



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LAÍS CÂNDIDO DA SILVA**

**ESTUDO SOBRE A MODIFICAÇÃO DO ÓLEO VEGETAL DE SOJA POR  
INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA COM A LIPASE Eversa TRANSFORM  
2.0 PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS**

**FORTALEZA**

**2026**

LAÍS CÂNDIDO DA SILVA

ESTUDO SOBRE A MODIFICAÇÃO DO ÓLEO VEGETAL DE SOJA POR  
INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA COM A LIPASE EVERSA TRANSFORM 2.0  
PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal Do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Sueli Rodrigues.

Coorientadora: Elaine Cristina Maciel Porto.

FORTALEZA

2026

LAÍS CÂNDIDO DA SILVA

ESTUDO SOBRE A MODIFICAÇÃO DO ÓLEO VEGETAL DE SOJA POR  
INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA COM A LIPASE EVERSA TRANSFORM 2.0  
PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal Do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado em: 20/02/2026.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Elaine Cristina Maciel Porto (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Dayana Pinto de Meneses  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”*

Marie Curie

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, à Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pelas condições institucionais que possibilitaram o desenvolvimento desta dissertação.

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

Agradeço ainda à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro concedido, fundamental para a execução do projeto de pesquisa.

Registro meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Profa. Dra. Sueli Rodrigues, pela orientação atenta, pelas contribuições intelectuais e pela disponibilidade ao longo de todas as etapas deste trabalho; e à minha coorientadora, Dra. Elaine Cristina Maciel Porto, pelo acompanhamento constante em todas as etapas experimentais deste trabalho, bem como na participação ativa do desenvolvimento teórico da pesquisa. Suas contribuições foram fundamentais para a condução da pesquisa e para o amadurecimento das discussões apresentadas nesta dissertação.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves e Dra. Dayana Pinto de Meneses, agradeço a avaliação crítica e as sugestões valiosas para uma melhor compreensão do trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes pelas contribuições diversas às metodologias empregadas no desenvolvimento da pesquisa e pela disponibilidade para esclarecimentos de complexidades inerentes ao projeto. À Dra. Dayanne Lara Holanda Maia pelo apoio técnico e contribuição no desenvolvimento experimental.

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) pela infraestrutura oferecida e a todos os seus integrantes, que me acolheram e tiveram a paciência para me guiar pelos caminhos experimentais.

Ao Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO) por disponibilizarem a enzima estudada neste trabalho, material essencial para a condução experimental, bem como pelo apoio de seus integrantes no esclarecimento e ensino dos processos iniciais de análise enzimática.

Agradeço aos meus colegas de turma, Carlos Eduardo, David, Hillydson, Mairlane, Mikaelly, Rebecca e Vítor pelas trocas de conhecimentos e convivência ao longo do período do mestrado.

Agradeço à minha família, minha mãe Lindalva, meu pai Francisco das Chagas, aos meus tios, e primos, Johnson, Cândido, Wendel e Jamilles, pelo apoio constante, pela compreensão e pelo incentivo ao longo dessa trajetória acadêmica.

Aos amigos, Maria Luiza, Vinícius, Fábio, Jadeh, Sarah, Alana, Fernanda e Richelma, agradeço pelo apoio emocional, pelas palavras de incentivo e pela presença nos momentos mais desafiadores.

Por fim, agradeço em especial ao meu noivo, Vítor Jucá Policarpo, pelo imenso apoio durante todo o período de mestrado, por me ajudar durante os trabalhos das disciplinas, por sempre me incentivar a continuar firme, por enxergar potencial nas minhas habilidades e por todo o apoio emocional e compreensão.

## RESUMO

Este trabalho consiste em um estudo sobre a utilização de enzima lipase Eversa Transform 2.0 na interesterificação do óleo vegetal de soja com o objetivo de promover um rearranjo das cadeias de ácidos na molécula de triacilglicerol, visando obter um lipídio estruturado para aplicação na indústria de alimentos *plant-based*. A composição de diferentes óleos vegetais com potencial para a formação de blends foi analisada. Entretanto, os testes iniciais de síntese foram realizados exclusivamente com óleo de soja, a fim de estabelecer e otimizar as condições reacionais. Assim, estudou-se o efeito da temperatura e da quantidade de enzima adicionada para a síntese por meio da análise de composição do óleo vegetal e produtos da síntese, bem como de sua conformação estrutural. A metodologia adotada para essas análises foi a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. As mudanças estruturais foram estudadas por meio da análise da posição sn-2 do triacilglicerol, utilizando a metodologia de hidrólise com lipase pancreática, enzima presente na pancreatina. Uma análise crítica de adaptações simplificadoras dessa metodologia também foi realizada a fim de determinar um caminho experimental mais reprodutível. Essas adaptações envolveram a retirada da etapa de cromatografia de camada delgada, a retirada dos sais biliares do sistema reacional e a utilização do hexano como solvente alternativo ao éter etílico. Os resultados para a análise crítica da metodologia de hidrólise com lipase pancreática foram favoráveis à manutenção da etapa de cromatografia de camada delgada na caracterização da posição sn-2 do triacilglicerol, dos sais biliares no meio reacional e do éter etílico como solvente de extração, embora a complexidade do método limita sua aplicação em uma grande matriz de experimentos. Os resultados das sínteses para 6 horas de reação foram mais favoráveis para as condições de 60 °C com 150 µL de enzima, 70 °C com 300 µL de enzima e 80 °C com 150 µL de enzima, que ofereceram aumentos de até 54% de ácidos graxos saturados na posição sn-2 em comparação com o óleo de soja puro. Os resultados contribuem para a definição de condições reacionais adequadas à interesterificação enzimática do óleo de soja com a enzima Eversa Transform 2.0 e para a validação da análise estrutural dos triacilgliceróis, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de lipídios estruturados com potencial aplicação em alimentos *plant-based*.

**Palavras-chave:** síntese enzimática; Eversa Transform 2.0; lipídio estruturado; óleo de soja.

## ABSTRACT

This work presents a study on the use of the lipase enzyme Eversa Transform 2.0 in the interesterification of soybean vegetable oil, aiming to promote a rearrangement of fatty acid chains within the triacylglycerol molecule in order to obtain a structured lipid for application in the plant-based food industry. The composition of different vegetable oils with potential for blend formation was analysed. However, the initial synthesis trials were carried out exclusively with soybean oil in order to establish and optimize the reaction conditions. Thus, the effects of temperature and enzyme loading on the synthesis were investigated through the analysis of the composition of the vegetable oil and the synthesis products, as well as their structural conformation. The methodology adopted for these analyses was gas chromatography coupled with mass spectrometry. Structural changes were evaluated through the analysis of the sn-2 position of triacylglycerols, using the pancreatic lipase hydrolysis methodology, an enzyme present in pancreatin. A critical analysis of simplifying adaptations to this methodology was also performed in order to determine a more reproducible experimental approach. These adaptations included the removal of the thin-layer chromatography step, the exclusion of bile salts from the reaction system, and the use of hexane as an alternative solvent to diethyl ether. The results of the critical analysis of the pancreatic lipase hydrolysis methodology supported the maintenance of the thin-layer chromatography step for the characterization of the sn-2 position of triacylglycerols, as well as the use of bile salts in the reaction medium and diethyl ether as the extraction solvent, although the complexity of the method limits its application to a large experimental matrix. The synthesis results after 6 hours of reaction were more favourable under the conditions of 60 °C with 150 µL of enzyme, 70 °C with 300 µL of enzyme, and 80 °C with 150 µL of enzyme, which led to increases of up to 54% in saturated fatty acids at the sn-2 position compared to pure soybean oil. These findings contribute to the establishment of suitable reaction conditions for the enzymatic interesterification of soybean oil using the Eversa Transform 2.0 enzyme and to the validation of the structural analysis of triacylglycerols, providing a basis for the development of structured lipids with potential applications in plant-based industry.

**Keywords:** enzymatic synthesis; Eversa Transform 2.0; structured lipid; soybean oil.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura de uma molécula de triacilglicerol. ....  | 14 |
| Figura 2 - Representação estrutural do Ácido Palmítico. ....   | 16 |
| Figura 3 - Representação estrutural do Ácido Oleico. ....  | 16 |
| Figura 4 - Fluxograma de etapas: síntese e análises. ....  | 28 |
| Figura 5 - Resumo Esquemático da Metodologia de Síntese 1. ....  | 30 |
| Figura 6 - Resumo Esquemático da Metodologia de Síntese 2. ....  | 31 |
| Figura 7 - Resumo Esquemático da Etapa de Hidrólise com Pancreatina. ....  | 33 |
| Figura 8 - Resumo Esquemático da Terceira Adaptação de Hidrólise com Pancreatina. ....   | 34 |
| Figura 9 - Resumo Esquemático da Etapa de Esterificação. ....  | 35 |
| Figura 10 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados na condição de 70 °C/300 µL na Metodologia de Síntese 2. ....   | 39 |
| Figura 11 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados para as amostras retiradas com 24 h na Metodologia de Síntese 1. ....   | 40 |
| Figura 12 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados para as amostras retiradas com 24 h na Metodologia de Síntese 2. ....   | 41 |
| Figura 13 - Comparativo entre as Metodologias de Sínteses 1 e 2. ....  | 41 |
| Figura 14 - Sistema reacional com pancreatina após adição de solvente (éter etílico). ....   | 42 |
| Figura 15 - Sistema reacional com pancreatina com e sem sais biliares após adição de solvente (hexano). ....   | 43 |
| Figura 16 - Placas de TLC após hidrólise com pancreatina com e sem sais biliares. a) Placa de TLC após extração com <b>Éter Etílico</b> ; b) Placa de TLC após extração com <b>Hexano</b> . .... | 44 |
| Figura 17 - Comparativo de proporção de ácidos graxos para as amostras de 6 h e protocolo de extração com éter etílico. ....   | 47 |
| Figura 18 - Comparativo de proporção de ácidos graxos para as amostras de 6 h e protocolo de extração com hexano. ....   | 48 |
| Figura 19 - Enzimas solicitadas e com atraso na entrega por parte do fornecedor. ....  | 56 |
| Figura 20 - E-mail resposta do fornecedor das enzimas com uma nova data para entrega apenas para 2027. ....  | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Óleos analisados no presente trabalho.....                             | 26 |
| Tabela 2 - Condições experimentais dos testes para a Etapa de Síntese. ....       | 29 |
| Tabela 3 - Composição geral de Ácidos Graxos dos Óleos analisados (parte 1). .... | 37 |
| Tabela 4 - Composição geral de Ácidos Graxos dos Óleos analisados (parte 2). .... | 37 |
| Tabela 5 - Protocolo TLC da extração com éter etílico e com sais biliares. ....   | 44 |
| Tabela 6 - Protocolo TLC da extração com éter etílico e sem sais biliares.....    | 45 |
| Tabela 7 - Protocolo TLC da extração com hexano e com sais biliares.....          | 45 |
| Tabela 8 - Protocolo TLC da extração com hexano e sem sais biliares. ....         | 46 |

## NOMENCLATURA

|                  |   |
|------------------|---|
| Abs              | Absorbância                             |
| $AG_{totais}$    | Ácidos Graxos totais                    |
| $AG_{sn-1 sn-3}$ | Ácidos Graxos das posições sn-1 ou sn-3 |
| $AG_{sn-2}$      | Ácidos Graxos da posição sn-2           |
| AT               | Atividade enzimática                    |
| D                | Fator de diluição                       |
| L                | Caminho óptico                          |
| GC/MS            | Gas Chromatography/Mass Spectrometry    |
| MAG              | Monoacilglicerol                        |
| MS               | Metodologia de Síntese                  |
| TLC              | Thin Layer Chromatography               |
| $V_e$            | Volume de enzima                        |
| $V_t$            | Volume total reacional                  |
| $\varepsilon$    | Coefficiente de extinção molar          |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Introdução .....   | 11 |
| 2     | Objetivo .....   | 13 |
| 3     | Revisão de Literatura.....   | 14 |
| 3.1   | Lipídios.....  | 14 |
| 3.1.1 | Triglicerídeos.....  | 14 |
| 3.1.2 | Ácidos Graxos .....  | 15 |
| 3.2   | Lipídios Estruturados.....   | 17 |
| 3.2.1 | Via Química.....   | 19 |
| 3.2.2 | Via Enzimática .....   | 19 |
| 3.2.3 | Interesterificação .....   | 23 |
| 3.3   | Métodos de análise de composição e conformação de triglicerídeos ..... | 23 |
| 4     | Materiais e métodos.....   | 26 |
| 4.1   | Materiais e Reagentes.....   | 26 |
| 4.2   | Métodos .....  | 27 |
| 4.2.1 | Atividade enzimática .....   | 27 |
| 4.2.2 | Fluxograma das etapas.....   | 28 |
| 4.2.3 | Síntese (Reação de Interesterificação).....                            | 29 |
| 4.2.4 | Pré-tratamento de amostras para análise no GC/MS .....                 | 31 |
| 4.2.5 | Metodologia do GC/MS .....   | 36 |
| 5     | Resultados.....  | 37 |
| 5.1   | Análise da composição dos óleos vegetais .....                         | 37 |
| 5.2   | Ensaio de Hidrólise com Pancreatina .....                              | 38 |
| 5.3   | Síntese (Reação de Interesterificação).....                            | 47 |
| 6     | Conclusão .....  | 50 |
|       | Referências .....  | 52 |
|       | ANEXO I – Enzimas solicitadas para desenvolvimento do projeto.....     | 56 |
|       | ANEXO II – E-mail com nova previsão de entrega para as enzimas.....    | 57 |

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um crescimento expressivo no mercado de alimentos *plant-based*, impulsionado pela crescente demanda por alternativas alimentares mais saudáveis, sustentáveis e éticas (Beacom; Bogue; Repar, 2021). Os alimentos *plant-based* têm origem vegetal e oferecem uma alternativa a produtos de origem animal, como carnes, laticínios e ovos. A principal diferença entre os alimentos de origem animal e os *plant-based* está na composição nutricional e na origem dos ingredientes. Os alimentos de origem animal contêm proteínas e lipídios específicos, como os ácidos graxos saturados, enquanto os alimentos *plant-based* buscam replicar essas características com fontes vegetais, como leguminosas, oleaginosas e grãos. (Hoek et al., 2011; Beacom; Bogue; Repar, 2021; Michel; Hartmann; Siegrist, 2021).

Grandes avanços tecnológicos na indústria desses alimentos já foram obtidos, principalmente em relação à mimetização da textura dos alimentos de origem animal. No entanto, outros fatores ainda necessitam de melhor desenvolvimento. É o caso de propriedades como aroma e sabor (Hoek et al., 2011).

Os lipídios desempenham um papel essencial no sabor e nas propriedades sensoriais dos alimentos de origem animal. Eles não apenas contribuem para a textura, como também são fundamentais para a liberação de compostos voláteis responsáveis pelo sabor característico dos alimentos (Shahidi; Hossain, 2022). As gorduras de origem animal, como as que estão presentes em carnes e laticínios, possuem um perfil lipídico com uma maior proporção de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, que conferem uma textura mais firme. Assim, o tipo e a concentração de lipídios são fatores essenciais para o sabor e o aroma desses alimentos (Shahidi; Hossain, 2022).

Em contraste, os óleos de origem vegetal, ricos em ácidos graxos insaturados, geralmente apresentam uma estrutura diferente, o que impacta a textura e o perfil sensorial (Belitz; Grosch; Schieberle, 2004). Embora os óleos vegetais possam oferecer benefícios nutricionais, como o fornecimento de ácidos graxos essenciais e a redução de gorduras saturadas, eles podem não ser suficientes para reproduzir a experiência sensorial oferecida pelas gorduras animais (Osborn; Akoh, 2002; Michel; Hartmann; Siegrist, 2021).

Neste contexto, os lipídios estruturados têm se destacado como uma ferramenta promissora para a indústria alimentícia (Hong et al., 2023). Esses lipídios resultam da modificação da estrutura dos ácidos graxos e são estudados para aplicação em diversas áreas de alimentos, incluindo para a produção de margarinas, de produtos de panificação e de alimentos

processados, sendo uma solução estratégica para aprimorar a qualidade dos alimentos *plant-based* e facilitar a transição para dietas mais sustentáveis, mantendo qualidades como o sabor ou a textura.

A produção de lipídios estruturados pode ser realizada por diferentes métodos, seguindo uma rota química ou enzimática, que permitem a formação de novos arranjos moleculares de ácidos graxos e, conseqüentemente, a criação de lipídios com propriedades físicas e sensoriais aprimoradas. As principais reações utilizadas na produção de lipídios estruturados incluem a esterificação, transesterificação e interesterificação. Essas reações podem ser promovidas por diferentes tipos de catalisadores, como catalisadores químicos e biocatalisadores, como as enzimas (Osborn; Akoh, 2002; Hong et al., 2023).

