacial (min⁻¹).

A distribuição dos tempos de escoamento das partículas de fluido na saída do sistema, $E(t)$, foi calculada com o auxílio a partir da equação 7 (Fogler, 2002):

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (7)$$

Sendo $C(t)$ (mg/mL) a concentração de saída do traçador no tempo t e a integral $\int_0^{\infty} C(t)dt$ corresponde numericamente à área abaixo da curva do gráfico $C(t)$ x t .

O tempo médio de residência (t_m) pode ser obtido com o auxílio da equação 8, a qual representa numericamente a área abaixo da curva do gráfico $tE(t)$ x t . (Levenspeal, 1999):

$$t_m = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (8)$$

Dessa forma, as equações 6 e 8 permitem comparar o valor teórico de tempo espacial com o valor obtido experimentalmente (tempo médio de residência) e assim caracterizar o reator quanto a sua hidrodinâmica.

3.4.16 Curva de calibração do corante

Foram preparadas misturas (óleo de semente de uva e corante) com concentrações de 0,1; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 mg/mL, e as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 545 nm. Com os resultados da média da triplicata das absorvâncias foi construído um gráfico relacionando a absorvância e a concentração do traçador, obtendo-se a curva de calibração do corante a partir de regressão linear.

3.4.17 Cálculo da densidade da enzima imobilizada

O cálculo para a determinação da densidade do biocatalisador a ser utilizado como leito fixo e em leito fluidizado foram determinadas utilizando-se balão volumétrico aferido com heptano à temperatura de 20 °C. A massa conhecida de imobilizado foi adicionada em um balão de 5 mL e o volume foi completo com heptano, o sistema foi submetido a vácuo para eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O volume do balão foi então ajustado com heptano até que o menisco estivesse alinhado com a marca de aferição do balão. A densidade foi calculada pela relação entre a massa (em gramas) e o volume (em mL) ocupado pelo biocatalisador, conforme estabelecido na equação 9 (Simões et al., 2015).

$$\rho_w = \frac{\text{massa de enzima imobilizada}}{\text{Volume do balão} - \text{Volume de heptano}} \left(\frac{g}{mL} \right) \quad (9)$$

3.4.18 Cálculo da velocidade mínima de fluidização

Para realizar o cálculo da determinação da velocidade mínima de fluidização em vazão ascendente, os ensaios foram realizados utilizando quantidade fixa de 5 gramas de derivado imobilizado em carregamentos diferentes de enzima. Foram testadas cargas de 0,3, 0,5 e 1,0 gramas de enzima por grama de suporte de imobilização, enquanto a altura do leito foi registrada em relação às diferentes taxas de fluxo empregadas. Para cada vazão, era mantido o tempo de 10 min a fim de garantir a estabilização completa do leito, assim, após esse tempo era realizada a medição da altura do leito.

Para cada carregamento enzimático, foi calculada a porosidade (ε) a partir da equação 10.

$$\varepsilon = \frac{(V_t - V_s)}{V_t} = 1 - \frac{M_s}{\rho_s \cdot A \cdot h} \quad (10)$$

Em que: ε = porosidade do leito; V_t = volume total do reator (cm^3); V_s = volume ocupado pelas partículas catalíticas (cm^3); M_s = massa de biocatalisador (g); ρ_s = densidade das partículas catalíticas (g/cm^3); A = área da seção transversal do reator (cm^2); h = altura do leito catalítico (cm).

Conforme proposto por Richardson e Zaki (1954), para calcular a velocidade mínima de fluidização a partir da expansão do leito catalítico composto por partículas esféricas de diâmetro uniforme, os autores apresentaram as equações (11) e (12).

$$\frac{u}{u_{tc}} = \varepsilon^n \quad (11)$$

$$\log u_{tc} = \log u_t - \frac{dp}{di} \quad (12)$$

Em que: u = velocidade superficial do fluido ($u = Q/A$); u_{tc} = velocidade terminal da partícula corrigida pelo efeito da parede da coluna; n = coeficiente de expansão; u_t = velocidade terminal da partícula; d_i = diâmetro interno do reator; dp = diâmetro da partícula sólida.

Deste modo, com a linearização da equação (11), é fornecida a seguinte relação expressa pela equação (13).

$$\ln(u) = n \cdot \ln(\epsilon) + \ln(u_{tc}) \quad (13)$$

Assim, com a construção do gráfico de $\ln(n)$ *versus* $\ln(\epsilon)$, os coeficientes angular e linear da reta obtida fornecerão o coeficiente de expansão (n) e o logaritmo neperiano da velocidade terminal da partícula corrigida (u_{tc}), respectivamente.

3.4.19 Preparo das nanoemulsões com lipídios estruturado do tipo e óleo de semente de uva

O desenvolvimento das nanoemulsões foi realizado seguindo o método de nanoprecipitação/precipitação espontânea conforme descrito por Siqueira-Moura e colaboradores (2015) com modificações. O lipóide S100 (fosfatidilcolina de soja 0,75% (v/v)) foi homogeneizado em acetona com posterior adição de óleo de semente de uva e/ou lipídio estruturado 2,5 (v/v), caracterizando a fase orgânica. Pluronic P-68 0,75% (p/v) foi homogeneizado em água ultrapura Milli-Q, caracterizando a fase aquosa. A fase orgânica foi lentamente filtrada na fase aquosa em condições específicas (50°C e 400rpm de agitação) com posterior extração do solvente orgânico por evaporação rotativa, obtendo-se um volume final de 10mL de formulação.

3.4.20 Cultura celular e viabilidade celular *in vitro*

Fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 – ATCC® CRL-1658™) e células de câncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2) foram cultivados seguindo o protocolo de Amaral e colaboradores (2022), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Vitrocell, Campinas, Brasil) e solução de antibiótico penicilina-estreptomicina 1% (10.000 U/mL) (Vitrocell, Campinas, Brasil). Após o cultivo, foram realizados ensaios de viabilidade *in vitro*, onde foram semeadas células NIH/3T3 em uma placa de 96 poços (5×10^3 células/poço) e incubadas por 24 h. Posteriormente, foi adicionado nanoemulsão/lipídios estruturados na faixa de concentração de 1,25 a 2% v/v e nanoemulsão/óleo de semente de uva nas mesmas concentrações usando meio DMEM para diluições e incubado por 3 h. Após 24 h, o metabolismo celular viável foi medido usando solução de resazurina a 10% ($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em PBS) incubada por 4 h, a mudança de cor dos compostos azul para rosa mostra redução metabólica de resazurina para risofurina. As análises de fluorescência foram realizadas no leitor de microplacas EnSpire® (PerkinElmer, EUA) com comprimento de onda de excitação em 540 nm e

emissão em 590 nm. A porcentagem de células viáveis (%) foi calculada seguindo a equação (14).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{O.D. \text{ amostra}}{O.D. \text{ controle}} \right) \times 100 \quad (14)$$

3.4.21 Caracterização Físico-Química por Espalhamento Dinâmico de Luz das nanoemulsões

O número de partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram analisados de acordo com o fabricante, utilizando o modelo Zeta Sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) por 43 dias após a síntese.

3.4.22 Análise termogravimétrica do lipídio estruturado e óleo de semente de uva

As medidas de análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas em um modelo TGA Q500 (TA Instruments) sob gás nitrogênio (fluxo da amostra 60 mL/min; fluxo da balança 40 mL/min). Testes de estabilidade térmica foram realizados em amostras completamente fundidas carregadas em um cadinho de platina e aquecidas de 25 a 600°C a uma taxa de 10°C/min com vazões de purga da balança e amostra de 40 e 60 mL/min respectivamente. As medidas foram realizadas em triplicata. Os dados da TGA foram analisados usando o software TA Universal Analysis.

3.4.23 Análise por FTIR do lipídio estruturado e óleo de semente de uva

A análise vibracional da amostra foi realizada utilizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por refletância, recorrendo à técnica de amostragem não destrutiva de refletância total atenuada (ATR).

O espectro de infravermelho (4000-550 cm⁻¹) da amostra foi registrado usando um espectrômetro Spectrum Two FT-IR da Perkin Elmer, equipado com detetor DTGS e um divisor de feixe de KBr. O registro do espectro foi efetuado com resolução 4.0 cm⁻¹ com 32 acumulações. Foi utilizado um acessório de amostragem da Perkin Elmer, módulo universal ATR (UATR - Universal Attenuated Total Reflectance) com cristal de diamante/ZnSe, à qual foi aplicada força de 30N constante em todo o registro.

3.4.24 Construção da Rede Neuronal Artificial (ANN)

O desenvolvimento da ANN para simular a produção de lipídios estruturados baseou-se nos dados experimentais obtidos a partir do modelo de planejamento experimental de segunda ordem desenvolvido por Miotti Junior e colaboradores (2022b).

O software MATLAB 2022® foi empregado como uma ferramenta de inteligência para projetar e simular o bioprocesso usando um modelo matemático não linear. Para isso, foram desenvolvidas várias arquiteturas de ANN feed-forward com o objetivo de encontrar o modelo que melhor se ajustasse e demonstrasse capacidade de generalização, aprendizado e alta resistência a ruídos e falhas. Foram analisadas diferentes funções objetivo, funções de ativação e números de neurônios na camada intermediária. A seleção do modelo de melhor desempenho baseou-se na minimização da função objetivo e no alcance do melhor coeficiente de correlação de Pearson (R). Este modelo escolhido foi então aplicado na otimização das variáveis de entrada para maximizar a produção do bioproduto final.

3.4.25 Variações de funções na construção das arquiteturas ANN

Para definir a função objetivo, optou-se entre funções de erro quadrático médio (EQM) e soma do erro quadrado (SEQ). Os testes no software MATLAB 2022a® com configurações fixas, incluindo o algoritmo de treinamento Levenberg-Marquardt (LM) e um número aleatório de 6 neurônios na camada intermediária. A escolha do algoritmo LM baseou-se na sua ampla aplicação na literatura em simulações de bioprocessos em ANN (Reis et al., 2022; Ekpenyong et al., 2020; Badhwar et al., 2020). Além disso, o LM apresenta um critério de parada de treinamento precoce que acelera o processo de treinamento da ANN, aumentando sua eficácia (Jokić et al., 2020).

Cada função objetivo foi testada com três funções de ativação diferentes: tangente hiperbólica (tansig), log-sigmoide (logsig) e função linear (purelin). O quadro 3.1 abaixo apresenta as fórmulas das funções objetivo e de ativação utilizadas nos testes de arquitetura.

Quadro 3–1 - Equações das funções objetivo do erro quadrático médio (EQM) e soma do erro quadrado (SEQ) e as representações matemáticas das funções de ativação *tansig*, *logsig* e *purelin*.

Função objetivo	EQM	$\sum \frac{(real - previsto)^2}{\text{número total de itens}}$
	SEQ	$\sum (real - previsto)^2$
Função ativação	<i>logsig</i>	$F(Net_k) = \frac{1}{1 + e^{-a \times Net_k}}$
	<i>tansig</i>	$F(Net_k) = \frac{2}{1 + e^{-a \times Net_k}} - 1$
	<i>purelin</i>	$F(Net_k) = \begin{cases} 1 & \text{se } 0,5 \leq Net_k \\ Net_k & \text{se } -0,5 < Net_k < 0,5 \\ 0 & \text{se } Net_k < -0,5 \end{cases}$

No treinamento da rede neuronal, os dados experimentais foram divididos em três grupos: 15% para testes, 15% para validação e 70% para aprendizado. A escolha da função objetivo é fundamental, pois determina a qualidade do ajuste numérico entre os dados de entrada e os resultados simulados pela rede. Após selecionar a função objetivo, procedemos à escolha da função de ativação e do número de neurônios na camada intermediária.

As configurações fixas para a rede foram definidas, incluindo o uso do algoritmo de treinamento LM e a função objetivo de melhor desempenho. Diferentes números de neurônios (2-6) com as funções de ativação *tansig*, *logsig* e *purelin* foram testadas para a rede, sendo que a seleção do número de neurônios é crítica, pois afeta a capacidade da rede de aprender e generalizar. Neurônios insuficientes levam a um aprendizado superficial (*underfitting*), enquanto um excesso de neurônios causa propagação de erro (*overfitting*). Portanto, é essencial encontrar o número ideal para cada problema (Yotov et al., 2020; Adil et al., 2020).

A escolha da função de ativação é igualmente relevante, pois ela introduz não-linearidade à rede, afetando como os pesos e os vieses se ajustam durante o treinamento,

influenciando as respostas das saídas. Essas decisões são cruciais para modelar eficazmente a rede neuronal (Amenaghawon et al., 2022; Cabaneros et al., 2019; Yogitha e Mathivanan, 2018).

3.4.26 Otimização do modelo matemático obtido por ANN

Após determinar a arquitetura de melhor desempenho da ANN, o processo de otimização das variáveis de entrada para maximizar a produção do bioproduto foi processada, correspondendo à saída da ANN. O software MATLAB 2022a® e a função 'fmincon' para realizar a otimização foram utilizadas.

Para adaptar a função ao objetivo de maximização do grau de incorporação do ácido cáprico, o conceito de minimização, usando a função negativa ($-f(x)$) foi aplicada. A função $f(x)$ da ANN selecionada como a de melhor desempenho foi empregada nesse processo de otimização. Com isso, foi permitido determinar o valor máximo da saída, juntamente com os valores correspondentes das variáveis independentes de entrada.

REFERÊNCIAS

- ADIL, M.; ULLAH, R.; NOOR, S.; GOHAR, N. Effect of number of neurons and layers in an artificial neural network for generalized concrete mix design. **Neural Comput Appl**, v. 34, n. 11, p. 8355–8363, 2022, doi: 10.1007/S00521-020-05305-8/METRICS.
- AMARAL, S.R.; AMANTINO, C.F.; DE ANNUNZIO, S.R.; DE PAULA, A. V.; FONTANA, C. R.; PRIMO, F. L. Advanced methylene blue nanoemulsions for in vitro photodynamic therapy on oral and cervical human carcinoma. **Lasers Med Sci**, v. 37, p. 3443–3450, 2022, doi: 10.1007/s10103-022-03603-2.
- AMENAGHAWON, A. N.; ORUKPE, P. I.; NWANBI-VICTOR, J.; OKEDI, M. O.; ABURIME, E. I. Enhanced lipase production from a ternary substrate mix of agricultural residues: A case of optimization of microbial inducers and global sensitivity analysis. **Bioresour Technol Rep**, v. 17, p. 101000, 2022, doi: 10.1016/j.biteb.2022.101000
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. **AOCS PRESS**, 5th ed, 2012.
- BADHWAR, P.; KUMAR, A.; YADAV, A.; KUMAR, P.; SIWACH, R.; CHHABRA, D.; DUBEY, K. K. Improved pullulan production and process optimization using novel GA–ANN and GA–ANFIS hybrid statistical tools. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 124, 2020, doi: 10.3390/biom10010124.
- CABALLERO, E.; SOTO, C.; OLIVARES, A.; ALTAMIRANO, C. Potential use of avocado oil on Structured lipids MLM type production catalysed by commercial immobilised lipases. **PLoS One**, v. 9, p. 1–7, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0107749.
- CABANEROS, S. M. J.; CALAUTIT K.; HUGHES, B. R. A review of artificial neural network models for ambient air pollution prediction. **Environmental Modelling & Software**, v. 119, p. 285–304, 2019, doi: 10.1016/J.ENVSOFT.2019.06.014.
- CASAS-GODOY, L.; MARTY, A.; SANDOVAL, G.; FERREIRA – DIAS, S. Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 77, p. 20 – 27, 2013.
- EKPENYONG, M; ASITOK, A.; ANTAI, S.; EKPO, B.; ANTIGHA, R.; OGAREKPE, N. Statistical and Artificial Neural Network Approaches to Modeling and Optimization of Fermentation Conditions for Production of a Surface/Bioactive Glyco-lipo-peptide. **Int J Pept Res Ther**, v. 27, n. 1, p. 475–495, 2021, doi: 10.1007/s10989-020-10094-8.
- FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 853. 2009.
- ISO 12966-1:2014. Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters. 2014.

JOKIĆ, A.; PAJČIN, I.; GRAHOVAC, J.; LUKIĆ, N.; IKONIĆ, B.; NIKOLIĆ, N.; VLAJKOV, V. Dynamic Modeling Using Artificial Neural Network of *Bacillus Velezensis* Broth Cross-Flow Microfiltration Enhanced by Air-Sparging and Turbulence Promoter. **Membranes**, v. 10, n. 12, p. 372, 2020, doi: 10.3390/MEMBRANES10120372.

MIOTTI JR, R. H.; CORTEZM D.V.; DE CASTRO, H.F. Transesterification of palm kernel oil with ethanol catalyzed by a combination of immobilized lipases with different specificities in continuous two-stage packed-bed reactor. **Fuel**, v. 310, Parte A, n. 122343, 2022.

MIOTTI JR, R. H.; FREITAS, A. N.; PRIMO, F. L.; DE PAULA, A. V. Searching the optimal region of the synthesis of MLM-type structured lipids catalyzed by lipases of *Rhizopus oryzae* immobilized on styrene-divinylbenzene. **Galoá Proceedings**, 2022. <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-sheb-enzitec-2022/trabalhos/searching-the-optimal-region-of-the-synthesis-of-mlm-type-structured-lipids-cata?lang=pt-br> (accessed Jul. 28, 2023).

REIS, B. D.; DE OLIVEIRA, F.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; FILLETTI, É. R.; DE BAPTISTA NETO, Á. Assessment of artificial neural networks to predict red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 46, n. 1, p. 147–156, 2023, doi: 10.1007/S00449-022-02819-4/METRICS.

RICHARDSON, J. H.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization – Part I. **Transactions Institution Chemical Engineers**, v. 32, p. 35-53, 1954.

SIMÕES, A.S.; RAMOS, L.; FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; ZANIN, G.M.; DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 6, p. 242-247, 2015.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloro aluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering**, c. 33, v. 3, p. 1744–1752, 2013, doi: 10.1016/j. msec. 2012. 12. 088.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, M. G. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology** v. 79, p. 745–57, 1999.

WANG, Y.; XIA, L.; XU, X.; XIE, L.; DUAN, Z. 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.

YOGITHA, R.; MATHIVANAN, G. Performance analysis of transfer functions in an artificial neural network. **Proceedings of the 2018 IEEE International Conference on Communication and Signal Processing**, ICCSP 2018, p. 393–397, 2018, doi: 10.1109/ICCSP.2018.8524387.

YOTOV, K.; HADZHIKOLEV, E.; HADZHIKOLEVA S. Determining the number of neurons in artificial neural networks for approximation, trained with algorithms using the Jacobi Matrix. **TEM Journal**, v. 9, n. 4, p. 1320–1329, 2020, doi: 10.18421/TEM94-02.

ZANIN, G. M; MORAES, F.F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S; PIETRO, R, C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, c. 4, p. 35-85, 2004.

**4. PRIMEIROS ENSAIOS REACIONAIS DA SÍNTESE DE
LIPÍDIOS ESTRUTURADOS EM REATORES DE TANQUE
AGITADO**

4.1 Introdução

Em linhas gerais, o sistema de Reator Tanque Agitado (STR) consiste em um tanque encamisado contendo um agitador mecânico ou magnético para a mistura mais efetiva do meio reacional (Remonatto et al., 2022; Jadhav & Annapure, 2021). Os STRs são amplamente utilizados, e a literatura reporta a utilização de diferentes dimensões, desde 25 mL a 2000 mL de volume para a síntese de lipídios estruturados (Jadhav & Annapure, 2021; Akil et al., 2020; Zhang Z et al., 2020; Zhang S. et al., 2021; Subroto et al., 2020; Moreira et al., 2020), devido a sua versatilidade em poder operar em modos de batelada, batelada alimentada e contínuo.

Os STRs operando em modo batelada são os mais comuns em reações que utilizam lipases imobilizadas (Remonato et al., 2022). Esses tanques são 71iorreatoresres mais simples para lipases imobilizadas (Poppe et al., 2015; Remonatto et al., 2022; Jadhav & Annapure, 2021) sendo equipados com dispositivos de controle de temperatura e de agitação, ao qual nenhum material é removido até que a reação seja interrompida. Devido à facilidade de operação e baixo custo, os STRs em modo batelada são amplamente usados para estudos preliminares, determinação das condições de operação e geração de dados cinéticos (Noriega et al., 2020). Estudos que visam investigar suportes novos ou diferentes técnicas de imobilização de lipases geralmente utilizam reatores de batelada devido à praticidade e flexibilidade (Bezerra et al., 2020; Remonatto et al., 2022).

Deste modo, os STRs são preferencialmente utilizados para ensaios preliminares à síntese de lipídios estruturados, cuja a estrutura do triacilglicerol e/ou disposição de ácidos graxos foram modificadas (Zam et al., 2020; Ferreira-Dias et al., 2018). Essas modificações realizadas na estrutura do triacilglicerol representam estratégias versáteis para aumentar a funcionalidade e aprimorar as propriedades nutricionais de óleos e gorduras (Jadhav et al., 2021).

Dentro da categoria de lipídios estruturados, merecem destaque os triglicerídeos do tipo MLM, que são compostos por ácidos graxos de cadeia média (M) nas posições *sn*-1 e *sn*-3, e ácidos de cadeia longa (L) na posição interna *sn*-2. Esses lipídios podem ser sintetizados por meio da rota enzimática, catalisados por lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3), permitindo a formação de compostos estruturados específicos que

são difíceis de obter usando catalisadores químicos (Ferreira-Dias et al., 2021; Rehman et al., 2017).

No entanto, em escala industrial, reatores operando em modo de batelada tendem a ser caros, devido à necessidade de descarregar, recuperar enzimas, limpar e recarregar o reator antes de iniciar uma nova batelada, o que constitui o chamado tempo de inatividade (Remonato et al., 2022). Adicionalmente, o preço da produção da enzima também contribui para a sua baixa adesão ao cenário industrial.

Sabendo das dificuldades de inserir as lipases em sistemas reacionais de escala industrial, uma estratégia de uso de imobilização enzimática reversíveis em suportes hidrofóbicos apresentam a possibilidade em minimizar custos globais do processo (Miranda et al., 2014; Silva et al., 2023; Al Angari et al., 2023). Portanto, o propósito deste capítulo foi empregar o suporte hidrofóbico de estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20) como uma plataforma para a imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae*, com o objetivo de aprimorar as condições operacionais em comparação com o uso da enzima em sua forma livre. Adicionalmente, com o desenvolvimento efetivo do biocatalizador, a lipase imobilizada foi aplicada na síntese de lipídios estruturados do tipo MLM, uma vez que a lipase de *Rhizopus oryzae* atua especificamente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol possibilitando a substituição dos ácidos graxos originais por ácido de cadeia média como o ácido cáprico.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Carregamento enzimático

O preparo do biocatalisador apresenta-se como uma etapa base ao desenvolvimento do trabalho, pois a partir do ponto de vista de uma aplicação industrial, o alto carregamento enzimático pode fornecer alta atividade catalítica por volume do reator, assim possibilitando aumento na taxa de reação e favorecendo a diminuição do tempo requerido para a formação dos produtos (Blanch & Dunn, 1974). Deste modo, a quantidade de enzima fornecida ao método de imobilização foi testada com a finalidade de se obter um biocatalisador com maior atividade catalítica. Como descrito no tópico 4.2.3 para cada grama de suporte foi utilizado um carregamento enzimático variando de 0,15 g de pó enzimático até 1,0 g para cada grama de suporte.

A Tabela 4.1 apresenta os valores obtidos das atividades hidrolítica e umidade de cada carregamento enzimático, enquanto a Figura 4.1 ilustra graficamente o comportamento obtido das atividades no teste de carregamento enzimático. Uma maior atenção foi concedida ao processo de imobilização, visando obter derivados com um teor de umidade inferior a 10%. De acordo com Da Rós et al. (2010), níveis elevados de umidade nos biocatalisadores podem propiciar reações de hidrólise, o que pode comprometer o resultado pretendido em aplicações de acidólise. Adicionalmente, ao se comparar a distribuição de três ou mais grupos de amostras independentes e evidenciar quais grupos diferem significativamente foi realizado o Teste de Tukey para demonstrar as diferenças entre as atividades hidrolítica. Assim, todos os tratamentos de carga enzimática foram submetidos ao Teste de Tukey e os resultados de significância foram apresentados na Tabela 4.1 e Figura 4.1.

Tabela 4. 1 - Atividade hidrolítica e teor de umidade dos derivados imobilizados em Diaion™ HP-20 empregando diferentes carregamentos.

Carregamento enzimático (g de extrato enzimático por g de suporte)	Umidade (%)	Atividade hidrolítica (U/g)
0,15	7,27	1515 ± 52,1 ^a
0,30	8,61	1860 ± 23,4 ^b
0,50	7,40	1912 ± 49,7 ^b
0,75	6,03	1801 ± 51,8 ^b
1,0	7,98	1853 ± 72,7 ^b

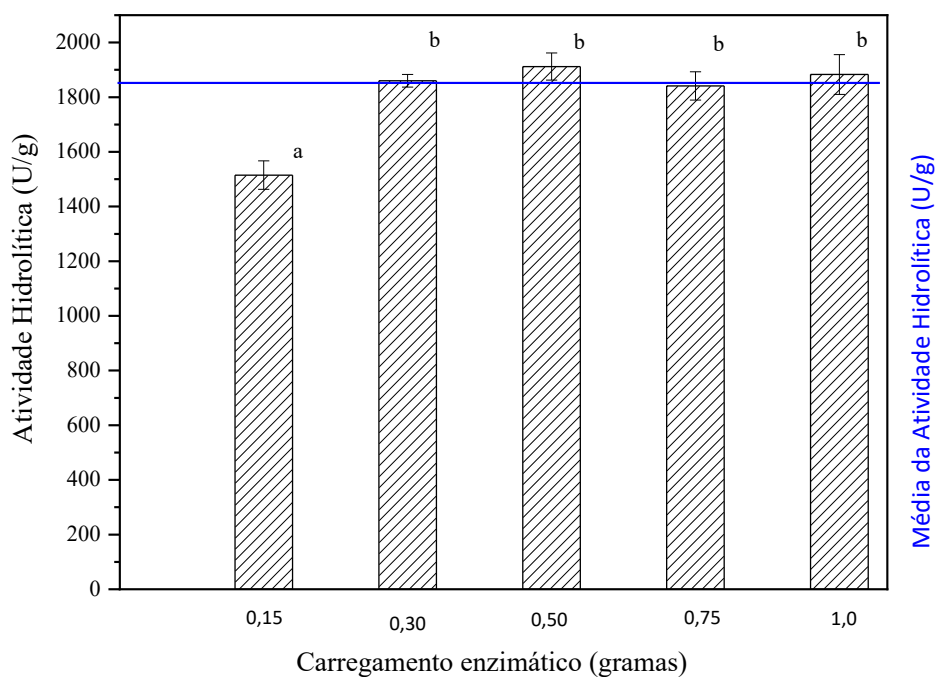
Nota: Valores de mesma notação (a,b) representam igualdade significativa pelo teste de Tukey.

De acordo com a Tabela 4.1, a imobilização da lipase utilizando o carregamento enzimático permitiu obter derivados com atividades hidrolítica elevadas. Com o aumento do carregamento enzimático esperava-se um aumento progressivo da atividade hidrolítica; no entanto, os derivados imobilizados apresentaram estatisticamente a mesma atividade. Esse comportamento da atividade está relacionado à saturação do suporte, de modo que a disponibilidade de área do suporte de imobilização esteja totalmente ocupada pela enzima; assim o excedente enzimático não adsorve ao suporte. Esse comportamento se assemelha ao apresentado por Ramos et al (2015), no qual os autores utilizaram volumes crescentes de caldo fermentado rico em lipase para a imobilização por adsorção física em partículas hidrofóbicas de PHB, no qual a quantidade de proteína adsorvida no

suporte mante-se praticamente a mesma conforme foi oferecido maior quantidade de caldo fermentado. Houve maior atividade enzimática para o derivado imobilizado à medida que o volume de caldo aumentou. Esse comportamento foi observado até atingir 75 mL de caldo para cada grama de suporte, e um derivado imobilizado com a maior atividade hidrolítica, ou seja, $404,4 \pm 2,3$ IU/g de biocatalisador, foi obtido; no entanto, para volumes maiores que 75 mL, foram encontrados valores mais baixos de atividade hidrolítica ($387,5 \pm 2,6$ IU/g de biocatalisador).

Outra investigação de como diferentes cargas de enzimas usando uma preparação enzimática líquida de uma lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* afetaram partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno foi apresentada por Alves e colaboradores (2017). Os autores exploraram diferentes cargas de enzimas e propriedades catalíticas do derivado imobilizado. A carga de enzima variou de 10 a 200 mg de proteína para cada grama de suporte, e o maior rendimento de imobilização foi encontrado para 125 mg de proteína/g de suporte, correspondendo a $469,9 \pm 60,2$ IU/g de suporte. Cargas maiores que 125 mg de proteína mostraram valores mais baixos de rendimento de imobilização e valores reduzidos de atividade hidrolítica. A queda na atividade da enzima e no rendimento de imobilização foi atribuída à saturação do suporte.

Conforme apresentado pela Figura 4.1, o valor médio da atividade hidrolítica foi de 1850 U/g. Com o aumento sucessivo da carga enzimática, foi demonstrado ineficácia ao aumento da atividade hidrolítica do derivado, reforçando hipótese de saturação do suporte no processo de imobilização.



Nota: Valores de mesma notação (a,b) representam igualdade significativa pelo teste de Tukey.

Figura 4. 1 - Atividade hidrolítica em função do carregamento enzimático.

No presente trabalho, o valor médio de atividade hidrolítica foi de 1860 U/g. Um aumento sucessivo na carga de enzimas demonstrou ineficiência em aumentar a atividade hidrolítica do derivado, corroborando assim a hipótese de saturação do suporte no processo de imobilização. Com base nos valores de atividade hidrolítica encontrados para os derivados, uma carga de enzima de 0,3 g de pó enzimático por grama de suporte de Diaion™ HP-20 indica saturação do suporte sob essas condições ($1860 \pm 23,4$ IU/g de biocatalisador). O valor de atividade hidrolítica encontrado aqui está próximo ao relatado na literatura. Vilas Bôas e colaboradores (2018), por exemplo, usaram partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno em vez de um suporte de polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) para imobilizar uma lipase comercial de *Rhizopus oryzae* (comprada da Biocatalysts Cardiff, País de Gales, Reino Unido) a fim de obter um derivado imobilizado mais hidrofóbico com menor teor de umidade. Assim, os autores obtiveram altas atividades hidrolítica (2504 ± 36 IU/g de biocatalisador) e baixo teor de água (3%). Portanto, uma carga de enzima de 0,3 g de pó enzimático para cada grama de suporte foi selecionada para estudos subsequentes sobre a síntese de lipídios estruturados por meio de acidólise do óleo de semente de uva com ácido cáprico.

Deste modo e a partir destes resultados, foi selecionado para os estudos subsequentes relativos à síntese dos lipídios estruturados a partir da acidólise do óleo de semente de uva com ácido cáprico o carregamento de 0,3 g de pó enzimático para cada grama de suporte.

4.2.2 Determinação das propriedades catalíticas do derivado imobilizado

Para a avaliação dos efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade catalítica da lipase imobilizada em partículas de Diaion™ HP-20 na hidrólise da emulsão do azeite de oliva foi elaborado um delineamento composto central rotacional conforme apresentado pela Tabela 4.2. Esta análise de atividade hidrolítica vem em concordância com trabalhos já apresentados na literatura (Soares et al., 1999; Vilas Boas et al., 2018; Ceron et al., 2018; Fidalgo et al., 2016; Miotti Jr et al., 2022), demonstrando valores de atividade hidrolítica entre uma faixa de 1700 a 2000 U/g dentre diferentes microrganismos produtores de lipase.

Tabela 4. 2 - Matriz do planejamento fatorial realizado para investigar a influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica do derivado imobilizado.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
	pH	T (°C)	pH	T (°C)	Atividade (U/g)	Predito
1	-1	-1	6,0	35	1231,89 ± 34,86	1162,79 ± 85,91
2	1	-1	9,0	35	636,44 ± 72,37	628,69 ± 85,91
3	-1	1	6,0	45	1540,20 ± 74,69	1603,99 ± 85,91
4	1	1	9,0	45	135,25 ± 49,41	257,40 ± 85,91
5	-1,41	0	5,4	40	1305,13 ± 76,60	1369,91 ± 92,55
6	1,41	0	9,6	40	105,72 ± 1,81	37,92 ± 92,55
7	0	-1,41	7,5	33	1027,78 ± 33,67	1095,23 ± 92,55
8	0	1,41	7,5	47	1267,28 ± 47,85	1146,79 ± 92,55
9	0	0	7,5	40	1715 ± 81,06	1770 ± 54
10	0	0	7,5	40	1737 ± 23,42	1770 ± 54
11	0	0	7,5	40	1802 ± 61,45	1770 ± 54

A Tabela 4.2 apresenta os fatores independentes, os níveis e o design fatorial em termos codificados e reais, juntos com os resultados obtidos. Assim, pode ser destacado a variação da atividade hidrolítica de $105,72 \pm 1,81$ U/g (ensaio 6) até $1802 \pm 61,45$ U/g (ensaios 9,10 e 11). Esses ensaios correspondem respectivamente ao nível mais elevado (pH 9,6) e ao nível moderado de pH (ponto central – pH 7,5) ambos em temperatura de 40 °C. Esses resultados foram utilizados para estimar os coeficientes e suas interações na capacidade catalítica. A análise estatística dos resultados (APÊNDICE A) apresentaram

significância para os termos lineares para a temperatura (x_1) e da interação do pH com a temperatura ($x_1.x_2$) e para os termos quadros da temperatura (x_1^2) e pH (x_2^2).