A utilização de enzimas como catalisadores na produção de lipídios estruturados tem ganhado destaque nos últimos anos. As enzimas oferecem uma série de benefícios sobre os catalisadores químicos tradicionais, incluindo maior especificidade, condições de reação mais brandas e menor impacto ambiental (Zhou et al., 2022). Dentre as enzimas aplicadas na produção de lipídios estruturados, as lipases são as mais utilizadas (Mandakar et al., 2025). Essas enzimas catalisam a hidrólise ou a transesterificação dos lipídios, permitindo a modificação de suas estruturas e a criação de novos produtos com propriedades físicas e sensoriais desejáveis.

O uso de lipases na modificação de lipídios estruturados oferece vantagens como maior seletividade e eficiência, o que possibilita a modificação de lipídios de maneira mais precisa, sem a necessidade de altas temperaturas (Fernandez-Lafuente, 2010; Mandakar et al., 2025).

Dessa forma, deseja-se explorar o potencial de utilização de uma lipase desenvolvida inicialmente para aplicação na produção de biodiesel como meio para o desenvolvimento de lipídios estruturados com propriedades sensoriais aprimoradas para a indústria de alimentos *plant-based*. Assim, pretende-se avaliar o rearranjo das cadeias de ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis catalisado pela enzima Eversa Transform 2.0, utilizando uma única fonte de triacilgliceróis, no caso, submeter à reação apenas um óleo vegetal, o óleo de soja.

## 2 OBJETIVO

Este trabalho busca promover um estudo sobre a atuação da enzima Eversa Transform 2.0 na interesterificação do óleo de soja, por meio de uma caracterização química por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, visando obter um lipídio estruturado com potencial aplicação na indústria de alimentos *plant-based*.

Almeja-se ainda com este trabalho:

- i. Avaliar diferentes condições experimentais para a síntese do lipídio estruturado a partir da interesterificação do óleo de soja catalisada pela enzima lipase Eversa Transform 2.0;
- ii. Estudar e determinar uma metodologia para análise conformacional das moléculas de triglicerídeos, a partir da metodologia desenvolvida por Luddy et al. (1964);
- iii. Caracterizar óleos vegetais de diferentes tipos e origens para utilização em blends com óleo de soja.
- iv. Caracterizar os produtos das sínteses a fim de determinar condições experimentais mais viáveis.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Lipídios

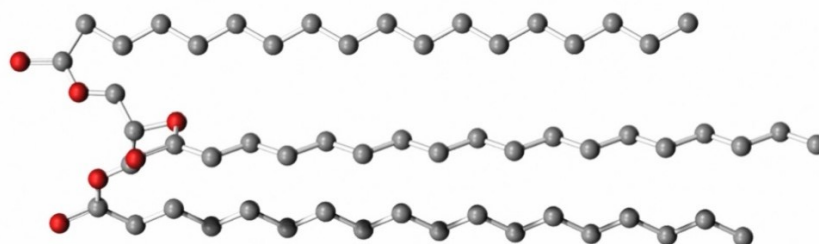
Os lipídios são biomoléculas que se destacam por possuírem hidrofobicidade, essa característica difere de outros grupos de moléculas, como as proteínas, por exemplo, que são caracterizadas por possuírem uma estrutura comum (Marques, 2014). A característica de baixa solubilidade dos lipídios em água permite que essas moléculas sejam mais facilmente separadas das proteínas e dos carboidratos, além disso, caracterizam-se por se solubilizarem em solventes orgânicos, como o hexano e clorofórmio. No entanto, mesmo não possuindo uma estrutura em comum, a maioria dos lipídios são derivados de ácidos graxos, como é o caso dos *acil* lipídios, dentre os quais os ácidos graxos aparecem como ésteres (Bobbio, 2003; Belitz; Grosch; Schieberle, 2004).

Os lipídios são denominados como gorduras, se estão em estado sólido, ou como óleos, se estão em estado líquido. No organismo animal, desempenham diversos papéis biológicos dentre estruturais e funcionais. Em termos estruturais, atuam como isolantes térmicos e constituintes das membranas celulares. Funcionalmente, atuam principalmente como reserva de energia, mas também como fontes de vitaminas e ácidos graxos essenciais (Mandakar et al., 2025).

#### 3.1.1 Triglicerídeos

Uma das classes mais abundantes de acil lipídios são os triacilgliceróis (ou triglicerídeos), que podem ser encontrados depositados em tecidos animais ou em órgãos de plantas. A estrutura da molécula de triacilglicerol pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura de uma molécula de triacilglicerol.



Fonte: Turbosquid, modelos 3D.

São constituídos por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos, formando um tri-éster. Os ácidos graxos podem ser iguais ou diferentes entre si, e a composição em termos de insaturação determinará se o triacilglicerol será sólido (uma gordura) ou líquido (um óleo) à temperatura ambiente. (Damodaran, 2019).

A composição e a conformação dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol são responsáveis por determinar várias das propriedades físico-químicas inerentes a essas substâncias. Algumas dessas propriedades que mais se destacam são o ponto de fusão e o polimorfismo. O ponto de fusão dos triacilgliceróis depende do empacotamento das moléculas, quanto maior o empacotamento e o tamanho da cadeia, maior será o ponto de fusão. Outras características que influenciam são: o grau de insaturação e a simetria nas cadeias de ácidos graxos; e a estabilidade polimórfica (Yang et al., 2024).

Uma propriedade importante apresentada pelos triacilgliceróis é o polimorfismo. Essa característica diz respeito à capacidade do triacilglicerol de se manifestar em diferentes formas de estrutura cristalina e empacotamento molecular. Existem três tipos principais de empacotamento das moléculas de triacilgliceróis, o hexagonal, o ortorrômbico e o triclinico, que são denominados como formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$ , respectivamente. A forma mais estável é a  $\beta$ , seguida pela forma  $\beta'$  e por último, a forma  $\alpha$ . No entanto, inicialmente, os triacilgliceróis costumam cristalizar na forma  $\alpha$ , devido à baixa energia de ativação, e depois assumem a forma mais estável, em uma taxa que depende das condições do meio onde estão inseridos (Damodaran, 2019; Yang et al., 2024).

O conhecimento sobre as formas polimórficas é de fundamental importância para o estudo das propriedades físico-químicas e sensoriais dos triacilgliceróis. Como visto anteriormente, o ponto de fusão é diretamente influenciado pela conformação das moléculas, adquirindo um valor mais elevado conforme o aumento da estabilidade da forma polimórfica. Em se tratando de propriedades sensoriais, a textura e a aparência de alguns alimentos dependem da manutenção dos cristais de gordura em uma forma polimórfica específica, como é o caso das margarinas, onde deseja-se, preferencialmente, que os lipídios estejam na forma  $\beta'$ , pois esta forma gera cristais menores e de textura mais macia, ao contrário da forma  $\beta$ , que gera cristais maiores e de textura arenosa (Shahidi; Hossain, 2022; Yang et al., 2024).

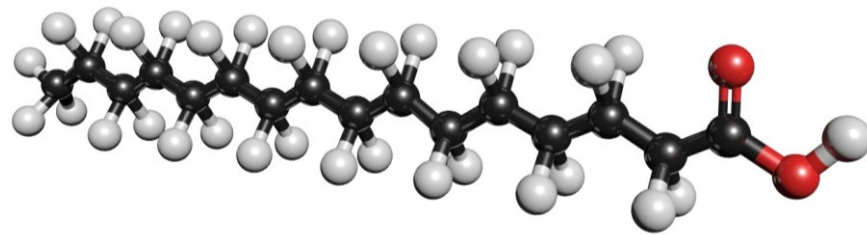
### 3.1.2 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são um dos principais componentes dos lipídios. Pertencem à família dos ácidos carboxílicos, sendo formados por uma cadeia carbônica que apresenta uma

carboxila: uma molécula de carbono ligada a um átomo de oxigênio e a uma hidroxila. Essa conformação confere aos ácidos graxos a característica de serem anfipáticos, ou seja, possuem uma região apolar, devido à cadeia carbônica, e outra região polar, devido à hidroxila (-OH) (Marques, 2014).

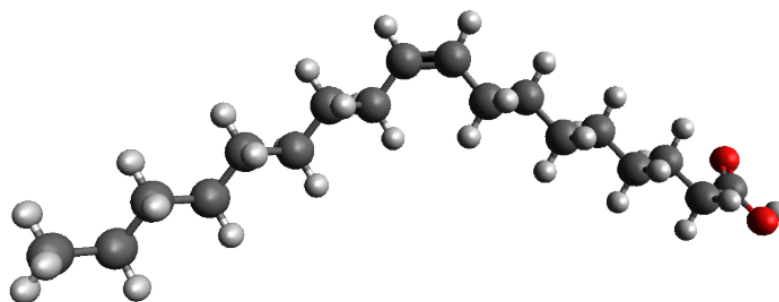
Podem ser categorizados de diversas formas, como por exemplo, em relação ao número de carbonos, ao tamanho da cadeia, quanto a posição das duplas ligações, entre outras formas. Ácidos graxos com número de carbonos pares são mais abundantes na natureza, enquanto ácidos graxos com número ímpar de carbonos são mais difíceis de serem encontrados, aparecendo apenas em traços em alimentos (Rustan; Drevon, 2005; Coniglio; Shumskaya; Vassiliou, 2023). No entanto, são divididos principalmente em relação à existência ou não de insaturações em sua cadeia, ou seja, ácidos graxos saturados, representado pelo ácido palmítico na Figura 2, e insaturados, representado pelo ácido oleico na Figura 3 (Rustan; Drevon, 2005).

Figura 2 - Representação estrutural do Ácido Palmítico.



Fonte: Free 3d, modelos 3D.

Figura 3 - Representação estrutural do Ácido Oleico.



Fonte: TodaCiência, Lipídios Cis e Trans.

Os ácidos graxos saturados possuem cadeia carbônica com ligações simples, sem insaturações, ou seja, não apresentam duplas ligações. São mais frequentemente encontrados em lipídios de origem animal, mas também podem ter origem vegetal. Os ácidos graxos

saturados de cadeias curtas (<14 carbonos) são encontrados na gordura do leite, no óleo de coco e em sementes de palmeira. Já ácidos graxos de cadeias longas (>18 carbonos) podem ocorrer tanto em legumes e alimentos de origem animal (Rustan; Drevon, 2005; Coniglio; Shumskaya; Vassiliou, 2023). As cadeias alifáticas dos ácidos graxos saturados são extremamente ordenadas, o que resulta em uma conformação mais rígida e confere às gorduras o estado sólido. Outra importante característica resultante dessa conformação mais rígida, é o ponto de fusão, que é mais elevado para essa classe de ácidos graxos (Yang et al., 2024).

Os ácidos graxos insaturados, por sua vez, possuem insaturações em sua cadeia carbônica. São mais abundantes que os ácidos graxos saturados e mais facilmente encontrados em óleos de origem vegetal. Devido à insaturação, as cadeias não são ordenadas, de forma que são também menos rígidas. Assim os óleos que possuem uma composição majoritária de ácidos graxos insaturados são encontrados em estado líquido e possuem ponto de fusão menor em comparação às gorduras de composição majoritária de ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos insaturados podem ser classificados quanto ao número de insaturações, são monoinsaturados se possuem apenas uma dupla ligação na cadeia e são poli-insaturados se possuem duas ou mais duplas ligações (Bobbio, 2003; Coniglio; Shumskaya; Vassiliou, 2023).

Quando se fala da conformação dos ácidos graxos na molécula do triacilglicerol, um mesmo conjunto de ácidos graxos saturados e insaturados podem resultar em texturas e propriedades físico-químicas diferentes dependendo da posição em que apareçam na molécula. Garcés et al. (2023), em seu trabalho sobre a determinação de isômeros de triacilgliceróis com dois ácidos graxos saturados, aborda, por exemplo, que uma composição com dois ácidos graxos palmíticos (saturados) e um ácido graxo oleico (insaturado) distribuídos de forma assimétrica, ou seja, Saturado-Saturado-Insaturado ou Insaturado-Saturado-Saturado, possui um ponto de fusão mais elevado e é mais suscetível a cristalizar na forma  $\beta'$  do que as gorduras que possuem a forma simétrica, Saturado-Insaturado-Saturado.

### ***3.2 Lipídios Estruturados***

Os lipídios são muitas vezes associados como precursores de problemas de saúde, principalmente quando há acúmulo de gordura no tecido adiposo. Isso se deve ao alto teor de calorias que carregam, o que pode gerar questões como o aumento de colesterol ou até mesmo doenças como hipertensão e diabetes (Zhou et al., 2022; Hong et al., 2023).

Devido à composição em ácidos graxos, alguns triacilgliceróis podem ser mais facilmente absorvidos. Cadeias curtas e médias de ácidos graxos são menos calóricas e mais

facilmente absorvidas, no entanto, são menos abundantes. Os ácidos graxos de cadeias longas são mais fáceis de serem encontrados em óleos e gorduras, mas a absorção no corpo é pior e são mais calóricos.

Alguns desses ácidos graxos de cadeia longa, no entanto, são considerados essenciais, como por exemplo os ácidos graxos linoleico (ômega-3) e linolênico (ômega-6). Esses ácidos adquirem essa denominação pois desempenham funções benéficas no organismo, mas não podem ser sintetizados no corpo. São encontrados em maior abundância em óleos vegetais e óleos marinhos (Zhou et al., 2022; Coniglio; Shumskaya; Vassiliou, 2023).

Visto que os lipídios apresentam propriedades benéficas, como fonte de energia ou fonte de ácidos essenciais, mas também podem oferecer malefícios devido ao acúmulo de gordura, estudos vêm sendo realizados na tentativa de gerar lipídios com propriedades funcionais. Estes são conhecidos como lipídios estruturados (Zhou et al., 2022).

Os lipídios estruturados são óleos modificados quimicamente para obterem propriedades funcionais, seja promovendo uma redução calórica seja aumentando a fonte de ácidos graxos essenciais, entre outras propriedades. Essencialmente, os lipídios estruturados são óleos que têm sua configuração e composição de ácidos graxos alterada e assim, suas propriedades físico-químicas também sofrem alteração (Osborn; Akoh, 2002; Zhou et al., 2022).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos para o desenvolvimento de lipídios estruturados. Grandes avanços já foram reportados, como a produção de lipídios com maior percentual de ácidos graxos de cadeia média, a incorporação de ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), que são ácidos graxos polinsaturados importantes para o desenvolvimento do feto, e ainda o desenvolvimento de lipídios com mesma composição em ácidos graxos que o leite humano, para aplicação em alimentação infantil (Fernandez-Lafuente, 2010; Zhou et al., 2022; Hong et al., 2023).

Muito embora esses avanços sejam reportados, a produção em escala industrial de lipídios estruturados ainda não é uma realidade. Um dos motivos para que não seja possível a produção em larga escala, é devido aos custos inerentes à produção (Zhou et al., 2022).

Os lipídios estruturados podem ser obtidos por via química, enzimática ou genética, mas os métodos mais comuns são os dois primeiros.

### 3.2.1 Via Química

A rota química é a mais utilizada para modificação de lipídios e consiste na utilização de um catalisador químico inorgânico, como o metóxido de sódio, durante o processo reacional. Na síntese dos lipídios estruturados, o catalisador age rearranjando as cadeias de ácidos graxos de forma randomizada (Vieira, 2018).

Esse método é mais econômico, pois os catalisadores químicos possuem menor custo em comparação às enzimas. Outra vantagem da via química é a produção mais simplificada e rápida (Vieira, 2018).

No entanto, apresenta algumas desvantagens para a produção de alimentos, como um maior risco de contaminação, o que acaba por exigir um maior número de etapas para garantir a purificação do produto. Além disso, devido à necessidade de se utilizar altas temperaturas na reação, tem-se que os reagentes podem ser degradados na reação e o gasto energético para manter a temperatura também é maior. Uma outra desvantagem é a não especificidade dos catalisadores químicos, o que limita a influência na distribuição posicional dos ácidos graxos do produto formado (Osborn; Akoh, 2002; Zhou et al. 2022; Mandakar et al., 2025).

### 3.2.2 Via Enzimática

Uma alternativa para modificação de lipídios que tem ganhado destaque nos últimos anos é a rota enzimática. A produção pela via enzimática possui diversas vantagens em relação à química. Uma dessas grandes vantagens é o fato das enzimas serem catalisadores mais específicos, o que permite um maior controle sobre o produto que será obtido da reação. Essa especificidade não é encontrada em catalisadores químicos, que produzem produtos randomizados (Sivakanthan; Madhujith, 2020; Zhou et al., 2022).

Outra vantagem em se utilizar enzimas como catalisadores é a melhora no gasto energético. Por necessitarem de uma menor temperatura de reação, o processo reacional demanda menos energia e permite que os reagentes não sejam submetidos a condições extremas, que poderiam ocasionar a degradação dos materiais (Fernandez-Lafuente, 2010; Sivakanthan; Madhujith, 2020).

Além disso, as enzimas oferecem um menor risco de contaminação e são menos poluentes que os catalisadores químicos, consagrando-se, então, como uma rota mais benéfica ao meio ambiente. A grande desvantagem da utilização das enzimas é seu alto custo, o que

dificulta o crescimento de seu uso em grande escala (Fernandez-Lafuente, 2010; Zhou et al., 2022; Hong et al., 2023; Mandakar et al., 2025).

### 3.2.2.1 *Lipases*

As lipases, conhecidas também como EC 3.1.1.3 triacilglicerol acil-hidrolase, pertencem à família das hidrolases e agem apenas na interface óleo-água (Monteiro et al., 2021). Atuam na hidrólise dos triacilgliceróis formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Kim; Hwang; Akoh, 2023).

Em um meio microaquoso, onde a umidade é mantida em menos de 1%, as lipases podem catalisar reações de reestruturação de lipídios, nesse caso, atuam na direção da esterificação e não da hidrólise do lipídio. As reações que podem ser catalisadas pela lipase nessas condições são conhecidas como acidólise, alcoólise, interesterificação, transesterificação ou esterificação, a depender dos substratos presentes na reação (Fernandez-Lafuente, 2010; Zhang et al, 2024).

Em comparação com outras enzimas, as lipases se destacam por apresentarem alta seletividade, especificidade, por reconhecerem uma grande variedade de substratos, o que permite seu uso como catalisador em diversas reações, e por apresentarem maior estabilidade quando em condições adversas, como em presença de solventes orgânicos. Por esses fatores, as lipases são os tipos de enzimas mais aplicadas na produção de lipídios estruturados (Monteiro et al., 2021; Zhou et al., 2022; Zhang et al, 2024).

Uma importante característica presente nessas enzimas é a presença de uma cadeia de polipeptídeos que separa seu sítio ativo do meio externo. Essa cadeia funciona como uma “tampa” e pode apresentar diferentes tamanhos, a depender a origem da lipase. Quando submetida a um meio hidrofóbico, como por exemplo um óleo, a cadeia de polipeptídeos se move para permitir que essa superfície hidrofóbica interaja com a região hidrofóbica da enzima, de forma a expor do sítio ativo da enzima para o meio reacional (Fernandez-Lafuente, 2010; Zhang et al., 2024). O sítio ativo é o local onde efetivamente ocorrem as transformações, para algumas enzimas é denominado como uma tríade catalítica, e para as lipases essa tríade é a GLU(ASP) - SER - HIS (Damodaran, 2019).

A seletividade das lipases pode se manifestar de diversas formas. Pode ocorrer por exemplo, em relação ao tamanho do triacilglicerol (mono, di ou triacilglicerol) ou à posição (sn) dos ácidos graxos no esqueleto do glicerol. Em relação à essa característica, dois grupos principais são formados: as lipases específicas e as não-específicas.

As lipases específicas atuam nas regiões *sn-1,3* do triacilglicerol, alguns exemplos são as lipases de *Aspergillus niger*, que possuem também preferência por ácidos graxos de cadeia curta, as de *Rhizomucor miehei*, as de *Aspergillus oryzae* e a lipase pancreática, esta última possuindo especificidade estrita para essas posições.

As lipases não-específicas não possuem preferência em relação à posição, podendo atuar nas três posições do triacilglicerol. Alguns exemplos são as lipases de *Candida rugosa*, de *Geotricum candidum* e de *Pseudomonas spp.* Há ainda tipos raros de seletividade, como por exemplo a lipase de *Candida antarctica* forma A, que é específica para a região *sn-2* (Monteiro et al., 2021; Hong et al., 2023; Zhang et al., 2024).

#### 3.2.2.1.1 Lipases de *Thermomyces lanuginosus*

As lipases produzidas pelo fungo filamentoso *Thermomyces lanuginosus* (TLL) estão entre as enzimas mais amplamente utilizadas e estudadas na biocatálise industrial, principalmente devido à sua elevada termoestabilidade e à alta atividade catalítica. Por ter origem em um microrganismo termofílico, essas enzimas possuem uma resistência superior a temperaturas elevadas, característica de grande interesse para aplicação industrial. Entre as principais atribuições dessas lipases, destaca-se a utilização em reações de hidrólise e síntese de ésteres, tanto em meios aquosos quanto em não aquosos (Fernandez-Lafuente, 2010; Monteiro et al., 2021; Kim; Hwang; Akoh, 2023).

Duas formulações comerciais relevantes dessa lipase são a Lipozyme TL e a Eversa, produzidas pela empresa Novozymes. A Lipozyme TL encontra-se na forma solúvel (livre) ou imobilizada. A Eversa é comercializada na forma solúvel, embora estudos sejam realizados acerca de sua imobilização (Monteiro et al., 2021).

A linha Eversa representa uma geração mais recente de formulações baseadas na lipase de *T. lanuginosus*, incluindo produtos como Eversa Transform e Eversa Transform 2.0. A preparação líquida dessa enzima é obtida a partir da inserção do gene da TLL no microrganismo *Aspergillus oryzae*. Por meio dessa modificação genética, a produção industrial se torna mais econômica, o que permite a obtenção de uma enzima de menor custo. A Eversa Transform 2.0, evolução da Eversa Transform, também apresenta desempenho aprimorado em termos de termoestabilidade e tolerância a solventes como metanol, o que justifica seu uso na produção de biodiesel (Monteiro et al., 2021; Kim; Hwang; Akoh, 2023).

Diversas são as aplicações industriais das lipases de *T. lanuginosus*. Uma das principais é a produção de biodiesel, onde essas enzimas atuam catalisando a transesterificação de óleos

e gorduras, permitindo a conversão de triglicérides em ésteres de ácidos graxos e glicerina. Na indústria de alimentos, essas lipases são empregadas na modificação de óleos e gorduras para diversos fins como: produção de mono e diacilgliceróis utilizados como emulsificantes; otimização de propriedades físico-químicas através de reações de interesterificação; e síntese de aromas através da formação de ésteres de baixo peso molecular. Essas enzimas podem ainda ser aplicadas na indústria farmacêutica, onde são valorizadas pela característica da estereosseletividade (Monteiro et al., 2021; Kim; Hwang; Akoh, 2023; Mandakar et al., 2025).

### *3.2.2.2 Parâmetros que influenciam a atividade enzimática*

O controle de alguns parâmetros do meio reacional se mostra de fundamental importância para garantir uma boa atividade enzimática. Os principais parâmetros de interesse são a temperatura, o pH e a atividade de água.

As enzimas apresentam atividade catalítica em uma faixa de pH ótimo. Cada tipo de enzima terá sua própria faixa de funcionamento, para as lipases essa faixa é entre 5,0 e 7,0. A sensibilidade em relação ao pH se deve a dois fatores, o primeiro seria porque pode acarretar uma mudança na estrutura da proteína, ocasionando a inativação da enzima; o segundo seria por conta da dependência da atividade catalítica com a quantidade de cargas eletrostáticas na região dos sítios ativos da enzima (Belitz, 2004).

A temperatura para a atividade enzimática desempenha um papel importante, pois interfere na velocidade de reação. O aumento da temperatura aumenta a velocidade da reação, mas acarreta uma queda na estabilidade proteica. As enzimas possuem uma faixa de temperatura ótima de operação, que varia para cada tipo de enzima, mas é menor que a temperatura necessária para o processo com catalisadores químicos. Para as lipases, a faixa de temperatura ótima é entre 30°C e 60°C. Caso a temperatura ultrapasse o valor ótimo, ocorre a desnaturação da enzima e elas perdem a atividade enzimática. Para uma temperatura abaixo da faixa ótima, as enzimas podem perder a estabilidade e até sofrerem inativação (Belitz, 2004; Damodaran, 2019).

A influência da água se dá em vários fatores e o controle do teor de água disponível tem um papel importante na conservação de alimentos. Essencialmente, a água afeta a atividade e estabilidade da enzima, pois interfere na taxa de reação a depender do papel que assume no meio reacional. Essas funções variam entre servir como meio para difusão, servir como cossustratos em reações hidrolíticas, controlar a diluição dos solutos e estabilizar a enzima (Damodaran, 2019).

Quando se trata das reações de triacilgliceróis catalisadas por lipases, o teor de água atua diretamente no tipo de reação que irá se obter. Em presença de água, a enzima atuará na hidrólise dos lipídios, formando ácidos graxos livres e glicerol. Em um teor baixo de água, a enzima atuará em reações de reestruturação das moléculas dos triacilgliceróis (Belitz, 2004; Damodaran, 2019).

### **3.2.3 Interesterificação**

A formação de lipídios estruturados se dá por reações de interesterificação, de acidólise, de alcoólise, de transesterificação ou de esterificação (Monteiro et al., 2021).

A interesterificação é uma rota de reação com apenas um substrato triacilglicerol. Nesse caso, a enzima atua rearranjando os ácidos graxos presentes na própria molécula, alterando suas posições entre as regiões sn-1, 2 e 3. Na acidólise, o triacilglicerol irá reagir com ácidos graxos livres. Essas cadeias livres serão incorporadas ao esqueleto de glicerol, formando uma nova molécula de triacilglicerol e liberando novos ácidos graxos. Na alcoólise, a reação se dá entre o triacilglicerol e um álcool e forma um triacilglicerol com uma nova composição de ácidos graxos e álcool. A transesterificação não se diferencia muito das reações anteriores e é caracterizada pela reação entre dois ésteres, no caso, duas moléculas de triacilgliceróis reagem formando novas moléculas de triacilgliceróis, com uma configuração diferente de ácidos graxos. Já a esterificação é uma reação que promove a produção de um triacilglicerol, ou seja, é uma reação entre o glicerol e ácidos graxo (Fernandez-Lafuente, 2010; Monteiro et al., 2021).

No presente trabalho, serão estudadas reações de interesterificação para a produção de lipídios estruturados, analisando o rearranjo das cadeias de ácidos graxos na molécula de triacilglicerol.

### ***3.3 Métodos de análise de composição e conformação de triglicerídeos***

Ao longo dos últimos anos, diversas metodologias de análise de composição foram desenvolvidas e estudadas. Em se tratando da composição de lipídios, observa-se um avanço em técnicas como cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. Análises mais específicas, como as conformacionais, ou seja, as que estudam a conformação e posição dos ácidos graxos nas moléculas de triglicerídeos, são mais complexas e objeto de estudo ainda nos tempos atuais.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa tem sido uma das metodologias mais exploradas nos últimos tempos (Garcés et al., 2023). O método consiste em uma técnica analítica de elevada sensibilidade e seletividade, aplicada na separação, identificação e quantificação de compostos voláteis e semivoláteis presentes em matrizes complexas.

Na etapa cromatográfica, a separação dos componentes ocorre em função de suas interações específicas com a fase estacionária da coluna capilar e de sua volatilidade. A amostra é inicialmente vaporizada em um injetor aquecido e conduzida por um gás de arraste, normalmente hélio ou nitrogênio. Analitos com menor ponto de ebulição ou menor afinidade pela fase estacionária percorrem a coluna em menor tempo, o que acarreta tempos de retenção reduzidos, enquanto compostos mais pesados ou com maior interação com a fase estacionária exibem tempos de retenção mais elevados. Para garantir que as espécies sejam vaporizadas sem degradação, pode-se ser necessário uma etapa de preparação por meio de derivatização (Nascimento et al., 2018; Ali, 2025).

A espectrometria de massas fornece informações estruturais para a identificação dos analitos. Após a eluição na coluna cromatográfica, as moléculas são introduzidas na fonte de ionização, sendo o impacto de elétrons (IE) o método mais comumente utilizado. Nesse processo, elétrons de alta energia removem um elétron da molécula neutra, gerando um íon molecular em estado excitado, o qual pode sofrer fragmentações subsequentes. O padrão de fragmentação resultante é altamente reprodutível e característico de cada composto. Os íons produzidos são separados em um analisador de massas e registrados no detector, originando espectros de massas que apresentam a abundância relativa dos fragmentos em função de seus valores de massa/carga (Ali, 2025).

O acoplamento entre cromatografia gasosa e espectrometria de massas é viabilizado por uma interface que assegura a transferência eficiente dos analitos da coluna, operando à pressão próxima da atmosférica, para o espectômetro, que funciona sob alto vácuo. O resultado consiste em um cromatograma onde cada pico corresponde a um composto individualmente separado, associado ao respectivo espectro de massas produzido no momento de sua eluição. A identificação dos componentes pode ser realizada por meio de comparação dos tempos de retenção com padrões analisados nas mesmas condições experimentais e, também, por comparação com espectros obtidos com bibliotecas como NIST ou Wiley (Nascimento et al., 2018).

Em se tratando da análise conformacional, uma das metodologias mais difundidas é a hidrólise do triglicerídeo utilizando a lipase pancreática. Essa metodologia é utilizada para

análise da posição sn-2 do triacilglicerol. A lipase pancreática é uma enzima específica para as posições sn-1 e sn-3 da molécula de triacilglicerol, de forma que durante a reação de hidrólise ela age liberando os ácidos graxos presentes nessas duas posições e gera um 2-monoacilglicerol. Luddy et al., em 1964, desenvolveu uma metodologia mais enxuta, com uma menor quantidade de reagentes, para avaliar essa reação.

O método utiliza a pancreatina como fonte da lipase pancreática, e, a partir de composições conhecidas de triglicerídeos (Ex.: um triacilglicerol produzido com ácido graxo palmítico nas posições sn-1 e sn-3 e ácido graxo oleico na posição sn-2), testa se uma redução de reagentes, 9,0 mg e 0,9 mg de pancreatina, ainda permite a obtenção de resultados confiáveis. Com acurácias de 95-98%, o método foi eficaz na identificação correta dos ácidos presentes na posição sn-2 das moléculas de triglicerídeos. Esse método pode ser dividido em algumas etapas, sendo a primeira a etapa da reação, onde a pancreatina é adicionada a um meio contendo tampão TRIS com pH 8,0, cloreto de cálcio, sais biliares e a amostra de triglicerídeo, à uma temperatura de 40 °C. Logo após, a mistura é agitada por 1 a 2 minutos, pois esse tempo é suficiente para se obter 50% de hidrólise e utiliza-se um ácido para interromper a reação (Luddy et al., 1964).

Segue-se, então para a etapa de extração, onde se utiliza um solvente para extrair os produtos da reação e depois para a cromatografia líquida de camada delgada (TLC), que irá separar em uma placa de sílica os componentes da reação em 2-monoacilglicerois, diglicerídeos, ácidos graxos livres e triglicerídeos não reagidos. O ponto de 2-monoacilglicerol é, então, marcado e recolhido para ser preparado para análise por cromatografia gasosa.

Ao se obter a composição e proporção dos ácidos que ocupam a posição sn-2, calcula-se e obtém-se os ácidos que ocupam as outras duas posições, muito embora não seja possível identificar separadamente o que está na posição sn-1 ou sn-3.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e Reagentes

Conforme identificado na Tabela 1, os óleos utilizados foram: óleo de Abacate, óleo de Abóbora, óleo de Amêndoa Doce, óleo de Amendoim, óleo de Cártamo, óleo de Castanha-do-Pará, óleo de chia, óleo de Linhaça Dourada, óleo de Linhaça Marrom, óleo de Macadâmia, todos esses da marca Pazze, Rio Grande do Sul, Brasil; e o óleo de Soja, da marca Soya, da Bunge Alimentos S.A.

Tabela 1 - Óleos analisados no presente trabalho.

| Óleos Analisados | Marca |
|------------------|-------|
| Abacate          | Pazze |
| Abóbora          |       |
| Amêndoa doce     |       |
| Amendoim         |       |
| Cártamo          |       |
| Castanha-do-Pará |       |
| Chia             |       |
| Linhaça dourada  |       |
| Linhaça marrom   |       |
| Macadâmia        |       |
| Soja             | Soya  |

Fonte: Autora.

Para a etapa de síntese, o biocatalisador utilizado foi a lipase Eversa Transform 2.0, lipase produzida de *Aspergillus oryzae* (SAE0065), da Sigma-Aldrich; e o substrato utilizado para a medição da atividade enzimática foi o p-nitrofenil butirato (p-NPB), da Sigma-Aldrich.

Para a hidrólise dos óleos vegetais e produtos das sínteses, utilizou-se a enzima pancreatina de pâncreas suíno 8 x USP (SLCQ9805), da Sigma-Aldrich. Outros reagentes e soluções utilizados nessa etapa foram Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Sais Biliares, TRIS, da Roche Diagnostics GmbH, Alemanha; Ácido Clorídrico P.A ACS., da Synth; Éter Etílico (Dietílico) P.A. ACS, da Vetec Química Fina. O produto da hidrólise foi revelado por Cromatografia de Camada Delgada (TLC) através de placas de sílica (sílica gel 60800 – 20EA), com revelação por vapor de iodo.