De acordo com o modelo estatístico o R^2 obteve valor de 98,17% e o F_{calc} apresentou valor de 139,2 ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}=3,03}$). Embora o modelo tenha apresentado R^2 e F_{calc} satisfatórios, os valores de falta de ajuste e erro puro foram elevados (APÊNDICE A). Esse problema está relacionado com a falta de repetições do processo ou devido as respostas apresentarem pouca variação dentre os ensaios realizados. Deste modo, tem-se um planejamento com quantidade de repetições satisfatórias; no entanto as variações entre as respostas dentro da faixa de temperatura tornam-se pequenas e esse fator contribui para o aumento da falta de ajuste do modelo. Esse resultado não invalida os experimentos realizados, no entanto indica que a faixa estudada não apresenta efeitos na variável resposta; ou seja, no caso deste modelo a faixa de temperatura não tem influência significativa para a resposta.

Os dados experimentais foram ajustados para um modelo polinomial de segunda ordem obtido dos valores codificados da estimativa de dados obtidas, como apresentada pela equação 4.1. Sendo o termo Y correspondendo aos valores de atividade hidrolítica obtidos, os termos x_1 e x_2 correspondem respectivamente à temperatura e pH.

$$Y_1 = 1770,12 + 18,23 x_1 - 324,55 x_1^2 - 470,92 x_2 - 533,10 x_2^2 - 202,37 x_1 x_2 \quad (4.1)$$

Com a análise de variância (ANOVA) demonstrando F-teste satisfatório em 95% de confiança, coeficiente de determinação (R^2) indicando 98,17%, a equação 4.1 foi utilizada para gerar a superfície de resposta da variabilidade dos efeitos (APÊNDICE A). A superfície de resposta foi gerada utilizando o software Protimiza Experimental Design®, como apresentada pela Figura 4.2, a qual apresenta as interações entre a temperatura e o pH sob a capacidade catalítica da lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

Tanto no modelo de superfície quanto na curva de nível é possível observar que a atividade hidrolítica aumenta conforme a temperatura eleva de 35 °C até a faixa próxima aos de 40 °C. Em temperaturas superiores, a atividade hidrolítica apresenta queda brusca. A queda da atividade é a resposta direta a inativação/ degradação térmica causada na enzima imobilizada. O pH apresenta o mesmo comportamento quadrático da temperatura,

sendo no caso o aumento da atividade hidrolítica conforme aumentam-se os valores de pH de 6 até próximo a faixa de 7,5. Concomitantemente com a temperatura, o aumento do pH para valores superiores ao 7,5 apresentaram queda brusca da atividade da enzima imobilizada, demonstrando que em pH mais elevados a enzima tem baixa efetividade catalítica. Deste modo, o derivado imobilizado apresentou faixa ótima de seu desempenho catalítico dentro da faixa de temperatura de 40 - 43 °C e na faixa de pH de 6 – 8 para este modelo.

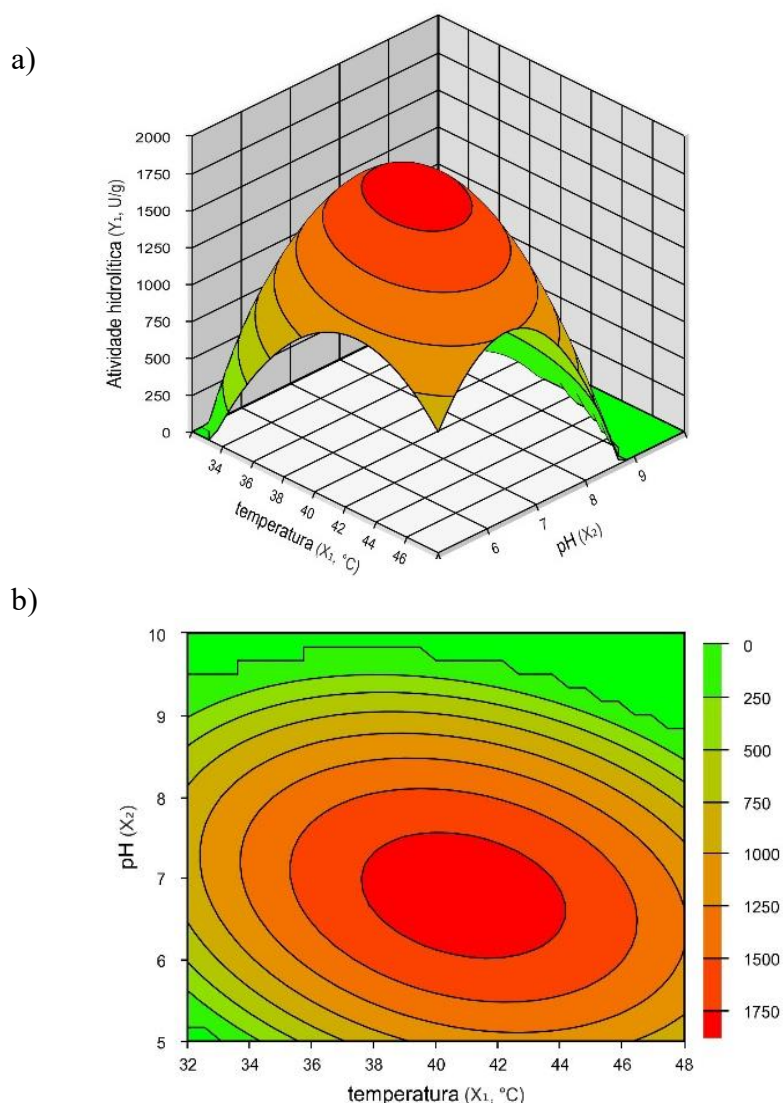


Figura 4. 2 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da temperatura e pH: a) Superfície de resposta ao modelo estatístico; b) Curva de nível dos efeitos da temperatura e pH em relação à atividade hidrolítica.

4.2.3 Aplicação do imobilizado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM

Para realizar a síntese de lipídios estruturados em reatores de leito fixo e fluidizado, as reações em reatores de tanque agitado em modo batelada tiveram como objetivo fornecer a base de informações essenciais ao processo, como temperatura de reação e razão molar. Assim, o grupo de pesquisa com experiência no processo de acidólise do óleo de semente de uva com ácido cáprico tem publicado trabalhos seguindo modelos de delineamento composto central rotacional. Bassan e colaboradores (2019) apresentaram em seu trabalho a síntese de lipídios estruturados utilizando lipases comerciais e obtiveram resultados de incorporações de ácido cáprico satisfatórias. Assim, a estrutura do plano experimental adotado pelos autores foi utilizada como referência para a comparação entre a lipase comercial mencionada no estudo (Lipozyme TL IM®) e a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em resinas hidrofóbicas específicas, como a Diaion™ HP-20, apresentando-se como uma alternativa ao biocatalisador comercial. Para a avaliação dos efeitos da temperatura e da razão molar (óleo: ácido) no grau de incorporação (%GI) do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol do óleo de semente de uva, a lipase imobilizada em partículas de Diaion™ HP-20 foi aplicada no processo de acidólise seguindo o delineamento composto central rotacional apresentado pela Tabela 4.3.

Tabela 4. 3 - Matriz do planejamento fatorial realizado para investigar a influência da temperatura e razão molar na síntese de lipídios estruturados utilizando lipase imobilizada em estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20).

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
	RM	T (°C)	RM (ácido: óleo)	T (°C)	GI (mol%)	Predito
1	-1	-1	2:1	45	14,68	16,32 ± 3,37
2	1	-1	6:1	45	50,84	50,50 ± 3,37
3	-1	1	2:1	65	11,98	9,91 ± 3,37
4	1	1	6:1	65	44,34	40,29 ± 3,37
5	-1,41	0	1,17:1	55	11,5	11,30 ± 3,51
6	1,41	0	6,83:1	55	54,34	56,95 ± 3,51
7	0	-1,41	4:1	41	31,67	30,25 ± 3,51
8	0	1,41	4:1	69	17,76	18,50 ± 3,51
9	0	0	4:1	55	18,00	17,70 ± 1,79
10	0	0	4:1	55	17,00	17,70 ± 1,79
11	0	0	4:1	55	18,09	17,70 ± 1,79

A Tabela 4.3 apresenta os fatores independentes, os níveis e o design fatorial em termos codificados e reais, além dos resultados obtidos. O grau de incorporação variou de 11,5 mols% (ensaio 5) até 54,34 mols% (ensaio 6). Esses ensaios correspondem respectivamente ao nível mais baixo da razão molar (RM = 1,17:1) e ao nível mais alto (RM = 6,83:1) ambos em temperatura de 55 °C. Esses resultados foram confrontados com os obtidos por Bassan e colaboradores (2019) de modo que, a Lipozyme RM IM® apresentou seu maior grau de incorporação (54,36 mols%) quando utilizado no ensaio 6. Por outro lado, o derivado imobilizado em Diaion™ HP-20 forneceu melhores valores de GI em temperatura menor e com teor de ácido mais elevado quando comparado ao biocatalisador comercial. No entanto, a lipase imobilizada no Diaion™ HP-20 apresentou queda no %GI quando empregado em ensaios com temperaturas elevadas. Esse comportamento já era esperado, uma vez que o estudo de sua atividade catalítica já demonstrou perda de sua efetividade em temperatura acima de 50 °C. Outro comparativo que se destaca é a sensibilidade à elevados teores de ácido cáprico, sendo que o biocatalisador comercial apresentou queda no GI quando aplicado ao ensaio de maior teor de ácido cáprico, de modo oposto ao apresentado pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada, na qual apresentou seu melhor desempenho no grau de incorporação no ensaio de maior teor de ácido cáprico. Essa diferença de comportamento pode ser atribuída às características intrínsecas de cada lipase e ao método de imobilização.

Os resultados obtidos foram utilizados para estimar os coeficientes e suas interações na capacidade de incorporar o ácido cáprico na estrutura do lipídio. A análise estatística dos resultados (APÊNDICE B) apresentam significância para os termos lineares para a razão molar (x_1) e para a temperatura (x_2) e para o termo quadro da razão molar (x_1^2). Os dados experimentais foram ajustados para um modelo polinomial de segunda ordem obtido dos valores codificados da estimativa de dados obtidas, como apresentada pela equação 4.2. O termo Y corresponde aos valores de grau de incorporação (mol%), os termos x_1 e x_2 correspondem respectivamente à razão molar e a temperatura.

$$Y_1 = 17,70 + 16,14 x_1 + 8,22 x_1^2 - 4,16 x_2 + 3,34 x_2^2 \quad (4.2)$$

Como pode ser observado na Tabela 4.4, a análise de variância (ANOVA) indica que o erro puro foi baixo (0,7), correspondendo a uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos experimentalmente. O teste F apresentou elevado valor ($F_{\text{calc}}=54,6$) demonstrando

alta significância da regressão do modelo em 95% de nível de confiança, sendo maior que o F_{tabelado} ($F_{\text{tabelado}}=5,05$). O valor do coeficiente de variação (R^2) foi de 98,20%, dos quais apenas 1,8% das variações gerais não foram explicadas pelo design do modelo. Deste modo, a equação 4.2 pode ser utilizada para gerar a superfície de resposta e a curva de nível para a análise da variabilidade dos efeitos na incorporação do ácido cáprico à estrutura do triacilglicerol.

Tabela 4. 4 - Análise de variância (ANOVA) do modelo que representa o GI empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

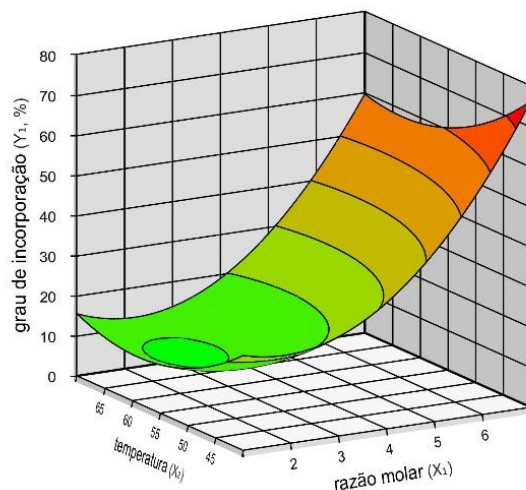
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	2611,7	5	522,3	54,64	0,00023
Resíduos	47,8	5	9,5		
Falta de Ajuste	47,1	3			
Erro Puro	0,7	2			
Total	2659,5	10			
$R^2 = 98,20\%$					

A superfície de resposta foi gerada utilizando o software Protimiza Experimental Design®, como apresentada pela Figura 4.3, a qual apresenta as interações entre a razão molar (ácido: óleo) e a temperatura sob o grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol utilizando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

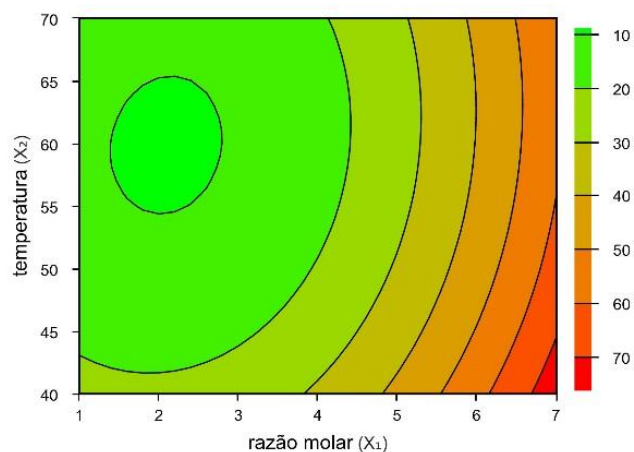
Tanto no modelo de superfície quanto na curva de nível foi possível observar que o grau de incorporação do ácido cáprico aumenta conforme a temperatura eleva de 40 °C até a faixa próxima aos de 45 °C. Após isso, o GI apresenta queda conforme a temperatura continua aumentando. A queda da %GI é a resposta direta a inativação/ degradação térmica causada na enzima imobilizada. A razão molar, por outro lado, apresenta aumento no grau de incorporação conforme o aumento do nível ($T_{\text{linear.calc. razão molar}} = 14,76$) quando comparada aos efeitos da temperatura ($T_{\text{linear.calc. temperatura}} = -3,8$) que apresentam queda na %GI com o aumento do nível. O comportamento quadrático da temperatura não apresentou significância ($p\text{-valor}_{\text{quadrático.calc. temperatura}} = 0,0502 > 0,05$). Em relação aos efeitos quadráticos da razão molar, este apresenta significância aos efeitos sobre a

variável resposta ($p\text{-valor}_{\text{quadrático.calc. razão molar}} = 0,00002 < 0,05$), de modo que a influência no aumento de seus níveis resulta em aumento do grau de incorporação do ácido cáprico.

a)



b)



a) Superfície de resposta ao modelo estatístico dos efeitos da razão molar e temperatura na %GI de ácido cáprico; b) Curva de nível dos efeitos da razão molar e temperatura na %GI de ácido cáprico.

Figura 4.3 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol

Como foi possível observar na Figura 4.3, o grau de incorporação não representa um modelo otimizado. Embora o valor máximo de GI tenha atingido 54,34%, o que se assemelha ao valor máximo atingido pelo trabalho de Bassan e colaboradores (2019), ainda existe a possibilidade de elaborar um novo delineamento estatístico para determinar as condições de máximo grau de incorporação, tornando a lipase imobilizada em Diaion™ HP-20 promissora na síntese de lipídios estruturados.

4.2.4 Otimização da síntese de lipídios estruturados do tipo MLM

Para o desenvolvimento desta etapa, o uso de métodos estatísticos de design de experimentos foi empregado visando maximizar a quantidade de ácido cáprico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do óleo de semente de uva com a mínima quantidade de experimentos possíveis, o que prioriza a gestão de recursos gastos com reagentes e outros insumos. Deste modo, a exploração por uma condição otimizada de síntese de MLM teve início com um delineamento composto central (DCC). O delineamento compõe uma matriz com 7 ensaios fornecendo um campo exploratório das condições iniciais do processo de síntese conforme apresenta a Tabela 4.5.

Tabela 4. 5 - Delineamento composto central utilizado na reação de acidólise enzimática do óleo de semente de uva com ácido cáprico com lipase imobilizada em Diaion™ HP-20.

Experimentos	Variáveis codificadas (Reais)		Resposta em grau de incorporação (GI, %)	
	T (°C)	RM (ácido: óleo)	Experimental	Predito
1	-1 (35)	- 1 (4:1)	25,11	25,49 ± 1,14
2	-1 (35)	+ 1 (7:1)	48,5	48,88 ± 1,14
3	+1 (55)	- 1 (4:1)	18,04	18,42 ± 1,14
4	+1 (55)	+ 1 (7:1)	54,04	54,42 ± 1,14
5	0 (45)	0 (5,5:1)	36,4	36,80 ± 0,45
6	0 (45)	0 (5,5:1)	38,7	36,80 ± 0,45
7	0 (45)	0 (5,5:1)	36,8	36,80 ± 0,45

A seleção dos valores de temperatura e razão molar para o delineamento composto central foi baseada nas respostas obtidas do grau de incorporação de ácido cáprico fornecidos pelo delineamento da Tabela 4.5. Consequentemente a Tabela 4.5 apresenta os fatores independentes, os níveis e o design fatorial em termos codificados e reais, além dos resultados obtidos e preditos. Conforme apresentado, os valores de %GI variaram

entre 18,04 mols% (ensaio 3) até 54,04 mols% (ensaio 4). Esses ensaios correspondem respectivamente ao nível mais baixo da razão molar (RM = 4:1) e ao nível mais alto (RM = 7:1) ambos em temperatura de 55 °C.

Os resultados de máxima e mínima incorporação foram confrontados com os ensaios de mesma condição reacional obtidos pela Tabela 4.3 (ensaio 6 e 9-11) de modo que, o valor de %GI obtido em ambos delineamentos experimentais demonstraram pouca variação quanto ao %GI, sendo a diferença de 0,3% para o ensaio de máxima incorporação e de 0,34% para o ensaio de mínima incorporação. Deste modo, foi possível demonstrar boa reprodutibilidade dos delineamentos realizados. Os resultados obtidos foram utilizados para estimar os coeficientes e suas interações na capacidade de incorporar o ácido cáprico na estrutura do lipídio.

A análise estatística dos resultados (APÊNDICE C) apresentam significância para o termo linear da razão molar (x_1). Os dados experimentais foram ajustados para um modelo polinomial de primeira ordem obtido dos valores codificados da estimativa de dados obtidos, como apresentado pela equação 4.3. O termo Y corresponde aos valores de grau de incorporação (mol%), os termos x_1 e x_2 correspondem respectivamente à razão molar e a temperatura.

$$Y_1 = 36,80 + 14,85 x_1 - 0,38 x_2 + 3,15 x_1 x_2 \quad (4.3)$$

Como pode ser observado na Tabela 4.6, a análise de variância (ANOVA) indica que o erro puro foi baixo (3,0), correspondendo a uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos experimentalmente. O teste F apresentou elevado valor ($F_{\text{calc}}=212,56$) demonstrando alta significância da regressão do modelo em 95% de nível de confiança, sendo maior que o F_{tabelado} ($F_{\text{tabelado}}=9,28$). O valor do coeficiente de variação (R^2) foi de 99,53%, dos quais apenas 0,47% das variações gerais não foram explicadas pelo design do modelo. Deste modo, a equação 4.3 pôde ser utilizada para gerar o plano de resposta e a curva de nível para a análise da variabilidade dos efeitos na incorporação do ácido cáprico à estrutura do triacilglicerol.

A superfície de resposta foi gerada utilizando o software Protimiza Experimental Design[®], como apresentada pela Figura 4.4, a qual apresenta as interações entre a razão molar (ácido: óleo) e a temperatura sob o grau de incorporação do ácido cáprico na

estrutura do triacilglicerol utilizando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

Tabela 4. 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo que representa o GI empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20 aplicada ao DCC com 2 níveis.

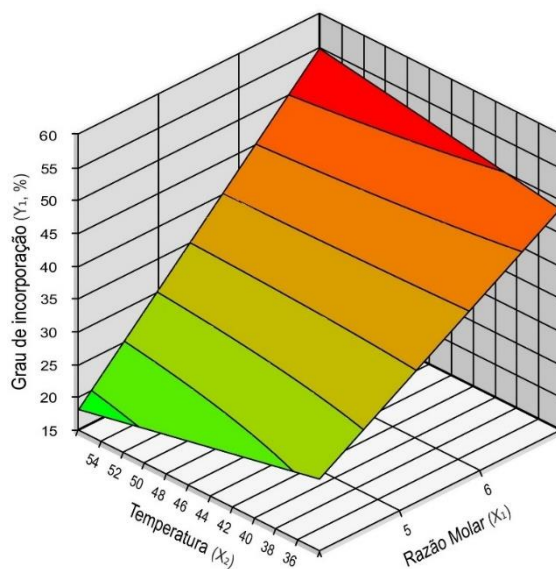
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	922,1	3	307,4	212,15	0,00054
Resíduos	4,3	3	1,4		
Falta de Ajuste	1,3	1			
Erro Puro	3,0	2			
Total	926,4	6			
R ² = 99,53%					

Tanto no modelo de plano resposta quanto na curva de nível (Figura 4.1) foi possível observar que o grau de incorporação do ácido cáprico aumenta conforme a razão molar eleva. Outra informação que pode ser extraída é que estatisticamente o %GI não varia quando se torna fixa a razão molar dentro da faixa de 4,5 até 6,5 mols de ácido para cada 1 mol de óleo em qualquer temperatura, haja visto que para a razão molar 7:1 temperaturas acima dos 40 °C proporcionaram maiores valores de %GI quando comparados aos ensaios de temperaturas abaixo de 40 °C. Sob essas condições experimentais, observa-se uma diminuição da viscosidade do meio reacional, uma vez que o ácido cáprico é sólido em temperaturas abaixo dos 30° C. Assim, com a diminuição da viscosidade as barreiras de difusão externas são minimizadas, favorecendo o acesso do biocatalisador ao substrato.

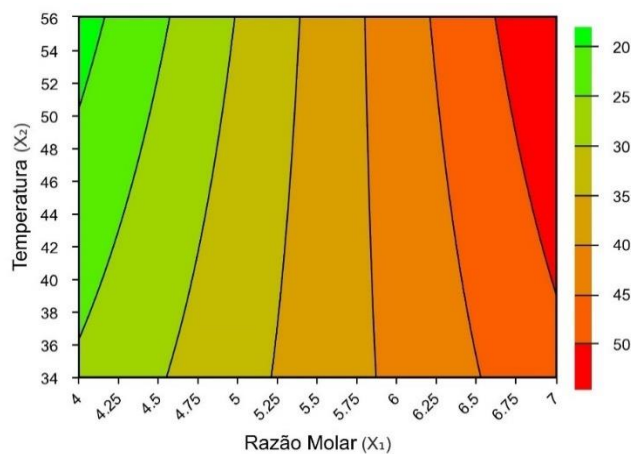
O plano resposta apresentou inclinação em relação aos eixos no sentido ascendente em níveis mais elevados das variáveis. De fato, o modelo indica que para atingir valores maiores no grau de incorporação há a necessidade de aumento da temperatura e da quantidade de ácido. Assim, a complementação deste planejamento inicial necessitou de ensaios que avançassem para regiões próximas aos valores de maior grau de incorporação. Caminhando em direção ao ponto de maior grau de incorporação (ensaio 4), tornou-se necessário dar continuidade à exploração da região ótima,

utilizando-se um modelo quadrático, sendo o mais comum a construção do planejamento em estrela ou também conhecido como rotacional (DCCR).

a)



b)



a) Plano de resposta ao modelo estatístico dos efeitos da razão molar e temperatura no %GI de ácido cáprico; b) Curva de nível dos efeitos da razão molar e temperatura no %GI de ácido cáprico.

Figura 4. 4 - Plano de resposta e curva de nível preditos do modelo linear dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol a partir de um DCC.

Nesta etapa foi proposto um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a localização da região ótima de síntese dos lipídios estruturados. Para isso, foi necessário acrescentar ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém rotacionado em 45° em relação à orientação original. Essa adição de um novo plano rotacionado ao planejamento original forneceu 4 novos pontos exploratórios e com isso foi possível obter um modelo matemático quadrático com 6 parâmetros, assim aumentando o campo exploratório do planejamento original. O delineamento composto por uma matriz com 11 ensaios fornecendo um campo exploratório das condições do processo de síntese é apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4. 7 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) composta por 2 repetições genuínas para a otimização da síntese de lipídios estruturados utilizando lipase imobilizada em estireno-divinilbenzeno (Diaion™ HP-20).

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
	MR	T (°C)	RM (ácido: óleo)	T (°C)	GI (mol%)	Predito
1	-1	-1	4:1	35	21,97 ± 2,82	19,30 ± 2,36
2	1	-1	12:1	35	45,96 ± 1,63	44,50 ± 2,36
3	-1	1	4:1	55	14,67 ± 2,25	14,47 ± 2,36
4	1	1	12:1	55	15,45 ± 2,26	16,50 ± 2,36
5	-1,41	0	2,34:1	45	8,18 ± 2,09	9,87 ± 2,50
6	1,41	0	13,66:1	45	29,15 ± 3,27	29,12 ± 2,50
7	0	-1,41	8	30,86	36,93 ± 1,98	39,50 ± 2,50
8	0	1,41	8	59,14	17,18 ± 4,86	16,27 ± 2,50
9	0	0	8	45	56,33 ± 3,51	55,17 ± 1,39
10	0	0	8	45	53,50 ± 2,87	55,17 ± 1,39
11	0	0	8	45	54,00 ± 1,00	55,17 ± 1,39

A Tabela 4.7 apresenta os fatores independentes, os níveis e o design fatorial em termos codificados e reais, além dos resultados obtidos. Os valores experimentais do grau de incorporação do ácido cáprico variou de $8,18 \pm 2,09$ mols% (ensaio 5) até $56,33 \pm 3,51$ mols% (ensaio 9). Esses ensaios correspondem respectivamente ao nível mais baixo da razão molar (RM = 2,34:1) e ao nível moderado do planejamento (RM = 8:1). Esses resultados foram utilizados para estimar os coeficientes e suas interações na capacidade de incorporar o ácido cáprico na estrutura do lipídio. A análise estatística dos resultados (APÊNDICE D) apresentam significância ao nível de 95% de confiança para os termos lineares para a razão molar (x_1), para a temperatura (x_2) e para a interação entre a razão molar com a temperatura ($x_1.x_2$) e para os termos quadros da razão molar (x_1^2) e da

temperatura (x_2^2). Os dados experimentais foram ajustados para um modelo polinomial de segunda ordem obtido dos valores codificados da estimativa dos dados obtidos, como apresentada pela equação 4.4. O termo Y corresponde aos valores de grau de incorporação (mol%), os termos x_1 e x_2 correspondem respectivamente à razão molar e a temperatura.

$$Y_1 = 55,17 + 6,81 x_1 - 17,83 x_1^2 - 8,21 x_2 - 13,64 x_2^2 - 5,79 x_1 x_2 \quad (4.4)$$

De acordo com o método estatístico, os dados experimentais foram ajustados a um modelo de superfície de resposta para avaliar eficazmente a relação entre a resposta (%GI) e as variáveis (razão molar e temperatura). Como pode ser observado na Tabela 4.8, a análise de variância (ANOVA) indica valor elevado do erro puro (216,2). Esse valor está intrinsecamente ligado aos erros aleatórios dos ensaios e é independente das estimativas do modelo, ou seja, essa parcela de contribuição dos resíduos não pode ser aperfeiçoada com o melhoramento do modelo. No entanto, com o erro puro, pode ser estimado quantitativamente se o modelo utilizado tem boa representação das observações obtidas. Assim, com a segunda parte que compõem os resíduos, a falta de ajuste (61,7) é dependente do modelo utilizado e pode ter seu valor reduzido com o aperfeiçoamento do modelo.

Tabela 4. 8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo que representa a %GI empregando a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20 aplicada ao DCCR com 2 níveis.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	8099,1	5	1619,8	139,9	1,1e-16
Resíduos	277,8	24	11,5		
Falta de Ajuste	61,6	3	20,5	2,0	
Erro Puro	216,2	21	10,2		
Total	8376,9	29			
R² = 96,68%					

Para avaliar a viabilidade do modelo o teste F dos resíduos ($F_{\text{calc}} = 139,9$) apresentou elevado valor demonstrando alta significância da regressão do modelo em 95% de nível de confiança, sendo maior que o F_{tabelado} ($F_{\text{tabelado}} = 9,01$). Com as respostas em triplicata, foram estimados os valores de erro puro e falta de ajuste no qual a razão do quadrado médio da falta de ajuste pelo quadrado médio do erro puro ($F_{\text{calc. Mqfaj/Mqep}} = 2,0$)

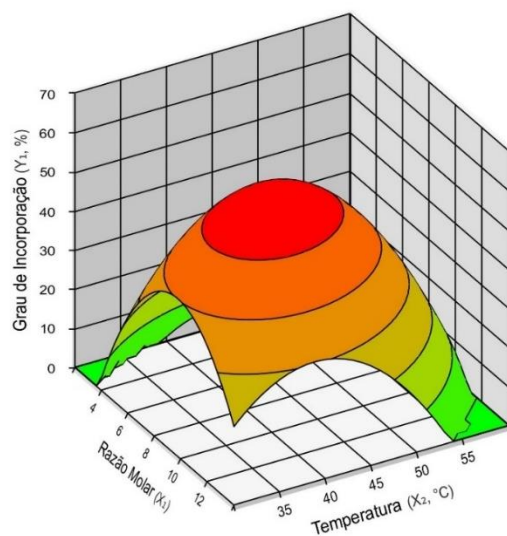
obteve valor menor que o tabelado ($F_{\text{tab. Mqfaj/Mqer}}=3,07$), demonstrando ser um modelo significativo. O valor do coeficiente de variação (R^2) foi de 96,68%, dos quais apenas 3,32% das variações gerais não foram explicadas pelo design do modelo. Deste modo, a equação 4.4 pôde ser utilizada para gerar a superfície de resposta e a curva de nível para a análise da variabilidade dos efeitos na incorporação do ácido cáprico à estrutura do triacilglicerol.

A superfície de resposta foi gerada utilizando o software Protimiza Experimental Design®, como apresentada pela Figura 4.5, a qual apresenta as interações entre a razão molar (ácido: óleo) e a temperatura sob o grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol utilizando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

Ao observar o modelo de superfície de resposta (Figura 4.5) um aumento na %GI ocorre com o aumento da razão molar a partir de 4 mols de ácido para 1 mol de óleo até a região máxima de incorporação por volta dos 9 mols de ácido para cada 1 mol de óleo. Após isso, foi notado queda do %GI pelo aumento molar da quantidade de ácidos cáprico no meio reacional. Sobre essas condições reacionais, a possibilidade de inativação dos biocatalisadores podem ser aplicadas devido aos efeitos do excesso de ácido cáprico livre (Nunes, Pires-Cabral, Guillén, Valero e Ferreira-Dias, 2012; Tecelão et al., 2012). Esse resultado apresenta concordância com trabalhos apresentados na literatura, demonstrando maiores graus de incorporação quando aplicadas as reações de acidólise com razões molares mais elevadas (Kim & Akih, 2015; Öztürk; Ustun, & Aksoy, 2010; Bassan et al., 2019).

A superfície de resposta apresentou aumento do %GI conforme a temperatura aumentava. A elevação da temperatura reacional de 35 até 42 °C contribuiu para o aumento de 49 para 56% de incorporação de ácido cáprico mantendo fixa a razão molar de 8:1. A queda do %GI foi observada para temperaturas maiores que 45 °C, no qual a temperatura elevada possibilita a inativação da enzima, haja visto que a faixa ótima de temperatura para a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Diaion™ HP-20 é de 40-43 °C.

a)



b)

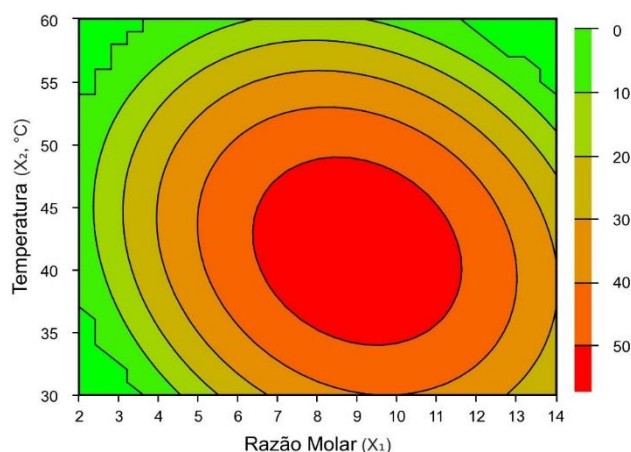


Figura 4.5 - Superfície de resposta e curva de nível preditos do modelo quadrático dos efeitos da razão molar e temperatura no grau de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol a partir de um DCCR. a) Superfície de resposta ao modelo estatístico dos efeitos da razão molar e temperatura no %GI de ácido cáprico; b) Curva de nível dos efeitos da razão molar e temperatura no %GI de ácido cáprico.