Na etapa de esterificação, utilizou-se os reagentes: Hidróxido de Potássio (KOH) 85% P.A., da Vetec Química Fina; Álcool Metílico (Metanol) P.A. A.C.S, da Synth; e Hexano P.A.

ACS, da Synth. Foram submetidos a essa etapa os óleos vegetais citados anteriormente e os produtos das sínteses com óleo de soja.

Os produtos da hidrólise e da esterificação foram caracterizados por meio de um aparelho de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de Massa.

## 4.2 Métodos

A metodologia adotada no presente trabalho foi dividida em 3 etapas: síntese, pré-tratamento para análise e caracterização por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry – GC/MS*). A etapa de síntese corresponde reação de interesterificação, na qual espera-se que a enzima atue rearranjando as cadeias de ácidos graxos na molécula de triglicerídeo do óleo vegetal.

O pré-tratamento das amostras para análise consiste em dois ensaios: a hidrólise com pancreatina para formação de 2-monoacilgliceróis, reação necessária para a análise conformacional da posição sn-2; e a esterificação ou metilação, etapa de preparação das amostras para a análise no GC/MS, onde os ácidos graxos presentes no triglicerídeo são transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos.

Por fim, a composição e quantificação dos ácidos graxos nos óleos vegetais e produtos das sínteses foram analisados por meio da Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas.

### 4.2.1 Atividade enzimática

O ensaio de atividade da lipase ocorreu de acordo com metodologia de Arana-Peña et al. (2020), com algumas adaptações. Em uma cubeta de 1,5 mL, adicionou-se 1,44 mL de tampão Fosfato 25 Mm e pH 7,0, 30 µL de substrato p-NPB 25 mM em acetonitrila e 30 µL da enzima. A cubeta foi levada para medir absorvância em espectrômetro (Espectrofotômetro UV Evolution 220, da Thermo Scientific) a 348 nm por um período de 90 s. Algumas diluições foram testadas até que a curva de absorvância resultasse em uma reta. O cálculo da atividade foi realizado com a seguinte equação:

$$AT (U/mL) = \frac{Abs * V_t * D}{\epsilon * L * V_e} \quad (1)$$

Onde: Abs – Absorvância: 0,673 min<sup>-1</sup>

V<sub>t</sub> – Volume total reacional: 1,5 mL

D – Fator de diluição: 500

$\epsilon$  – Coeficiente de extinção molar: 5,15 mL/  $\mu$ mol.cm

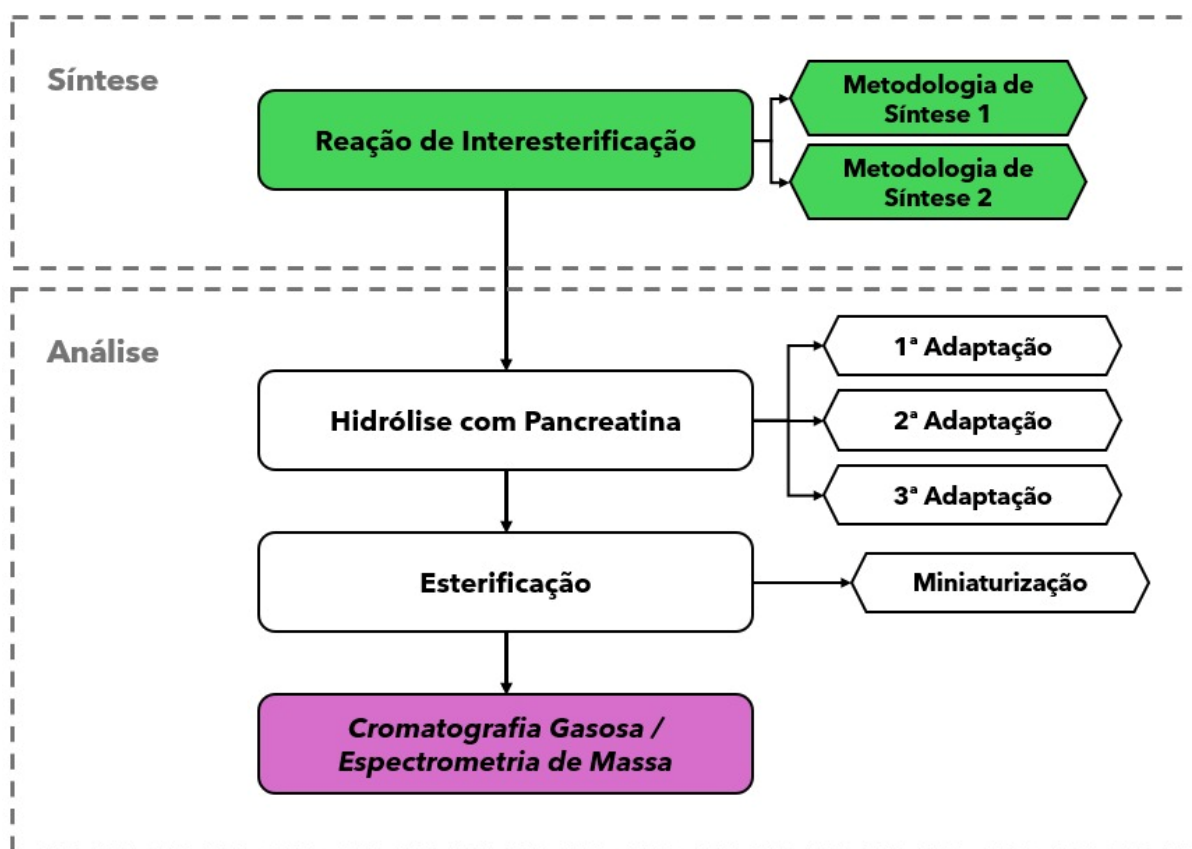
L – Caminho óptico: 1 cm

$V_e$  – Volume de enzima: 0,03  $\mu$ L

#### 4.2.2 Fluxograma das etapas

O fluxograma apresentado na Figura 4 resume o processo para melhor visualização das etapas.

Figura 4 - Fluxograma de etapas: síntese e análises.



Fonte: Autora.

### 4.2.3 Síntese (Reação de Interesterificação)

A reação principal de síntese de óleo vegetal estruturado ocorreu inicialmente apenas com óleo vegetal de soja e a enzima lipase Eversa Transform 2.0, seguindo duas metodologias de síntese.

A adição da enzima foi administrada com cautela, visto que por estar na forma livre, uma grande quantidade de enzima poderia acarretar uma adição de água indesejada ao processo, pois a água poderia favorecer a hidrólise em detrimento da interesterificação (Karabulut et al., 2007). Para este trabalho, decidiu-se realizar testes preliminares com uma quantidade de enzima até aproximadamente 6% do volume total de reação, visto que atividade se mostrou favorável a testes com um valor reduzido, mas ainda condizentes com a literatura (Martínez-Sanchez et al., 2020; Chang; Chan; Song, 2021; Dhiman et al., 2024).

A simulação de condições experimentais realizada como uma etapa prévia à experimental determinou uma faixa teste de temperaturas de 50 °C a 80 °C. Realizou-se testes para verificar a quantidade de enzima mais favorável bem como a temperatura ótima para a reação. Assim, quatro condições de temperatura foram testadas: 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C; e quatro quantidades de enzima: 100 µL, 150 µL, 300 µL e 450 µL.

Um resumo das condições operacionais dos testes realizados (temperatura e quantidade de enzima), em cada síntese, pode ser observado na Tabela 2. Os testes 5, 6 e 7 foram realizados em triplicata.

Tabela 2 - Condições experimentais dos testes para a Etapa de Síntese.

| Teste | Temperatura (°C) | Quantidade de Enzima (µL) | MS |
|-------|------------------|---------------------------|----|
| 1     | 50               | 100                       | 1  |
| 2     | 50               | 300                       | 1  |
| 3     | 70               | 100                       | 1  |
| 4     | 70               | 300                       | 1  |
| 5     | 70               | 300                       | 2  |
| 6     | 60               | 150                       | 1  |
| 7     | 60               | 150                       | 2  |
| 8     | 60               | 450                       | 1  |
| 9     | 60               | 450                       | 2  |
| 10    | 80               | 150                       | 2  |
| 11    | 80               | 450                       | 2  |

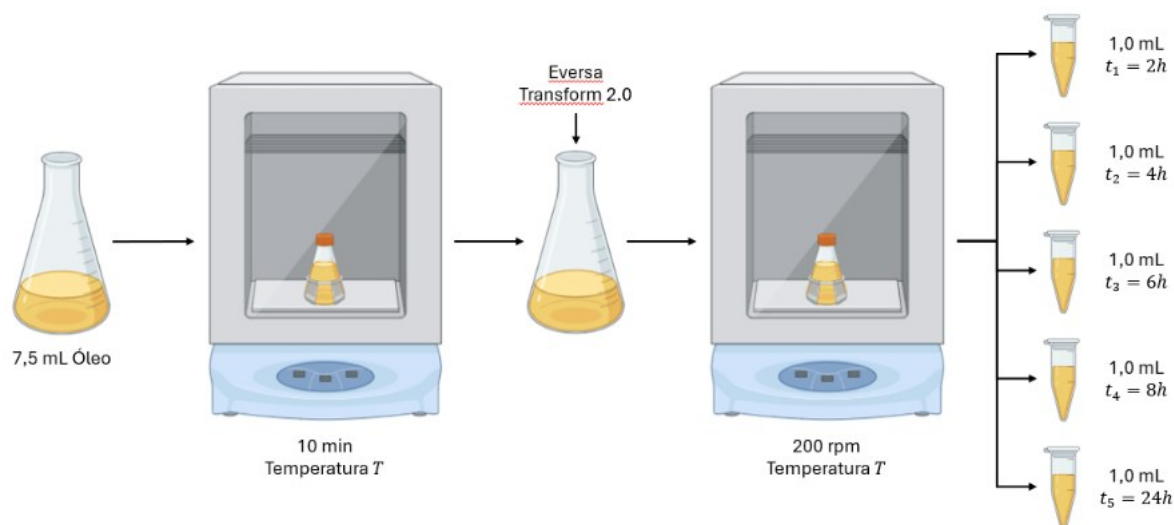
Fonte: Autora.

#### 4.2.3.1 Metodologia de Síntese 1 (MS 1)

Uma primeira metodologia para a síntese ocorreu de acordo com o procedimento descrito a seguir: em um Erlenmeyer foi adicionado 7,5 mL de óleo de soja cada; ele foi levado a uma incubadora shaker, da marca SOLAB para temperaturas até 65 °C e da marca Marconi para temperaturas até 90 °C, ajustada à temperatura desejada para a síntese e mantido por 10 minutos até atingir a temperatura do meio. Em seguida, a enzima foi adicionada. O Erlenmeyer é submetido a agitação de 200 rpm, sendo este um valor próximo ao encontrado em outros trabalhos de síntese com óleo e enzima do tipo lipase (Karabulut et al. 2011; Soleimanian; Ghazani; Marangoni, 2023; Mayookha et al., 2024)

Para fins de simplificação, essa metodologia com as incubadoras shakers de Erlenmeyer será denominada como **MS 1**. A Figura 5 mostra um esquema visual do procedimento desta Síntese.

Figura 5 - Resumo Esquemático da Metodologia de Síntese 1.



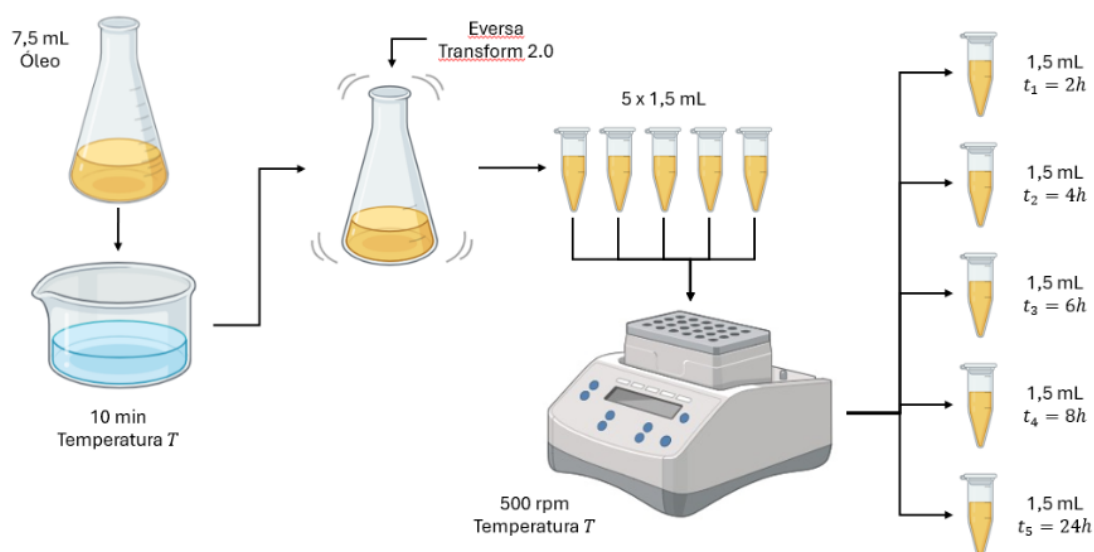
Fonte: Autora.

A reação total durou 24 horas, e alíquotas de 1,0 mL foram retiradas de cada Erlenmeyer a cada 2 horas até 8 horas de reação e depois com 24 horas, ou seja, as alíquotas para cada condição de temperatura e quantidade de enzima foram retiradas com  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$  e  $t_5$ , que equivalem a 2, 4, 6, 8 e 24 horas de reação, respectivamente, a fim de observar o progresso da reação bem como identificar o tempo ótimo para obtenção de resultados satisfatórios. As amostras foram transferidas para eppendorfs, identificadas e armazenadas sob refrigeração.

#### 4.2.3.2 Metodologia de Síntese 2 (MS 2)

A metodologia de síntese 2 foi realizada no shaker de microtubo. Em um tubo de ensaio, foi adicionado 7,5 mL de óleo de soja; em seguida o tubo permaneceu por 10 minutos em banho maria (SOLAB) para que o óleo atingisse a temperatura da síntese; de forma rápida, a enzima foi adicionada e o tubo foi levemente agitado para homogeneização do meio. Cinco alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e transferidas para eppendorfs, sendo um eppendorf para cada ponto de tempo de retirada das amostras, ou seja, um eppendorf para cada tempo  $t_1$  a  $t_5$ . A velocidade de agitação no shaker (Thermo-Shaker, da marca Agimaxx) foi ajustada para 500 rpm. Cada eppendorf coletado foi identificado e posteriormente armazenado sob refrigeração. Essa metodologia no shaker de microtubo será referenciada como **MS 2** e foi sumarizada na Figura 6 a seguir.

Figura 6 - Resumo Esquemático da Metodologia de Síntese 2.



Fonte: Autora.

#### 4.2.4 Pré-tratamento de amostras para análise no GC/MS

##### 4.2.4.1 Hidrólise com Pancreatina para formação de monoacilgliceróis na posição sn-2

Para identificar a composição e conformação dos produtos da síntese bem como do óleo de soja, utilizou-se da metodologia de hidrólise com pancreatina desenvolvida por Luddy et al. (1964), com algumas adaptações.

O cálculo do percentual das posições pode ser dado de duas formas. Caso seja analisado o 2-monoacilglicerol obtido como produto da hidrólise com pancreatina, por diferença em relação ao total de ácidos graxos do triglicerídeo, obtém-se os ácidos graxos que estavam na posição sn-1 e sn-3. O cálculo é dado da seguinte forma:

$$AG_{sn-1 | sn-3} = \frac{(3 \cdot AG_{totais}) - AG_{sn-2}}{2} \quad (2)$$

Sendo AG representativo de Ácidos Graxos.

A segunda forma é uma análise indireta, com base na determinação dos ácidos graxos livres, ou seja, os ácidos que ocupavam as posições sn-1 e sn-3 e que foram hidrolisados. Assim, o cálculo é realizado para obter o percentual da posição sn-2, da seguinte forma:

$$AG_{sn-2} = 3 \cdot AG_{totais} - 2 \cdot AG_{sn-1 | sn-3} \quad (3)$$

#### 4.2.4.1.1 Primeira adaptação para análise posicional

Em relação à metodologia de Luddy et al., que utiliza 0,9 mg e 9,0 mg de enzima, para este trabalho a quantidade de pancreatina foi aumentada de 9,0 mg para 50 mg, e os outros reagentes necessários foram aumentados na mesma proporção (~ 5,5 x): 277,7 µL de amostra de óleo, 0,555 mL de solução de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 2,2% (m/v), 1,39 mL de solução de sais biliares 0,1% (m/v), 5,5 mL de tampão TRIS pH 8,0.