4.2.5 Estabilidade operacional

Com o objetivo de reduzir os custos gerais dos processos enzimáticos, a imobilização de lipases em suportes insolúveis se destaca como uma técnica que não apenas simplifica a remoção dos biocatalisadores do meio reacional, mas também viabiliza sua reutilização em novos ciclos de produção (Ismail et al., 2020; Remonatto et al., 2022; Rodrigues et al., 2019).

Nesse contexto, foi realizado uma investigação para avaliar a estabilidade operacional da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno, em ensaios de síntese de lipídios estruturados. Para tal, foi empregado condições ideais no sistema de reação, executando cinco ciclos consecutivos.

Os resultados, conforme ilustrados na Figura 4.6, indicam o grau de incorporação (%GI) permaneceu constante em 59% nos quatro ciclos iniciais, sofrendo uma ligeira queda para 57% no quinto ciclo. Notavelmente, o derivado imobilizado exibiu uma estabilidade operacional satisfatória, possibilitando seu uso em cinco novos ciclos sem perdas substanciais de incorporação, mantendo a padronização do produto final.

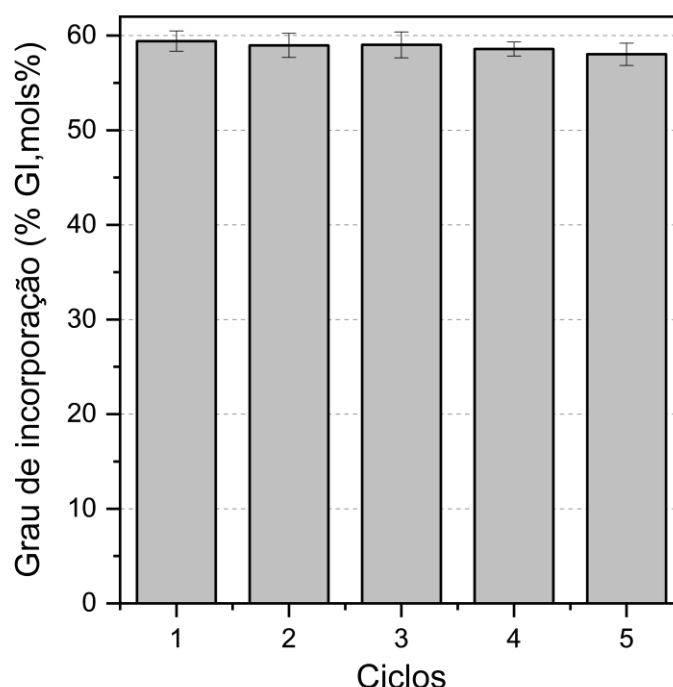


Figura 4. 6 - Ensaio de estabilidade operacional do derivado imobilizado na síntese de lipídios estruturados. Ciclos reacionais de 24 horas.

Comparando os resultados obtidos com o estudo de Martínez-Galán e colaboradores (2021) a lipase de *Rhizopus oryzae* (PROZYN™) imobilizada covalentemente em pó de sabugo de milho atingiu aproximadamente 25% de grau de incorporação após o quinto ciclo, no entanto, o presente trabalho representa um avanço na eficácia do biocatalisador. Esse progresso pode ser atribuído em parte às características do suporte Diaion™ HP-20, que apresenta uma área superficial elevada e propriedades hidrofóbicas, favorecendo a carga enzimática e a estabilização da enzima no suporte

(Rodrigues et al., 2019). Visto a transição do sistema reacional de tanque agitado para o reator de leito fixo em modo contínuo, não se fez necessário a continuação após o quinto ciclo, já demonstrando elevada estabilidade operacional.

4.2.6 Estabilidade térmica

Para os ensaios de estabilidade térmica foram conduzidos testes utilizando lipases em sua forma livre e imobilizada, com incubação a temperaturas variando de 35°C a 55°C. A Atividade relativa foi medida pela técnica da hidrólise de emulsão de óleo de oliva a pH 7,0 e 37°C, como descrito por Soares e colaboradores (1999).

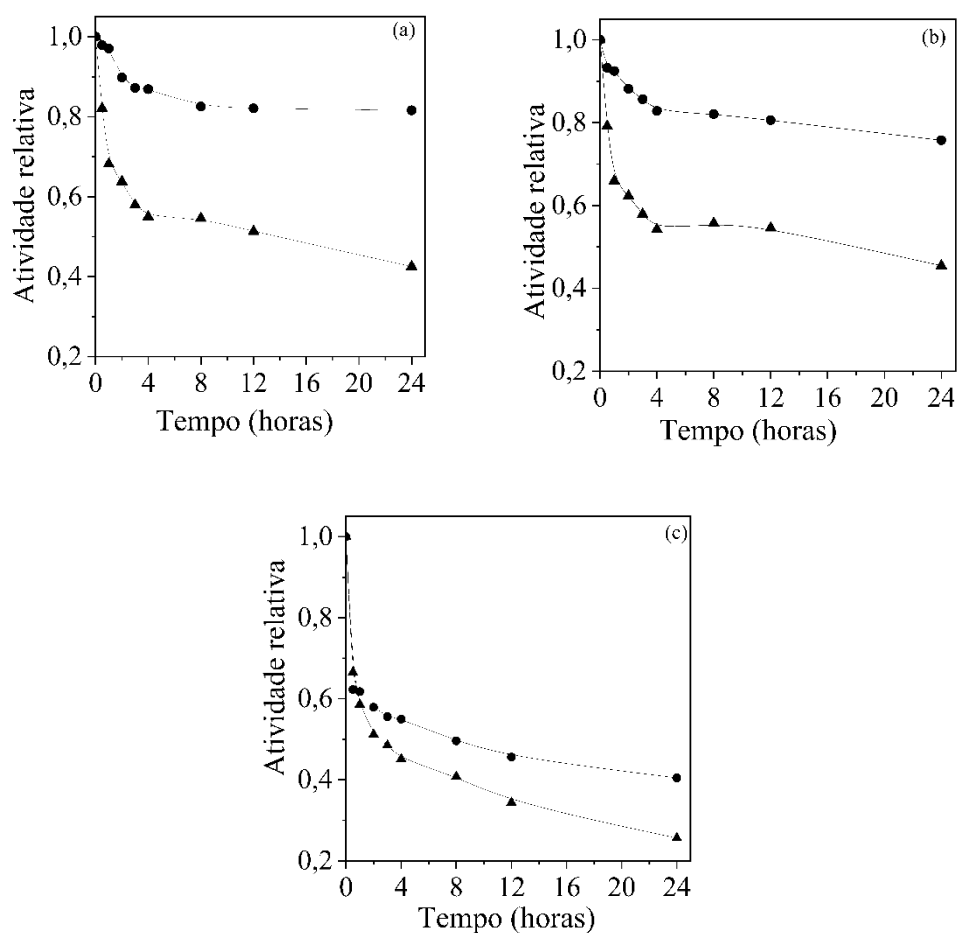


Figura 4. 7 - Curvas de inativação térmica da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20 (●) e curva de inativação térmica da lipase de *Rhizopus oryzae* livre (▲) em 35 (a), 45 (b) e 55 °C (c).

Como mostrado na Figura 4.7, o aumento da temperatura de incubação resultou em uma taxa de inativação mais rápida para ambos os biocatalisadores (lipase livre e lipase imobilizada), como era esperado. A 35°C (Figura 4.7-a), a lipase livre manteve 42,53% de sua atividade inicial após 24 horas de incubação, enquanto a lipase imobilizada reteve 81,57% da atividade após o mesmo período. Conforme apresentado na Figura 4.7-b), o biocatalisador imobilizado preparado manteve cerca de 76,0% de sua atividade inicial após 24 horas de incubação a 40°C, e a lipase livre exibiu atividade semelhante à observada a 35°C, com 45% da atividade inicial após 24 horas de incubação a 45°C, conforme Figura 4.7-c).

Os valores de meia-vida e a constante de desativação (K_d) foram calculados para os três ensaios. Para a temperatura de 35 °C o tempo de meia-vida do biocatalizador foi de 81,65 horas, apresentando constante de desativação (K_d) de 0,0084 horas. Com o aumento da temperatura para o valor de 45 °C, o tempo de meia-vida do biocatalisador passou a ser de 55,51 horas e seu K_d obteve valor de 0,012 horas. Enquanto que para o ensaio com 55 °C, o imobilizado apresentou tempo de meia-vida de 4,15 horas e K_d de 0,1667 horas, demonstrando a perda rápida de capacidade catalítica em temperaturas mais elevadas. Para a lipase livre, o valor da meia-vida para a temperatura de 35 °C foi de 21,01 horas e K_d de 0,0329 horas. Em relação ao ensaio com temperatura de 45 °C, a lipase livre apresentou valor de meia-vida de 18,25 horas e K_d de 0,0352 horas. Por fim, no ensaio de 55 °C, a enzima livre apresentou meia-vida de 3,90 horas e K_d de 0,1777 horas.

Com base nesses resultados, a lipase imobilizada demonstrou ser mais estável do que o extrato enzimático livre quando incubada em diferentes temperaturas, até o limite de 55 °C. Esse aumento na estabilidade está associado à redução da flexibilidade da enzima no micro ambiente ao qual está imobilizada. Adicionalmente, a imobilização em suportes porosos pode favorecer o aumento da estabilidade térmica aparente (Rodrigues et al., 2019) Isso significa que as enzimas permanecem mais ativas quando expostas ao calor por mais tempo, evitando problemas como agregação e autólise (degradação da enzima por ela mesma) e a proteólise (degradação da enzima por outras substâncias proteicas) (Rodrigues et al., 2019)

4.3 Conclusões

Os resultados apresentados neste Capítulo demonstraram que o carregamento enzimático de 0,3 gramas de pó enzimático de lipase de *Rhizopus oryzae* apresentou capacidade em realizar a reação de acidólise do ácido cáprico na síntese de lipídios estruturados do tipo MLM. Após aplicação do biocatalisador nos ensaios de síntese delineados pela técnica de planejamento de experimentos (DOE), os biocatalisadores foram submetidos a ensaios de estabilidade operacional e de estabilidade térmica. Após esses ensaios, a lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de estireno-divinilbenzeno apresentou maior estabilidade á temperatura quando comparada aos resultados obtidos pela enzima livre. Conclusões semelhantes podem ser aferidas sobre a estabilidade operacional do derivado imobilizado, sendo capaz de realizar 5 ciclos reacionais mantendo a mesma capacidade de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol.

REFERÊNCIAS

- AKIL, E.; PEREIRA, A. DA S.; EL-BACHA, T.; AMARAL, P. F. F.; TORRES, A. G. Efficient production of bioactive structured lipids by fast acidolysis catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase, free and immobilized in chitosan-alginate beads, in solvent-free medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 910–918, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.282.
- AL ANGARI, Y. M.; ALMULAIKY, Y. Q.; ALOTAIBI, M. M.; HUSSEIN, M. A.; EL-SHISHTAWY, R. M. Synthesis and characterization of aminoamidine-based polyacrylonitrile fibers for lipase immobilization with effective reusability and storage stability. **Int. J. Mol. Sci.**, c. 3, v. 24, p. 1970, 2023, doi: 10.3390/ijms24031970.
- ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, Kinetic, Mechanism and Thermodynamic Studies of Adsorption of a Microbial Lipase on a Mesoporous and Hydrophobic Resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1–12, 2017, doi: doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069.
- BASSAN, N.; RODRIGUES, R. H.; MONTI, R.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PAULA, A. V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in batch reactor. **LWT – Food Science and Technology**, v. 99, p. 600-606, 2019.
- BLANCH, H.W.; DUNN, I.J. Modelling and simulation in biochemical engineering. In: **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer, v. 3, 1974.
- BEZERRA, R.M.; MONTEIRO, R.R.C.; NETO, D.M.A.; DA SILVA, F.F.M.; DE PAULA, R.C.M.; DE LEMOS, T.L.G.; FECHINE, P.B.A.; CORREA, M.A.; BOHN, F.; GONÇALVES, L.R.B.; DOS SANTOS, J.C.S. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 138, n. 109560, 2020, doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109560.
- CERÓN, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p.166-172, ISSN 0961-9534, 2018, doi:10.1016/j.biombioe.2018.09.013.
- DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508–5516, 2010.
- FERREIRA-DIAS, S.; OSÓRIO, N. M.; RODRIGUES, J.; TECELÃO, C. Structured Lipids for Foods. **Reference Module in Food Science**, p. 357-369, 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21766-6

FIDALGO, W. R. R.; CERON, A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 217-223, 2016.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1624-1639, 2020, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.02.

JADHAV, H. B.; UDAY, A. Designer lipids-synthesis and application—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 884-902, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.020.

KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. **Journal of Food Science**, c. 8, v. 80, p. C1713–C1724, 2015, doi:10.1111/1750-3841.12953.

MARTÍNEZ-GALÁN, J. P.; ONTIBÓN-ECHEVERRI C. M.; COSTA, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; BATISTA V. G.; MESA, V.; MONTI, R.; DE PAULA, A. V.; BAVIERA, A. M. 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, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110602.

MIOTTI JR, R. H.; CORTEZM, D.V.; DE CASTRO, H.F. Transesterification of palm kernel oil with ethanol catalyzed by a combination of immobilized lipases with different specificities in continuous two-stage packed-bed reactor. **Fuel**, v. 310, Parte A, article 122343, 2022.

MIRANDA, J. S.; SILVA, N.C.A.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; LAGE, F.A.P.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chem. Eng.**, v. 251, p. 392–403, 2014, doi: 10.1016/j.cej.2014.04.087.

MOREIRA, D. K. T.; DE PÁDUA GANDRA, R. L.; ZUIN, J. C.; RACT, J. N. R.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, J. A.; GAMBERO, A.; AKIL, E.; TORRES, A. G.; MACEDO, G. A. Synthesis and characterization of structured lipid rich in behenic acid by enzymatic interesterification. **Food and Bioprocess Processing**, v. 122, p. 303–310, 2020, doi: 10.1016/j.fbp.2020.06.005.

NORIEGA, A.K.; TIRADO, A.; M'ENDEZ, C.; MARROQUÍN, G.; ANCHEYTA, J. Hydrodeoxygenation of vegetable oil in batch reactor: experimental considerations, **Chin. J. Chem. Eng.**, v. 28, c. 6, p. 1670-1683, 2020, doi:10.1016/j.cjche.2019.12.022.

NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 7, p. 1287-1295, 2012.

ÖZTÜRK, T.; USTUN, G.; AKSOY, H. A. Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: Optimization by response surface methodology. **Bioresource Technology**, c. 19, v.101, p. 7456–7461, 2010, doi:10.1016/j.biortech.2010.04.09.

POPPE, J.K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C.; AYUB, M.A.Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects, **Biotechnol. Adv.**, v. 33, p. 511–525, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.011.

RAFIEE, F.; M. REZAEI. Different Strategies for the Lipase Immobilization on the Chitosan Based Supports and Their Applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 170–195, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198.

RAMOS, E. Z.; MIOTTI JR, R. H.; DE CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Production and Immobilization of *Geotrichum Candidum* Lipase via Physical Adsorption on Eco-Friendly Support: Characterization of the Catalytic Properties in Hydrolysis and Esterification Reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

REHMAN, S.; WANG, P.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International journal of biological macromolecules**, v. 97, p. 279–286, 2017.

REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A.V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022, doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Lipases on Hydrophobic Supports: Immobilization Mechanism, Advantages, Problems, and Solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, c. 5, p. 746–70.

SILVA, J. M. F.; DOS SANTOS, K. P.; DOS SANTOS, E. S.; RIOS, N. S.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on a new hydrophobic support (Streamline phenyl™): Strategies to improve stability and reusability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 163, p. 110–166, 2023, doi:10.1016/j.enzmictec.2022.110166.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, M. G. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology** v. 79, p. 745–757, 1999.

SUBROTO, E.; WISAMPUTRI, M.F.; SUPRIYANTO; UTAMI, T.; HIDAYAT, C. Enzymatic and chemical synthesis of high mono- and diacylglycerol from palm stearin and olein blend at different type of reactor stirrers. **J. Saudi Soc. Agric. Sci.**, v. 19, p. 31–36, 2020, doi:10.1016/j.jssas.2018.05.003.

TECELÃO, C.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Immobilized Heterologous *Rhizopus Oryzae* Lipase: A Feasible Biocatalyst for the Production of Human Milk Fat Substitutes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67: 104–110, 2012, doi: 10.1016/j.bej.2012.06.001.

VILAS-BÔAS, R. N.; CERON, A. A.; BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F. Application of an Immobilized *Rhizopus Oryzae* Lipase to Batch and Continuous Ester Synthesis with a Mixture of a Lauric Acid and Fusel Oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 61–68, 2018, doi: 10.1016/j.biombioe.2018.09.011.

ZAM, W. Structured Lipids: Synthesis, Health Effects, and Nutraceutical Applications. **Lipids and Edible Oils**, p. 289–327, 2020.

ZHANG, S.; WILLETT, S. A.; HYATT, J. R.; MARTINI, S.; AKOH, C. C. Phenolic compounds as antioxidants to improve oxidative stability of menhaden oil-based structured lipid as butterfat analog. **Food Chemistry**, v. 334, n. 127584, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127584

ZHANG, Z.; SONG, J.; LEE, W. J.; XIE, X.; WANG, Y. Characterization of enzymatically interesterified palm oil-based fats and its potential application as cocoa butter substitute. **Food Chemistry**, v. 318, n. 126518, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126518

5. SIMULAÇÃO DA SÍNTESE DOS LIPÍDIOS ESTRUTURADOS POR REDES NEURONAIS.

5.1 INTRODUÇÃO

A produção e otimização do processo de acidólise enzimática utilizando lipases imobilizadas são de grande importância devido ao potencial dos lipídios estruturados (LS) quanto ao seu potencial em melhorar as propriedades nutricionais e em seu uso ao combate da obesidade (Martínez-Galán et al., 2021; Bassan et al., 2019). Essas características estão intimamente ligadas à composição química dos LS, pois o controle da presença ou ausência de certos ácidos graxos saturados ou insaturados influencia diretamente seu comportamento nas vias metabólicas (Zhao et al., 2022; Da Silva & Gioielli, 2009).

O avanço científico está direcionado para a melhoria contínua desse bioprocesso, buscando otimizar as condições de produção e aumentar a eficiência. Em um estudo recente, Miotti Junior e colaboradores. (2022) conduziram uma análise estatística do processo e aprimoraram a produção de lipídios estruturados ricos em ácido cáprico por meio da acidólise do óleo de semente de uva, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte hidrofóbico. Neste estudo, variáveis como temperatura (°C) e razão molar (ácido:óleo) foram manipuladas como fatores independentes, com o objetivo de simular o grau de incorporação (%GI). Os resultados revelaram uma significativa melhoria no bioprocesso, com um aumento do grau de incorporação de 49% para 56% de GI.

Conforme apresentado por Sivakanthan e colaboradores (2019), ao otimizar os parâmetros de interesterificação enzimática usando lipase por meio da metodologia de superfície de resposta (RSM) para analisar o desempenho do modelo matemático. Os pesquisadores utilizaram temperatura (°C), tempo (h) e proporção de óleo como variáveis independentes, e grau de interesterificação e proporção de ácidos graxos monoinsaturados para poli-insaturados como variáveis dependentes de saída. Usando a RSM, obtiveram valores ótimos de grau de interesterificação de 22% e proporção de 1,4 (MUFA:PUFA) de ácidos graxos monoinsaturados para poli-insaturados, com condições de temperatura de 57 °C, tempo de 16 horas e proporção de peso do óleo de 50:50, conseguindo escalar a produção de lipídios estruturados.

Analisando a literatura disponível, é evidente que a RSM é comumente utilizada por pesquisadores para otimizar bioprocessos. No entanto, essa abordagem apresenta limitações quando comparada a novos modelos matemáticos que se baseiam em inteligência artificial. Esses modelos têm maior tolerância a falhas e ruídos no processo de aprendizado e simulação. Em processos biológicos, as variações são frequentes, gerando ruído e falhas para análise com modelos simples. Portanto, o uso de modelos matemáticos com inteligência artificial, como Redes Neurais Artificiais (ANN), pode proporcionar maior precisão na previsão de variáveis de resposta.

Nesse sentido, este Capítulo tem como objetivo empregar a Rede Neuronal Artificial (ANN) como um modelo matemático para otimizar a produção de lipídios estruturados do tipo MLM por meio de acidólise enzimática. Além disso, busca-se uma comparação com os resultados alcançados por Miotti Junior et al. (2022), os quais foram obtidos por meio de um modelo polinomial de segunda ordem para otimizar o grau de incorporação. Essa comparação entre as abordagens matemáticas oferecerá subsídios para avaliar a seleção do método que melhor se ajusta aos resultados obtidos experimentalmente.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Desenvolvimento da arquitetura das Redes Neurais Artificiais

Inicialmente, para o desenvolvimento da rede, o primeiro passo foi obter a função objetivo que demonstrasse o melhor ajuste numérico com minimização de erro. Esta função objetivo desempenha um papel importante no ajuste feito pelo modelo matemático, determinando assim, se a arquitetura escolhida para o aprendizado foi suficiente para que a ANN generalize e simule a variável de resposta de acordo com o que foi inicialmente apresentado (Drew & Monson, 2000). Para isso, testes foram realizados em uma arquitetura de ANN de 2-6-1 usando o algoritmo de treinamento de Levenberg-Marquardt (LM) e testados com diferentes funções de ativação: tangente hiperbólica sigmóide (tansig), sigmóide logístico (logsig) e função linear (purelin). Os resultados do processo de aprendizado da simulação estão apresentados na Tabela 5.1

Tabela 5. 1 - Resultados do processo de aprendizagem da ANN com teste de arquitetura, utilizando algoritmo de treinamento LM e 6 neurônios na camada intermediária configurados como configurações fixas.

Função ativação	Função objetivo			
	<i>SEQ</i>	<i>R</i>	<i>EQM</i>	<i>R</i>
<i>tansig</i>	2,645	0,9823	2,734	0,9804
<i>logsig</i>	2,605	0,9816	3,005	0,9801
<i>purelin</i>	2,742	0,9834	2,671	0,9807

SEQ: soma dos erros quadrados; EQM :erro quadrático médio; R: coeficiente de correlação de Pearson.

Analisando a Tabela 5.1, foi possível notar a correlação entre a minimização da função objetivo e o coeficiente de correlação de Pearson R , pois, quanto menor o valor do erro, maior o coeficiente de correlação. Isso demonstra a função objetivo SEQ com melhores resultados durante os testes de arquitetura das redes, menores discrepâncias entre os resultados teóricos e apresentando maiores coeficientes de correlação quando comparado aos resultados obtidos pela função objetivo EQM.

Isso pode-se justificar pela função SEQ apresentar tendência em fazer ajustes de forma igualitária para os menores valores de erro. Deste modo, a função objetivo SEQ foi selecionada para dar continuidade aos ensaios de arquitetura de ANN. Após selecionada a função objetivo, foram realizados os testes para selecionar uma entre as funções ativação *tansig*, *logsig* e *purelin* e o melhor número de neurônios na camada intermediária, apresentando os resultados na Tabela 5.2.

Tabela 5. 2 - Resultados da soma dos erros quadrados (SEQ) e do coeficiente de correlação de Pearson R obtidos no processo de treinamento das ANN.

Nº neurônios	<i>Tansig</i>		<i>logsig</i>		<i>purelin</i>	
	SEQ	R	SEQ	R	SEQ	R
2	8,517	0,813	4,383	0,799	6,861	0,816
3	4,529	0,942	6,140	0,922	2,954	0,976
4	3,602	0,946	2,887	0,982	3,343	0,970
5	2,647	0,976	3,420	0,944	3,939	0,966
6	2,644	0,983	4,868	0,962	3,687	0,976

Nota: resultados obtidos testando as funções ativação *tansig*, *logsig* e *purelin*, para cada variação no número de neurônios, de 2 a 6 neurônios. Tendo como fixo a função ativação *purelin* na camada de saída.

Analisando a Tabela 5.2, fica evidente que a maioria das simulações segue um padrão: quanto menor o valor da soma dos erros quadrados (SEQ), maior é o coeficiente de correlação R , o que já era esperado e desejado. Isso ocorre porque o coeficiente de correlação depende do ajuste realizado pelo modelo matemático. Quanto melhor o ajuste, mais próximas as respostas da saída da ANN estarão do valor da variável resposta apresentado no início do treinamento, e, como resultado, o valor da soma dos erros quadrados (SEQ) será baixo. Portanto, observa-se uma relação inversamente proporcional entre esses dois fatores: quanto menor o erro, maior o coeficiente de correlação.

Realizando uma análise comparativa, percebe-se que com apenas dois neurônios, a ANN não conseguiu obter um bom processo de treinamento e generalização do problema apresentado a ela, resultando em soma dos erros quadrados (SEQ) elevados e coeficiente de correlação de Pearson R baixos. Com o aumento do número de neurônios na camada intermediária, e utilizando as três funções de ativação, houve uma melhoria na minimização do erro e um aumento em R . Isso pode ser justificado pelo fato de ter sido apresentado à ANN um problema complexo necessitando maior quantidade de neurônios.

Com a função de ativação ‘tansig’, observa-se uma melhoria progressiva ao aumentar o número de neurônios. Já com a função ‘logsig’, ocorre uma instabilidade perceptível, não apresentando um perfil de melhoria. Por fim, com a função ‘purelin’, observa-se uma estabilidade após 3 neurônios na camada intermediária. Foram selecionados, então, os melhores modelos obtidos entre as três funções de transferência: ‘tansig’ com 6 neurônios, ‘logsig’ com 4 neurônios e ‘purelin’ com 3 neurônios na camada intermediária. Durante o treinamento dessas ANNs, o software gerou diferentes gráficos para representar o desempenho de cada uma, ilustrados na Figura 5.1.

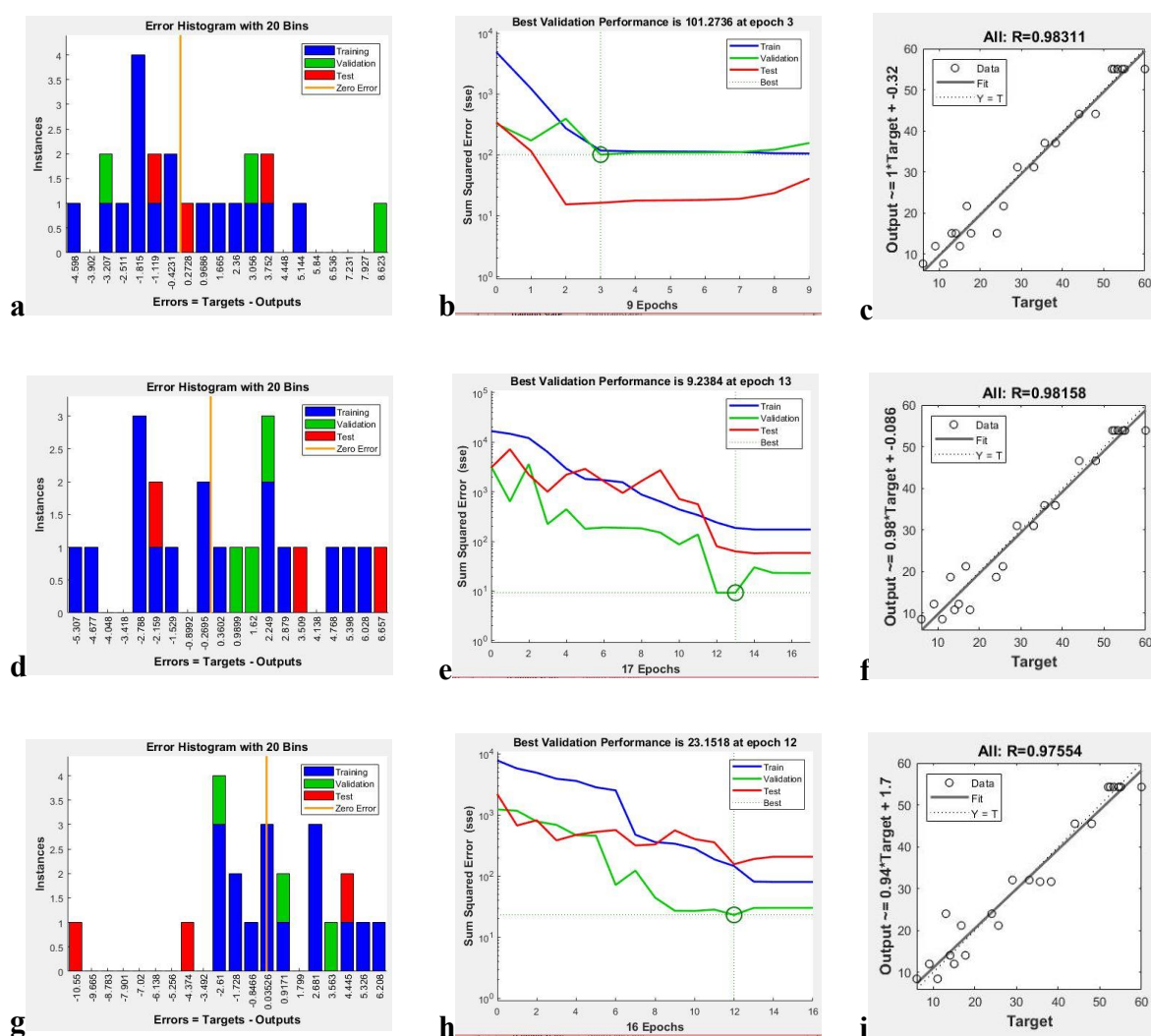


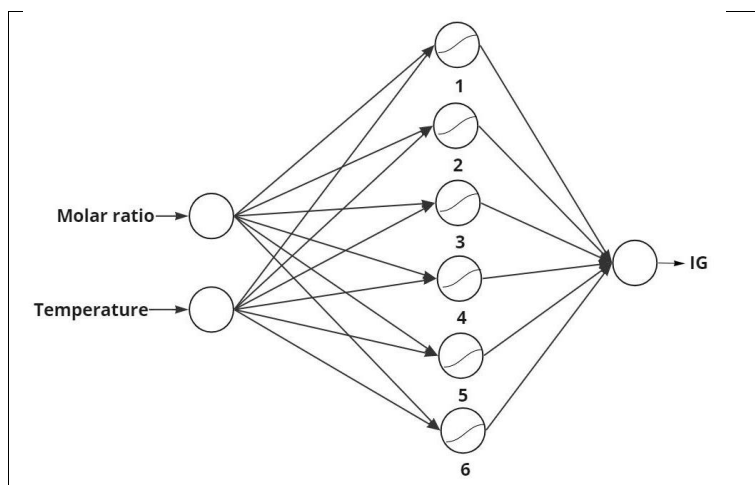
Figura 5.1 - Representação dos gráficos de desempenho obtidos durante o treinamento das ANN. 7) histograma da ANN tansig 2-6-1; b) desempenho da ANN tansig 2-6-1; c) regressão da ANN tansig 2-6-1; d) histograma da ANN logsig 2-4-1; e) desempenho da ANN logsig 2-4-1; f) regressão da ANN logsig 2-4-1; g) histograma da ANN purelin 2-3-1; h) desempenho da ANN purelin 2-3-1; i) regressão da ANN purelin 2-3-1.

Através da análise do gráfico de histograma, observa-se que a distribuição mais próxima de uma curva de distribuição normal foi alcançada com a função de ativação ‘tansig’, apresentando um pico ligeiramente deslocado para a região do erro -1.8015. Isso resultou em uma distribuição de erros mais concentrada próxima a zero, em comparação com os outros modelos avaliados. Quanto ao gráfico de desempenho, todos os casos demonstraram uma tendência de declínio, porém o modelo com a função ‘tansig’ exibiu maior estabilidade. Além disso, alcançou o melhor desempenho durante a validação na terceira época, indicando que a rede neuronal necessitou de poucas iterações para aprender e validar o modelo simulado. Essa capacidade de aprendizado rápido e resolução eficiente do problema apresentado à rede é notável.

Com base na análise dos gráficos anteriores, é esperado que a ANN com a função de ativação ‘tansig’ na camada intermediária apresente um melhor coeficiente de correlação entre os valores experimentais e simulados. Esse resultado foi confirmado, já que a ANN com ‘tansig’ atingiu o maior coeficiente de correlação, com um R de 0,983, o que indica um ajuste excepcional do modelo matemático.

Portanto, a rede neuronal artificial com a seguinte arquitetura foi escolhida como a de melhor desempenho: algoritmo de treinamento LM, 2 neurônios na camada de entrada, 6 neurônios na camada intermediária com função de ativação ‘tansig’, 1 neurônio na camada de saída com função de ativação ‘purelin’, função objetivo SEQ e algoritmo de treinamento LM. A representação gráfica desta ANN pode ser vista na Figura 5.2.

Quadro 5.1 – Representação da ANN treinada e selecionada como melhor desempenho, com arquitetura 2-6-1, com função ativação na camada intermediária *tansig* e *purelin* na camada de saída, com algoritmo de treinamento LM e função objetivo SEQ.



5.2.2 Otimização das variáveis simulada pela ANN

Com a ANN selecionada como a de melhor desempenho, prosseguiu-se com o processo de otimização das variáveis de entrada para maximizar a variável resposta, que neste estudo é o grau de incorporação de lipídios estruturados. Miotti Jr. et al. (2022) demonstraram que, utilizando uma lipase imobilizada com atividade hidrolítica de 1870 U, o modelo polinomial de segunda ordem alcançou uma conversão máxima de 55.17 ± 1.39 mol% de grau de incorporação (ID) de ácido cáprico, com condições de entrada de razão molar 8:1 e temperatura de 45 °C. Na validação do modelo, conseguiram uma conversão de 56.33 ± 3.51 mol% ID.

Utilizando o modelo obtido pela ANN com os mesmos dados de Miotti Jr. et al. (2022), a otimização resultou em uma conversão máxima de 70,32 mol% ID, com um ponto ótimo de razão molar de 6,7:1 e temperatura de 41 °C. A ANN obteve resultados condizentes com as características desejadas para o processo. A faixa de temperatura ideal para a enzima utilizada neste estudo ficou entre 40-43 °C; acima de 45 °C, houve uma diminuição na efetividade catalítica devido à possível desnaturação da estrutura enzimática. Portanto, a ANN foi precisa na previsão da temperatura ideal, o que também pode aumentar a estabilidade da atividade enzimática para maior reutilização.

A razão molar prevista na otimização, 6,7 de ácido para 1 de óleo, mostrou-se ideal para o meio reacional, evitando interferência na atividade enzimática causada por

excesso de acidez, o que poderia resultar na inativação das enzimas e, consequentemente, na redução do grau de incorporação.

Para validar o modelo gerado pela ANN, experimentos laboratoriais foram conduzidos de acordo com a metodologia de Miotti Jr. et al. (2022), utilizando as condições iniciais ótimas simuladas pela rede. Os experimentos foram realizados em duplicata. É importante notar que pode haver variações na atividade enzimática devido ao processo de imobilização. A ANN foi treinada com dados de atividade enzimática de 1870 U e, na validação experimental, a enzima imobilizada apresentou uma atividade de 1872 ± 37 U. Os resultados experimentais estão detalhados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Resultados normalizados com base na atividade enzimática para o processo de otimização do grau de incorporação (%GI) com temperatura inicial ideal de 41 °C e razão molar de 6,7:1 (ácido:óleo).

Ensaio	Razão Molar	Temperatura (°C)	Grau de incorporação (%)
1	6,7:1	41	61,3
2	6,7:1	41	60,1
3	6,7:1	41	61,6

Os resultados experimentais apresentados pela Tabela 5.3 obtiveram uma média de 61% de grau de incorporação do ácido cáprico, indicando um valor máximo superior ao previsto pelo modelo polinomial de 56% e validação experimental (56%GI). Embora o resultado experimental esteja abaixo da previsão da ANN, espera-se um máximo teórico de 66% de incorporação de ácido cáprico, desde que o produto desejado mantenha as propriedades estruturais de ter uma cadeia de carbono curta nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e uma longa na posição *sn*-2.

A regiosseletividade da lipase é um fator determinante na produção de óleos modificados para a indústria alimentícia, pois ela pode substituir seletivamente cadeias de carbono específicas nos triacilgliceróis, um nível de especificidade que não é alcançado pelos catalisadores químicos. Valores próximos ao máximo teórico foram observados no trabalho de Bassan et al. (2019), onde a lipase comercial Lipozyme RM IM foi usada na reação de acidólise com uma razão molar ácido-óleo de 7:1 a 69°C, resultando em 61% de GI. De fato, um excesso de ácido em relação ao óleo usado nas reações favorece o deslocamento do equilíbrio químico para a formação do produto. No

entanto, uma quantidade excessiva de ácido orgânico pode comprometer a capacidade biocatalítica da enzima (Nunes et al., 2012; Tecelão et al., 2012). Reduzir a temperatura de 69°C para 41°C traz economia de custos energéticos quando ampliado para aplicações industriais, o que contribui positivamente para a redução de custos.

A ANN não foi capaz de prever essa limitação, muito provavelmente devido à falta de números de amostras suficientes e dados de treinamento que não mostraram essa limitação. No entanto, a ANN demonstrou sensibilidade ao encontrar o ponto ótimo dentro da região estudada, simulando condições do bioprocessamento mais alinhadas com as condições ideais da enzima, indicando uma tendência melhor do que o modelo polinomial. Portanto, a validação experimental do modelo gerado pela ANN indicou a otimização do processo, reduzindo as condições ideais indicadas pelo modelo polinomial e maximizando o grau de incorporação, alcançando o objetivo desejado neste estudo.

5.3 Conclusões

Os resultados obtidos pela ANN na busca pela otimização da incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol demonstraram sua eficiência na previsão de um modelo matemático, comparável a um modelo polinomial de segunda ordem e a um modelo de resposta de superfície. Além disso, o modelo proposto pela ANN sugere uma razão molar ácido-óleo e temperatura de reação diferentes em relação ao modelo polinomial. Através do modelo da ANN, foi possível alcançar um aumento aproximado de 5% no grau de incorporação na síntese de lipídios estruturados, utilizando uma razão molar de 6,7:1 e uma temperatura de 41°C. Esses resultados destacam a promissora utilização da ANN na construção de modelos matemáticos para sínteses catalisadas por enzimas, que apresentam um comportamento complexo e não intuitivamente previsível em comparação com catalisadores químicos. Em continuidade ao trabalho de tese, os resultados otimizados pela ANN foram utilizados para a produção dos lipídios estruturados em reatores de leito fixo e fluidizado, os quais são apresentados nos Capítulos 6 e 7.

REFERÊNCIAS

- BASSAN, N.; RODRIGUES, R. H.; MONTI, R.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; DE PAULA, A. V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. **LWT**, v. 99, p. 600–606, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.013.
- DA SILVA, R. C. AND GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Quim Nova**, v. 32, n. 5, p. 1253–1261, 2009, doi: 10.1590/S0100-40422009000500032.
- DREW, P. J. AND MONSON, J. R. T. Artificial neural networks. **Surgery**, v. 127, n. 1, p. 3–11, 2000, doi: 10.1067/msy.2000.102173.
- MARTÍNEZ-GALÁN, J. P.; ONTIBÓN-ECHEVERRI C. M.; COSTA, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; BATISTA V. G.; MESA, V.; MONTI, R.; DE PAULA, A. V.; BAVIERA, A. M. 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, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110602.
- MIOTTI JR, R. H.; FREITAS, A. N.; PRIMO, F. L.; DE PAULA, A. V. Searching the optimal region of the synthesis of MLM-type structured lipids catalyzed by lipases of *Rhizopus oryzae* immobilized on styrene-divinylbenzene. **Galoá Proceedings**, 2022. <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-sheb-enzitec-2022/trabalhos/searching-the-optimal-region-of-the-synthesis-of-mlm-type-structured-lipids-cata?lang=pt-br> (accessed Jul. 28, 2023).
- NUNES, P. A; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized Production of MLM Triacylglycerols Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. **J Am Oil Chem Soc**, v. 89, n. 7, p. 1287–1295, 2012, doi: 10.1007/S11746-012-2027-9.
- TECELÃO, C.; RIVERA, I.; SANDOVAL, G.; FERREIRA-DIAS, S. Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 3, p. 266–276, 2012, doi: 10.1002/EJLT.201100226.
- ZHAO, J.; MA, M.; YAN, X.; ZHANG, G.; XIA, J.; ZENG, Z.; YU, P.; DENG, Q.; GONG, D. Green synthesis of polydopamine functionalized magnetic mesoporous biochar for lipase immobilization and its application in interesterification for novel structured lipids production. **Food Chem**, v. 379, p. 132-148, 2022, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2022.132148.

6. SÍNTESE DE LÍPIDIOS ESTRUTURADOS EM REATOR DE LEITO FIXO

6.1 Introdução

Após os Reatores Tanques Agitados (STR s), os Reatores de Leito Fixo(PBRs) são a segunda escolha mais comum em bioreatores para reações que envolvem lipases imobilizadas (Remonatto et al., 2022). Os PBRs se caracterizam em uma coluna cujas dimensões em comprimento, largura e altura variam dependendo do tipo de operação realizada. As enzimas são dispostas nessa coluna de forma compacta, assemelhando-se a uma cama, dando origem ao nome “reator de leito fixo”. A mistura reacional passa por esse leito fixo e à medida que a mistura reacional flui ao longo do comprimento do leito, ela entra em contato com a enzima/catalisador, e é transformada em um produto (Zhong et al., 2020; Jadhav & Annapure, 2021; Remonatto et al., 2022). Assim como os STRs, os PBR s podem operar nos modos de batelada e/ou contínuo (de Paula et al., 2018; Souza-Gonçalves et al., 2023; Zhou et al., 2022).

Os PBRs são relativamente simples de construir e dimensionar sendo predominantes em reações contínuas que envolvem lipases imobilizadas (Zhou et al., 2022; Remonatto et al., 2022), com a vantagem adicional de permitir o reuso dos biocatalisadores, já que os derivados imobilizados permanecem no leito ao final do processo (Utama et al., 2018; Guajardo et al., 2018; Balcão et al., 1996). Diferentemente dos STRs, os PBRs estão menos suscetíveis a problemas como o cisalhamento dos biocatalisadores devido à ausência de agitação mecânica. Isso resulta em alta estabilidade dos catalisadores e uso prolongado (Remonatto et al., 2022; Zhou et al., 2022).

Adicionalmente, os PBRs são conhecidos por sua eficiência excepcional, sendo capazes de operar com grandes volumes do leito catalítico, resultando em uma ampla área de superfície por unidade de volume da reação e, consequentemente, gerando uma elevada razão de enzima para substrato (Hamas et al., 2011; Remonatto et al., 2022). Essa eficiência torna os PBRs uma opção econômica para a produção em larga escala de lipídios estruturados. O substrato permanece tempo suficiente no leito para aumentar o contato entre a enzima e o substrato, resultando em um maior grau de conversão (%). Além disso, a recirculação do substrato pelo leito de enzimas pode levar a uma conversão (%) mais elevada, aprimorando a taxa de transferência de massa (Jadhav & Annapure, 2021).

Diversas pesquisas exploraram a transição dos STRs em modo batelada para os PBRs contínuos em protocolos de síntese (Remonatto et al., 2022), resultando na bem-sucedida produção de diversos compostos. De modo a exemplificar, Matte e colaboradores (2016) conduziram uma comparação de eficiência entre STRs de batelada, PBRs contínuos e reatores de leito fluidizado (FBRs) na síntese enzimática de butirato de n-butila. Por outro lado, um desafio presente em se trabalhar com reatores de leito fixo estão na perda de pressão, embora possa ser reduzida com o aumento do tamanho das esferas catalíticas que compõem o leito, o que promoveria a diminuição da compactação do leito, impactando na possibilidade de menor difusão intramolecular (Gupta et al., 2020; Remonatto et al., 2022).

Deste modo, este Capítulo tem por objetivo a construção e caracterização do reator de leito fixo, apresentando a determinação da distribuição do tempo de residência do reator e a projeção da síntese de lipídios estruturados em modo contínuo. Assim, partindo do princípio da utilização das condições reacionais otimizadas pela rede neuronal em reatores de tanque agitado para a transição do modo de produção dos lipídios estruturados do tipo MLM em reatores de leito fixo.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Teste traçador do tipo pulso e cálculo da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Do ponto de vista experimental, a Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é obtida pela introdução imediata de um composto, chamado traçador, no reator no início da reação, seguida pela monitorização da concentração desse traçador no efluente do reator ao longo do tempo. O traçador deve ser uma substância não reativa, de fácil detecção, com propriedades físicas comparáveis àquelas da mistura reagente, além de ser completamente miscível na mistura (Fogler, 2009).

Inicialmente, foi estabelecida a construção da curva de concentração do traçador no meio reacional por meio da medição de sua absorbância. Os experimentos foram conduzidos utilizando o corante azul, de grau alimentício da marca MIX®, que foi dissolvido na concentração de 1,5% (m/m) na mistura reacional. Isso possibilitou a determinação da concentração do traçador no efluente do reator ao longo do estudo da

Distribuição do Tempo de Residência (DTR). A análise inicial realizada no espectrofotômetro na faixa de luz visível revelou que o pico de maior absorbância para esse corante estava localizado no comprimento de onda de 575 nm. Consequentemente, foram feitas leituras subsequentes sob diferentes concentrações da solução do traçador na mistura reacional, permitindo a construção de uma reta que correlaciona a concentração do traçador com a absorbância (conforme ilustrado na Figura 6.1). Isso possibilitou, por conseguinte, a determinação da concentração do traçador no efluente do reator durante a análise da Distribuição do Tempo de Residência (DTR).

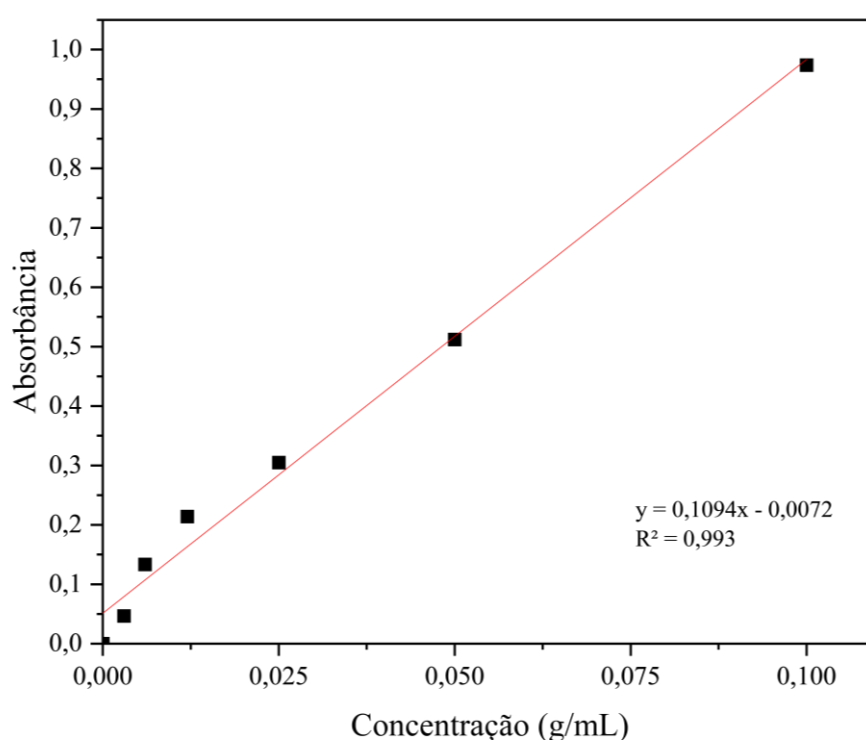


Figura 6. 1 - Concentração do traçador em mistura reacional em função da absorbância.

A função de distribuição do tempo de residência (DTR) foi determinada experimentalmente conforme descrito pelo tópico 3.4.15. Como a vazão volumétrica foi constante, pode-se então calcular a função da DTR $E(t)$. Em reatores ideais, sem caminhos preferenciais ou zonas mortas, o tempo médio de residência deve coincidir com tempo espacial (Fogler, 2009), obtendo um pico de altura infinita e largura zero, como apresentado pela Figura 6.2.

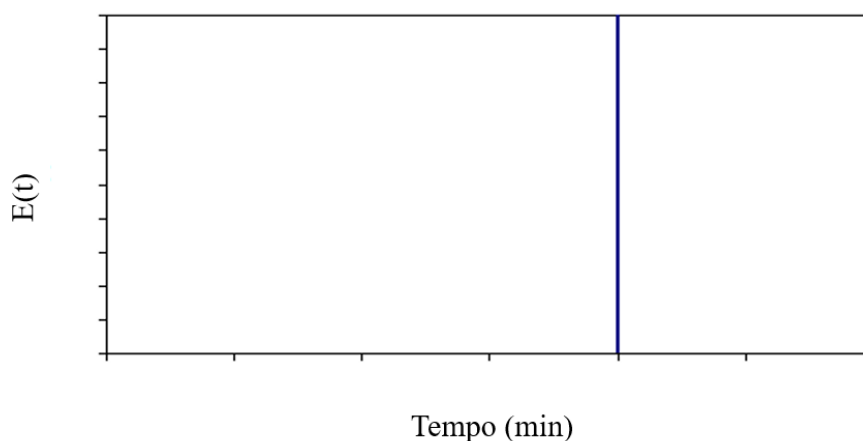


Figura 6. 2 - Representação da resposta de um fluxo constante à introdução de um pulso em um reator ideal, onde $E(t)$ é a função da Distribuição de Tempo de Residência.

Quando trazemos a análise para um reator real, os caminhos preferencias e as zonas mortas presentes no reator influenciam na passagem do meio reacional pelo reator. Quanto maior for a quantidade de caminhos preferencias e de zonas mortas, maior será a diferença entre o tempo médio de residência e o tempo espacial. Deste modo, a representação gráfica de $E(t)$ em função do tempo para o tempo espacial de 1 e 3 horas são apresentados na Figura 6.3.

Para estes ensaios o tempo médio de residência calculado foi de 22 horas para os tempos espaciais de 24 horas. Foram utilizadas um bastão de vidro e uma vareta de alumínio para a acomodação das partículas catalíticas dentro da coluna. Neste procedimento, a vazão de alimentação era ligada após a adição de cada 1 grama de biocatalizador à coluna do reator, essa estratégia favoreceu a acomodação das partículas e a estruturação do leito com a minimização de bolhas, de caminhos preferencias e de compressão do leito.

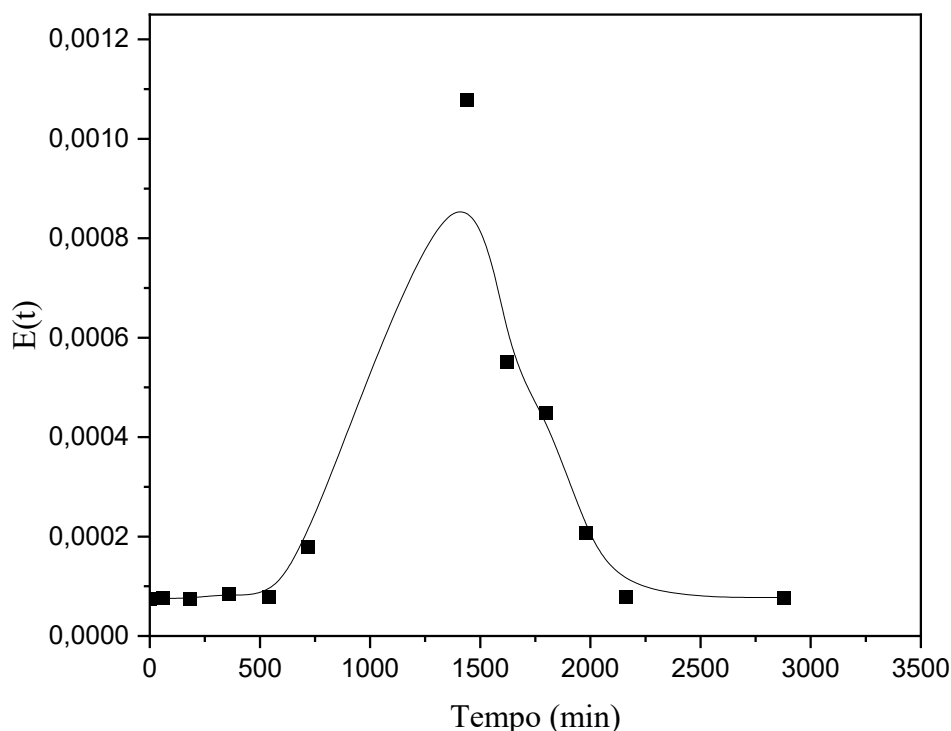


Figura 6.3 - Distribuição de Tempo de Residência para o reator de coluna de leito fixo empregado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM.

Ao cuidar do empacotamento do leito, notamos que a diferença entre a DTR e o tempo espacial teve um erro de 8,33%, o que é razoável nesse tipo de teste com reatores contínuos de leito fixo. A Figura 6.3 mostra que o reator de coluna com leito fixo não é perfeito, com a curva de Tempo de Residência (DTR) se espalhando um pouco, mas mantendo um pico. Isso sugere que o tempo espacial e o tempo médio de residência são bem próximos, indicando que não há grandes desvios no fluxo ou mistura no leito, como pode ser visto nas fotos do experimento na Figura 6.4, desde a injeção do traçador.

Ao levar em conta esses resultados e as ideias de Levenspiel (2000) e a sugestão anterior, percebe-se uma coerência. A afirmação de que o modelo de dispersão pode ser usado sem problemas, graças à boa adaptação aos dados, faz sentido à luz do que observamos no experimento. O fato de o D/uL permanecer abaixo de 1 para ambas as condições reforça que o modelo é adequado, mesmo com a variabilidade esperada em sistemas de leito fixo contínuo. Essa concordância entre a teoria e os resultados práticos dá confiança de que o modelo de dispersão funciona bem para o nosso reator.

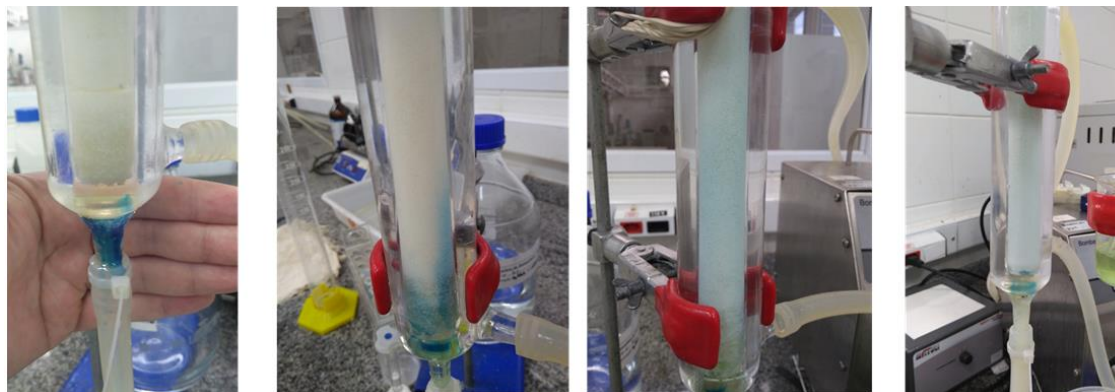


Figura 6. 4 - Foto do experimento para determinação da DTR demonstrando influência de caminho preferencial na redução do tempo de residência para o reator de coluna de leito fixo empregado na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM.

6.2.2 Síntese de lipídios estruturados do em reator de leito fixo

Conforme descrito no tópico 3.4.9 a reação de síntese de lipídios estruturados do tipo MLM seguiu as condições de razão molar de 1:6,7 e temperatura de 41 °C, conforme determinado pela rede neuronal. Visando a transição do reator de tanque agitado em modo batelada para o reator de leito fixo em modo contínuo, o tempo espacial de 24 horas foi mantido para garantir o tempo de contato entre o meio reacional e o leito catalítico, assim como para manter o mesmo tempo de contado proposto para o reator de tanque agitado. A Figura 6.5 mostra o sistema reacional empregado na síntese de lipídios estruturados.



Figura 6. 5 - Sistema reacional utilizando reator de leito fixo na síntese de lipídio estruturado do tipo MLM em modo contínuo.

Os resultados obtidos por esse sistema são apresentados na Tabela 6.1. Para esse sistema, as amostras eram retiradas a cada 24 horas e analisados o grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol. Os resultados mostram que, inicialmente a adição do ácido cáprico a estrutura do triacilglicerol foi baixa ($4,0 \pm 0,35$ %GI) quando comparada as 24 horas de reação utilizando o reator de tanque agitado. Esse grau de incorporação baixo era esperado, uma vez que o estado estacionário do reator é atingido a partir do 3 tempo espacial, assim como demonstrado por Miotti Jr e colaboradores (2022), em que a conversão máxima do bioproduto catalisado por lipase é atingida após a passagem de 3 tempos espaciais. Para este sistema reacional de leito fixo foi possível atingir maior grau de incorporação do ácido cáprico ($61,37 \pm 2,19$) após 120 horas, correspondendo ao quinto tempo espacial, mantendo esses valores até o sétimo tempo espacial. Após as 192 h de reação em estado estacionário, foi possível observar a queda de aproximadamente 5%, essa baixa no grau de incorporação pode estar associada a desativação da enzima imobilizada. Após essa queda no grau de incorporação foi decidido pela interrupção da alimentação do reator.

Tabela 6.1 - Composição em ácidos graxos (%) do lipídio modificado de óleo de semente de uva na reação de acidólise com ácido cáprico em reator de leito fixo em modo contínuo ao longo de ciclos de 24 horas.

Ácido graxo (%)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
Ácido cáprico (C:10)	4,3 ± 0,3	32,9 ± 2,0	49,0 ± 2,1	56,1 ± 3,7	61,3 ± 2,1	60,8 ± 1,9	61,2 ± 1,0	55,7 ± 2,9
Ácido palmítico (C16:0)	11,9 ± 4,2	6,9 ± 1,3	6,8 ± 1,5	6,9 ± 2,0	1,2 ± 0,9	2,9 ± 1,4	2,2 ± 1,5	7,4 ± 2,5
Ácido esteárico (C18:0)	3,3 ± 0,2	2,9 ± 0,5	2,0 ± 0,9	1,6 ± 0,4	2,4 ± 1,7	2,9 ± 2,7	2,7 ± 2,4	3,6 ± 1,4
Ácido oleic (C18:1)	23,6 ± 3,2	18,7 ± 2,8	12,7 ± 5,1	10,3 ± 2,6	7,6 ± 0,3	8,3 ± 0,6	8,6 ± 1,1	9,6 ± 3,5
Ácido linoleico (C18:2)	52,5 ± 1,7	37,7 ± 5,7	22,0 ± 3,9	19,4 ± 2,5	14,8 ± 3,4	15,3 ± 4,0	15,8 ± 3,3	27,4 ± 2,8
Ácido linolênico (C18:3)	3,7 ± 3,8	3,3 ± 0,9	4,9 ± 2,5	5,0 ± 1,0	8,5 ± 2,8	9,8 ± 3,6	8,1 ± 2,3	4,7 ± 0,2
Ácido araquídico (C20:0)	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,8	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2

Os resultados apresentados pela Tabela 6.1 são extremamente satisfatórios, condizendo com o aumento do teor do ácido cáprico (%) com a diminuição dos demais ácidos graxos. É interessante notar que, as maiores porcentagem em ácido graxos, ignorando o ácido cáprico, são pertencentes ao ácido linoleico e linolênico respectivamente com 15 e 9%. O aumento no teor do ácido linolênico pode estar associado à sua fixação na posição *sn*-2 do triacilglicerol, uma vez que, ao longo dos ciclos reacionais de 24 horas, aumenta a substituição dos ácidos graxos pelo ácido cáprico, sendo que a lipase de *Rhizopus oryzae* atua preferencialmente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, mantendo o ácido linolênico na estrutura do TAG. Conforme as cadeias carbônicas laterais vão sendo substituídas por ácido cáprico, o ácido linolênico

por estar na posição mais interna se mantém intacto, aumentando sua porcentagem pelo fato de não ser atacado pela lipase.

Com o objetivo de favorecer a transição da síntese dos lipídios estruturados em reatores de tanque agitado, operando em batelada, para reatores de leito fixo, operando em modo contínuo, nota-se que os valores de grau de incorporação do ácido cáprico obtidos em reatores de leito fixo representaram, em dias, a utilização de 5 ciclos dos reatores de tanque agitado, ou seja, durante 5 dias seguidos, o reator de leito fixo foi capaz de obter grau de incorporação do ácido cáprico semelhante a uma sequência de 5 batelada com o reator de tanque agitado. Isso é traduzido em economia, uma vez que em escala industrial, reatores operando em modo de batelada tendem a ser caros, devido à necessidade de descarregar, recuperar enzimas, limpar e recarregar o reator antes de iniciar uma nova batelada, o que constitui o chamado tempo de inatividade (Remonatto et al., 2022).

A literatura apresenta excelentes trabalhos relacionados a produção dos lipídios estruturados do tipo MLM. Dentre eles encontra-se o trabalho apresentado recentemente por Souza-Gonçalves e colaboradores (2023). Os autores apresentam a produção de lipídios estruturados de baixa caloria a partir do óleo de bagaço de azeitona por meio da acidólise com ácidos graxos de cadeias médias (ácido caprílico e ácido cáprico). Para a síntese foi utilizada lipases comercialmente imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), e lipase de *Rhizomucor miehei*, (Lipozyme RM IM), em meio livre de solventes a 40°C utilizando reatores de leito fixo de modo contínuo. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram aproximadamente a conversão de 30% do novo TAG utilizando ácido caprílico e aproximadamente 50% de conversão para o novo TAG utilizando o ácido cáprico após 70 horas de reação catalisada por Lipozyme TL IM e de aproximadamente 40% do novo TAG utilizando o ácido caprílico e aproximadamente 60% do novo TAG quando utilizado o ácido cáprico após 70 horas de reação catalisada por Lipozyme RM IM.

Outro trabalho reportando a produção dos lipídios estruturados em reatores de leito fixo de modo contínuo é apresentado por Cozentino e colaboradores (2020). Os autores utilizaram óleo de semente de uva para a reação de acidólise com ácido cáprico catalisada por lipases comercialmente imobilizadas de *Rhizomucor miehei*, (Lipozyme

RM IM). Os resultados obtidos pelos autores foram de aproximadamente 30% de incorporação do ácido cáprico à estrutura do TAG ao longo de 120 horas operacionais da reação. Outro dado importante apresentado pelos autores foi a estabilidade operacional do biocatalisador, com meia-vida de 209,64 horas para o reator de leito fixo e um coeficiente de desativação de 0,0061 por hora.

O trabalho apresentado por Wang e colaboradores (2012) é utilizado como referência a outros trabalhos que visam a síntese de lipídios estruturados e também foi citado nos trabalhos anteriormente mencionados neste tópico. Assim, fazendo necessária à sua apresentação e comparação com os resultados obtidos neste presente trabalho. Inicialmente, Wang e colaboradores (2012) propuseram a síntese de lipídios estruturados do tipo MLM com óleo de canola em reação de acidólise com ácido caprílico. Os autores utilizaram três tipos de lipases comercialmente imobilizadas (Lipozyme RM IM, Novozym 435 e Lipozyme TL IM) variando a razão molar entre óleo e ácido caprílico entre 1:2 a 1:6 em diferentes temperaturas (30-60 °C) em frascos de fundo redondo. Em suma, a Lipozyme RM IM demonstrou a maior capacidade de incorporação do ácido caprílico na estrutura do óleo de canola em um sistema livre de solventes. O lipídio estruturado obtido com proporção molar de 1:4 (óleo de canola/ácido caprílico), carga de enzima de 10%, tempo de reação de 15 horas e temperatura de 55°C contendo aproximadamente 45% ácido caprílico.

Na busca em contribuir com o avanço tecnológico dentro dos processos de síntese de lipídios estruturados, os resultados obtidos no Capítulo 6 convergem para o progresso científico. Diferente dos trabalhos apresentados, os quais utilizam lipases comercialmente imobilizadas, grande destaque é dado a capacidade do biocatalisador elaborado em bancada, utilizando técnica simples de imobilização, demonstrar-se capaz em sintetizar a reação de acidólise dos lipídios estruturados do tipo MLM tão bem quanto os biocatalisadores imobilizados comercialmente. Deste modo, sendo capaz de incorporar aproximadamente 60% de ácido cáprico a estrutura do triacilglicerol, correspondendo a mais de 90% de conversão em um novo TAG. Adicionalmente, o sistema reacional desenvolvido neste capítulo foi capaz de manter operando por 192 h, das quais 120 h operou em incorporação máxima do ácido cáprico, sendo que, em termos comparativos com o trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, Cozentino e colaboradores (2020) atingiram o máximo de 30% de incorporação em 120 horas. Outro

destaque se dá ao tempo de meia-vida do biocatalisador, obtendo aproximadamente 60 horas e constante de desativação com valor de 0,0125 horas. A menor capacidade de manter a atividade catalítica por um período prolongado pode ser atribuída a diversos fatores, que incluem o método de imobilização empregado, o suporte de imobilização selecionada e as condições reacionais às quais o sistema foi submetido (Remonatto et al., 2022).

O trabalho de Wang e colaboradores (2012), por mais que tenha sido realizado em reator de tanque agitado, apresenta o estudo da influência da razão molar entre óleo e ácido. Os autores apresentam um aumento no grau de incorporação com o aumento da razão molar. Por outro lado, quando a razão molar atinge a proporção de 1:5, não reflete aumento expressivo no grau de incorporação. No entanto, para lipases de fontes diferentes e imobilizadas por métodos diferentes, a razão molar de 1:6,7 demonstra coerência com os resultados apresentados por Wang e colaboradores (2012).