Os reagentes foram adicionados a um tubo de ensaio com tampa e o tubo foi levado ao banho maria a uma temperatura de 40 °C por 2 min. Após esse período, o tubo foi retirado do banho e levado para agitação em vórtex (Vórtex Multi 0-3000, da CRALTECH) por aproximadamente 1,5 min. Para interromper a reação utilizou-se 2,75 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 6,0 M.

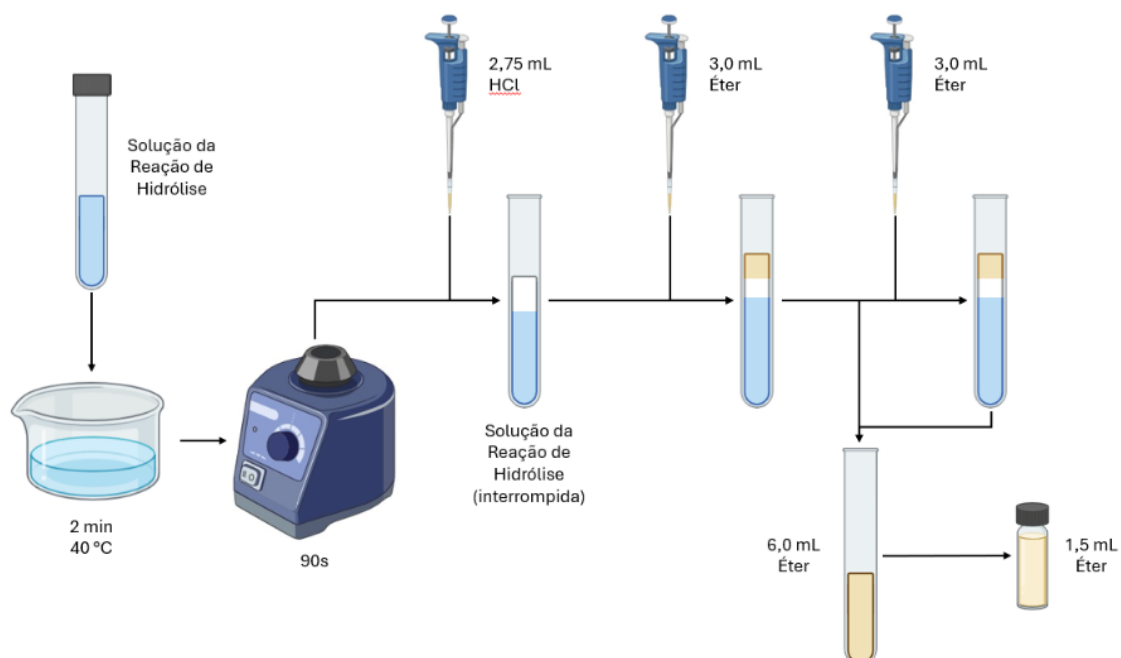
Em seguida, procedeu-se com a extração dos produtos da hidrólise seguindo a metodologia adaptada de Luddy et al. (1964) por Karabulut et al. (2007). A extração ocorreu em duas etapas, com uma primeira adição de 3,0 mL de éter etílico, retirada dessa alíquota que permanecia na superfície da mistura e mais uma adição de 3,0 mL de éter etílico com posterior retirada e armazenamento juntamente à alíquota retirada anteriormente, totalizando aproximadamente 6,0 mL. Para obter uma concentração maior de produtos da hidrólise, a fase éter foi concentrada por meio de evaporação até que atingisse aproximadamente 1,5 mL.

#### 4.2.4.1.2 Segunda adaptação para análise posicional

Avaliou-se a possibilidade de retirada da etapa de TLC, presente no método de Luddy et al. (1964), na tentativa de aferir se o equipamento de GC/MS poderia detectar os produtos da hidrólise apenas extraídos com éter etílico. A fase éter concentrada das amostras foi levada diretamente para análise em GC/MS. Com essa metodologia analisou-se os componentes da hidrólise com óleo de soja puro e com os produtos das sínteses (de todas as condições).

A Figura 7 apresenta um esquema da metodologia de hidrólise com primeira e segunda adaptação.

Figura 7 - Resumo Esquemático da Etapa de Hidrólise com Pancreatina.

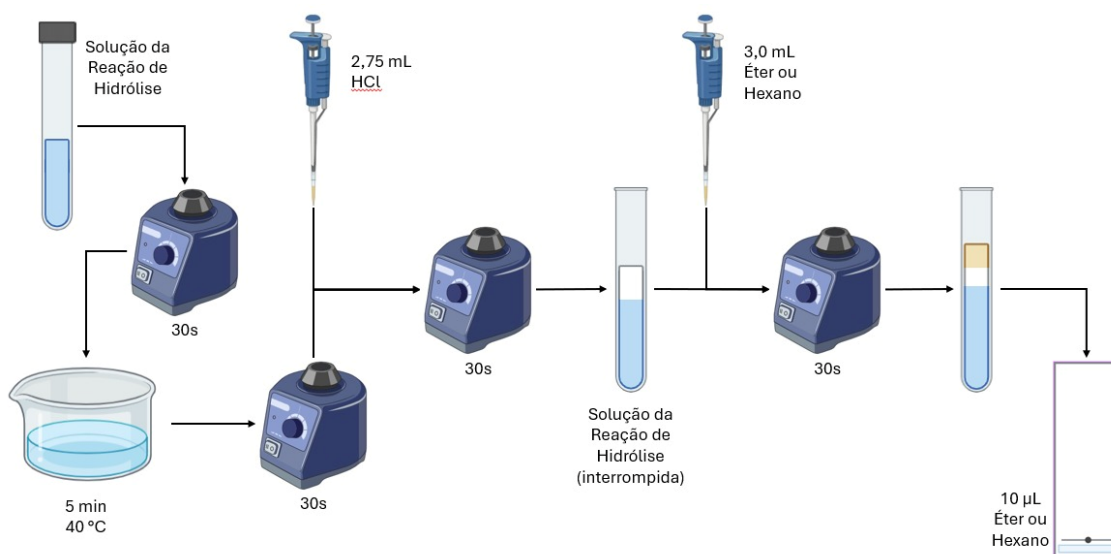


Fonte: Autora.

#### 4.2.4.1.3 Terceira adaptação para análise posicional

Um novo protocolo (ilustrado na Figura 8) seguiu como o anterior com algumas alterações: após adição dos reagentes ao tubo de ensaio, este foi levado para agitação em vortex por 30 s; após esse período, o tubo foi levado ao banho maria por 5 min, para garantir que se atingisse a temperatura de 40°C; ao ser retirado do banho, o tubo foi levado para agitação em vortex novamente por 30 s e somente após essa agitação se adicionou o ácido clorídrico para interromper a reação, seguindo para uma agitação em vortex por 30 s para garantir que o ácido entrasse em contato com todo o meio.

Figura 8 - Resumo Esquemático da Terceira Adaptação de Hidrólise com Pancreatina.



Fonte: Autora.

Seguindo essa adaptação, avaliou-se ainda a interferência dos sais biliares na reação e a possibilidade de a etapa de extração ocorrer com outro solvente. Dessa forma, a hidrólise do óleo de soja com pancreatina foi realizada em um sistema com a adição dos sais biliares 0,1% (m/v) e um sistema sem os sais biliares. Realizou-se em sequência, testes de extração com dois solventes diferentes: éter etílico e hexano.

Os testes de extração foram realizados em sistemas com sais e sem sais biliares, sendo uma duplicata de cada sistema para cada solvente, totalizando 4 amostras (2 com sais e 2 sem sais) para a extração com éter, e 4 amostras (2 com sais e 2 sem sais) para a extração com hexano. Assim, 3,0 mL do solvente foi adicionado ao tubo de ensaio e levado para agitação em vórtex por 30 s. Do sobrenadante formado, 10 µL foram retirados e aplicados na placa de sílica para TLC.

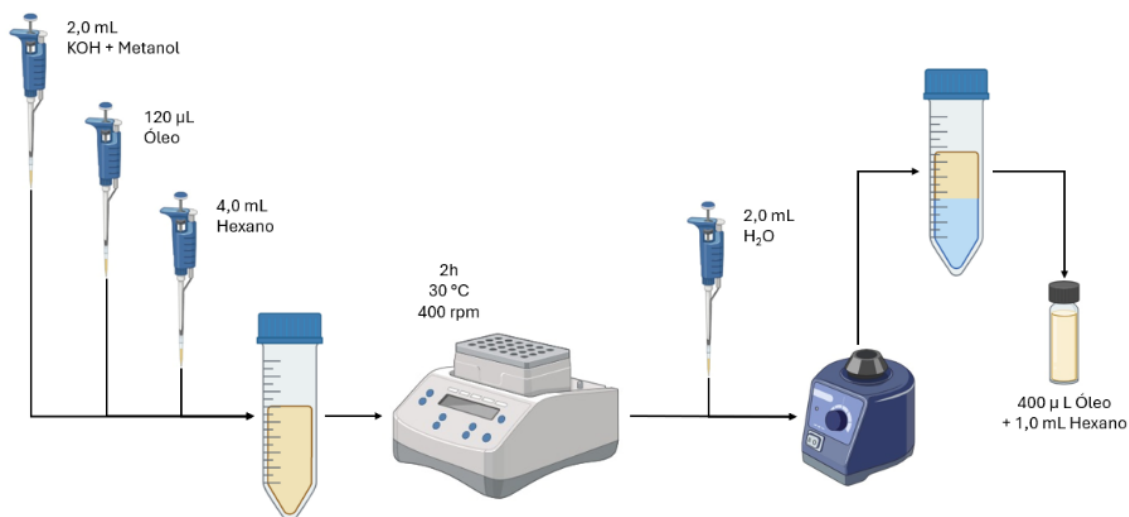
A cuba para ensaio de TLC foi saturada com uma solução com 60% (v/v) de hexano, 40% (v/v) de éter etílico, e 1,6% (v/v) de ácido fórmico. As placas com as amostras permaneceram durante aproximadamente 35 min na cuba, o suficiente para que a placa saturasse até 1,5 cm da borda superior. Ao atingir esse ponto, a placa foi retirada e levada para secar na capela. Após a secagem, a placa seguiu para um recipiente transparente fechado contendo grânulos de iodo e foi retirada somente após estar completamente tingida com o vapor de iodo. Os pontos foram circulados a lápis e após total evaporação do vapor de iodo, foram raspados e armazenados em eppendorf separadamente.

Em seguida, realizou-se a extração dos componentes da hidrólise retidos na sílica da placa de TLC. Utilizou-se de 500 a 700  $\mu\text{L}$  de hexano para extrair, a depender da quantidade de sílica contida no eppendorf. Desse total, 500  $\mu\text{L}$  foram retirados para esterificação, conforme metodologia readaptada a ser explicada a seguir.

#### 4.2.3.2 Reação de esterificação para formação de ésteres metílicos de ácidos graxos

Para a análise da composição dos triglicerídeos por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa é necessário a esterificação dos óleos. A Figura 9 apresenta um esquema simplificado do processo de esterificação, o qual foi miniaturizado no âmbito deste trabalho.

Figura 9 - Resumo Esquemático da Etapa de Esterificação.



Fonte: Autora.

Os ácidos graxos das moléculas de triglicerídeos são transformados em metil-ésteres de ácidos graxos por meio da reação do óleo vegetal com álcool, que pode ser catalisada através da alcalinização do meio, segundo metodologias já exploradas na literatura (Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018). Uma adaptação dessas metodologias foi utilizada, onde uma solução de KOH em álcool metílico (metanol) foi preparada com uma concentração de 6 % (m/v), para garantir o meio básico. Em seguida, para cada amostra, em um tubo Falcon adicionou-se 2,0 mL dessa solução de KOH em álcool metílico, 120  $\mu\text{L}$  de amostra de óleo e 4,0 mL de Hexano. O tubo foi levado a um agitador com aquecimento por 2 horas, onde se utilizou uma temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  e agitação de 400 rpm.

Após esse período, foram adicionados 2,0 mL de água destilada e em seguida o tubo foi agitado em vórtex por 30s para a separação das fases. Recolheu-se a fase sobrenadante (orgânica). Dessa fase, 400  $\mu\text{L}$  foram coletados e transferidos para um vial e o volume foi completado com 1,0 mL de hexano.

As reações de esterificação foram executadas em duplicatas para cada tipo de óleo. A lista de óleos pode ser observada na Tabela 1.

#### 4.2.4.2.1 Miniaturização da metodologia de esterificação

Uma readaptação da metodologia anterior foi realizada para analisar as amostras extraídas com TLC, de forma a não ser necessário uma nova diluição. Assim, algumas quantidades para a reação de esterificação foram reduzidas: utilizou-se para a reação 500  $\mu\text{L}$  da amostra já extraída com hexano e 250  $\mu\text{L}$  de KOH em metanol. As condições de reação foram as mesmas do procedimento anterior. Após 2 h, ao eppendorf foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de água destilada. Por fim, aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  da fase sobrenadante foram armazenados em vials com insertos.

#### 4.2.5 Metodologia do GC/MS

Utilizou-se para a análise das amostras o cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Thermo Scientific, modelo ISQ), operando com injetor em modo splitless a 250 °C e interface mantida à mesma temperatura. A separação cromatográfica foi conduzida em coluna capilar DB-5 (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme). O forno foi programado para iniciar a 50 °C (isotérmico por 1 min), seguido de rampas de aquecimento de 20 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  até 210 °C (mantido por 1 min) e, em seguida, de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  até 250 °C, permanecendo nesta temperatura por 8 min.

O espectrômetro de massas operou em modo de ionização por elétrons (70 eV), com temperatura da fonte de íons ajustada para 200 °C e faixa de varredura de  $m/z$  50 a 400. O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo de 1,0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ . A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles disponíveis nas bibliotecas comerciais NIST e Wiley, associada à verificação dos tempos de retenção.

## 5 RESULTADOS

Inicialmente, deseja-se observar a atuação da enzima na reação de interesterificação, principalmente detectar se há um padrão de troca posicional de ácidos graxos na molécula de triglicerídeo a depender dos fatores: temperatura e quantidade de enzima.

### 5.1 Análise da composição dos óleos vegetais

Ao todo foram analisados 11 óleos diferentes em relação à composição geral de ácidos graxos. A Tabela 3 e a Tabela 4 compilam os resultados obtidos.

Tabela 3 - Composição geral de Ácidos Graxos dos Óleos analisados (parte 1).

| Ácido Graxo      | Abacate | Abóbora | Amêndoa Doce | Amendoin | Cartamo |
|------------------|---------|---------|--------------|----------|---------|
| <b>C14:0</b>     | 0,0     | 0,3     | 0,0          | 0,3      | 0,1     |
| <b>C16:1</b>     | 1,0     | 0,3     | 0,0          | 1,2      | 0,2     |
| <b>C16:0</b>     | 11,3    | 12,7    | 11,0         | 10,1     | 9,1     |
| <b>C18:2</b>     | 41,1    | 45,7    | 24,8         | 76,7     | 24,6    |
| <b>C18:1</b>     | 39,4    | 35,7    | 55,7         | 5,1      | 58,6    |
| <b>C18:0</b>     | 5,7     | 4,5     | 3,5          | 0,4      | 4,8     |
| <b>C20:1</b>     | 0,2     | 0,1     | 1,2          | 1,8      | 0,4     |
| <b>C20:0</b>     | 0,5     | 0,3     | 0,8          | 1,4      | 0,9     |
| <b>C22:0</b>     | 0,9     | 0,4     | 3,0          | 2,9      | 1,2     |
| <b>Sat/Insat</b> | 0,22    | 0,22    | 0,22         | 0,18     | 0,19    |
| <b>Sat/Total</b> | 0,18    | 0,18    | 0,18         | 0,15     | 0,16    |

Fonte: Autora.

Tabela 4 - Composição geral de Ácidos Graxos dos Óleos analisados (parte 2).

| Ácido Graxo | Castanha-do-Pará | Chia | Linhaça Dourada | Linhaça Marrom | Macadâmia | Soja |
|-------------|------------------|------|-----------------|----------------|-----------|------|
| C14:0       | 0,2              | 0,0  | 0,0             | 0,3            | 0,8       | 0,0  |
| C16:1       | 1,2              | 0,0  | 0,0             | 0,5            | 12,8      | 0,0  |
| C16:0       | 17,0             | 9,4  | 15,3            | 17,0           | 11,5      | 11,6 |
| C18:2       | 29,9             | 45,2 | 45,7            | 46,3           | 25,7      | 30,0 |

|                  |      |      |      |      |      |      |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| C18:1            | 36,1 | 38,3 | 27,8 | 20,7 | 35,0 | 41,2 |
| C18:0            | 12,5 | 6,1  | 8,9  | 11,9 | 6,6  | 8,1  |
| C20:1            | 0,8  | 0,3  | 0,5  | 0,9  | 2,6  | 4,5  |
| C20:0            | 1,1  | 0,3  | 0,8  | 1,0  | 3,4  | 1,8  |
| C22:0            | 1,3  | 0,4  | 1,1  | 1,4  | 1,7  | 2,7  |
| <b>Sat/Insat</b> | 0,47 | 0,19 | 0,35 | 0,46 | 0,31 | 0,32 |
| <b>Sat/Total</b> | 0,32 | 0,16 | 0,26 | 0,32 | 0,24 | 0,24 |

Fonte: Autora.