6.3 Conclusões

A construção do leito fixo por mais que tenha apresentado caminhos preferencias, foi capaz de atingir valores da DTR próximos ao valor teórico do tempo espacial, demonstrando apenas 8% de erro entre os valores. Assim, sendo capaz de ser utilizado como sistema reacional funcional para a síntese de lipídios estruturados. Deste modo, os resultados obtidos pelo sistema de reator de leito fixo utilizando as condições reacionais otimizadas pela rede neuronal demonstraram eficiência na síntese de lipídios estruturados do tipo MLM. Esses resultados foram capazes de atingir aproximadamente 60% de incorporação do ácido cáprico, correspondendo a conversão de 90% do substrato em novo TAG. O biocatalisador demonstrou promissor na produção dos lipídios estruturados sendo comparado a efetividade de síntese de biocatalisadores imobilizados comercialmente. Adicionalmente, o sistema reacional foi capaz de manter operante com elevado grau de incorporação por 120 horas contínuas.

REFERÊNCIAS

- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 392–416, 1996, doi: 10.1016/0141-0229(95)00125-5.
- COZENTINO, I. DE S. C.; RODRIGUES, M. DE F.; MAZZIERO, V. T.; CERRI, M. O.; CAVALLINI, D. C. U.; DE PAULA, A. V. Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil in associated packed bed reactors. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, p 101-109, 2020, doi:10.1002/bab.2085.
- DE PAULA, A. V.; NUNES, G.F.M.; DE CASTRO, H.F.; DOS SANTOS, J.C. Performance of packed bed reactor on the enzymatic interesterification of milk fat with soybean oil to yield structure lipids. **Int. Dairy J.**, v. 86, p. 1–8, 2018, doi: 10.1002/aocs.12319.
- FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 853. 2009.
- GUAJARDO, N.; SCHREBLER, R.A.; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. From batch to fed-batch and to continuous packed-bed reactors: lipase-catalyzed esterifications in low viscous deep-eutectic-solvents with buffer as cosolvent. **Bioresour. Technol.**, v. 273, p. 320–325, 2019, doi:10.1016/j.biortech.2018.11.026.
- GUPTA, S.; MAZUMDER, P.B.; SCOTT, D.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasound-assisted production of biodiesel using engineered methanol tolerant *Proteus vulgaris* lipase immobilized on functionalized polysulfone beads. **Ultrason. Sonochem.**, v. 68, n. 105211, 2020, doi: doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105211.
- HAMA, S.; S. TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochem. Eng. J.**, v. 55, p. 66–71, 2011, doi:10.1016/j.bej.2011.03.008.
- MATTE, C.R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J.K.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 127, p. 67–75, 2016, doi:10.1016/j.molcatb.2016.02.016.
- REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A.V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022, doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.
- SOUZA-GONÇALVES, J.; FIALHO, A.; SOARES, C.M.F.; OSÓRIO, N.M.; FERREIRA-DIAS, S. Continuous Production of Dietetic Structured Lipids Using Crude Acidic Olive Pomace Oils. **Molecules**, v. 28, c. 6, p. 2637, 2023, doi: 10.3390/molecules28062637.
- UTAMA, Q. D.; SITANGGANG, A. B.; ADAWIYAH, D. R.; HARIYADI, P. Lipase-Catalyzed Interesterification for the Synthesis of Medium-Long-Medium (MLM)

Structured Lipids - A Review. **Food Technol Biotechnol.** v. 57, c. 3, p. 305-318, 2019, doi: 10.17113/ftb.57.03.19.6025.

ZHANG, Z.; ZHANG, S.; LEE, W. J.; LAI, O. M.; TAN, C. P.; WANG, Y. Production of Structured Triacylglycerol via Enzymatic Interesterification of Medium-Chain Triacylglycerol and Soybean Oil Using a Pilot-Scale Solvent-Free Packed Bed Reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 97, c. 3, p. 271-280, 2020, doi:10.1002/aocs.12319.

ZHONG, L.; FENG, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; BILAL, M.; LV, H.; JIA, S.; CUI, J. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 152, p. 207–222, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258.

7. SÍNTESE DE LIPÍDIO ESTRUTURADO EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO.

7.1 Introdução

Em continuidade em explorar os diferentes tipos de reatores, os Reatores de Leito Fluidizado (FBRs) torna-se o alvo deste capítulo. Os Reatores de Leito Fluidizado (PBRs) são essencialmente um reator de leito fixo, no entanto o que difere de um reator de leito fixo é o efeito de mistura entre partículas catalíticas e meio reacional com comportamento de um único fluido quando a vazão de alimentação é suficientemente alta para colocar as partículas catalíticas em suspensão (Biniaz et al., 2021).

Esse tipo de configuração de reator ainda vem sendo pouco apresentado na literatura para a síntese de lipídios estruturados, abrindo oportunidades para serem exploradas. Assim, os reatores de leito fluidizado apresentam vantagem quando comparado ao reator de leito fixo. Essas vantagens são apresentadas como a redução da variação na pressão em altas taxas de fluxo de alimentação, evitando a formação de gradientes de concentração (Willis et al., 2020).

Uma característica notável desses reatores é a capacidade de operar com cargas de enzimas substancialmente reduzidas, uma vez que um espaço livre é essencial para manter a suspensão das enzimas e do suporte (Osório et al., 2009; Remonatto et al., 2022). Embora cargas de enzimas menores possam demandar tempos de reação mais longos, muitas vezes essa desvantagem é compensada pela aceleração da reação decorrente de uma transferência de massa facilitada (Jadhav & Annapure, 2021). No caso de meios viscosos, como óleos, a fluidização minimiza problemas de obstrução e reduz a pressão sobre a matriz da coluna, uma preocupação recorrente em reatores de leito fixo (Remonatto et al., 2022; Jadhav & Annapure, 2021; (Hidayat et al., 2016). Em comparação com os Reatores de Tanque Agitado em Batelada (BSTRs), os Reatores de Leito Fluidizado (FBRs) impõem um estresse mecânico reduzido sobre o catalisador, tornando esse tipo de equipamento especialmente vantajoso para reações de catálise enzimática. Isso se traduz em uma melhoria da estabilidade operacional dos catalisadores (Balcão et al., 1996; Poppe et al., 2015; Remonatto et al., 2022).

Deste modo, este Capítulo tem por objetivo a construção e caracterização do reator de leito fluidizado, apresentando os ensaios de expansão do leito catalítico, a velocidade mínima de fluidização, a projeção do tamanho ideal da coluna, o estudo cinético e a

obtenção do lipídio estruturado com grau de incorporação máximo. Assim, partindo do princípio da utilização das condições reacionais otimizadas pela rede neuronal em reatores de tanque agitado para a transição do modo de produção dos lipídios estruturados do tipo MLM em reatores de leito fluidizado.

7.2 Resultados e discussão

7.2.1 Ensaio de expansão do leito em reator fluidizado utilizando lipase imobilizada em Diaion™ HP-20

O conceito mais trivial ao descrever um reator de leito fluidizado é ser um sistema que utiliza um reator de coluna ao qual o meio reacional flui por entre o leito. No entanto, o que difere de um reator de leito fixo é o efeito de mistura entre partículas catalíticas e meio reacional com comportamento de um único fluido quando a vazão de alimentação é suficientemente alta para colocar as partículas catalíticas em suspensão (Biniaz et al., 2021).

O efeito de fluidização das partículas catalíticas proporcionam uma melhor mistura e distribuição do biocatalisador. Essa melhoria contribui para a redução da queda de pressão frequentemente observada em reatores de leito fixo, diminuindo os riscos de obstrução da coluna, a formação de caminhos preferenciais e a compactação do leito catalítico (Remonatto et al., 2022). Deste modo, para determinar a altura mínima da coluna de reator de leito fluidizado realizou-se, então, o teste de expansão de leito. O ensaio consistiu na utilização de uma coluna de vidro encamisada de 210 mm de altura, 14 mm de diâmetro interno e 32 mL de volume com 5 gramas de biocatalisador. Nestes ensaios de expansão de leito foram utilizados três carregamentos enzimáticos diferentes, os quais foram mantidas fixa a quantidade de 1 grama de suporte de imobilização (Diaion™ HP-20) e o carregamento enzimático variando entre 0,3, 0,5 e 1,0 grama de pó enzimático de lipase de *Rhizopus oryzae*. O meio reacional utilizado foi a mistura entre óleo de semente de uva e ácido cáprico na razão molar de 1:7 respectivamente. A tabela 7.1 exhibe as variações na altura do leito em relação à taxa de alimentação em um fluxo ascendente.

Tabela 7. 1 - Altura do leito fluidizado em função do carregamento enzimático e da vazão.

Vazão (mL/min)	Altura do leito (cm)		
	0,3 g carregamento enzimático	0,5 g carregamento enzimático	1,0 g carregamento enzimático
0,0	11,3	11,0	10,6
0,5	12,5	12,0	11,4
1,0	13,0	12,8	12,5
2,0	15,0	14,8	14,0
2,5	16,4	15,9	15,3
3,0	19,0	18,4	17,5
3,5	21,0*	19,6	18,4
4,0	21,0*	20,3	19,1
4,5	21,0*	21,0	20,6
5,0	21,0*	21,0*	21,0

*altura máxima da coluna com fuga do biocatalisador

Conforme apresentado pela Tabela 7.1, a expansão do leito catalítico ocorre em função do aumento da vazão, o que já era esperado, uma vez que maior a vazão (Q) maior é a velocidade superficial do fluido (v), correspondendo a um aumento da porosidade do leito (ϵ). Adicionalmente, pôde-se observar que ao aumentar o carregamento enzimático, consecutivamente aumentando a densidade do catalisador, ocorre o aumento da altura do leito de forma menos intensa quando comparada ao carregamento de menor teor enzimático em mesma vazão. O aumento do leito menos intenso para o carregamento enzimático de maior densidade também era esperado, pois a densidade das partículas catalíticas é um fator dependente na porosidade do leito juntamente com sua altura. Isso torna-se mais evidente em vazões superiores a 3,0 mL/min, notando-se a expansão do leito catalítico atingir a altura máxima da coluna para o carregamento enzimático de 0,3 g de pó enzimático. Este comportamento também foi observado para os outros

carregamentos enzimáticos como o ensaio utilizando 0,5 g de enzima, atingindo altura máxima da coluna com vazões superiores a 4,5 mL/min e em vazões maiores que 5,0 mL/min quando utilizado o carregamento de 1 g de enzima.

No caso observado pelo sistema, o aumento da produtividade seria inviável com o simples aumento da vazão quando superior a 3,5 mL/min, como apresentado pelo sistema utilizando 0,3 g de carregamento enzimático, pois o aumento da altura do leito proporcionava a fuga das partículas catalíticas no topo do reator. Haja visto que o mesmo efeito acontecia de forma análoga para os carregamentos de 0,5 e 1,0 g em suas respectivas vazões limitantes de 4,5 e 5,0 mL/min.

Tabela 7. 2 - Porosidade do leito fluidizado em função de cada carregamento enzimático e da vazão de alimentação.

Vazão (mL/min)	Porosidade do leito		
	0,3 g carregamento enzimático	0,5 g carregamento enzimático	1,0 g carregamento enzimático
0,0	0,754	0,764	0,805
0,5	0,778	0,783	0,819
1,0	0,786	0,797	0,834
2,0	0,815	0,824	0,852
2,5	0,831	0,837	0,865
3,0	0,854	0,859	0,882
3,5	0,868	0,867	0,888
4,0	0,868	0,872	0,892
4,5	0,868	0,876	0,900
5,0	0,868	0,876	0,901

A partir dos valores obtidos pela Tabela 7.1 foi possível calcular a porosidade do leito (ϵ) em função das vazões utilizadas. Deste modo, foi possível calcular a porosidade inicial do leito catalítico (ϵ_0), ou seja, aquela na ausência de fluidização (equação 10, capítulo

3.4.18), foi possível calcular a porosidade do leito catalítico nos três diferentes carregamentos enzimáticos (Tabela 7.2).

Pelos resultados apresentados pela Tabela 7.2, foi possível observar que a porosidade do leito catalítico sofre efeitos em função da vazão de alimentação do reator e do carregamento enzimático, quanto maior a vazão, maior a porosidade, assim como maior o carregamento enzimático. Portanto, para ser determinada o valor da altura mínima ($h_{\min}$) da coluna para uma única passagem do meio reacional no reator de leito fluidizado, são necessários a determinação de alguns parâmetros, como: coeficiente de expansão (n); velocidade terminal da partícula corrigida pelo efeito de parede da coluna (v_{tc}); vazão mínima ($Q_{\min}$); e o tempo espacial desejado (ζ).

Os resultados experimentais para a determinação dos parâmetros anteriormente mencionados são apresentados na Tabela 7.3. para cada um dos carregamentos enzimáticos.

Tabela 7. 3 - Valores do coeficiente de expansão (n), velocidade terminal da partícula (v_{tc}), da vazão mínima ($Q_{\min}$) e altura mínima ($h_{\min}$) para cada carregamento enzimático.

	0,3 g carregamento enzimático	0,5 g carregamen to enzimático	1,0 g carregamento enzimático
coeficiente de expansão (n)	0,055	0,054	0,044
velocidade terminal da partícula (v_{tc} ; cm/min)	0,816	0,823	0,853
Vazão mínima ($Q_{\min}$; mL/min)	1,237	1,249	1,301
Altura mínima da coluna ($h_{\min}$; m)	15,342	15,305	15,120

Conhecendo os valores de coeficiente de expansão (n), a velocidade terminal da partícula corrigida pelo efeito de parede da coluna (v_{tc}), a vazão mínima ($Q_{\min}$), a

porosidade mínima (ε_{min}) e utilizando do tempo espacial de 24 horas, tempo obtido para o grau de incorporação de ácido cáprico de aproximadamente 60% em reator de leito fixo e no reator de tanque agitado, foi utilizada a equação (15) a partir das equações (11) e (12) e (13) para se determinar a altura mínima da coluna do reator de leito fluidizado.

$$h_{min} = \frac{4}{\pi} \frac{\tau \cdot Q_{min}}{D^2 \cdot \varepsilon_{min}} \quad (15)$$

A Tabela 7.3 apresenta a altura mínima da coluna sendo de 15 metros. A construção e toda operação para colocar em funcionamento deste reator tornam-se inviável para essas condições reacionais. O problema enfrentado ao se utilizar o sistema apresentado anteriormente estão atrelados a dois fatores. O primeiro é a grande quantidade de enzima imobilizada a ser utilizada neste reator. O segundo fator é a relação entre a vazão necessária para se manter a fluidização do leito catalítico, de modo que mantenha tempo de contato suficiente entre o meio reacional e a superfície do catalisador. Ao tentar satisfazer a relação de tempo de contato entre o meio reacional com o catalisador, pode-se pensar na estratégia de vazões menores, o que refletiria em um tempo espacial maior. No entanto, não é possível garantir que haja energia suficiente para o favorecimento da fluidização dos catalisadores, apresentando assim um comportamento de reator de leito fixo, o que foge da proposta em realizar a incorporação do ácido cáprico no óleo de semente de uva em reator de leito fluidizado.

Para superar este obstáculo, foi proposto a recirculação do meio reacional do reator. Deste modo, o meio reacional que retorna ao tanque de alimentação, proporcionado uma nova passagem pelo leito catalítico fluidizado, assim aumentando o tempo de contato entre os reagentes e o biocatalisador. Desta forma, o sistema para a síntese de lipídios estruturados do tipo MLM em reator de leito fluidizado foi idealizado de acordo com a Figura 7.1.



Figura 7.1 - Sistema de reator de leito fluidizado operando com reciclo na síntese de lipídios estruturados do tipo MLM em câmara de temperatura controlada

7.2.2 Ensaio cinético da síntese dos lipídios estruturados em reator de leito fluidizado

Para a síntese dos lipídios estruturados do tipo, o reator utilizado consistia em uma coluna de vidro encamisada de 210 mm de altura, 14 mm de diâmetro interno e 32 mL de volume total. Neste primeiro ensaio foi utilizado 5 g de derivado imobilizado. O carregamento utilizado de lipase de *Rhizopus oryzae* foi de 0,5g para cada grama de suporte de imobilização (Diaion™ HP-20). A atividade hidrolítica foi de 1765 ± 52 U/g com 5,2% de umidade. O meio reacional e a temperatura seguem conforme anteriormente ajustado pela rede neuronal (Capítulo 5).

A vazão da bomba de alimentação do reator foi ajustada para valores de 1 a 5 mL/min, sendo monitorado o grau de incorporação. A cada 24 horas, alíquotas de 3 mL de amostra eram retiradas do sistema para posterior análise de incorporação do ácido cáprico, sendo recolocado o volume retirado com a mistura do tempo zero do processo. A retirada de alíquotas fora mantida até que a porcentagem de incorporação do ácido cáprico mantivesse constante. Os valores de incorporação do ácido cáprico em função do tempo e da vazão de alimentação estão apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 - Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (% GI) em função do tempo de reação e respectivas vazões para o carregamento enzimático de 0,5 gramas.

Tempo (horas)	Vazão (mL/min)				
	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0
24	27,1 ± 2,3	29,8 ± 3,2	36,1 ± 3,3	44,6 ± 3,9	43,8 ± 2,0
48	40,9 ± 3,1	43,4 ± 3,1	52,3 ± 3,0	56,7 ± 1,1	59,0 ± 3,2
72	48,2 ± 2,9	49,3 ± 2,0	54,4 ± 2,9	57,6 ± 2,5	58,2 ± 3,5
96	54,7 ± 2,4	55,3 ± 1,9	58,7 ± 2,6	58,0 ± 2,3	59,8 ± 2,4

Durante as 96 horas contínuas de reação, o grau de incorporação do ácido cáprico variou de $27,12 \pm 2,34$ a $59,87 \pm 2,44$ %GI, sendo respectivamente as primeiras 24 horas em vazão de 1 mL/min e as 96 horas em vazão de 5 mL/min. Analisando individualmente cada coluna (Vazão) da Tabela 7.4, é possível afirmar que o grau de incorporação (% GI) é dependente do tempo de exposição efetiva do meio reacional ao leito catalítico, ou seja, quanto maior o tempo de contato efetivo com a superfície do catalisador, maior será a incorporação do ácido cáprico. Esse efeito fica mais evidente quando se fixa um tempo reacional e variam-se as vazões de alimentação. À medida que a taxa de alimentação aumenta, a taxa de incorporação também se eleva; essa relação está associada aos efeitos de transferência de massa que ocorrem entre o meio reacional e o microambiente na superfície do catalisador. (Remonato et al., 2022; Poppe et al., 2015). Logo, com maiores vazões, há maior movimentação do meio entre o leito catalítico, esse aumento na movimentação influencia na diminuição da camada de fluido estagnado na superfície do

biocatalisador, com a diminuição dessa camada limite há o favorecimento da transferência de massa, resultando no aumento do grau de incorporação (Remonatto et al., 2022; Cabral et al. 2003). A Figura 7.2 ilustra o perfil cinético corresponde ao grau de incorporação do ácido cáprico apresentado pela Tabela 7.4.

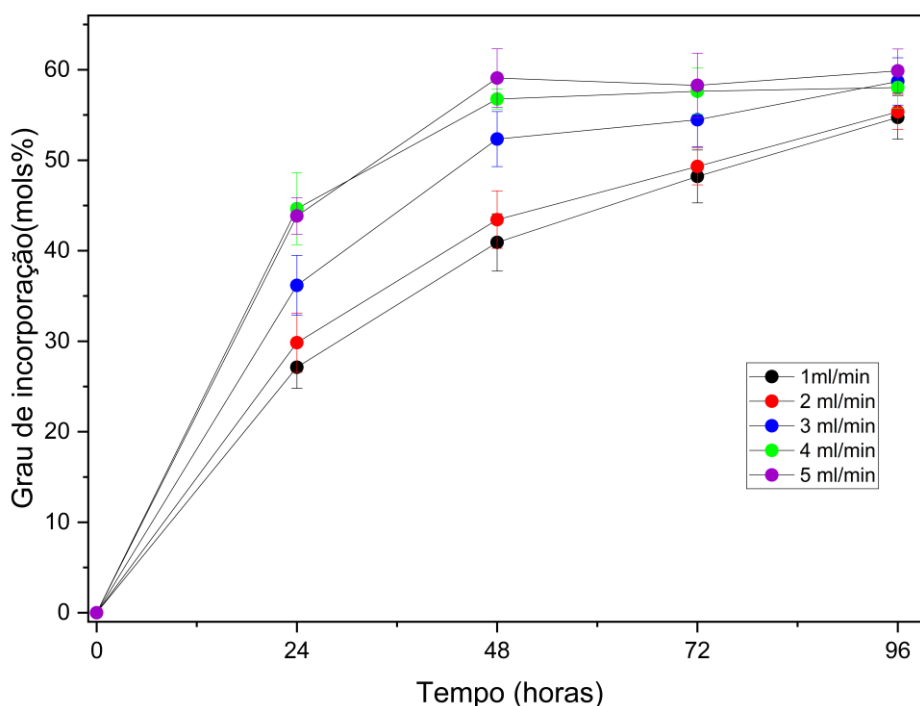


Figura 7.2 - Perfil cinético da síntese de MLM em função da vazão de alimentação e do tempo em reator de leito fluidizado.

Com a Figura 7.2, reforça-se a evidente de que o tempo necessário para atingir a saturação do triacilglicerol com a incorporação do ácido cáprico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 é menor para vazões maiores, sendo possível atingir um platô de incorporação em 48 horas de reação para o sistema utilizando a vazão de 5 mL/min. O máximo teórico de incorporação do ácido cáprico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 da estrutura do triacilglicerol são de 66%. Deste modo, ao calcular o rendimento de incorporação para o lipídio estruturado formado a partir da síntese utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico a partir da equação (14), tem-se um rendimento de aproximadamente 90% de formação de um novo triacilglicerol para o sistema em leito fluidizado.

$$Rendimento (\%) = \frac{Quantidade\ real\ do\ produto}{Quantidade\ teórica\ do\ produto} \cdot 100\% \quad (16)$$

Os resultados deste estudo demonstraram a eficácia do sistema proposto na síntese dos lipídios estruturados, destacando-se na formação desse novo triglicerídeo. Comparativamente ao trabalho de Souza-Gonçalves e colaboradores (2023), em que foi utilizado reator de leito fluidizado para a síntese contínua de lipídios estruturados MLM ou MLL, observou-se que a taxa de conversão para a formação dos novos triglicerídeos atingiu cerca de 50-60%. Este processo utilizou a técnica de acidólise com ácido cáprico em azeite de bagaço de azeitona e operou por um período de 70 horas. É importante salientar que foram empregadas lipases imobilizadas comercialmente, nomeadamente Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, devido à sua significativa capacidade catalítica na síntese por via acidolítica.

O perfil cinético de cada vazão apresentado anteriormente (Figura 7.2) foi ajustado linearmente para determinar o tempo necessário de reação para atingir os 60% de incorporação do ácido cáprico, sendo apresentado pela Figura 7.3.

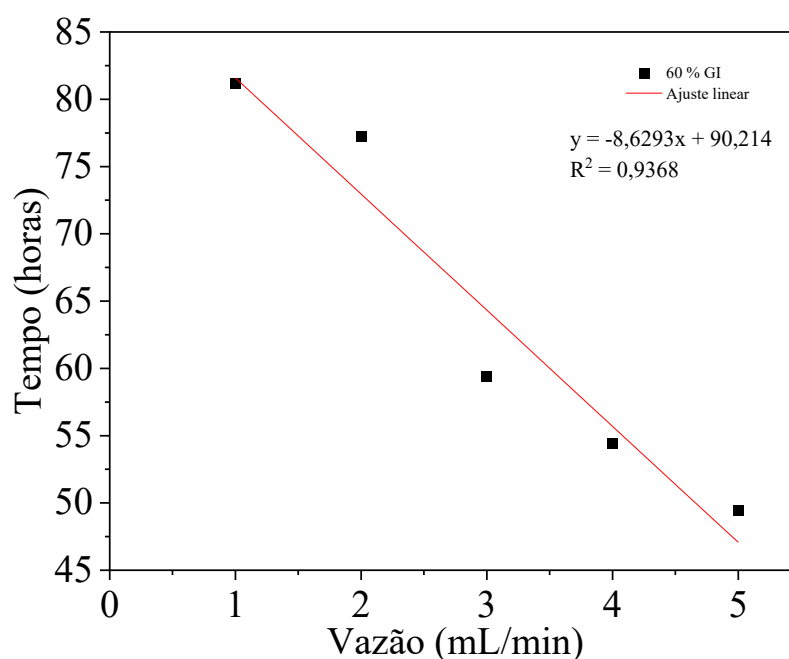


Figura 7. 3 - Ajuste linear do tempo necessário para cada vazão atingir 60% de incorporação de ácido cáprico em 100g de meio reacional.

Conforme ilustrado pela Figura 7.3, quanto menor a vazão, maior será o tempo reacional para atingir os 60% de incorporação, destacando o tempo mínimo de 48 horas

de tempo reacional para a vazão de 5 mL/min. Ao extrapolar a equação da reta ajustada para esse modelo, foi possível calcular com o tempo reacional de 24 horas a vazão necessária para que as 100 gramas de meio reacional atinjam a incorporação 60%. O valor teórico necessário seria de aproximadamente 7,5 mL/min. Em vista deste valor teórico, seria possível atingir esse nível de saturação aumentando a produtividade, uma vez que o tempo de trabalho seria reduzido pela metade. No entanto, por mais que o aumento da vazão influencie positivamente na incorporação do ácido, para este modelo de reator e catalisador, torna-se inviável o trabalho em vazões maiores que 5 mL/min, pois a expansão do leito atinge alturas que ultrapassam a altura do reator, acarretando na fuga de partículas catalíticas pelo topo. Por outro lado, outras estratégias para que haja ganho em produtividade e % de incorporação do ácido cáprico são presentes neste trabalho e são apresentadas no tópico 7.2.4.

7.2.3 Efeito do carregamento enzimático na síntese de MLM em reator de leito fluidizado

Com o objetivo de melhorar a eficiência da síntese de lipídios estruturados do tipo MLM, seja aumentando a quantidade de ácido cáprico incorporada, reduzindo o tempo de reação ou minimizando a quantidade de enzima necessária como catalisador, o plano estratégico deste tópico consistiu, inicialmente, em comparar a cinética entre duas condições de carregamento enzimático. Uma delas envolveu 0,5 gramas de enzima por grama de suporte de imobilização, e a outra utilizou 0,3 gramas de enzima por grama de suporte de imobilização. Os experimentos foram conduzidos seguindo o mesmo procedimento mencionado anteriormente (tópico 7.2.2) em vazões de 1 a 3 mL/min retirando alíquotas de 3 mL para análise do grau de incorporação a cada 24 horas. O volume da alíquota removida foi repostado com o meio reacional do tempo zero de reação. Os valores de incorporação do ácido cáprico em função do tempo, carregamento enzimático e da vazão de alimentação estão apresentados na Tabela 7.5.

Tabela 7.5 - Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (%GI) em função do tempo de reação e respectivas vazões para o carregamento enzimático de 0,3 gramas.

Tempo (horas)	Vazão (mL/min)		
	1	2	3
0	0	0	0
24	23,0 ± 3,2	32,1 ± 1,3	34,6 ± 3,1
48	35,2 ± 2,0	41,8 ± 2,5	46,6 ± 2,8
72	47,2 ± 1,6	50,2 ± 3,3	56,1 ± 1,1
96	55,5 ± 3,0	56,4 ± 2,4	58,1 ± 2,1

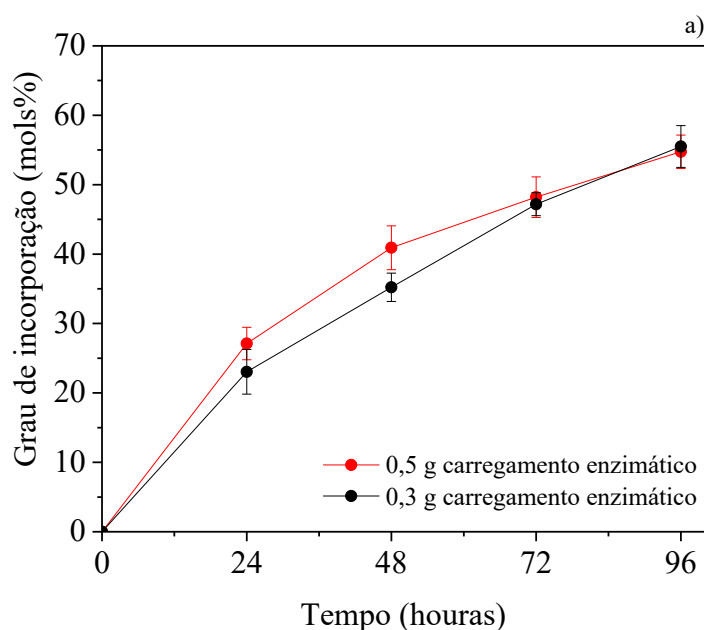
Os ensaios correspondentes da Tabela 7.5 apresentaram uma variação na incorporação do ácido cáprico de $23,04 \pm 3,22$ a $58,19 \pm 2,15$, sendo respectivamente as primeiras 24 horas em vazão de 1 mL/min e as 96 horas em vazão de 3 mL/min. Para estes ensaios não foram observadas a fuga de partículas de catalisadores pelo topo do reator. Novamente, a Tabela 7.5 apresenta um aumento do grau de incorporação ao longo do tempo para uma vazão fixa e um aumento do grau de incorporação com o aumento da vazão. Esse comportamento de incorporação era esperado, uma vez que para o carregamento de 0,5 gramas de enzima foi observado um comportamento análogo ao da Tabela 7.4. Em vista disso, a Figura 7.4 foi elaborada para melhor visualização do comportamento cinético da síntese do lipídio estruturado do tipo MLM, comparando-se os carregamentos empregados.

A Figura 7.4 ilustra a comparação do perfil cinético do grau de incorporação do ácido cáprico entre os carregamentos enzimático de 0,3 e 0,5 gramas de enzima ao longo do tempo em função da vazão de alimentação. Destaca-se para esse comparativo de carregamentos a semelhança do perfil entre os dois carregamentos, independentes da vazão aplica nos ensaios. Isso demonstrou que o menor carregamento foi capaz de atingir valores de incorporação entre 55 e 58% em média de ácido cáprico no total das 96 horas de reação.

Ao se objetivar a implementação desse tipo de sistema reacional em escala industrial, a redução de carga enzimática acaba por se tornar uma estratégia valorosa para reduções de custos globais do processo. O custo do biocatalisador em um processo é

responsável por aproximadamente 75% dos custos totais, sendo o restante dividido entre 10% de equipamentos e 15% de trabalho laboral (Tufvesson et al., 2011; Hasan et al., 2006; Cvetnić et al., 2023). Aparentemente a redução de 0,2 gramas de enzima possa parecer insignificante para um ensaio inicial de bancada, no entanto, para um mercado que movimentou USD 425.0 milhões em 2018 e que está projetado a atingir USD 590.2 milhões em 2023, a otimização desse recurso pode impactar em manter a planta de um projeto no papel ou de colocá-la em operação.

A Figura 7.4 ainda enfatiza o aumento da taxa em que o grau de incorporação atinge durante as primeiras 24 horas. Nota-se que, a diferença entre a porcentagem em mols do ácido cáprico nas primeiras 24 horas para a vazão de 3 mL/min é de aproximadamente 11 mols% a mais de incorporação quando comparada ao ensaio com vazão de alimentação de 1 mL/min. Evidenciando mais uma vez a dependência entre a capacidade de incorporação do ácido cáprico com a vazão de alimentação.



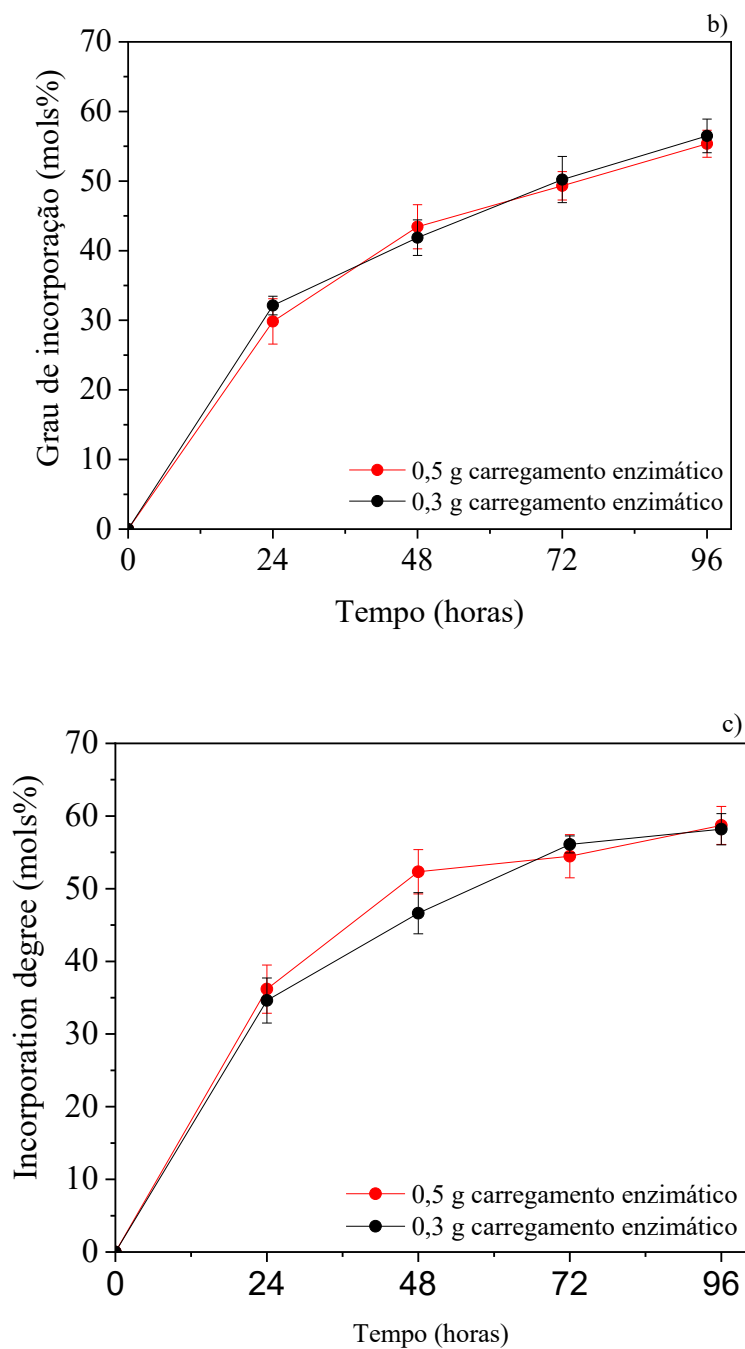


Figura 7.4 - Comparação entre o perfil cinético da síntese de MLM utilizando carregamento enzimático de 0,3 e 0,5 gramas de enzima em reator de leito fluidizado. Cinética de incorporação do ácido cáprico. a) vazão de 1mL/min, b) vazão de 2mL/min e c) vazão de 3mL/min.

No entanto, o máximo teórico de 66% de grau de incorporação do ácido cáprico ainda não foi atingido. Deste modo, o próximo passo desenvolvido neste trabalho, baseado nas análises anteriores de vazão de alimentação, foi utilizar da melhor condição

de vazão (3 mL/min), alterando somente o carregamento enzimático na composição do biocatalisador. Assim, o próximo ensaio foi proposto com a utilização de 1,0 gramas de carregamento enzimático com a finalidade de investigar se o grau de incorporação de ácido cáprico e sua taxa de incorporação sofrem efeitos por influência do carregamento.

Portanto, nesta etapa, o experimento foi realizado seguindo os mesmos conceitos anteriormente mencionados, fixando-se a vazão de alimentação em 3mL/min e carregamento enzimático de 1,0 grama de enzima. Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 7. 6.

Tabela 7. 6 - Valores de incorporação do ácido cáprico em porcentagem (% GI) em função do tempo de reação na vazão de alimentação de 3 mL/min para o carregamento enzimático de 1,0 gramas.

Tempo (horas)	Grau de incorporação (%GI)
0	0
24	48,1 ± 2,7
48	57,3 ± 2,5
72	65,3 ± 2,4
96	66,1 ± 1,5

Os ensaios correspondentes da Tabela 7.6 apresentaram variação na incorporação do ácido cáprico de $48,13 \pm 2,73$ a $66,14 \pm 1,57$, sendo respectivamente as primeiras 24 e as 96 horas em vazão de 3 mL/min. Com este ensaio foi possível atingir o máximo teórico de incorporação de ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol. Não obstante, ao descrever que o efeito do carregamento enzimático é fator que influencia no grau de incorporação do ácido cáprico, seria intuitivo pensar que isso ocorreu pois, quanto maior a quantidade de enzima presente, maior será sua atividade, consequentemente, maior e mais rápida será a incorporação do ácido cáprico.

Quando comparado aos resultados recentemente publicado pelo nosso grupo, Remonatto e colaboradores (2023) apresentam a síntese de lipídios estruturados do tipo MLM por acidólise enzimática do óleo de algodão e ácido cáprico (C10) catalisado por Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei*) em reator de leito fluidizado com

temperatura de 45 °C, razão molar óleo:ácido de 1:4 e com reciclo, obtendo 40% de incorporação do ácido cáprico em aproximadamente 17 horas. De fato, a lipase comercialmente imobilizada demonstrou capacidade de incorporar elevado teor de ácido cáprico em poucas horas. Continuamente na busca de contribuir com o avanço da síntese de lipídios estruturados do tipo MLM, os valores obtidos pela Tabela 7.6 são convergentes para a melhora no aumento da conversão em novos TAG, correspondendo a aproximadamente 99% de conversão. Esse aumento do grau de incorporação está possivelmente correlacionado à diferença entre os métodos de imobilização, a fonte provedora da lipase e as condições reacionais envolvidas no processo, uma vez que o excesso de ácido cáprico tem demonstrado o deslocamento da síntese para a formação dos produtos de interesse (Hasan et al., 2009; Li et al., 2012; Cabral et al., 2003; Remonatto et al., 2022).

A Figura 7.5 ilustra o perfil de incorporação entre os diferentes carregamentos enzimáticos na vazão de 3 mL/min.

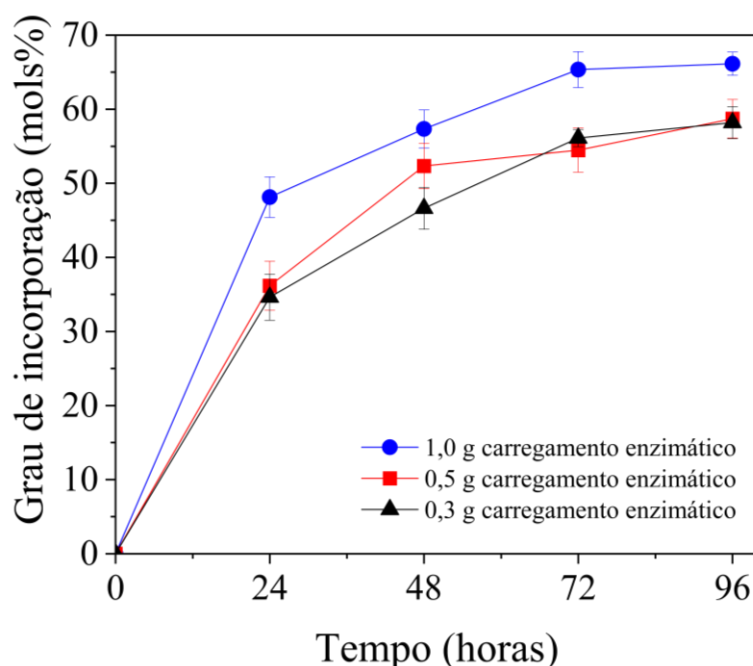


Figura 7. 5 - Comparação entre o perfil cinético da síntese de MLM utilizando carregamento enzimático de 0,3, 0,5 e 1,0 gramas de enzima em reator de leito fluidizado com vazão de alimentação de 3 mL/min.

A Figura 7.5 apresenta o efeito da influência do carregamento enzimático na incorporação do ácido cáprico. Comparando a taxa de incorporação do ácido cáprico nas

primeiras 24 horas, observa-se que o carregamento de 1,0 grama de enzima atingiu valores maiores que os demais carregamentos, fornecendo valor próximo aos 50 % de incorporação. Dentro da ótica em que, utilizada a mesma massa de biocatalisador, o mesmo tempo reacional e o mesmo volume de substrato, pode-se afirmar de maneira direta que ocorreu um aumento na produtividade com o aumento do carregamento enzimático, o que possivelmente não está diretamente relacionado ao aumento da produtividade por massa de enzima. Para fazer tal afirmação são necessários os cálculos de produtividade por grama de enzima.

Embora o aumento do carregamento enzimático tenha refletido no aumento da taxa de incorporação nas primeiras 24 horas e alcançado o máximo teórico de 66% de incorporação em 72 horas, não é possível afirmar que isso ocorreu devido ao aumento da atividade catalítica, uma vez que não há diferença significativa entre os derivados imobilizados utilizando 0,3 a 1,0 grama de enzima por grama de suporte de imobilização (Figura 4.1). Por outro lado, ao comparar os efeitos do carregamento enzimático com a porosidade do leito catalítico na vazão de alimentação de 3 mL/min, nota-se que, o ensaio realizado com o carregamento de 1,0 grama de enzima apresentou um aumento de aproximadamente 3,3% da porosidade do leito catalítico ao comparar com a porosidade do ensaio realizado com 0,3 gramas. O aumento da porosidade contribuiu para incorporar os 6% restantes no lipídio estruturado do tipo MLM. Isso ocorre porque o aumento da porosidade ajuda a reduzir a resistência à transferência de massa da mistura reacional na superfície do catalisador. De acordo com a literatura, essa maior porosidade torna mais fácil para o meio reacional atingir as regiões do catalisador de maneira mais eficiente. (Hasan et al., 2009; Li et al., 2012; Cabral et al., 2003)

Outro ponto em questão é se esse aumento de carregamento corresponde em uma melhor produtividade. O comparativo entre a produtividade de cada ensaio foi realizado e está descrito no tópico 7.2.4.

7.2.4 Análise da produtividade dos lipídios estruturado do tipo MLM em reator de leito fluidizado.

Neste tópico foram desenvolvidas as análises de produtividade da síntese de lipídios estruturados do tipo MLM em reatores de leito fluidizado. Para isso, inicialmente

foi realizado a correlação entre a vazão de alimentação e a produtividade em função do grau de incorporação por quantidade de material processado, por grama de catalisador, por hora, conforme apresentado pela equação (17).

$$p = GI\% \cdot g_{reagentes} / g_{biocat} \cdot h \quad (17)$$

Em que: GI% é a porcentagem de ácido cárpico adicionada à estrutura do triacilglicerol; $g_{reagentes}$ corresponde a 100 gramas de meio reacional; g_{biocat} é o valor da massa de biocatalisador utilizada (5 gramas) e h é o tempo em horas. O ensaio para esse ajuste linear da vazão com a produtividade foi realizado com o carregamento enzimático de 0,5 gramas de enzima em tempo médio de 48 horas de reação (Figura 7.6).

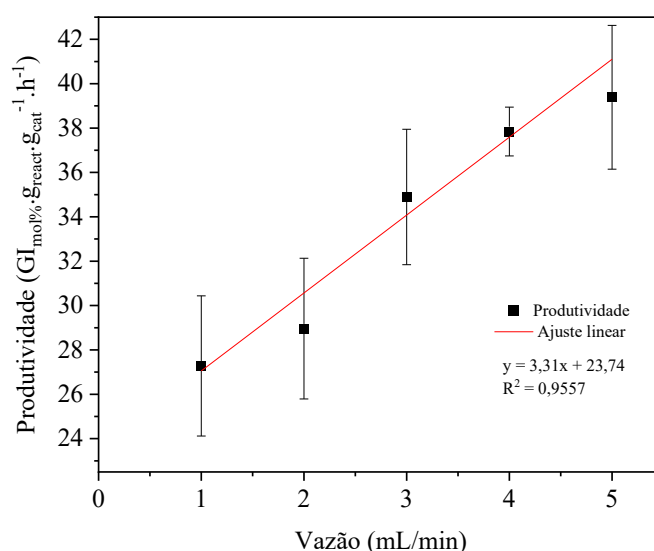


Figura 7. 6 – Relação entre a produtividade e a vazão de alimentação do reator de leito fluidizado fixado no tempo de 48 horas de tempo reacional.

Mantendo a quantidade de meio reacional em 100 gramas e um carregamento enzimático constante de 0,5 gramas de enzima, foi possível observar um aumento na produtividade à medida que aumentamos a vazão. Comparando os valores de produtividade entre as vazões de 1 mL/min e 5 mL/min, observamos um aumento de cerca de 45% na formação do novo lipídio.

No entanto, é importante notar que esse aumento na produtividade está relacionado ao tempo de reação fixo de 48 horas. Se prolongarmos o tempo de reação

para 96 horas em todos os ensaios, os valores de produtividade se tornarão iguais. Isso ocorre porque todos os ensaios alcançaram aproximadamente o mesmo grau de incorporação após 96 horas, desde que a massa de material processado e a massa de biocatalisador sejam mantidas constantes conforme apresentado pela Figura 7.7. Deste modo, o estudo cinético auxilia na compreensão do tempo necessário para se atingir o grau de incorporação desejado, o qual fornece informações úteis para a melhor estratégia de eficiência do processo.

Assim, quando colocados em comparação o perfil de produtividade ao longo do tempo, referente a cada vazão, é possível analisar o comportamento da produtividade ao longo do tempo. Adicionalmente, o gráfico referente ao perfil de incorporação do ácido cáprico ao longo do tempo está representado em conjunto para melhor compreensão da queda da produtividade após as 24 horas de reação.

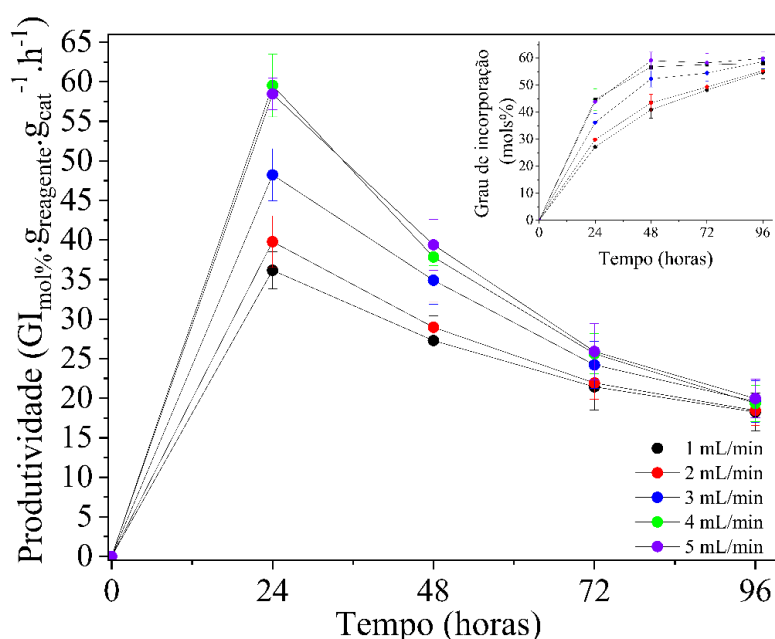


Figura 7.7 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo e perfil cinético do grau de incorporação ao longo do tempo para o carregamento enzimático de 0,5 gramas.

Com o auxílio da Figura 7.7 foi possível visualizar a diminuição da produtividade após 24 horas de reação. A queda de produtividade está relacionada à diferença entre a porcentagem de incorporação do ácido cáprico entre as primeiras 24 horas e as 48 horas de reação. Essa diferença fica clara quando nas horas iniciais do processo não há

incorporação do ácido cáprico, sendo que, a alíquota retirada no tempo de 24 horas apresenta um aumento de aproximadamente 44% de incorporação do ácido cáprico no ensaio de vazão de 5 mL/min, por exemplo. Tendo essa vazão como modelo a elucidar a queda de produtividade após as 24 horas, nota-se que após esse aumento de 44%, a próxima alíquota retirada no tempo de 48 horas apresenta um ganho da incorporação comparada ao ponto analisado anteriormente de 15%. Ao analisar o grau de incorporação em 48 horas de reação, o valor alcançado foi de aproximadamente 60 %GI, no entanto, o tempo necessário para isso foi maior que as 24 horas necessárias para se obter 44 %GI. Ou seja, em questões de produtividade, seria mais atrativo iniciar um novo processo ao invés de adicionar mais 24 horas de reação. Por outro lado, quando a aplicação do produto final é destinada a uma utilização farmacológica, em que se visa o maior nível de pureza do produto, traduzindo para um maior grau de incorporação, por exemplo, torna-se interessante sacrificar a ideia de se obter a maior produtividade pela obtenção de um produto mais puro e que possa ser comercializado por um valor de mercado superior.

Com o foco em obter o maior grau de incorporação do ácido cáprico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, o ensaio utilizando 1,0 grama de carregamento enzimático foi capaz de atingir o máximo teórico com a vazão de 3 mL/min, conforme anteriormente discutido. Assim, a produtividade ao longo do tempo reacional com o carregamento enzimático está ilustrada na Figura 7.8.

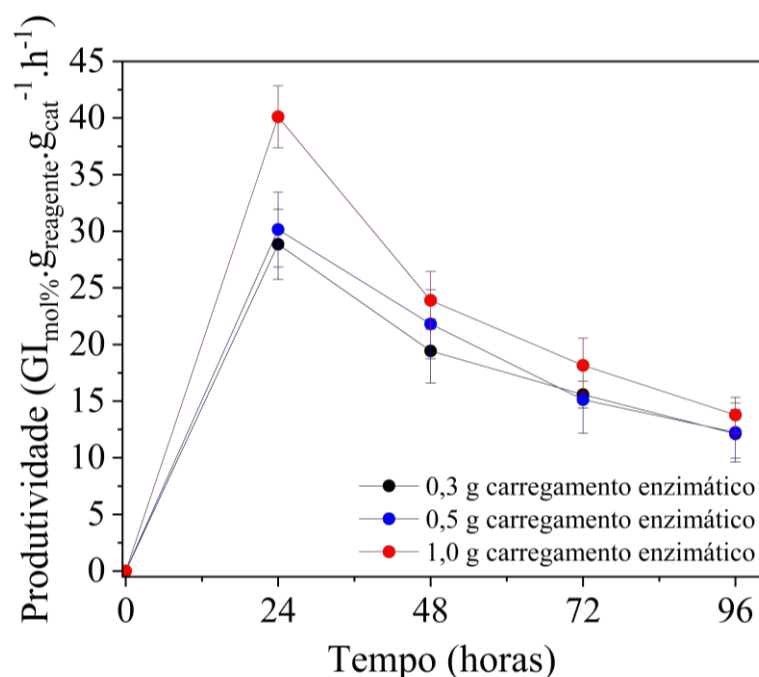


Figura 7.8 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo na vazão de 3 mL/min em diferentes carregamentos enzimáticos.

Conforme apresentado pela Figura 7.8, o carregamento enzimático de 1,0 grama de enzima apresenta a maior produtividade ao longo de todo os tempos reacionais. O ápice da produtividade encontra-se nas primeiras 24 horas, alcançando o valor de 40 $GI_{mol\%} \cdot g_{reagente} \cdot g_{cat}^{-1} \cdot h^{-1}$, correspondendo a aproximadamente 50 % de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol.

Também é observado a diminuição da produtividade ao longo do tempo para todos os ensaios. Em termos de aumento do carregamento enzimático em relação à produtividade, foi realizado os cálculos de produtividade por grama de enzima utilizada nos carregamentos. Com esses valores obtidos, a Figura 7.9 ilustra o perfil de produtividade em função do tempo em consideração a massa de enzima utilizada.

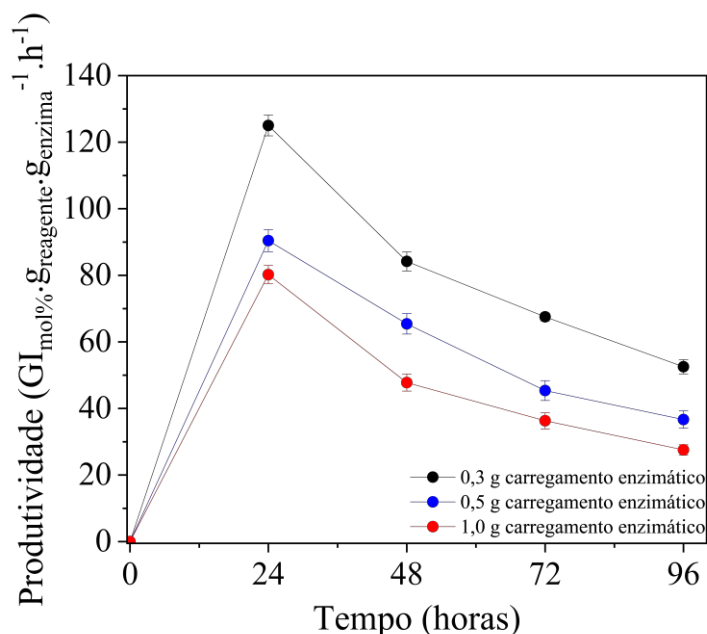


Figura 7.9 - Comparação entre o perfil de produtividade de 100 g de material processado em função do tempo na vazão de 3 mL/min em relação a massa enzimática aplicada.

Como era esperado, o aumento da quantidade de enzima não refletiu no aumento da produtividade. Conforme ilustrado pela Figura 7.9, o maior valor da produtividade foi atingido nas primeiras 24 horas para o carregamento enzimático de 0,3 grama de enzima, alcançando o valor de $125 \text{ GI}_{\text{mol}\%} \cdot \text{g}_{\text{reagente}} \cdot \text{g}_{\text{enzima}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Por mais que o carregamento de 0,3 grama de enzima tenha apresentado a maior produtividade por grama de enzima, ainda assim, nas primeiras 24 horas de reação o máximo de incorporação apresentado foi de aproximadamente 25 %GI.

Esse resultado aponta um direcionamento para a utilização de uma suporte de imobilização de maior massa específica, visto que nos estudos de expansão de leito e cálculo de porosidade refletiram em uma melhora nos efeitos de transferência de massa para os biocatalisadores com maior carga enzimática. O aumento do grau de incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol foi relacionado ao aumento da porosidade do leito catalítico, pois não apresentou diferença significativa de atividade hidrolítica entre os diferentes carregamentos. Com tudo, as análises de produtividade favoreceram a compreensão de que ao se priorizar a estratégia em obter um produto de maior grau de incorporação, será necessário abdicar de um ganho da produtividade para que o tempo reacional ofertado seja capaz de incorporar os 15 %GI restantes.

7.3 Conclusões

Inicialmente, a modificação de um refrigerador para uma câmara de aquecimento controlado demonstrou-se eficaz em manter todo o sistema reacional a 41 °C durante todos os ensaios. O estudo da expansão do leito catalítico mostrou-se de extrema importância para compreender como a movimentação das moléculas catalíticas, o aumento do carregamento enzimático e as vazões de alimentação contribuem para o aumento do grau de incorporação do ácido cáprico à estrutura do triacilglicerol. Demonstrando assim, maior porosidade do leito catalítico quando utilizada maiores vazões de alimentação e/ou quando utilizado maiores carregamentos enzimáticos. Embora o cálculo de altura mínima tenha apresentado valor mínimo para uma única passagem do meio reacional pelo leito catalítico ter sido de 15 metros, a estratégia de utilizar o reator em reciclo demonstrou ser capaz de produzir lipídios estruturados do tipo MLM de maneira eficiente. Com esse sistema reacional foi possível atingir o máximo grau de incorporação teórico de 66% em 72 horas.

REFERÊNCIAS

- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 392–416, 1996, doi: 10.1016/0141-0229(95)00125-5.
- BINIAZ , P.; SHIRAZI, N. A.; ROOSTAIE, T.; RAHIMPOUR, M. R. 12 - Wastewater treatment: employing biomass. **Advances in Bioenergy and Microfluidic Applications**, p. 303-327, ISBN 9780128216019, 2021, doi:10.1016/B978-0-12-821601-9.00012-1.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. (Coord). **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.
- DEMIR, H.; MOBEDI, M.; ÜLKÜ, S. Effects of porosity on heat and mass transfer in a granular adsorbent bed. **International Communications in Heat and Mass Transfer**, v. 36, c. 4, p. 372-377, ISSN 0735-1933, 2009, doi:10.1016/j.icheatmasstransfer.2009.01.008.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p 235-251, 2006.
- HIDAYAT, C.; FITRIA, K.; SUPRIYANTO; HASTUTI, P. Enzymatic Synthesis of Bio-Surfactant Fructose Oleic Ester Using Immobilized Lipase on Modified Hydrophobic Matrix in Fluidized Bed Reactor. **Agric. Agric. Sci. Procedia**, v. 9, p. 353–362, 2016, doi:10.1016/j.aaspro.2016.02.150.
- JADHAV, H. B. AND UDAY, A. Designer lipids-synthesis and application—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 884-902, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.020.
- LI ,Y.; HU, X.; SONG, Y.; LU,Z.; NING, T.; CAI, H.; KE, Y. Identification of novel alternative splicing variants of interferon regulatory factor 3. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, c. 3, p. 166-175, 2011, doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.01.006.
- POPPE, J.K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C.; AYUB, M.A.Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects, **Biotechnol. Adv.**, v. 33, p. 511–525, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.011.
- REMONATTO, D.; MIOTTI JR, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A.V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022, doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.
- SOUZA-GONÇALVES, J.; FIALHO, A.; SOARES, C.M.F.; OSÓRIO, N.M.; FERREIRA-DIAS, S. Continuous Production of Dietetic Structured Lipids Using Crude Acidic Olive Pomace Oils. **Molecules**, v. 28, c. 6, p. 2637, 2023, doi: 10.3390/molecules28062637.

TUFVESSON, P.; LIMA-RAMOS, J.; NORDBLAD, M.; WOODLEY J. M. Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. **Organic Process Research & Development**, v. 15, c.1, p. 266-274, 2011, doi: 10.1021/op1002165.

WILLIS, W.M.; MARANGONI ALEJANDRO, G. Enzymatic Interesterification. **In Food Lipids**; Akoh, C.C., Min, D.B., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, p. 821–854, 2020.

8. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E DO LIPÍDIO ESTRUTURADO DO TIPO MLM

8.1 Introdução

Atualmente, as fontes vegetais são responsáveis por aproximadamente 80% da origem de óleo e gorduras comestíveis, as quais correspondem a 120 milhões de toneladas em um cenário global (Vladimír et al., 2021; O.O. Fasina & Z. Colle, 2009). O Brasil, com sua produção rica em soja está projetado a produzir 10,7 milhões de toneladas de óleo para o ano de 2023, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE).

Dentro da vastidão de inúmeras fontes de óleo e gorduras (girassol, canola, soja, palma, oliva, amendoim, abacate), as características físicas e químicas são as principais diferenças entre elas. A presença de compostos bioativos como compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas lipossolúveis, favorecem seu uso na indústria de cosméticos, farmacêutica e de alimentos (Rodríguez et al., 2016; K. Sangeetha et al., 2023; Kapcsándi et al., 2021).

Na busca por uma fonte alternativa de óleo vegetal que não dispute a frente da produção de soja brasileira, a qual também se destaque pela presença de compostos bioativos, rico em ácidos graxos polinsaturados e preferencialmente que seja um coproduto industrial, o óleo de semente de uva torna-se atraente. Matéria prima com valor dietético e também rico em ácidos graxos essenciais e tocoferóis apresenta-se com potencial qualidade em aplicações como base para modificações em lipídios estruturados do tipo MLM (Torres-Leon et al., 2018; D'Eusano et al., 2023; Basan et al., 2019).

Diferente dos óleos convencionais como o óleo de milho e soja, o óleo de semente de uva apresenta alto teor de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico (58-78%) na posição *sn*-2 dos triacilgliceróis (Basan et al., 2016). Outro destaque é por apresentar maior teor deste ácido graxo essencial quando comparado ao óleo de milho (34-65,6%) e óleo de soja (48–59%) (FAO, 1999). No entanto, devido à grande variedade de uvas, o perfil em ácido graxo e outras características como índice de peróxido e acidez podem variar conforme o tipo de uva, assim como evidenciado por Kapcsándi e colaboradores (2021), em que foi caracterizado o perfil em ácido graxo de oito tipo de uvas (*Italian Riesling*”, “*Cabernet Franc*”, “*Pinot Noir*”, “*Sauvignon Blanc*”, *Királyleányka*”, “*Rhine Riesling*”, “*Merlot*” e “*Lemberger*”), apresentando diferença entre os perfis.

Deste modo, sabendo que possa existir diferença entre o perfil de ácidos graxos no óleo de semente de uva, o objetivo deste capítulo foi caracterizar o óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L.) em ensaios preliminares de índice de acidez e peróxido. Posteriormente, foi determinado o perfil de ácidos graxos, realizado análise termogravimétrica e análise por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do óleo de semente de uva e do lipídio estruturado do tipo MLM.

8.2 Resultados e Discussão

8.2.1 Caracterização do óleo de semente de uva

O óleo de semente de uva usado nas reações de acidólise foi previamente submetido a uma caracterização que incluiu a análise dos índices de peróxido e acidez, conforme detalhado no tópico 3.4.1. Esses ensaios foram conduzidos em triplicata, e os resultados médios, juntamente com seus desvios padrões correspondentes, estão apresentados na Tabela 8.1.

Tabela 8. 1 - Índices de peróxido e acidez do óleo de semente de uva puro utilizado nas reações de acidólise com ácido cáprico.

Índice de peróxido (mEq/kg de óleo)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1,23 ± 0,14	0,12 ± 0,06

Conforme estabelecido na Resolução-RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, pela Anvisa, os valores máximos permitidos para o índice de peróxido e acidez de óleos prensados a frio e não refinados, como o óleo de semente de uva, são de 10 mEq/kg d.l.e óleo e 0,6 mg KOH/g de óleo, respectivamente. A tabela 8.1 demonstra que a matéria-prima utilizada neste estudo está em total conformidade com as regulamentações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Quando o índice de peróxido e de acidez obtidos experimentalmente foram com os valores apresentados na literatura, obteve-se valores menores ao apresentado por Pardo e colaboradores (2009). Os autores realizaram as análises para diferentes variedades de *Vitis vinifera*, selecionando as “Monastrell”, “Garnacha Tintorera”, “Syrah” e “Petit Verdot”. Sendo que os valores de índice de peróxido foram respectivamente de 5,99; 8,00; 6,80; 13,50 e 11,60 mEq/kg de óleo, somente passando do limite estabelecido pela

ANVISA os óleos provenientes das uvas do tipo “*Syrah*” e “*Petit Verdot*”, ultrapassando o máximo de 10 mEq/kg de óleo. No entanto, as análises do índice de acidez demonstraram valores superiores a 0,6 mg KOH/g para todas as amostras, menos para a “*Monastrell*”, sendo a única a ser permitida para consumo de modo a ser comercializado como óleo extraído prensado a frio e não refinado. Ademais, o óleo de semente de uva passou por uma análise de seu perfil de ácidos graxos por meio de cromatografia gasosa. Os valores médios e seus desvios padrões correspondentes estão detalhados na Tabela 8.2.

Tabela 8. 2 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa do óleo de semente de uva puro utilizado para as reações de acidólise enzimática com ácido cáprico.

Ácidos graxos	%
<i>C16:0</i>	11,23 ± 0,01
<i>C18:0</i>	4,30 ± 0,01
<i>C18:1</i>	28,70 ± 0,01
<i>C18:2</i>	46,96 ± 0,03
<i>C18:3</i>	4,11 ± 0,01
<i>C20:0</i>	0,40 ± 0,01
total	100

Analisando a Tabela 8.2, verifica-se que o óleo de semente de uva apresenta elevadas concentrações de ácidos graxos essenciais, aqueles não metabolizados pelo organismo humano, como o ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Este fato evidencia que o óleo de semente de uva é uma promissora matéria prima para utilização na produção de lipídios estruturados. Além disso, este óleo é proveniente do resíduo da indústria vinícola, sendo assim sua utilização para esta finalidade é uma oportunidade de agregar valor a este óleo (Abed et al., 2018; Demir e Demir, 2018). Quando comparado aos valores apresentados na literatura, o perfil em ácidos graxos se apresentou em conformidade com o trabalho de Bassan e colaboradores (2019). Os valores obtidos pela Tabela 8 foram obtidos da análise cromatográfica ilustrada pela Figura 8.1.

A análise cromatográfica do perfil em ácidos graxos do óleo de semente de uva apresentado pela Figura 8.1 teve tempo de corrida de 30 min; no entanto, para tempos superiores a 11 minutos não foram observados picos correspondentes à ácidos graxos.

Assim, para facilitar a visualização dos picos, o eixo dos minutos foi delimitado até o tempo de 12 minutos.

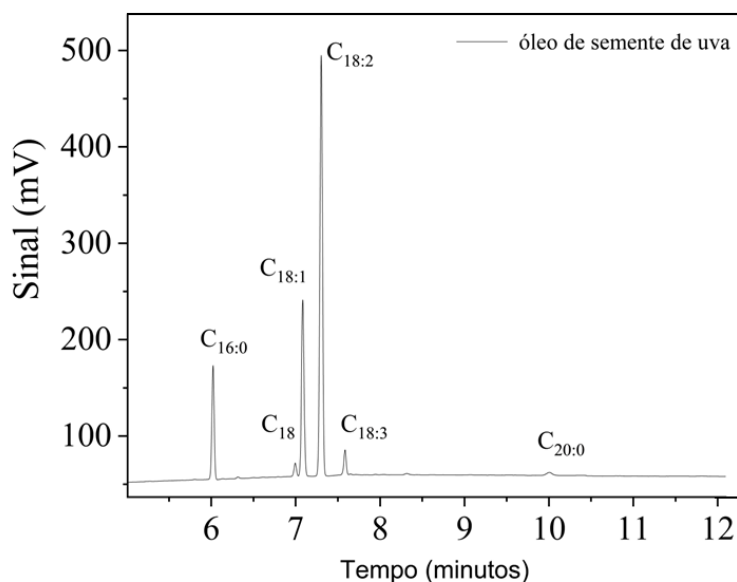


Figura 8. 1 - Cromatograma obtido pela composição em ácido graxos presentes da composição do triacilglicerol do óleo de semente de uva

Em seguida, a análise termogravimétrica do óleo de semente de uva foi realizada para demonstrar a estabilidade térmica. A termogravimetria (TG) e a derivada termogravimétrica (DTG) são apresentadas na Figura 8.2 juntamente com seus valores de % de perda de massa, temperatura estimada de início da decomposição e a taxa de perda de massa. O óleo de semente de uva permaneceu estável até próximo da temperatura de 300 °C, apresentando perdas de massa até 398,78 °C, correspondendo a queda de 1,23 % da massa a cada minuto, resultando na perda de 63,28 % de sua massa inicial. A perda de massa dentro da faixa de temperatura de 300 – 400 °C estão relacionados a quebra do triacilglicerol (Chenlu et al., 2021; Paulraj & Rhim, 2014; Chao et al., 2018).