Nota-se que os óleos de Castanha-do-Pará, Linhaça Dourada e Linhaça Marrom apresentaram um maior teor de ácidos graxos saturados, principalmente os que estão mais presentes na gordura animal, os quais são: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) (Dohmen et al., 2022).

Esses óleos não apresentam forte odor, de forma que não necessitariam de um pré-tratamento antes de serem utilizados na reação de interesterificação. Esses resultados mostram o potencial desses óleos em um estudo para a estruturação de blends com o óleo de soja, que é um óleo de menor valor comercial, visando aumentar a proporção de ácidos graxos saturados disponíveis na composição total.

Para fins de determinação das melhores condições experimentais, optou-se por seguir com as etapas do estudo apenas com o óleo de soja, visto que é um óleo de mais fácil obtenção.

## 5.2 Ensaio de Hidrólise com Pancreatina

Devido à disponibilidade restrita da enzima, a avaliação da metodologia de análise da posição sn-2 foi inicialmente testada apenas utilizando o óleo de soja, evitando assim, comprometer o quantitativo obtido das sínteses. A análise posicional foi realizada seguindo a metodologia de Luddy et al. (1964), no entanto, observou-se que devido à quantidade tão diminuta, a concentração de amostra final não era detectável pelo equipamento de cromatografia, fazendo-se necessário uma adaptação ao método para melhorar a detecção.

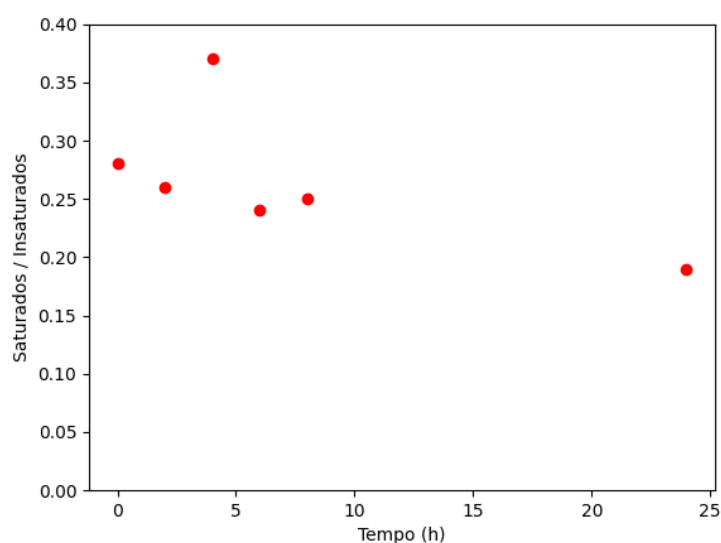
Uma primeira adaptação foi realizada ao aumentar as quantidades de reagentes utilizados no ensaio com pancreatina. A segunda adaptação testada foi a viabilidade de analisar apenas o composto concentrado extraído com éter, ou seja, sem a realização de TLC. Os resultados obtidos para a hidrólise com a pancreatina do óleo de soja foram passíveis de detecção pelo equipamento de GC/MS, assim, seguiu-se para a realização dessa metodologia

adaptada com os produtos das sínteses. Analisou-se inicialmente os produtos obtidos com as sínteses à 50 °C e 70 °C, ambas com 100 µL e 300 µL de enzima (atividade 3.264,69 U/mL). Após a segunda etapa de sínteses, onde se avaliou as temperaturas de 60 °C e 80 °C, com 150 µL e 450 µL de enzima, e 70 °C, com 300 µL de enzima, seguindo a metodologia na incubadora shaker de microtubo, realizou-se a hidrólise com pancreatina desses novos pontos experimentais.

Ao se analisar o extrato da fase éter, obteve-se a composição de ácidos graxos livres que ocupavam as posições sn-1 e sn-3. Considerando uma razão de ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados para essas posições, é preferível que o valor seja menor, visto que uma maior proporção de ácidos graxos saturados na posição sn-2 pode ser uma etapa inicial para se atingir propriedades físico-químicas aprimoradas, como cristalização e ponto de fusão. Dessa forma, quanto menor for essa razão para as posições sn-1 e sn-3, significa que durante a interesterificação mais ácidos graxos insaturados estão sendo incorporados a essas posições.

Os resultados obtidos com essa segunda adaptação, no entanto, não apresentaram boa confiabilidade. As análises foram realizadas em triplicatas, os pontos de 60 °C/150 µL de enzima e 70 °C/300 µL de enzima, apresentaram grandes variações nos resultados para um mesmo tempo de análise. Para algumas condições não foi possível obter uma leitura para alguns tempos de reação, impossibilitando uma avaliação da reação com o tempo. A Figura 10 mostra os resultados obtidos para uma das triplicatas da síntese a 70 °C/300 µL de enzima na Síntese 2.

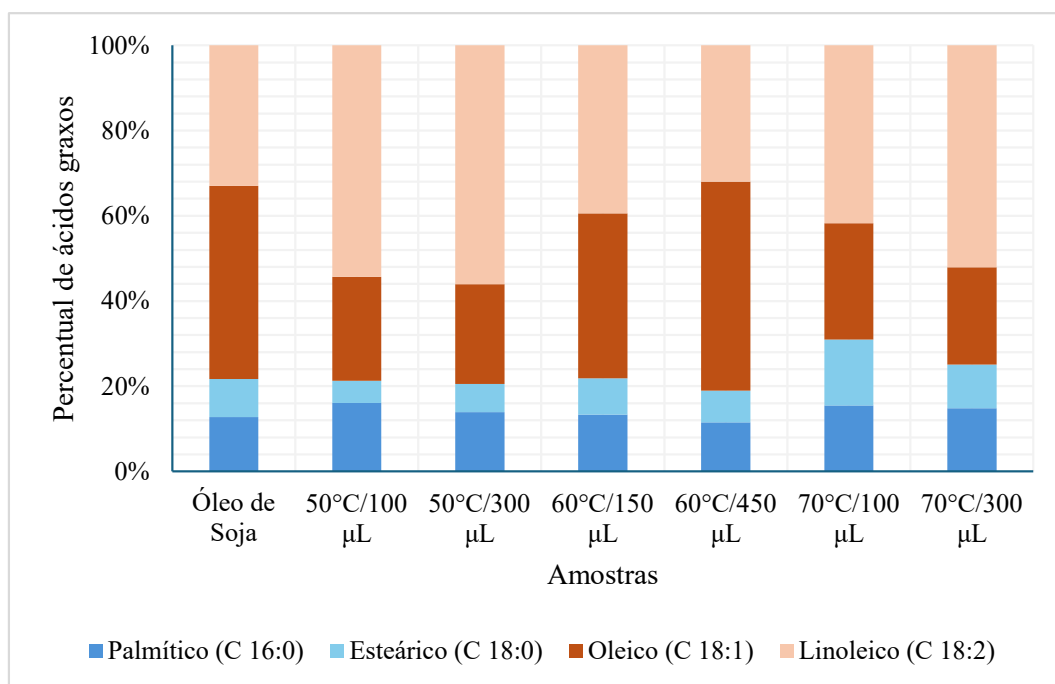
Figura 10 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados na condição de 70 °C/300 µL na Metodologia de Síntese 2.



Fonte: Autora.

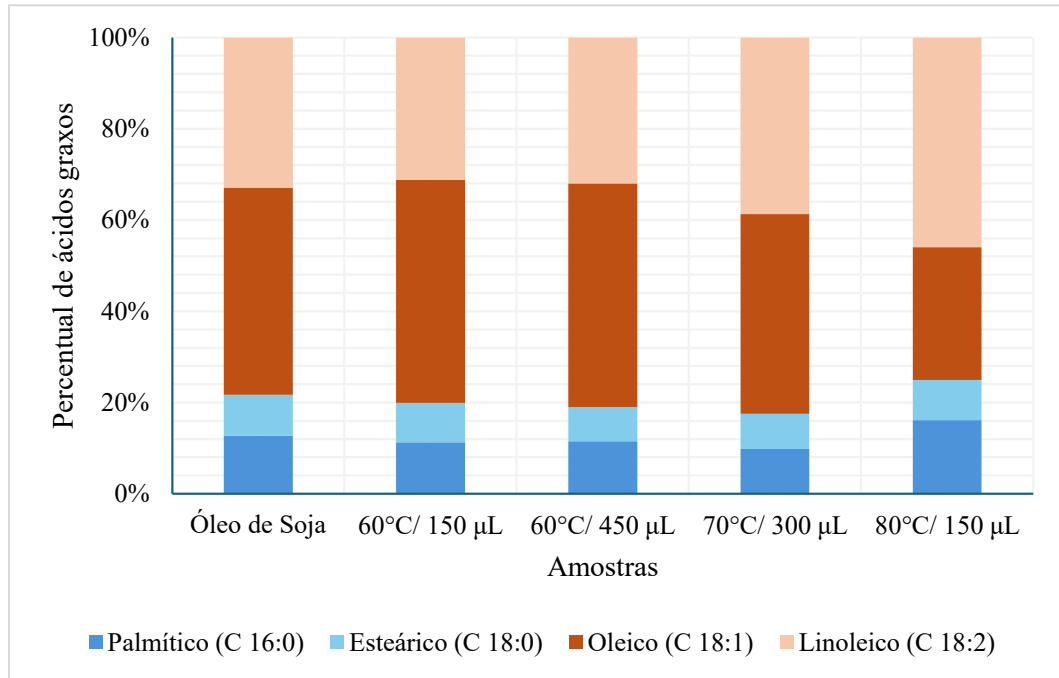
As Figuras 11 a 13 mostram uma comparação do teor de ácidos graxos saturados nas posições 1 e/ou 3 entre as condições experimentais com 24 horas de reação para cada Síntese trabalhada. A Figura 11 mostra os resultados obtidos para Metodologia de Síntese 1, realizada com a incubadora shaker de Erlenmeyer, a Figura 12 mostra os resultados para a Metodologia de Síntese 2 (incubadora shaker de microtubo), e a Figura 13 mostra os resultados das condições que foram realizadas nas duas sínteses. Observa-se que os resultados são difusos, não apresentam padrão mesmo quando se aumenta a temperatura e/ou a quantidade de enzima, o que impossibilita a determinação de uma condição ótima de processamento. Entretanto, os resultados evidenciam a ocorrência da interesterificação sem uso de solventes.

Figura 11 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados para as amostras retiradas com 24 h na Metodologia de Síntese 1.



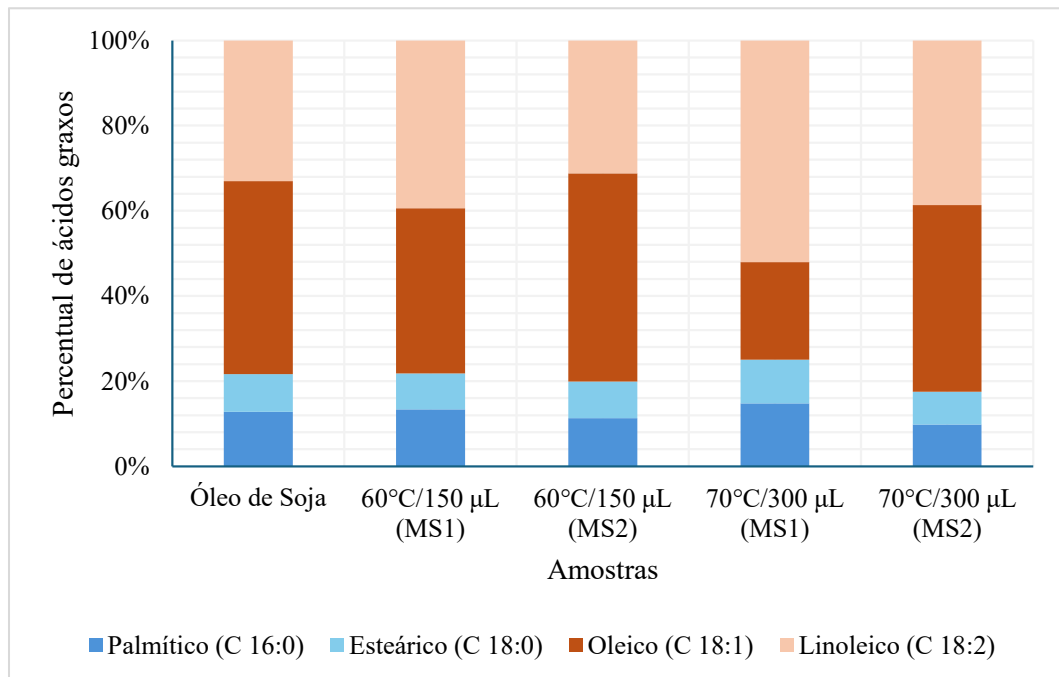
Fonte: Autora.

Figura 12 - Razão de ácidos graxos saturados e insaturados para as amostras retiradas com 24 h na Metodologia de Síntese 2.



Fonte: Autora.

Figura 13 - Comparativo entre as Metodologias de Sínteses 1 e 2.



Fonte: Autora.

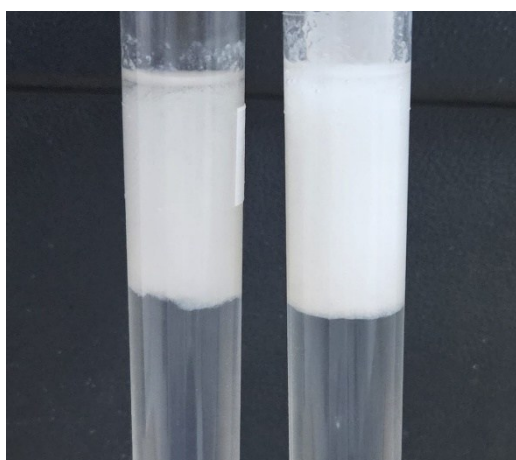
Em decorrência desses resultados que mostraram uma possível não reprodutibilidade da metodologia da hidrólise, realizou-se a terceira adaptação dessa metodologia, visando retornar com a etapa de TLC, e obter efetivamente o produto 2-monoacilglicerol.

Os testes dessa metodologia foram realizados inicialmente apenas com óleo de soja, e outras condições de teste também foram analisadas a fim de estudar e melhorar determinados pontos do processo, como a reação e a extração. Assim, observou-se fatores como a inserção ou não de sais biliares no meio reacional para determinar se a reação seria modificada, principalmente em relação à separação de fases, pois a reação de hidrólise forma uma fase aquosa transparente de fundo e uma fase branca sobrenadante que se assemelha a uma emulsão. Durante a etapa de extração com solvente, uma terceira fase é formada, a fase do solvente, acima da fase branca. Estudou-se a viabilidade de retirar os sais biliares para melhorar o contato entre a fase emulsionada e o solvente e assim promover uma melhor extração.

Além disso, estudou-se a extração com solventes diferentes, o éter e o hexano. Sendo o objetivo principal determinar se o hexano seria um solvente apropriado para essa etapa, visto que, em comparação com o éter, é um solvente menos volátil e mais de mais fácil manuseio.

Após a separação de fases, a fase líquida no fundo é composta majoritariamente por água e não retém o produto de interesse da reação, o 2-monoacilglicerol. Isso foi possível determinar por meio de um teste de TLC aplicando uma alíquota da fase de fundo, e após revelação, nenhum ponto ou banda apareceu na placa de sílica. A Figura 14 mostra o meio reacional após adição do solvente e agitação no vórtex.

Figura 14 - Sistema reacional com pancreatina após adição de solvente (éter etílico).

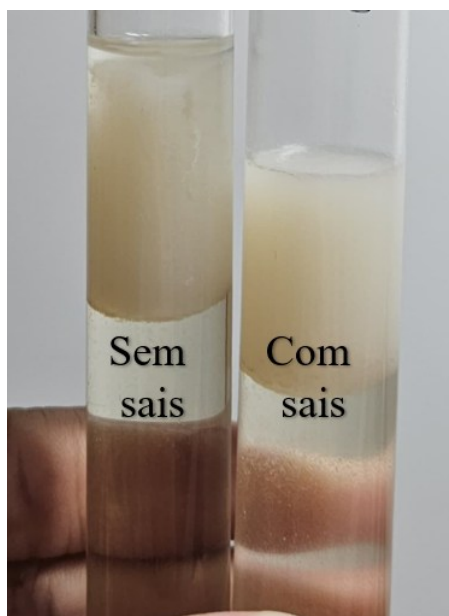


Fonte: Autora.

Os testes com sais e sem sais biliares mostraram que, visualmente, uma fase emulsionada é formada em ambas as reações, com diferenças pontuais, mas não sendo possível estabelecer um padrão entre uma ou outra, como pode ser observado na Figura 15.

Foi possível perceber que, após agitação com o solvente, este ficou incorporado à fase emulsionada, de forma que dificultou a extração e apenas após alguns minutos, a fase de solvente começou a se formar na superfície da fase emulsionada. Esse resultado foi observado em todos os ensaios, com e sem sais, e para os solventes éter e hexano. A diferença observada foi de que nas amostras sem sais biliares, a fase com solvente tendeu a ser formada ligeiramente mais rápido que nas amostras com sais. Apenas ao tentar mover ou retirar a fase emulsionada é que ocorre o “desprendimento” do solvente, formando assim a terceira fase.

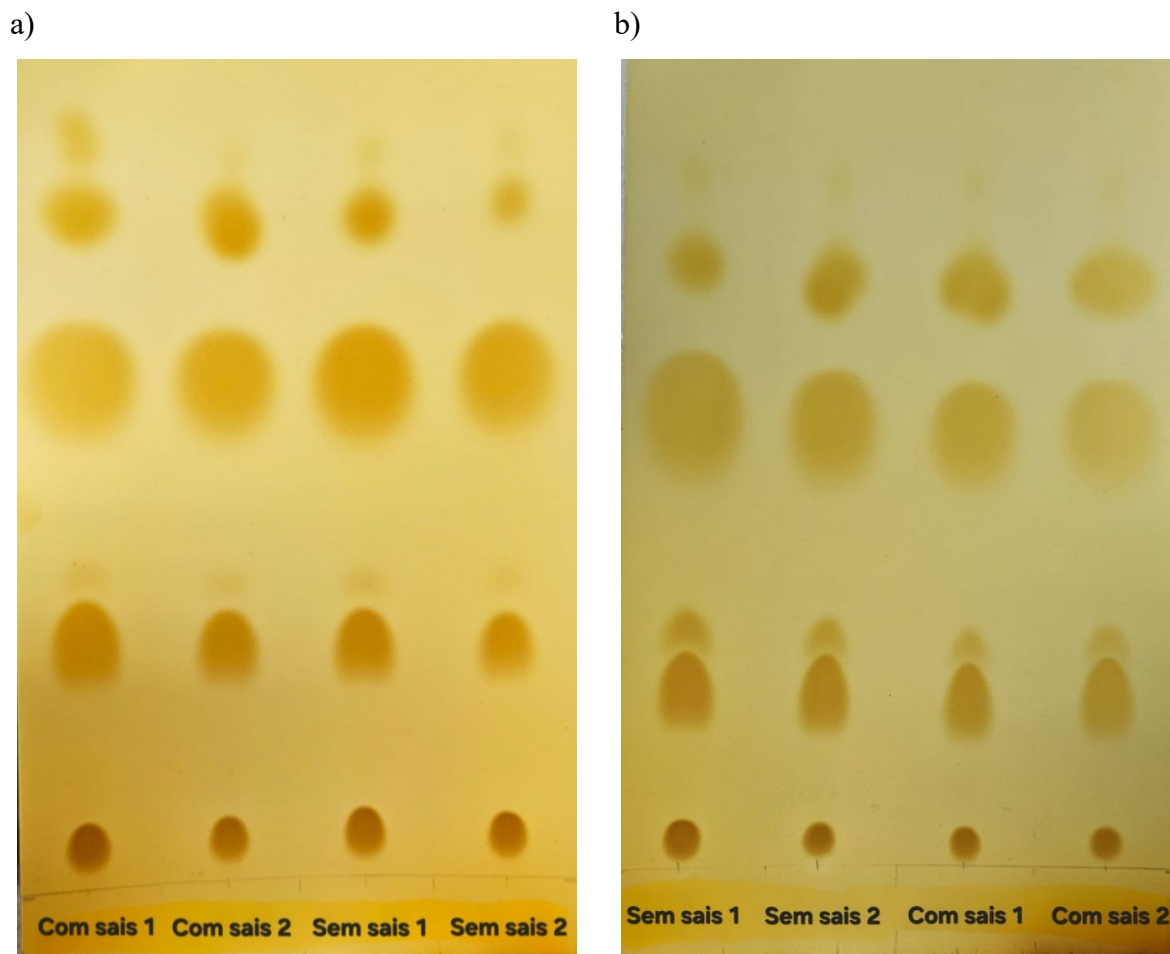
Figura 15 - Sistema reacional com pancreatina com e sem sais biliares após adição de solvente (hexano).



Fonte: Autora.

Após a extração com os solventes, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da fase na superfície de cada sistema foram retirados para realização do ensaio de TLC e posterior análise em GC/MS. A Figura 16 mostra as placas para cada extração com solvente após revelação com iodo.

Figura 16 - Placas de TLC após hidrólise com pancreatina com e sem sais biliares. a) Placa de TLC após extração com **Éter Etilico**; b) Placa de TLC após extração com **Hexano**.



Fonte: Autora.

Ao analisar os resultados obtidos pelo GC/MS para esses testes, observa-se que a média tanto para os ensaios com sais biliares quanto para os sem sais biliares apresentaram resultados similares. No entanto, analisando os desvios entre as duplicatas, nota-se que para os ensaios sem sais biliares esses desvios são bem mais significativos que para os ensaios com sais, mostrando que possivelmente a utilização dos sais biliares promove um sistema mais estável, que resultará em medidas mais precisas e confiáveis.

As proporções de ácidos graxos obtidas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa para cada condição de ensaio podem ser observados nas tabelas 5 a 8.

Tabela 5 - Protocolo TLC da extração com éter etílico e com sais biliares.

| Ácido Graxo        | 2-monoacilglicerol |             | Média | Desvio |
|--------------------|--------------------|-------------|-------|--------|
|                    | Duplicata 1        | Duplicata 2 |       |        |
| Mirístico (C 14:0) | 2,51               | 2,57        | 2,54  | ±0,05  |

|                              |       |       |             |       |
|------------------------------|-------|-------|-------------|-------|
| <b>Palmitoleico (C 16:1)</b> | 2,07  | 2,75  | 2,41        | ±0,48 |
| <b>Palmítico (C 16:0)</b>    | 14,68 | 14,66 | 14,67       | ±0,01 |
| <b>Linoleico (C 18:2)</b>    | 40,74 | 41,09 | 40,91       | ±0,25 |
| <b>Oleico (C 18:1)</b>       | 30,09 | 30,75 | 30,42       | ±0,47 |
| <b>Esteárico (C 18:0)</b>    | 9,91  | 8,18  | 9,04        | ±1,22 |
| <b>Saturado/Insaturado</b>   | 0,37  | 0,34  | <b>0,36</b> | ±0,02 |
| <b>Saturado/Total</b>        | 0,27  | 0,25  | <b>0,26</b> | ±0,01 |

Fonte: Autora.

Tabela 6 - Protocolo TLC da extração com éter etílico e sem sais biliares.

| <b>Ácido Graxo</b>           | <b>2-monoacilglicerol</b> |                    | <b>Média</b> | <b>Desvio</b> |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------|---------------|
|                              | <b>Duplicata 1</b>        | <b>Duplicata 2</b> |              |               |
| <b>Mirístico (C 14:0)</b>    | 2,19                      | 0,85               | 1,52         | ±0,95         |
| <b>Palmitoleico (C 16:1)</b> | 1,85                      | 2,08               | 1,96         | ±0,16         |
| <b>Palmítico (C 16:0)</b>    | 11,59                     | 17,93              | 14,76        | ±4,48         |
| <b>Linoleico (C 18:2)</b>    | 48,47                     | 36,46              | 42,47        | ±8,50         |
| <b>Oleico (C 18:1)</b>       | 31,34                     | 32,00              | 31,67        | ±0,47         |
| <b>Esteárico (C 18:0)</b>    | 4,56                      | 10,70              | 7,63         | ±4,34         |
| <b>Saturado/Insaturado</b>   | 0,22                      | 0,42               | <b>0,31</b>  | ±0,14         |
| <b>Saturado/Total</b>        | 0,18                      | 0,29               | <b>0,24</b>  | ±0,08         |

Fonte: Autora.

Tabela 7 - Protocolo TLC da extração com hexano e com sais biliares.

| <b>Ácido Graxo</b>           | <b>2-monoacilglicerol</b> |                    | <b>Média</b> | <b>Desvio</b> |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------|---------------|
|                              | <b>Duplicata 1</b>        | <b>Duplicata 2</b> |              |               |
| <b>Mirístico (C 14:0)</b>    | 0,00                      | 0,00               | 0,00         | ±0,00         |
| <b>Palmitoleico (C 16:1)</b> | 7,57                      | 7,51               | 7,54         | ±0,04         |
| <b>Palmítico (C 16:0)</b>    | 24,74                     | 26,75              | 25,75        | ±1,42         |
| <b>Linoleico (C 18:2)</b>    | 24,20                     | 24,13              | 24,17        | ±0,05         |
| <b>Oleico (C 18:1)</b>       | 25,08                     | 23,27              | 24,18        | ±1,28         |
| <b>Esteárico (C 18:0)</b>    | 18,40                     | 18,34              | 18,37        | ±0,04         |
| <b>Saturado/Insaturado</b>   | 0,76                      | 0,82               | <b>0,79</b>  | ±0,04         |
| <b>Saturado/Total</b>        | 0,43                      | 0,45               | <b>0,44</b>  | ±0,01         |

Fonte: Autora.

Tabela 8 - Protocolo TLC da extração com hexano e sem sais biliares.

| Ácido Graxo                  | 2-monoacilglicerol |             | Média       | Desvio |
|------------------------------|--------------------|-------------|-------------|--------|
|                              | Duplicata 1        | Duplicata 2 |             |        |
| <b>Mirístico (C 14:0)</b>    | 0,00               | 0,00        | 0,00        | ±0,00  |
| <b>Palmitoleico (C 16:1)</b> | 8,39               | 7,42        | 7,91        | ±0,69  |
| <b>Palmítico (C 16:0)</b>    | 26,96              | 29,25       | 28,10       | ±1,61  |
| <b>Linoleico (C 18:2)</b>    | 17,45              | 11,28       | 14,36       | ±4,36  |
| <b>Oleico (C 18:1)</b>       | 30,23              | 39,23       | 34,73       | ±6,36  |
| <b>Esteárico (C 18:0)</b>    | 16,96              | 12,82       | 14,89       | ±2,93  |
| <b>Saturado/Insaturado</b>   | 0,78               | 0,73        | <b>0,75</b> | ±0,04  |
| <b>Saturado/Total</b>        | 0,44               | 0,42        | <b>0,43</b> | ±0,01  |

Fonte: Autora.

Em se tratando dos tipos de solventes, é possível observar que os resultados obtidos com a extração com éter e com hexano são diferentes em alguns aspectos. Observa-se que a extração do ponto 1, referente ao 2-monoacilglicerol, é maior, a depender do ácido graxo ligado à molécula de glicerol, para o éter do que para o hexano.

Ao analisar a molécula do triglicerídeo, nota-se que a estrutura é apolar. Quando ocorre a quebra das cadeias de ácidos graxos nas posições 1, 2 ou 3, a ramificação passa a receber uma hidroxila (OH), o que torna a composição mais polar, ou, considerando a permanência dos outros ácidos graxos, uma estrutura anfifílica. Dessa forma, um diacilglicerol é mais polar que um triacilglicerol e, por essa mesma lógica, um monoacilglicerol é mais polar que um diacilglicerol e um triacilglicerol. A polaridade da molécula é ainda afetada pelo tipo de ácido graxo ligado a ela, sendo um ácido graxo saturado mais apolar que um ácido graxo insaturado.

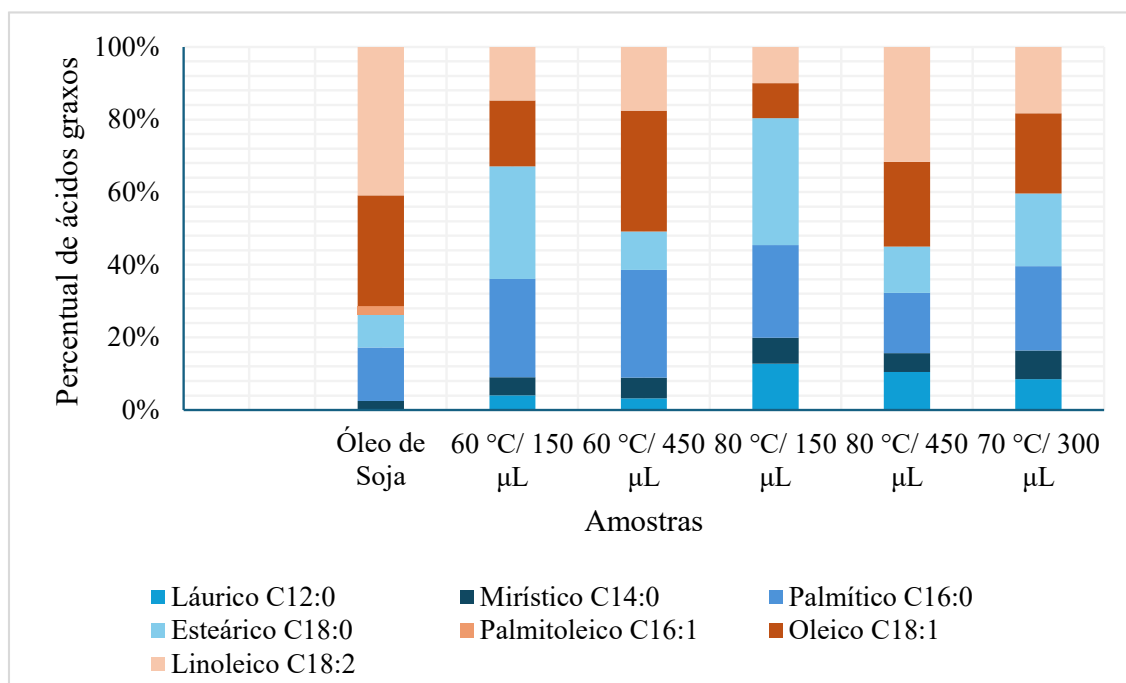
Considerando um solvente como o hexano, que é apolar, presume-se que a diferença nos resultados entre a extração com esse solvente e com o éter está relacionado a essa diferença de polaridades (Barwick, 1997). O hexano pode extrair melhor os 2-MAG com ácidos graxos saturados em detrimento dos com ácidos graxos insaturados (Zarrinmehr et al., 2022). O inverso pode estar ocorrendo com o éter etílico que, por ser mais polar que o hexano, apresenta uma extração maior de 2-MAG de ácidos graxos insaturados.

### 5.3 Síntese (Reação de Interesterificação)

A nova metodologia de análise com pancreatina foi aplicada nas amostras de síntese realizadas com a síntese 2, no ponto de 6 h. Avaliou-se ainda a extração com os dois solventes, éter etílico e hexano, para analisar se o padrão obtido com a hidrólise do óleo de soja se repetiria com os produtos das sínteses. Como o objetivo principal é a incorporação de ácido graxo saturado na posição sn-2 do triacilglicerol, apenas a análise dessa posição, obtida por TLC, foi considerada.

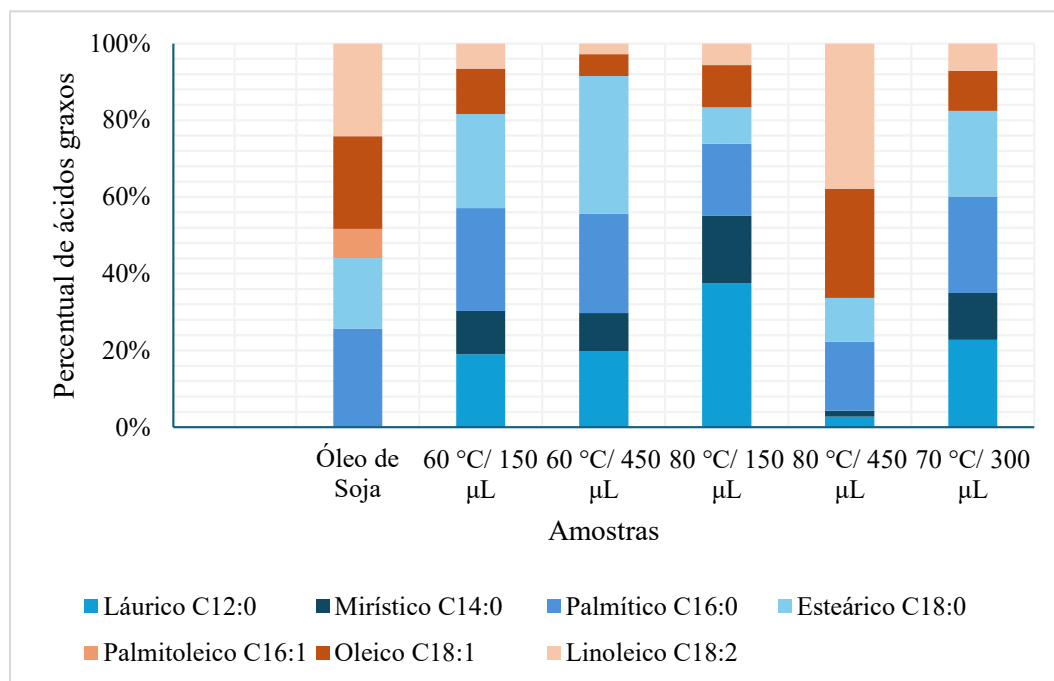
Os resultados obtidos são comparados por meio de uma razão de ácidos graxos saturados em relação à ácidos graxos insaturados na posição sn-2. Deseja-se uma maior razão para essa posição com as sínteses em comparação com a razão obtida para óleo de soja puro. A Figura 17 e a Figura 18 mostram os resultados obtidos para as sínteses à 6 h das reações realizadas com as condições: 60 °C e 150 µL de enzima; 60 °C e 450 µL de enzima; 70 °C e 300 µL de enzima; 80 °C e 150 µL de enzima; e 80 °C e 450 µL de enzima.