A segunda perda de massa teve início aproximadamente em 400 °C, finalizando-se em 452 °C, correspondendo a taxa de perda de massa de 0,718 % de massa por minuto. Esta segunda decomposição está relacionada aos ácidos graxos livres e possíveis estruturas de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (Nawar, 1962).

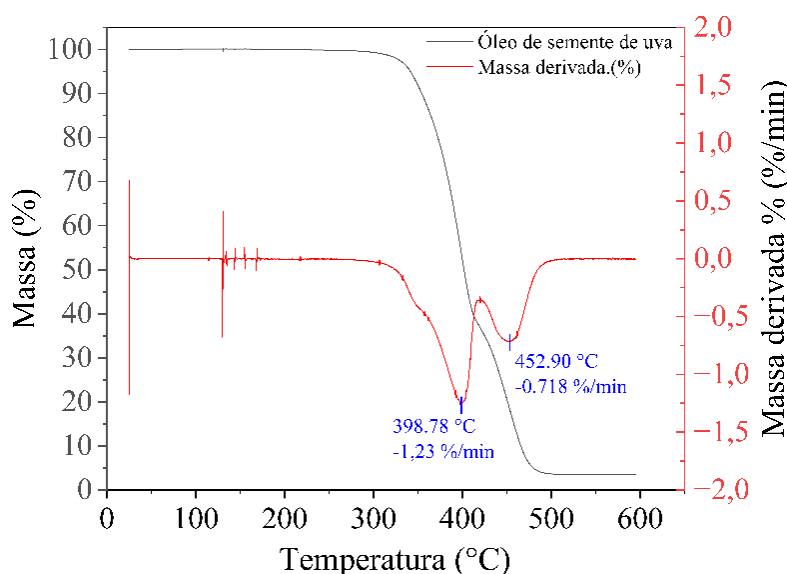


Figura 8. 2 - Análise termogravimétrica do óleo de semente de uva (TG) e a sua respectiva primeira derivada (DTG).

O perfil de decomposição do óleo de semente de uva apresentou perda de massa em mesma faixa de temperatura apresentadas na literatura. O trabalho de Fiori e colaboradores (2012), apresentaram a análise termogravimétrica do resíduo de uva. Neste ensaio foram apresentados a TG do óleo de uva com faixa de 300-490 °C. Deste modo, as análises mantiveram coerência com o que já vem sendo apresentado pela literatura

8.2.2 Caracterização dos lipídios estruturados do tipo MLM

Após as reações de síntese dos lipídios estruturados do tipo MLM, a caracterização do perfil em ácidos graxos foi realizada. Esta análise foi determinante para apresentar a incorporação do ácido cáprico na estrutura do triacilglicerol, que originalmente não apresenta esse ácido em sua composição. Assim, a Figura 8.3 ilustra o cromatograma do perfil em ácidos graxos para o lipídio estruturado.

A análise cromatográfica do perfil em ácidos graxos do novo lipídio estruturado, assim como anteriormente mencionado para o perfil do óleo de semente de uva, (Figura 8.3) teve tempo de corrida de 30 min. No entanto, para tempos superiores a 11 minutos não foram observados picos correspondentes à ácidos graxos, e para facilitar a visualização dos picos, o eixo dos minutos foi delimitado até o tempo de 12 minutos.

Nota-se que, a presença do ácido cáprico, anteriormente ausente no óleo de semente de uva, agora está presente ao perfil de ácidos graxos do novo lipídio.

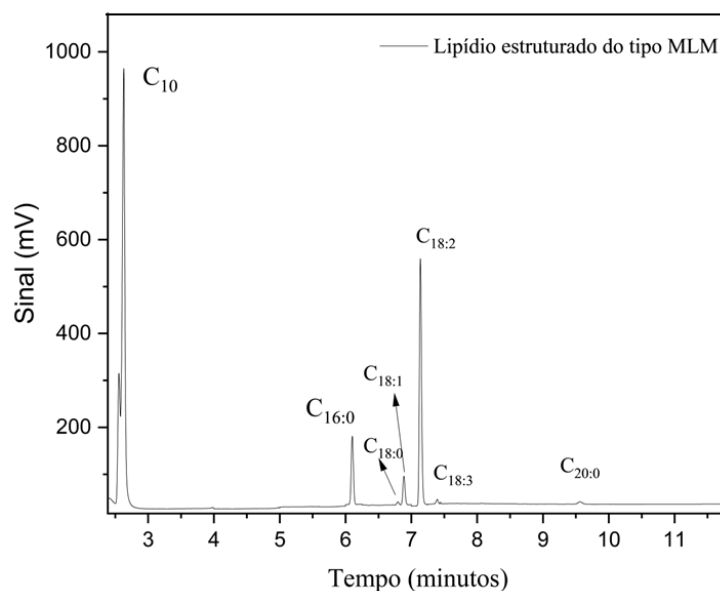


Figura 8. 3 - Cromatograma obtido pela composição em ácidos graxos presente na composição do lipídio estruturado da reação de acidólise do óleo de semente de uva com a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Diaion™ HP-20.

Após a síntese dos lipídios estruturados foram realizados os ensaios para a determinação do perfil em ácidos graxos na posição *sn*-2 do triacilglicerol, conforme descrito pelo tópico 3.4.14. A Figura 8.4 apresenta as marcações da corrida cromatográfica na placa de CCD do monoacil, diacil e triacilglicerol. Esse teste preliminar foi realizado para identificar adequadamente cada um dos compostos, uma vez que foram empregados padrões cromatográficos.

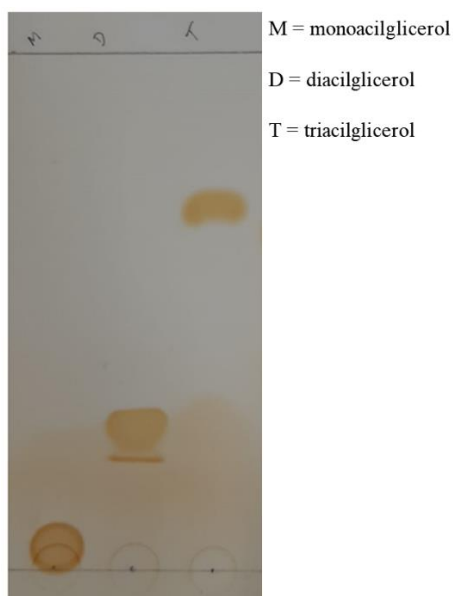


Figura 8. 4 - Folha cromatográfica para identificação dos possíveis compostos formados pela reação de hidrólise dos lipídios estruturado do tipo MLM.

O mesmo procedimento foi realizado para a amostra de triacilglicerol modificado (MLM) e os resultados são apresentados na Figura 8.5.

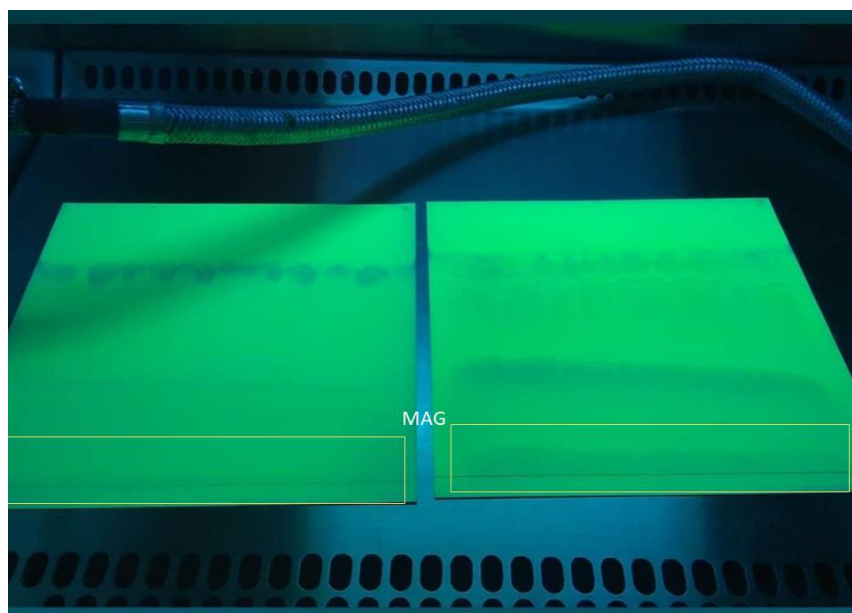


Figura 8. 5 - Folha cromatográfica dos compostos formados pela reação de hidrólise dos lipídios estruturado do tipo MLM em luz ultravioleta.

As bandas evidentes apresentadas na linha de marcação da placa cromatográfica estão saturadas com os monoacilglicerois resultantes do processo de hidrólise. A análise

do perfil em ácidos graxos foi iniciada com a raspagem desta banda e cuidadosamente coletada. Em um tubo, a amostra coletada foi submetida a uma extração utilizando 2 mL de éter etílico. Posteriormente, o solvente foi evaporado, possibilitando a coleta da amostra para a determinação do perfil composicional o qual é apresentado pela Tabela 8.3.

Tabela 8. 3 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa dos monoacilgliceróis obtidos pela hidrólise com lipase pancreática de porco (LPP).

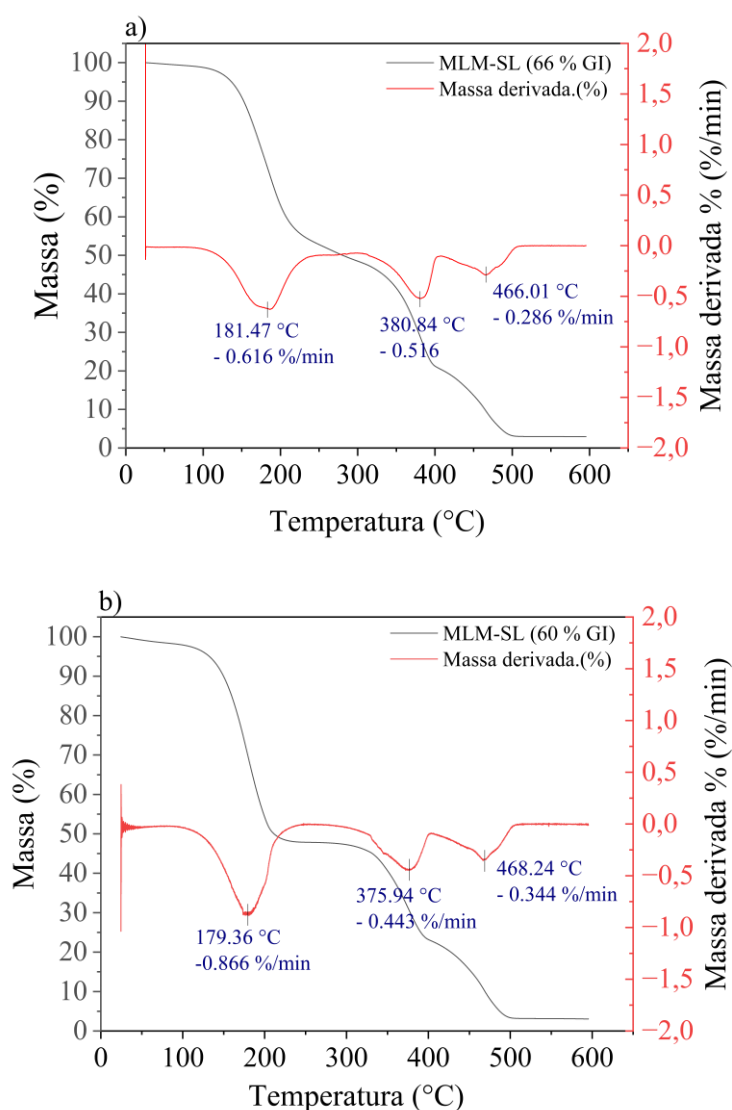
Ácidos graxos	%
<i>C10:0</i>	-
<i>C16:0</i>	9,26 ± 0,31
<i>C18:0</i>	10,44 ± 0,91
<i>C18:1</i>	29,32 ± 2,87
<i>C18:2</i>	39,96 ± 4,03
<i>C18:3</i>	11,11 ± 2,41

Como esperado, o teor de ácido cáprico é ausente nas amostras de monoacilglicerol. Com esse resultado é possível afirmar que a escolha do óleo de semente de uva como matéria prima para a síntese de lipídios estruturados do tipo MLM foi assertiva, demonstrando elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa na sua posição mais interna da estrutura do triacilglicerol. Adicionalmente, a análise do perfil em ácidos graxos da posição *sn*-2, auxilia na justificativa do aumento do teor de ácido linolênico anteriormente apresentado pela Tabela 6.1.

Em seguida, a análise termogravimétrica (TG) do lipídio estruturado juntamente com sua primeira derivada termogravimétrica (DTG) foram realizadas aos ensaios utilizando diferentes graus de incorporação do ácido cáprico (Figura 8.6). Deste modo, foi possível analisar o comportamento da estabilidade térmica sobre influência de diferentes graus de incorporação.

Para todos os ensaios, os padrões de decomposição apresentaram de forma semelhante dentro das faixas de temperatura. A perda inicial de massa começa a ser observada para valores de temperatura próximos a faixa de 172 a 181 °C, seguida da segunda perda dentro da faixa de 374-380 °C e finalizando com a terceira perda de massa dentro da faixa de 462-468 °C.

Quando comparada a temperatura de primeira perda de massa do óleo de semente de uva nota-se que ocorreu uma diminuição da estabilidade térmica. Essa redução da estabilidade está correlacionada a quantidade de energia fornecida para ocorrer a quebra de ligações entre a estrutura do glicerol e os ácidos graxo ligados a ela. Deste modo, temos para cadeias carbônicas maiores uma maior distribuição dessa energia oferecida, o que ocasiona a necessidade de fornecer mais energia para romper essas ligações. No momento em que essas cadeias carbônicas de ácidos graxos longos são substituídas por cadeias carbônicas menores, a energia necessária para romper as interações é menor. Assim, a energia fornecida para a decomposição desse composto torna-se menor, fato observado pela análise termogravimétrica, apresentando uma temperatura suficientemente menor para promover a decomposição (Nawar, 1972).



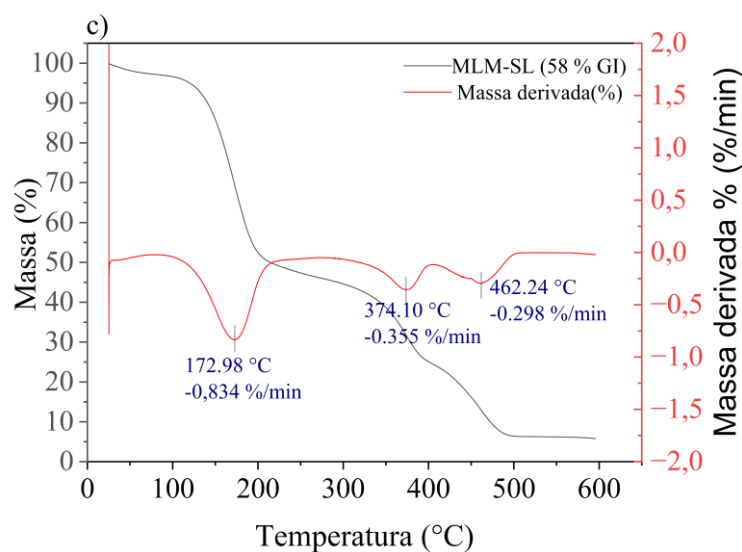


Figura 8. 6 - Análise termogravimétrica do novo lipídio estruturado (TG) e a sua respectiva primeira derivada (DTG). Lipídios estruturados com diferentes graus de incorporação. a) 66% GI, b) 60 %GI e c) 58 %GI obtidos por reatores de leito fluidizado.

Essa maior quantidade de energia fornecida para a decomposição dos lipídios também foi apresentada no trabalho de Luangkiattikhun e colaboradores (2007). Os autores realizaram análises termogravimétricas do óleo de palma, sendo rica em ácido palmítico e oleico, representando juntos 76 % da composição em ácidos graxos, aproximadamente, apresentaram a faixa de temperatura de 290-310 °C para o início da decomposição do óleo de palma.

A presença de três sucessivas perdas de massa nos ensaios como os lipídios estruturados estão relacionadas em como ocorreu a decomposição do óleo. Assim como demonstrado pelo trabalho de Nawar (1962), a primeira perda de massa pode estar relacionada a formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis e anidridos; a segunda perda de massa sendo relacionada a formação dos ácidos graxos e a terceira a formação de óxidos.

A comparação dos perfis de decomposição do óleo de semente de uva e dos lipídios estruturados foram ilustrados em conjunto e estão representados na Figura 8.7. A comparação entre o perfil de cada amostra permitiu evidenciar a mudança nas características físicas do produto formado. Essas mudanças são notadas na diminuição da estabilidade térmica provocada pela substituição das cadeias carbônicas laterais da molécula de triacilglicerol por cadeias carbônicas médias, no caso o ácido cáprico. O

perfil da redução da estabilidade térmica para os novos lipídios demonstrou sofrer grande influência em relação ao grau de incorporação, variando de 58 a 66 %GI. No entanto, quando comparados entre si, a diferença de incorporação não apresentou diferença no perfil de decomposição.

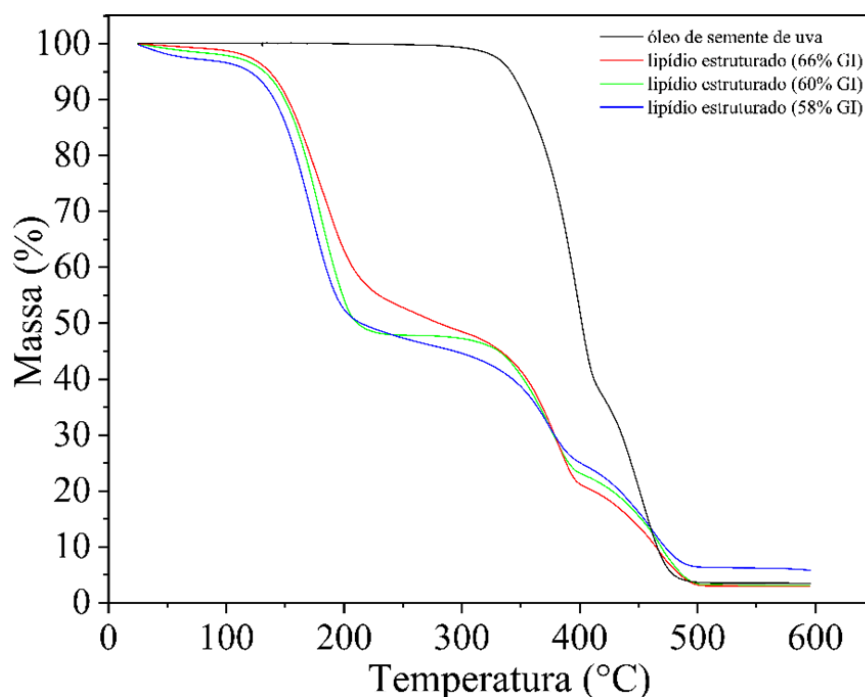


Figura 8. 7 - Comparativo entre as análises termogravimétricas do óleo de semente de uva e os lipídios estruturados em diferente %GI.

Visto que o foco do presente trabalho foi a síntese de um novo lipídio, foi realizada análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para a análise da caracterização da composição dos óleos. Para estes ensaios foram utilizadas amostras do lipídio estruturado com 66 % GI, comparando com os espectros do óleo de semente de uva e do ácido cáprico. A Figura 8.8 ilustra a comparação entre as amostras de FTIR.

Para essa análise destaca-se inicialmente os picos em 3011 cm^{-1} , os quais representam os estiramentos vibracionais pertencentes a configurações *cis* de =C-H , correspondente aos ácidos graxos insaturados presentes na amostra de óleo de semente de uva e do lipídio estruturado. As vibrações características no comprimento de onda máximo aprox. 2923 e 2853 são responsáveis pelo estiramento das vibrações -C-H dos grupamentos -CH_3 , CH_2 presentes na estrutura do triglicerídeo. Outro pico característico é decorrente das vibrações de estiramento do grupamento C=O presente nos ésteres. Essa

região atinge valor máximo em 1745 cm^{-1} , sendo que os valores obtidos foram de 1744 cm^{-1} . A próxima característica notável é a presença do pico em 1707 cm^{-1} responsável pelo estiramento vibracional do grupamento C=O , no entanto, para esse estiramento é correspondente á grupamento de ácidos, neste caso, presente somente para o espectro do ácido cáprico (Guillen & Cabo, 1997).

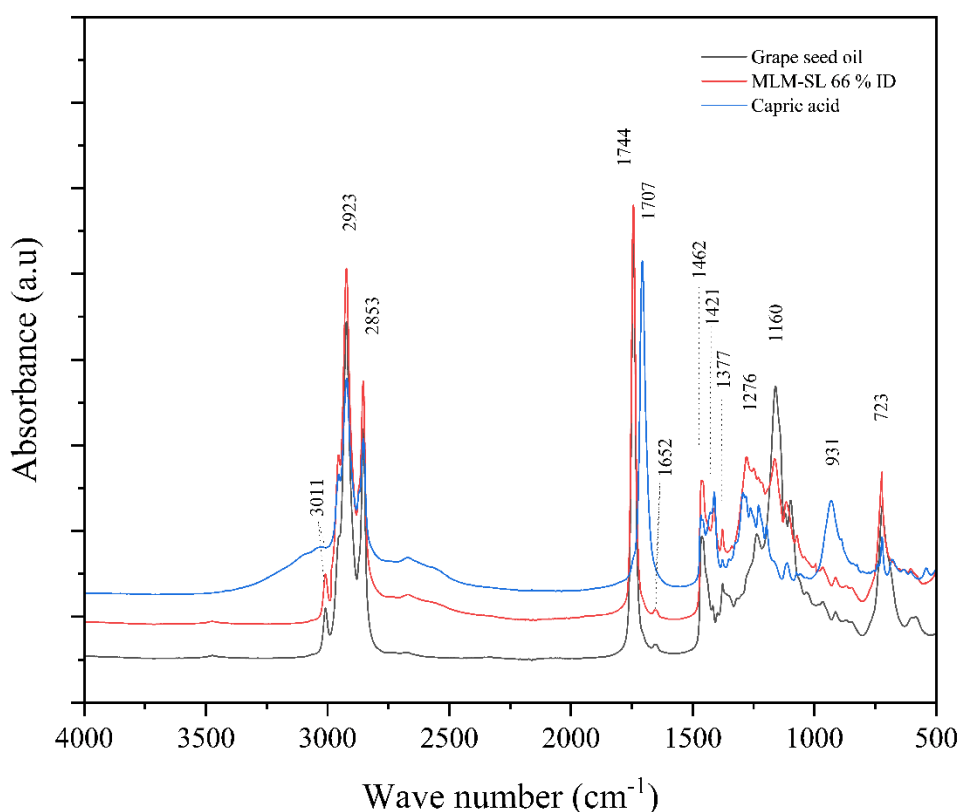


Figura 8. 8 - Espectros FTIR das amostras de lipídio estruturado (66 % GI), óleo de semente de uva e ácido cáprico.

Em 1652 cm^{-1} , apresenta o pico correspondente aos estiramentos vibracionais dos grupos C=C de ligações *cis* (Yang et al., 2005; Guillen & Cabo, 1997; Vladimír et al., 2021). Essas vibrações eram esperadas, uma vez que o óleo de semente de uva é rico em ligações *cis* ($\text{C}_{18:2}$). A faixa seguinte encontra-se o pico em 1462 cm^{-1} originárias das deformações vibracionais do grupamento C-H presente em CH_2 e CH_3 .

Para destacar a diferença entre os grupos C-O encontrados em ésteres e ácidos, analisamos as vibrações de estiramento da ligação éster (C-O) que compreendem duas vibrações assimétricas combinadas. Nesse caso, observamos as vibrações do grupo C-C(=O)-O e O-C-C no pico de 1160 cm^{-1} , conforme descrito por Rohman e Man (2010).

Isso indica a presença de ésteres na amostra do lipídio estruturado, enquanto não encontramos essa característica no espectro do ácido cáprico. A presença das interações O-H típicas do ácido cáprico são presentes com pico em 932 cm^{-1} (Ali et al., 2020), sendo possível observar essas vibrações na região de 931 cm^{-1} presente no espectro do ácido cáprico e ausente nos demais. Por fim, o pico de 723 cm^{-1} também pode estar correlacionado com os estiramentos vibracionais do tipo C-O e C-C (Vladimír et al., 2021).

8.3 Conclusões

Com o auxílio das análises cromatográficas, termogravimétricas e por infravermelho por transformada de Fourier foi possível concluir que a proposta em sintetizar lipídios estruturados do tipo MLM foi alcançada com sucesso. A partir da modificação do perfil em ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, notou-se mudança nas características físicas do novo TAG, apresentando maior sensibilidade a degradação em altas temperaturas. Adicionalmente, foi possível demonstrar que a posição *sn*-2 do lipídio estruturado era majoritariamente composta por ácidos graxos essenciais, ao qual viabiliza a estratégia de aplicar os novos TAG ricos em ω -3 e ω -6 nanoemulsionados em um cenário clínico, como o combate de células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- ALI, H. H.; GHAREEB, M. M.; AL-REMAWI, M.; AL-AKAYLEH, F. T. New insight into single phase formation of capric acid/menthol eutectic mixtures by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, c. 2, p. 361–369, 2020, doi:10.4314/tjpr.v19i2.19.
- BASSAN, N.; RODRIGUES, R. H.; MONTI, R.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PAULA, A. V. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in batch reactor. **LWT – Food Science and Technology**, v. 99, p. 600-606, 2019.
- CHAO, C. Y.; MANI, M. P.; JAGANATHAN, S. K. Engineering electrospun multicomponent polyurethane scaffolding platform comprising grapeseed oil and honey/propolis for bone tissue regeneration. **PLoS ONE**, v. 13, c.10, p. 1-17, 2018, doi:10.1371/journal.pone.0205699.
- D'EUSANIO, V.; Malferrari, D.; Marchetti, A.; Roncaglia, F.; Tassi, L. Waste by-product of grape seed oil production: Chemical characterization for use as a food and feed supplement. **Life**, v. 13, c. 2, p. 326, 2023, doi:10.3390/life13020326.
- FAO. **Food and Agricultural Organization**, 1999. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- FASINA, O.O.; COLLEY, Z. Viscosity and Specific Heat of Vegetable Oils as a Function of Temperature: 35 °C to 180 °C. **International Journal of Food Properties**, v. 11, c. 4, p. 738-746, 2008, doi: 10.1080/10942910701586273.
- FIORI, L.; VALBUSA, M.; LORENZI, D.; FAMBRI, L. Modeling of the devolatilization kinetics during pyrolysis of grape residues. **Bioresource Technology**, v. 103, c. 1, p. 389-397, ISSN 0960-8524, 2012, doi:10.1016/j.biortech.2011.09.113.
- GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, c.1, p. 1–11, 1997, doi:10.1002/(sici)1097-0010(199709)75:1<1::aid-jsfa842>3.0.co;2-r.
- KANMANI, P.; RHIM, J. W. Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 708-716, ISSN 0144-8617, 2014, doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.099.
- KAPCSÁNDI, V.; LAKATOS, E. H.; SIK, B.; LINKA, L. A.; SZÉKELYHIDI, R. Characterization of fatty acid, antioxidant, and polyphenol content of grape seed oil from different *Vitis vinifera* L. varieties. **EDP Sciences**, v. 28, p. 16, 2021, doi:10.1051/ocl/2021017.
- LUANGKIATTIKHUN, P.; TANGSATHITKULCHAI, C.; TANGSATHITKULCHAI, M. Non-isothermal thermogravimetric analysis of oil-palm solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, c. 5, p. 986–997, 2008, doi:10.1016/j.biortech.2007.03.001.

NAWAR, W. W. Thermal Degradation of Lipids. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, c.1, p.18-21, 1969, doi: 10.1021/jf60161a012.

PARDO, J. E.; FERNÁNDEZ, E.; RUBIO, M.; ALVARRUIZ, A.; ALONSO, G. L. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, c.2, p. 188–193, 2009, doi:10.1002/ejlt.200800052.

ROHMAN, A.; CHE MAN, Y. B. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, c. 3, p. 886-892, ISSN 0963-9969, 2010, doi:10.1016/j.foodres.2009.12.006.

TORRES-LEON, C.; RAMIREZ-GUZMAN, N.; LONZONO-HERNANDEZ, L.; MARTINEZ-MEDINA, G.A.; DIAZ-HERRERA, R.; NAVARRO-MACIAS, V.; ALVAREZ-PEREZ, O.B.; PICAZO, B.; VILLAREAL-VAZQUEZ, M.; ASCACIO-VALDES, J.;AGUILAR, C. N. Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. **Front. Sustain. Food Syst**, v. 2, p. 1–17, 2018.

VLADIMÍR, M.; MATWIJCZUK, A.P.; NIEMCZYNOWICZ, A.; KYCIA, R. A.; KARCZ, D.; GŁADYSZEWSKA, B.; ŚLUSARCZYK, L; BURG, P. Chemometric approach to characterization of the selected grape seed oils based on their fatty acids composition and FTIR spectroscopy. **Nature - Sci Rep**, v. 11, n. 19256, 2021, doi:10.1038/s41598-021-98763-6.

YANG, C.; SHANG,K.; LIN, C.; WANG, C.; SHI, X.; WANG, H.; LI, H. Processing technologies, phytochemical constituents, and biological activities of grape seed oil (GSO): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 1074-1083, ISSN 0924-2244, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.09.011.

YANG, H.; IRUDAYARAJ, J.; PARADKAR, M. M. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 93, c. 1, p. 25-32, ISSN 0308-8146, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.039.

**9. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE APLICADOS AO LIPÍDIO
ESTRUTURADO E ÓLEO DE EMENTE DE UVA.**

9.1 Introdução

Dentro do contexto dos lipídios estruturados (SL), merecem destaque os triglicerídeos do tipo MLM, que consistem em ácidos graxos de cadeia média (M) nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e ácidos de cadeia longa (L) na posição interna *sn*-2. Eles podem ser sintetizados por meio de reações enzimáticas catalisadas por lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3), permitindo a formação de compostos estruturados específicos que são particularmente desafiadores de obter usando catalisadores químicos (Ferreira-Dias et al., 2018; Jadhav et al., 2021; Rehman, S et al., 2017).

Além disso, essa classe de lipídios estruturados apresenta um menor valor calórico (5–7 kcal/g) quando comparada aos óleos e gorduras convencionais (9 kcal/g). Portanto, estudos sobre o controle da obesidade foram conduzidos por Martínez-Galán e colaboradores (2021), que investigaram os efeitos dos lipídios estruturados do tipo MLM em camundongos Swiss alimentados com dietas pré-fabricadas e relataram uma redução no ganho de peso corporal e uma diminuição nos pesos do tecido adiposo branco. Essas reduções no peso corporal e no tecido adiposo branco são atribuíveis ao menor teor de ácidos graxos de cadeia longa nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos SLs, o que aumenta sua solubilidade e acelera o metabolismo, uma vez que não são armazenados como gordura.

Estudos anteriores relataram que o óleo de semente de uva oferece benefícios à saúde devido à presença de antioxidantes, como vitamina E e tocoferóis (Yu & Mohamed, 2013; Yang et al., 2021; Garavaglia et al., 2016; Gitea et al., 2023; Martin et al., 2020). Além disso, o extrato de semente de uva demonstra potencial na prevenção de doenças cardiovasculares (Khaki et al., 2023; Gupta et al., 2019). Outra vantagem associada ao óleo de semente de uva é sua composição química rica em ácidos graxos essenciais, como ácidos graxos ω -3 e ω -6. A literatura científica contém estudos que mostram o potencial dos ácidos graxos poli-insaturados em reduzir a inflamação celular (Martin et al., 2020, Calder, P. 2015.; Vanden, H. 2012) e em combater células cancerígenas, induzindo a apoptose celular (Vanden, H. 2012; Miccadei et al., 2016).

O óleo de semente de uva também se encontra em aplicações clínicas como promotor de nanocarregadores, que proporcionam melhor controle, biocompatibilidade, liberação direcionada, redução de toxicidade e efeitos colaterais quando associados a

compostos químicos que, quando administrados diretamente *in vivo*, apresentam limitações (Garavaglia et al., 2016; Amaral et al., 2022; Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. 2015; Lacatusu et al., 2015). Portanto, este estudo teve como objetivo utilizar os lipídios estruturados com elevado grau de incorporação de ácido cáprico de modo a usá-lo como um inovador “oil core” nanoemulsionados aplicados em ensaios de viabilidade celular com fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™) e células de câncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2), com a finalidade de desenvolver nanoemulsões como uma nova abordagem terapêutica.

9.2 Resultados e discussão

9.2.1 Análise dos parâmetros físico-químicos ao longo do tempo das nanoemulsões

O tamanho de partícula, o PDI (Índice de Polidispersão) e o potencial zeta (ζ) foram avaliados por meio de um analisador de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O desvio padrão foi utilizado para indicar a média dos dados obtidos para a nanoemulsão utilizando os lipídios estruturados (nanoemulsão/MLM-SL) e nanoemulsão utilizando o óleo de semente de uva (nanoemulsão/GSO). A determinação dos parâmetros analisados é de extrema importância, pois descreve o material e suas características, sendo fundamental na análise de nanomateriais (Amaral et al., 2022). Os valores médios obtidos, expressos como média $\pm$ desvio padrão, para a nanoemulsão/MLM-SL e nanoemulsão/GSO, são apresentados a seguir.

Os valores de tamanho de partícula obtidos para a nanoemulsão desenvolvida com óleo de semente de uva (256,0 nm $\pm$ 8,5) foram altamente satisfatórios, estando de acordo com o esperado para sistemas coloidais submicrônicos. A nanoemulsão MLM-SL (464,7 nm $\pm$ 10,2) apresentou tamanhos de partículas maiores, no entanto, ainda dentro do perfil de aplicação esperado.

Os valores de PDI para nanoemulsão/GSO (0,235 $\pm$ 0,015) e nanoemulsão/MLM-SL (0,316 $\pm$ 0,035) demonstraram baixa polidispersão do material, com pequena tendência à aglomeração. Os valores do zeta potencial para nanoemulsão/GSO (-34,0 $\pm$ 0,917) e nanoemulsão/MLM-SL (-18,6 $\pm$ 0,711) permaneceram estáveis durante os 43 dias após a síntese.

Comparando com trabalhos relatados, Nam e colaboradores (2010) prepararam nanoemulsões utilizando seis sistemas diferentes de óleo em água, que exibiram diferentes diâmetros hidrodinâmicos dependendo do peso molecular do óleo. Os autores apresentaram nanoemulsões com diâmetros hidrodinâmicos maiores para óleos com menor peso molecular e diâmetros hidrodinâmicos menores para óleos com maior peso molecular. Da mesma forma, como relatado por Nam e colaboradores (2010), as nanoemulsões preparadas com MLM-SL exibiram menor peso molecular (em comparação com o óleo de semente de uva original) e, adicionalmente, um diâmetro hidrodinâmico maior (Figura 9.1), o que desfavorece cineticamente a prevenção do “amadurecimento de Ostwald”, conhecida como um mecanismo importante de desestabilização para gotículas de emulsão nanométricas (Nam et al., 2010; Yamashita et al., 2017). Isso justifica o aumento do diâmetro hidrodinâmico da emulsão MLM-SL após 43 dias.

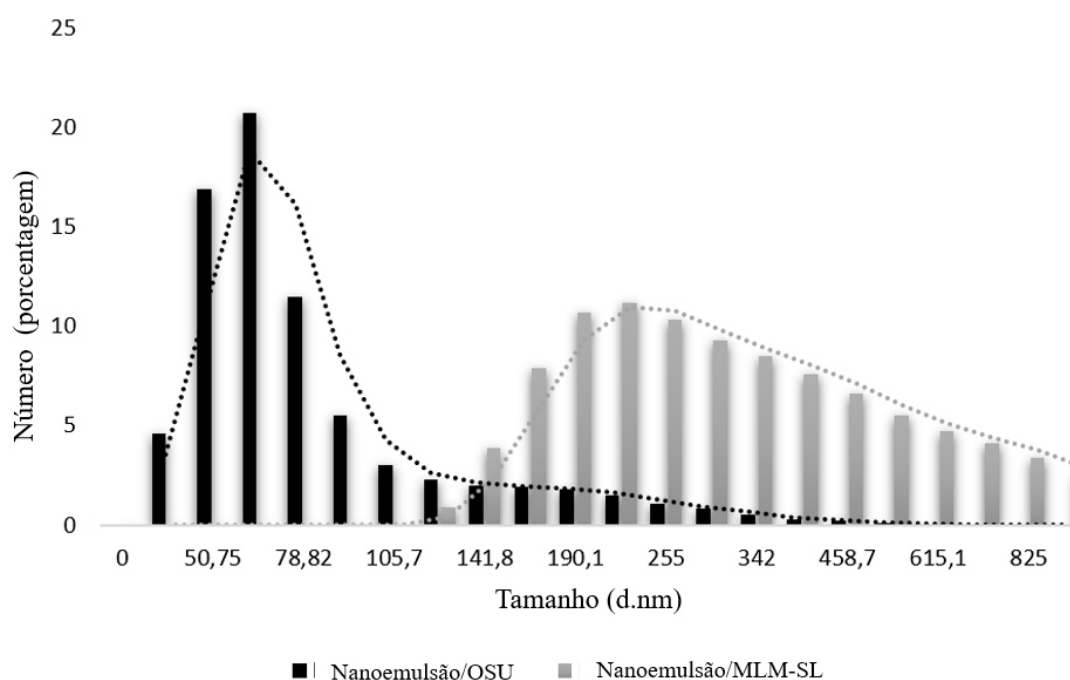


Figura 9. 1 - Perfil da distribuição de diâmetro das Nanoemulsões/GSO (preto) e Nanoemulsões/MLM-SL (cinza) a partir de análises de DLS após 43 dias de síntese.

Esses resultados sustentam a análise de que o MLM-SL foi devidamente sintetizado, uma vez que o lipídio estruturado, devido às suas cadeias carbônicas mais curtas nas posições laterais, proporciona um aumento ligeiro na solubilidade em água em comparação com o óleo de semente de uva original. Como mostrado na Figura 9.1, é

possível observar os tamanhos de partícula dos nanomateriais desenvolvidos, nos quais as populações em seu potencial máximo estão no tamanho de partícula adequado, mostrando também estabilidade ao longo do tempo.

9.2.2 Ensaios de citotoxicidade in vitro utilizando nanoemulsão/MLM-SL e nanoemulsão/GSO

Testes de viabilidade celular foram realizados como um teste preliminar para avaliar a toxicidade do lipídio estruturado. Conforme mostrado na Figura 9.2, baixas concentrações das nanoemulsões (1,125 e 1,5% v/v) não causaram citotoxicidade. No entanto, com o aumento das concentrações do lipídio estruturado, ou seja, 1,75 e 2% v/v, a viabilidade celular diminuiu para 15 e 9%, respectivamente. Com base nesses resultados, foram realizados os ensaios de citotoxicidade in vitro usando linhagens de células HeLa, adenocarcinoma cervical humano (ATCC® CCL-2).

As células foram incubadas em diferentes concentrações de nanoemulsão/GSO (verde) e nanoemulsão/MLM-SL (laranja) (1,25%, 1,5%, 1,75% e 2%). A significância estatística foi determinada usando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste post-Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes (CT, controle, * $p < 0,001$).

Os resultados do ensaio de viabilidade com células HeLa estão apresentados na Figura 9.2. Pode-se observar que em baixas concentrações do lipídio ativo, não houve redução na viabilidade celular, indicando alta biocompatibilidade. No entanto, à medida que a concentração aumentou para 1,75% e 2% v/v, o nanomaterial foi capaz de induzir a morte celular em 56% e 64% das células de adenocarcinoma, respectivamente.

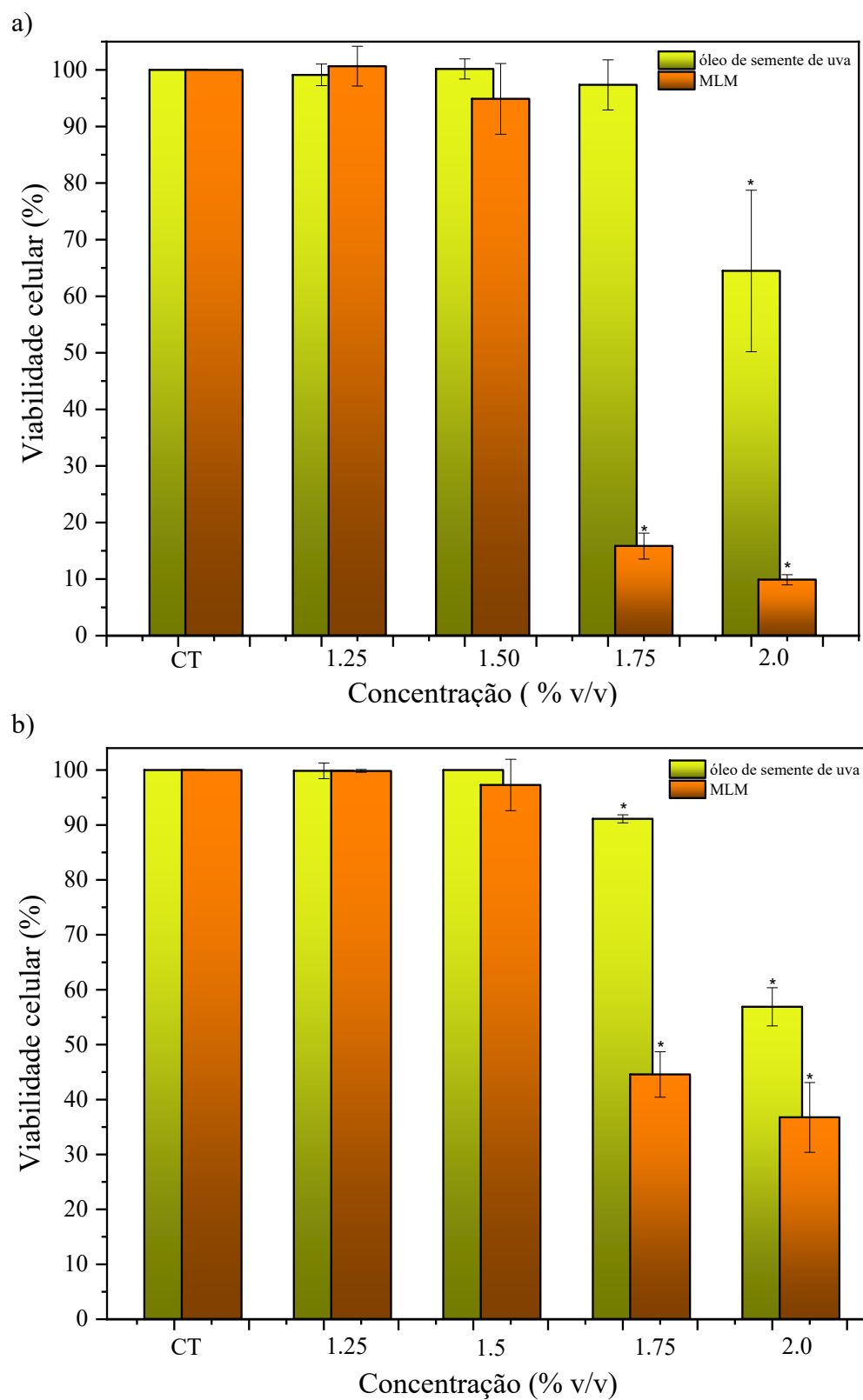


Figura 9.2 - Teste de citotoxicidade in vitro em fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™). Fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 - ATCC®

CRL-1658TM) (a) e células de câncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2) (b). Nanoemulsão/GSO (verde) e nanoemulsão/MLM-SL (laranja).

Poucos trabalhos utilizam óleo como o “oil-core” ativo do nanomaterial. Lanna e colaboradores (2021) avaliaram a ação do triglicerídeo de ácido docosaheptaenóico em células de câncer de mama, como “core lipídico” em sistemas de nanoemulsão (nanoemulsões, nanocápsulas e carreadores lipídicos nanoestruturados). Eles observaram que os três nanocarreadores diminuíram a viabilidade de maneira dependente da dose, aumentando a seletividade do tratamento. Roy e colaboradores (2015) desenvolveram uma nova nanocápsula polimérica contendo ácidos graxos poli-insaturados. Os autores observaram que o nanomaterial pode melhor internalizar o ativo quando testado em células de câncer de mama, controlando a liberação de ácidos graxos nas células. A nanotecnologia, como visto, surge com o propósito de otimizar a liberação dos nanocarreadores desenvolvidos, proporcionando uma maior biodisponibilidade no alvo de interesse, uma vez que foram observadas concentrações biocompatíveis e citotóxicas do ativo.

Até o presente momento, este estudo é o primeiro a relatar a estabilidade físico-química e a atividade anticâncer de nanoemulsões de lipídios estruturados (SL) do tipo MLM em células de adenocarcinoma humano (HeLa). Embora as nanoemulsões sejam comumente usadas no tratamento do câncer, sua função principal é servir como transportadora para drogas hidrofóbicas em sua fase oleosa, com menos ênfase em ser a própria substância bioativa. Neste trabalho, de tese, foi apresentado a otimização da síntese de MLM-SL, destacando a atividade biológica aprimorada da emulsão/MLM-SL (Figura 9.2), levando a uma maior citotoxicidade em comparação com a atividade da emulsão/GSO. Essa diferença na capacidade citotóxica está relacionada à modificação do perfil de ácidos graxos, permitindo que o novo triacilglicerol tenha um menor peso molecular e seja metabolizado mais rapidamente devido à presença de cadeias de carbono curtas nas posições *sn*-1 e *sn*-3, enquanto preserva ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na posição *sn*-2 do triacilglicerol (Morales-Medina et al., 2017; Ferreira-Dias et al., 2018). Como amplamente relatado na literatura, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como o ácido oleico (18:1), o ácido linoleico (18:2) e o ácido linolênico (18:3) encontrados na posição *sn*-2 do óleo de semente de uva, demonstrando a capacidade de reduzir a proliferação de células carcinogênicas (Matin et al., 2020;

Calder, P. 2015; Vanden Heuvel, J. P. 2012; Martha, A. B. 2002; Hanke et al., 2013; Lisa et al., 2020; Freitas et al., 2019). A preservação de ácidos graxos poli-insaturados na posição *sn*-2 do triacilglicerol destaca o potencial do MLM-SL em aplicações anticâncer. Com base nos resultados obtidos, é possível propor a nanoemulsão desenvolvida como uma nova abordagem terapêutica promissora.

9.3 Conclusões

As nanoemulsões demonstraram elevada estabilidade ao longo de 43 dias, com baixa polidispersão do material e baixa tendência à aglomeração. O teste de viabilidade celular não mostrou citotoxicidade em ambas as linhagens nas concentrações mais baixas de nanoemulsão/MLM-SL e nanoemulsão/GSO, indicando alta biocompatibilidade. No entanto, quando a concentração de nanoemulsão/MLM-SL foi aumentada para 1,75% e 2% v/v, foi capaz de induzir um maior percentual de morte celular em células HeLa quando comparado à nanoemulsão/GSO, demonstrando maior sensibilidade aos sistemas de nanoemulsão com MLM-SL. Esses resultados obtidos com nanoemulsões contribuem para futuras aplicações associadas ou não a aditivos químicos que são prejudicados quando aplicados diretamente em um sistema *in vivo*, contribuindo para uma possível sinergia na eficácia no combate às células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, S.R.; AMANTINO, C.F.; DE ANNUNZIO, S.R.; DE PAULA, A. V.; FONTANA, C. R.; PRIMO, F. L. Advanced methylene blue nanoemulsions for in vitro photodynamic therapy on oral and cervical human carcinoma. **Lasers Med Sci**, v. 37, p. 3443–3450, 2022, doi: 10.1007/s10103-022-03603-2.
- BUTLER, L. M.; PERONE, Y.; DEHAIRS, J.; LUPIEN, L. E. DE LAAT, V.; TALEBI, A.; LODA, M.; KINLAW, W. B.; SWINNEN, J. V. Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 159, p. 245-293, ISSN 0169-409X, 2020, doi:10.1016/j.addr.2020.07.013.
- CALDER, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39(1_suppl), p.18S–32S, 2015, doi:10.1177/0148607115595980.
- DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.082
- FERREIRA-DIAS, S.; OSÓRIO, N. M.; RODRIGUES, J.; TECELÃO, C. Structured Lipids for Foods. **Reference Module in Food Science**, 2018, doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.21766-6.
- FREITAS, R.D.S.; CAMPOS, M.M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. **Nutrients**, v. 11, n. 945, 2019, doi:10.3390/nu11050945
- GARAVAGLIA, J.; MARKOSKI, M. M.; OLIVEIRA, A.; MARCADENTI, A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, NMI.S32910, 2016, doi:10.4137/nmi.s3291010.4137/NMI.
- GITEA, M. A.; BUNGAU, S. G.; GITEA, D.; PASCA, B. M.; PURZA, A. L.; RADU, A. F. Evaluation of the Phytochemistry–Therapeutic Activity Relationship for Grape Seeds Oil. **Life**, v. 13, n. 1:178, 2023. doi:10.3390/life13010178.
- GUPTA, M.; DEY, S.; MARBANIANG, D.; PAL, P.; RAY, S.; MAZUMDER, B. Grape seed extract: having a potential health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1205-1215, 2019, doi:10.1007/s13197-019-04113-w.
- HANKE, D.; ZAHRADKA, P.; MOHANKUMAR, S. K.; CLARK, J. L.; TAYLOR, C. G. A diet high in α -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, c. 6, p. 391-401, ISSN 0952-3278, 2013, doi: 10.1016/j.plefa.2013.09.009.
- JADHAV, H. B.; UDAY, A. Designer lipids-synthesis and application–A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 884-902, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.020.
- KHAKI, E.; DEHKODI, K. J.; TAGHIAN, F.; HOSSEINI, S. Interactive Effect of Grape Seed Nanoparticle Extract and Resistance Training on Antioxidant System Function in Myocardial Infarction Rat Model. **Gene Cell Tissue**, v. 10, n. 1, p. e123703, 2023, doi:10.5812/gct-123703.

- LACATUSU, I.; BADEA, N.; BADEA, G.; OPREA, O.; MIHAILA, M. A.; KAYA, D. A.; MEGHEA, A. Lipid nanocarriers based on natural oils with high activity against oxygen free radicals and tumor cell proliferation. **Materials Science and Engineering**: v. 56, p. 88–94, 2015, doi:10.1016/j.msec.2015.06.019.
- LANNA, E. G.; SIQUEIRA, R. P.; MACHADO, M. G. C.; DE SOUZA, A.; TRINDADE, I. C.; BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C. F. Lipid-based nanocarriers co-loaded with artemether and triglycerides of docosahexaenoic acid: Effects on human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111–114, 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.111114.
- MARTIN, M. E.; GRAO-CRUCES, E.; MILLAN-LINARES, M. C. DE LA PAZ, S. M. Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil: A Functional Food from the Winemaking Industry. **MDPI Foods**, v. 9, n. 10, p. 1360, 2020, doi:10.3390/foods9101360.
- MARTÍNEZ-GALÁN, J. P.; ONTIBÓN-ECHEVERRI, C. M.; COSTA, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; BATISTA, V. G.; MESA, V.; MONTI, R.; DE PAULA, A. V.; BAVIERA, A. M. 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, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110602.
- MICCADEI, S.; MASELLA, R.; MILEO, A. M.; GESSANI, S. ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids as Immunomodulators in Colorectal Cancer: New Potential Role in Adjuvant Therapies. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 486, 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00486.
- MORALES-MEDINA, R.; MUNIO, M.; GUADIX, A.; GUADIX, M. E. Development of an up-grading process to produce MLM Structured lipids from sardine discards. **Food Chemistry**, v. 228, p. 634–642, 2017.
- NAM, Y. S.; KIM, J.-W.; SHIM, J.; HAN, S. H.; KIM, H. K. Nanosized Emulsions Stabilized by Semisolid Polymer Interphase. **Langmuir**, v. 26, c. 16, p. 13038–13043, 2010, doi:10.1021/la102084f
- REHMAN, S.; WANG, P.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Improved catalytic properties of Penicillium notatum lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International journal of biological macromolecules**, v. 97, p. 279–286, 2017.
- ROY, J.; OLIVEIRA, L. T.; OGER, C.; GALANO, J.-M.; BULTEL-PONCÉ, V.; RICHARD, S.; GUIMARAES, A. G.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DURAND, T.; BESSON, P.; MOSQUEIRA, V. C. F.; LE GUENNEC, J.-Y. Polymeric nanocapsules prevent oxidation of core-loaded molecules: evidence based on the effects of docosahexaenoic acid and neuroprostane on breast cancer cells proliferation. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 155, p. 1–12, 2015.
- VANDEN HEUVEL, J. P. Nutrigenomics and Nutrigenetics of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Recent Advances in Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 108, p. 75–112, 2012, doi:10.1016/b978-0-12-398397-8.00004-6.
- YAMASHITA, Y.; MIYAHARA, R.; SAKAMOTO, K. Emulsion and Emulsification Technology, Editor(s): Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach, Yuji Yamashita. **Cosmetic Science and Technology, Elsevier**, c. 28, p. 489–506, 2017.

YANG, C.; SHANG, K.; LI, C.; WANG, C.; SHI, X.; WANG, H.; LI, H. Processing technologies, phytochemical constituents, and biological activities of grape seed oil (GSO): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p.1074–1083, 2021.

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 221-237, 2013.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

10.1 Considerações finais

Na busca por novas tecnologias para a produção de alimentos mais saudáveis, o uso de óleos e gorduras modificados tornou-se uma estratégia relevante em novas formulações de alimentos. Além de possuírem propriedades nutracêuticas básicas, eles também contribuem para os processos fisiológicos usados na prevenção e tratamento de doenças. Assim, este trabalho de tese focou em desenvolver novas estratégias de produção de lipídios estruturados do tipo MLM. Primeiramente, o desenvolvimento de um biocatalisador composto pela imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em suporte Diaion™ HP-20 foi realizado. Como apresentado ao decorrer da tese, o biocatalisador apresentou elevada atividade catalítica, bom desempenho na síntese dos lipídios estruturados e elevada estabilidade térmica e operacional quando comparada à enzima livre.

Como apresentado nos Capítulos 4 e 5, os ensaios de otimização utilizando Design of Experiments (DOE) e por modelos matemáticos a partir de Redes Neurais Artificiais (ANN) foram aplicados com sucesso para a melhora das condições reacionais da síntese dos novos triacilgliceróis. A análise estatística e os modelos matemáticos confirmaram que, para atingir um grau de incorporação mais elevado de lipídios estruturados do tipo MLM, são necessárias razões molares de óleo para ácido na proporção de 1:6,7, com uma temperatura de 41 °C.

Após os parâmetros reacionais serem otimizados em reatores de tanque agitado, a transição da produção dos novos TAG foram realizados em reatores de leito fixo. A construção do leito reacional foi capaz de promover valores da DTR próximos ao valor teórico do tempo espacial, demonstrando um bom empacotamento do leito, com apenas 8% de erro entre os valores. Os resultados de síntese obtidos por esse sistema foram capazes de atingir grau de incorporação na faixa de 61%. Complementarmente ao elevado grau de incorporação, o reator de leito fixo foi capaz de operar em modo contínuo por 192 horas, como apresentado no Capítulo 6.

Na busca de atingir o máximo teórico de incorporação do ácido cáprico, o reator de leito fluidizado foi idealizado por apresentar melhores condições de transferência de massa e de calor, assim como diminuição na perda de pressão. No Capítulo 7, a

modificação do refrigerador para uma câmara de aquecimento controlado foi executado com sucesso, mantendo todo o sistema reacional a 41 °C, impedindo a solidificação do meio reacional dentro das mangueiras de alimentação. No entanto, ao se calcular o tamanho mínimo da coluna para as condições reacionais descritas, o valor obtido foi de 15 metros. A solução dada para contornar as limitações de se trabalhar com uma coluna de 15 metros demonstrou-se simples sem ser simplista. A recirculação do meio reacional pelo leito fluidizado contribuiu com o entendimento do comportamento cinético da síntese dos lipídios estruturados. Os resultados obtidos alcançaram o grau de incorporação máximo (66%) em 72 horas de reação.

Visando a oportunidade em se explorar a potencial ação dos lipídios estruturados no combate de células cancerígenas, o Capítulo 8 foi de grande importância para consolidar a formação específica do lipídio proposto a serem sintetizados. Assim com as análises cromatográficas, termogravimétricas e de infravermelho por transformada de Fourier foram possíveis validar a formação dos lipídios estruturados do tipo MLM. Posteriormente, no Capítulo 9, os novos TAGs foram nanoemulsionados demonstrando elevada estabilidade ao longo de 43 dias, com baixa polidispersão do material e baixa tendência à aglomeração. Em testes de viabilidade celular ambas as linhagens indicaram alta biocompatibilidade em concentrações mais baixas de nanoemulsão/MLM-SL e nanoemulsão/GSO. Para concentrações de 1,75% e 2% v/v, os ensaios foram capazes de induzir um maior percentual de morte celular em células HeLa quando comparado à nanoemulsão/GSO, demonstrando maior sensibilidade aos sistemas de nanoemulsão com MLM-SL.

Em resumo, por meio desta tese, acredita-se que foram fornecidas informações significativas sobre a otimização da síntese e o uso de redes neuronais para aprimorar a produção de lipídios estruturados do tipo MLM. Além disso, contribuiu-se para a produção de novos triacilgliceróis (TAGs) em diferentes configurações de reatores, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas hidrofóbicas como uma alternativa aos biocatalisadores comercialmente imobilizados. O reator de leito fluidizado emerge como a escolha ideal quando se busca alcançar um grau de incorporação máximo, sendo particularmente aplicável em indústrias farmacêuticas, onde a pureza do produto é de extrema importância. Por outro lado, o reator de leito fixo se destaca em setores industriais que não demandam uma pureza excepcional, ganhando vantagem significativa

em produtividade com seu sistema reacional eficiente. Enquanto isso, o reator de tanque agitado demonstra eficácia em termos de conversão, porém pode apresentar limitações na produtividade devido à sua natureza descontínua. Esta análise destaca a crucial importância de selecionar o tipo de reator mais adequado, levando em consideração os objetivos específicos da produção e as necessidades específicas de cada setor industrial. Adicionalmente, foram alcançadas valiosas contribuições sobre o uso de nanoemulsões de lipídios estruturados para possíveis aplicações clínicas no combate a células cancerígenas.

10.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Como apresentado no Capítulo 2, o uso de diferentes suportes para imobilização de enzimas pode proporcionar mudanças na capacidade catalítica do derivado imobilizado. Pensando nisso, a busca por outros suportes e outras técnicas de imobilização podem refletir em resultados diferentes aos apresentados neste trabalho.
- Ensaios do potencial antineoplásico com graus de incorporação variados de ácido cáprico com a finalidade de se compreender a relação entre o grau de incorporação e a viabilidade celular.
- Estudos de viabilidade econômica do processo de síntese dos lipídios estruturados.
- Estudo com a implementação do novo TAG em alimentos e avaliação do combate à obesidade.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Artigos publicados

Publicações em periódicos científicos internacionais com revisão por pares.

MIOTTI JR, R.H.; AMARAL, S. R.; BENTO, B. S.; CARVALHO, A.K. F.; PRIMO, F. L.; de PAULA, A.V. Enzymatic production process of capric acid-rich structured lipids: development of formulation as a new therapeutic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, 2024, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128641.

REMONATTO, D.; **MIOTTI JR, R. H.**; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A.V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022, doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.

ATSAKOU, A.E.; REMONATTO, D.; **MIOTTI JR, R.H.**; PAZ-CEDENO, F. R.; MASARIN, F.; ANDRADE, G. S. S.; GATTAS, E. A. L.; DE PAULA, A. V. Synthesis of dietary lipids from pumpkin (*Cucurbita pepo. L*) oil obtained by enzymatic extraction: a sustainable approach. **3 Biotech**, v. 13, n. 358, 2023, doi:10.1007/s13205-023-03781-y.

Manuscritos submetidos

DOS REIS, B.D.; **MIOTTI JR, R.H.**; NETO, A. B.; DE PAULA, A.V. “Artificial neural network simulation of structured lipid synthesis using immobilized lipase”.

PAZ, A.V.C; MUSSAGY, C.U; MESA, V; **MIOTTI JR, R.H.**; VALENZUELA, R.V; DE PAULA, A.V; MATÍNEZ-GALÁN, J.P. “Enzymatic synthesis of structured lipids from *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*) oil with capric acid via acidolysis reaction in stirred tank and packed bed mini reactors”.

Manuscritos em preparação.

MIOTTI JR, R.H.; FREITAS, A.N.; PRIMO, F. L.; DE PAULA, A.V. “Continuous Fixed-Bed Reactors for MLM-Type Structured Lipids Synthesis”.

MIOTTI JR, R.H.; FREITAS, A.N.; PEREIRA, J.F.B.; PRIMO, F. L.; DE PAULA, A.V. “MLM-Type Structured Lipids Synthesis in Recirculating Fluidized Bed Reactors”.

FREITAS, A.N.; **MIOTTI JR, R.H.**; REMONATTO, D.; DO NASCIMENTO, J. F.C.; EBINUMA, V. C. S.; DE PAULA, A.V. "Immobilization of Extracellular Lipase from *Aspergillus tubingensis* in a Packed-Bed Bioreactor: A Novel Approach".

Apêndice A - Coeficientes estimados, erros padrão, valores p e anova para a atividade hidrolítica do derivado imobilizado obtida pelo planejamento fatorial

Tabela 1 – Valores dos coeficientes estimados, seus erros padrão e os valores p correspondentes à atividade hidrolítica do derivado imobilizado, conforme obtidos pelo planejamento fatorial, estão apresentados.

Variáveis	Coeficiente	Erro padrão	T calculado	p -valor
Média	1770,12	53,99	32,78	0,0000
X ₁	18,22	23,38	0,77	0,4496
X ₁ ²	-324,55	33,74	-9,61	0,0000 ^a
X ₂	-470,92	23,38	-20,14	0,0000 ^a
X ₂ ²	-533,09	33,74	-15,79	0,0000 ^a
X ₁ · X ₂	-202,37	33,06	-6,12	0,0000 ^a

^a variável significativa (p < 0,05)

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) do modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada em partículas hidrofóbicas de Diaion™ HP-20.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p -valor
Regressão	6087446,3	5	1217489,27	139,19	0,0000
Resíduos	113710,2	13	8746,94		
Falta de Ajuste	95518,8	3	31839,58		0,00026
Erro Puro	18191,5	10	1819,14		
Total	6201156,6	18			
R ² = 98,17%					

Apêndice B - Coeficientes estimados, erros padrão, valores p para a o grau de incorporação do planejamento proposto por bassan e colaboradores

Tabela 1 – Valores de coeficientes estimados, erros padrão e valores p para o grau de incorporação seguindo o planejamento proposto por Bassan e colaboradores (2019) aplicando derivado imobilizado de lipase de *Rhizopus oryzae*.

Variáveis	Coeficiente	Erro padrão	T calculado	p -valor
Média	17,69	1,78	9,91	0,0001
X ₁	16,13	1,09	14,76	0,00002 ^a
X ₁ ²	8,21	1,30	6,31	0,00146 ^a
X ₂	-4,15	1,09	-3,80	0,01261 ^a
X ₂ ²	3,34	1,30	2,56	0,05019
X ₁ · X ₂	-0,94	1,54	-0,61	0,56577

^a variável significativa (p < 0,05)

APÊNDICE C - Coeficientes estimados, erros padrão, valores *p* para a o grau de incorporação do planejamento DCC proposto para o grau de incorporação

Tabela 1– Valores de coeficientes estimados, erros padrão e valores *p* para o grau de incorporação seguindo o planejamento DCC proposto para o grau de incorporação aplicando a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Diaion™ HP-20.

Variáveis	Coeficiente	Erro padrão	T calculado	<i>p</i> -valor
Média	36,80	0,45	80,94	0,0000
x ₁	14,85	0,60	24,69	0,0001 ^a
x ₂	-0,38	0,60	-0,63	0,5699
x ₁ .x ₂	3,15	0,60	5,24	0,01351 ^a

^a variável significativa ($p < 0,05$)

Apêndice D - Coeficientes estimados, erros padrão, valores p para a o grau de incorporação do planejamento DCCR proposto para otimização do grau de incorporação de ácido cáprico

Tabela 1 – Valores de coeficientes estimados, erros padrão e valores p para o grau de incorporação seguindo o planejamento DCCR proposto para otimização do grau de incorporação de ácido cáprico.

Variáveis	Coeficiente	Erro padrão	T calculado	p -valor
Média	55,16	1,38	39,71	0,0000 ^a
x_1	6,80	0,69	9,80	0,0000 ^a
x_1^2	-17,83	0,91	-19,41	0,0000 ^a
x_2	-8,21	0,69	-11,82	0,0000 ^a
x_2^2	-13,64	0,91	-14,84	0,0000 ^a
$x_1 \cdot x_2$	-5,79	0,98	-5,89	0,0000 ^a

^a variável significativa ($p < 0,05$)