Figura 17 - Comparativo de proporção de ácidos graxos para as amostras de 6 h e protocolo de extração com éter etílico.



Fonte: Autora.

Figura 18 - Comparativo de proporção de ácidos graxos para as amostras de 6 h e protocolo de extração com hexano.



Fonte: Autora.

Como observado anteriormente para o óleo de soja puro, nota-se uma tendência da extração com hexano apresentar uma quantidade menor de ácidos graxos insaturados em comparação com a extração realizada com éter etílico. Essa diferença resulta em condições ótimas de reação diferentes para cada método. Para 6 h de reação, realizando a extração com hexano, a condição de síntese a 60 °C/450 μL de enzima mostra a maior razão de ácidos saturados/insaturados na posição sn-2, com um aumento de aproximadamente 47,6% em relação ao óleo de soja puro, seguido pela condição de 80 °C/150 μL de enzima, com um aumento de 39,4%.

No entanto, esse resultado é diferente para a extração com éter etílico, sendo a condição de 60 °C/450 μL de enzima a que oferece o segundo pior resultado de incorporação de ácidos graxos saturados na posição sn-2, com aproximadamente 23% de aumento em relação ao óleo de soja puro, mas oferecendo melhor resultado com a condição de 80 °C/150 μL de enzima, com um aumento de aproximadamente 54,2 % em relação ao óleo de soja. Outras condições de síntese que apresentaram resultados satisfatórios com os dois métodos de extração foram a 60 °C/150 μL de enzima e 70 °C/300 μL de enzima, com aumentos de 40,9% e 33,3%, respectivamente. A síntese a 80 °C e 450 μL não apresentou bons resultados em ambas as metodologias de extração, o que pode indicar que uma alta carga de enzima exposta a uma alta temperatura por um longo período não mantém uma boa atividade. A diferença em relação à

síntese a 80 °C/150 µL pode estar na quantidade de enzima, que por ser menor, é consumida mais rapidamente, evitando a longa exposição à temperatura alta.

Ressalva-se que a temperatura mais alta pode ser prejudicial à atividade da enzima a longo prazo, visto que outros estudos que utilizam a Eversa trabalham em faixas de temperatura menores (Bouaid et al., 2022), sendo uma faixa até 60 °C explorada quando a enzima é previamente imobilizada (Oh et al., 2022; Monteiro et al., 2024). Além disso, por uma questão energética, é preferível trabalhar com temperaturas menores. Assim, os bons resultados obtidos com as condições a 60 °C e 70 °C são mais promissores.

A avaliação das outras condições de síntese ainda se mostra necessária para determinar se a reação atinge alguma estabilidade com o tempo. Faz-se necessário também o estabelecimento de um método mais confiável para a total extração dos produtos da hidrólise com pancreatina, de forma que seja possível caracterizar e quantificar os ácidos graxos.

## 6 CONCLUSÃO

O estudo da composição dos 11 óleos mostrou que, dado o objetivo de produzir um lipídio com mais ácidos graxos saturados, os óleos de Castanha-do-Pará, Linhaça Dourada e Linhaça Marrom apresentaram as melhores composições de ácidos graxos saturados Palmítico e Esteárico, os dois de maior abundância na gordura animal. Esses óleos se mostram promissores para a formulação de blends.

A adaptação da metodologia de hidrólise pancreática mostrou avanços para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. A concentração das amostras para aplicação, manutenção dos sais biliares e da etapa de separação por TLC com subsequente esterificação, mostrou-se como a forma mais eficaz para análise posicional, permitindo a caracterização dos ácidos graxos presentes na posição sn-2. A extração com o solvente hexano mostrou que a alteração do solvente de extração pode levar a resultados enviesados. O estudo de adaptações do ensaio de hidrólise com pancreatina mostrou que essa metodologia de análise conformacional é eficiente, mas que sua complexidade dificulta a aplicação em uma extensa matriz de experimentos.

A identificação dos ácidos graxos saturados nessa posição é interessante pois altera certas propriedades do óleo para que se aproximem de características mais presentes em gorduras animais, como uma maior cristalização e ponto de fusão. As sínteses realizadas na incubadora shaker de microtubo foram comparadas no ponto experimental de 6 h quanto à razão de saturação na posição de interesse, e mostraram que a enzima está sendo eficaz em alterar o posicionamento dos ácidos graxos nas moléculas de triglicerídeos e resultando em um maior percentual dos ácidos saturados na posição sn-2 para algumas condições de síntese, como por exemplo para a condição de 60 °C/150 µL de enzima, que resultou em aproximadamente 40,9% de ácidos graxos saturados a mais na posição sn-2 em relação ao óleo de soja puro.

Embora os resultados de melhor condição para obtenção de uma maior razão de saturação sejam divergentes a depender do solvente utilizado na extração, foi possível observar que ambos os solventes éter etílico e hexano foram capazes de extrair os produtos da hidrólise, mesmo que alguns em maior ou menor grau, e mostraram que há um padrão na atuação da enzima a depender da temperatura e da quantidade de enzima, visto que a síntese a 80 °C e 450 µL de enzima apresentou os menores percentuais de ácidos saturados na posição sn-2 para qualquer dos solventes utilizados na extração. Os melhores resultados, para as duas metodologias de extração, foram a 60 °C/150 µL de enzima, 70 °C/300 µL de enzima e 80 °C/150 µL de enzima.

Os resultados obtidos nesse estudo abrem perspectivas para investigações futuras, principalmente no estudo de blends com os óleos já determinados com composição de interesse. Outra veia pode ser explorada ainda na otimização do processo análise conformacional pela metodologia de hidrólise com pancreatina, para que este possa ser mais facilmente aplicado em uma grande escala de experimentos. Um estudo de tempo reacional para a síntese se faz também necessário para determinar o tempo ideal de reação.

## REFERÊNCIAS

- ALI, H. H. Gas Chromatography: Principles, Medicine and Pharmaceutical, Energy, Fuel Applications and Environmental Analysis. **SAR Journal of Medical Biochemistry**. v. 06. p. 94-105. 2025.
- ARANA-PENÃ, S.; RIOS, N.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; LOKHA Y.; CARBALLARES, D.; GONÇALVES, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coimmobilization of different lipases: Simple layer by layer enzyme spatial ordering. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 145. p. 856-864. 2020.
- BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection – a literature review. **Trends in analytical chemistry**. v. 16, n° 6. 1997.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3°Ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- BEACOM, E.; BOGUE, J.; REPAR, L. Market-oriented Development of Plant-based Food and Beverage Products: A Usage Segmentation Approach. **Journal of Food Products Marketing**. v. 27. 2021.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3° Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003.
- BOUAID, A.; ACHERKI, H.; BONILLA, M. H.; MARCHETTI, J. M. Enzymatic ethanolysis of high free fatty acid jatoppha oil using Eversa Transform. **Energy Advances**. v. 1, p. 159-168. 2022.
- CHANG, M. Y.; CHAN, E-S.; SONG, C.P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel**. v. 283. 2021.
- CONIGLIO, S.; SHUMSKAYA, M.; VASSILIOU, E. Unsaturated Fatty Acids and Their Immunomodulatory Properties. **Biology**, 12, 279. 2023.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de Alimentos de Fennema**. 5° Ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- DHIMAN, A.; CHOPRA, R.; SINGH, P.K.; SINGH, A.; HOMROY, S. Enzymatic interesterification of perilla seed oil and palm stearin: A sustainable approach to develop a novel zero-trans-fat margarine rich in omega-3 fatty acids. **Journal of Food Science**. v. 89. pp. 8504-8523. 2024
- DOHMEN, R.; HUBALEK, S.; MELKE, J.; MESSMER, T.; CANTONI, F.; MEI, A.; HUEBER, R.; MITIC, R.; REMMERS, D.; MOUTSATSOU, P.; POST, M.; JACKISCH, L.; FLACK, J. Muscle-derived fibro-adipogenic progenitor cells for production of cultured bovine adipose tissue. **npj Science of Food**. v. 06. 2022.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 197-212. 2010.

FREE3D. Palmitic Acid 3D model (C16H32O2). Free3D, [s.d.]. Disponível em: <https://free3d.com/pt/3d-model/palmitic-acid-3d-model-c16h32o2-5338.html>. Acesso em: 9 fev. 2026.

GARCÉS R.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; VENEGAS-CALERÓN, M.; MORENO-PÉREZ, A.; SALAS, J. A GC/MS method for the rapid determination of desaturated triacylglycerol positional isomers. **Food Chemistry**. v. 409. 2023.

HOEK, A. C. et al. **Replacement of meat by meat substitutes**. A survey on person- and product-related factors in consumer acceptance. *Appetite*. v. 56, p. 662-673. 2011.

HONG, C. R. et al. An Overview of Structured Lipid in Food Science: Synthesis Methods, Applications, and Future Prospects. **Journal of Chemistry**. 2023.

KARABULUT, I.; TURAN, S.; VURAL, H.; KAYAHAN, M. Human Milk Fat Substitute Produced by Enzymatic Interesterification of Vegetable Oil Blend. **Food Technology and Biotechnology**. v. 45. p. 434-438. 2007.

KIM, B.H.; HWANG, J.; AKOH, C.C. Liquid microbial lipase – recent applications and expanded use through immobilization. **Current Opinion in Food Science**, 50:100987. 2023.

LIU, Z.; EZERNIEKS, V.; ROCHFORD, S.; COCKS, B. Comparison of methylation methods for fatty acid analysis of milk fat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 210-215. 2018.

LUDDY, F.; BARFORD, R.; HERB, S.; MAGIDMAN, P.; RIEMENSCHNEIDER, R. Pancreatic Lipase Hydrolysis of Triglycerides by a Semimicro Technique. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 41. p. 693-696. 1964.

MANDAKAR, C.S.; BHAGAT, A.S.; NASSER, E.K.; ALTEMIMI, A.B.; CACCIOLA, F.; MAHNA, N. Structured Lipids: Synthesis, Genetic Engineering, and Applications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 102:1325-1337. 2025.

MARQUES, M. R. F. **Bioquímica**. 1º Ed. Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2014.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, J. A.; ARANA-PEÑA, S.; CARBALLARES, D.; YATES, M.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilized Biocatalysts of Eversa Transform 2.0 and Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Comparison of Some Properties and Performance in Biodiesel Production. **Catalysts**. v. 10, 738. 2020.

MAYOOKHA, V. P.; RAKSHA, U.; HAROHALLY, N. V.; KUMAR, G. S. Solvent-free synthesis of medium chain triacylglycerols by esterification of capric, caprylic acids with 1,3-specific and non-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 102. n. 03. p. 657-667. 2024.

MICHEL, F.; HARTMANN, C.; SIEGRIST, M. Consumers' associations, perceptions and acceptance of meat and plant-based meat alternatives. **Food Quality and Preference**. v. 87. 2021.

MONTEIRO, R. R. C.; ARANA-PEÑA, S.; ROCHA, T. N.; MIRANDA, L. P.; BERENQUER-MURCIA, A.; TARDIOLI, P. W.; SANTOS, J. C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**. v. 164. p. 1566-1587. 2021.

MONTEIRO, R. R. C.; NETA, M. M. F. M.; SOARES, J. B.; LOMONACO, D.; LUNA, F. M. T.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; VIEIRA, R. S. Eversa transform 2.0 immobilized on a hydrophobic support enables the solvent-free almost quantitative esterification of the free fatty acids from soybean oil with neopentylglycol. **Renewable Energy**. v. 237, part A, 121598. 2024.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 2018. 332 p. (Estudos da pós-graduação). ISBN 978-85-7485-327-7.

OH, D.; NO, D. S.; YOON, S. W.; KIM, Y.; KIM, H. R.; KIM, I. H. Synthesis of palmitoleic acid-enriched triacylglycerol via two-step enzyme reaction. **Process Biochemistry**. v. 113, p. 234-240. 2022.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids – Novel Fats with Medical, Nutraceutical and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 03. 2002.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Ltd. 2005.

SHAHIDI, F.; HOSSAIN, A. Role of Lipids in Food Flavor Generation. **Molecules**. v. 27, 5014. 2022.

SIVAKANTHAN, S.; MADHUVITH, T. Current trends in applications of enzymatic interesterification of fats and oils: A review. **LWT – Food Science and Technology**. v. 132, 109880. 2020.

SOLEIMANIAN, Y.; GHAZANI, S. M.; MARANGONI, A. G. Enzymatic glycerolysis for the conversion of plant oils into animal fat mimetics. **Food Research International**. v. 174. 2023.

TODACIÊNCIA. Lipídios cis e trans. TodaCiência, [s.d.]. Disponível em: [https://www.todaciencia.com.br/bioquimica/lipdios\\_cis\\_e\\_trans.html](https://www.todaciencia.com.br/bioquimica/lipdios_cis_e_trans.html). Acesso em: 9 fev. 2026.

TURBOSQUID. 3D model c55h98o6. TurboSquid, [s.d.]. Disponível em: [https://www.turbosquid.com/pt\\_br/3d-models/3d-model-c55h98o6/1022755](https://www.turbosquid.com/pt_br/3d-models/3d-model-c55h98o6/1022755). Acesso em: 9 fev. 2026.

VIEIRA, I. S. A. **Produção de lipídios dietéticos, a partir de óleo de argão e óleo de gralha de uva por catálise enzimática**. Dissertação para obtenção de título de mestre em Engenharia Alimentar. Universidade de Lisboa. 2018.

YANG, D.; LEE, Y. Y.; LU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Z. Internal Factors Affecting the Crystallization of the Lipid System: Triacylglycerol Structure, Composition, and Minor Components. **Molecules**. v. 29, 1847. 2024.

ZARRINMEHR, M. J.; DANESHVAR, E.; NIGAM, S.; GOPINATH, K. P.; BISWAS, J. K.; KWON, E. E.; WANG, H.; FARHADIAN, O.; BHATNAGAR, A. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. **Bioresource Technology**. v. 344, part B, 126303. 2022.

ZHANG, M.; YANG, X.; ZHAO, H.T.; DONG, A.J.; WANG, J.; LIU, G.Y.; WANG, P.; CHENG, C.L.; ZHANG, H. A quick method for routine analysis of C18 *trans* fatty acids in

non-hydrogenated edible vegetable oils by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Control**. v. 57, p. 293-301. 2015.

ZHANG, Y.; FU, Y.; LI, H.; WANG, X.; WANG, X. A systematic review on the acyl migration in enzymatic synthesis of structured lipids: Mechanisms, influencing factors, evaluation methods, and future prospects. **Food Research International**. v. 196. 2024.

ZHOU, J.; LEE, Y.; MAO, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Z. Future of Structured Lipids: Enzymatic Synthesis and Their New Applications in Food Systems. **Foods**. v. 11, 2400. 2022.

## ANEXO I – ENZIMAS SOLICITADAS PARA DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

Cumpre informar que houve dificuldade na aquisição da enzima Eversa Transform 2.0. Apesar do pedido ter sido realizado no início de junho de 2025, o único fornecedor da enzima no Brasil (Sigma-Aldrich) relatou problemas com o fornecedor geral e não entregou o material, informando apenas em dezembro de 2025 a possível data de entrega somente em janeiro de 2027, o que pode ser observado na Figura 19, no Anexo II. A indisponibilidade para entrega se estende às demais enzimas possíveis de serem utilizadas neste trabalho conforme Anexo I, figura 20. Dessa forma, todos os experimentos foram realizados com uma sobra da enzima de outros projetos e cedida por outro grupo de pesquisa.

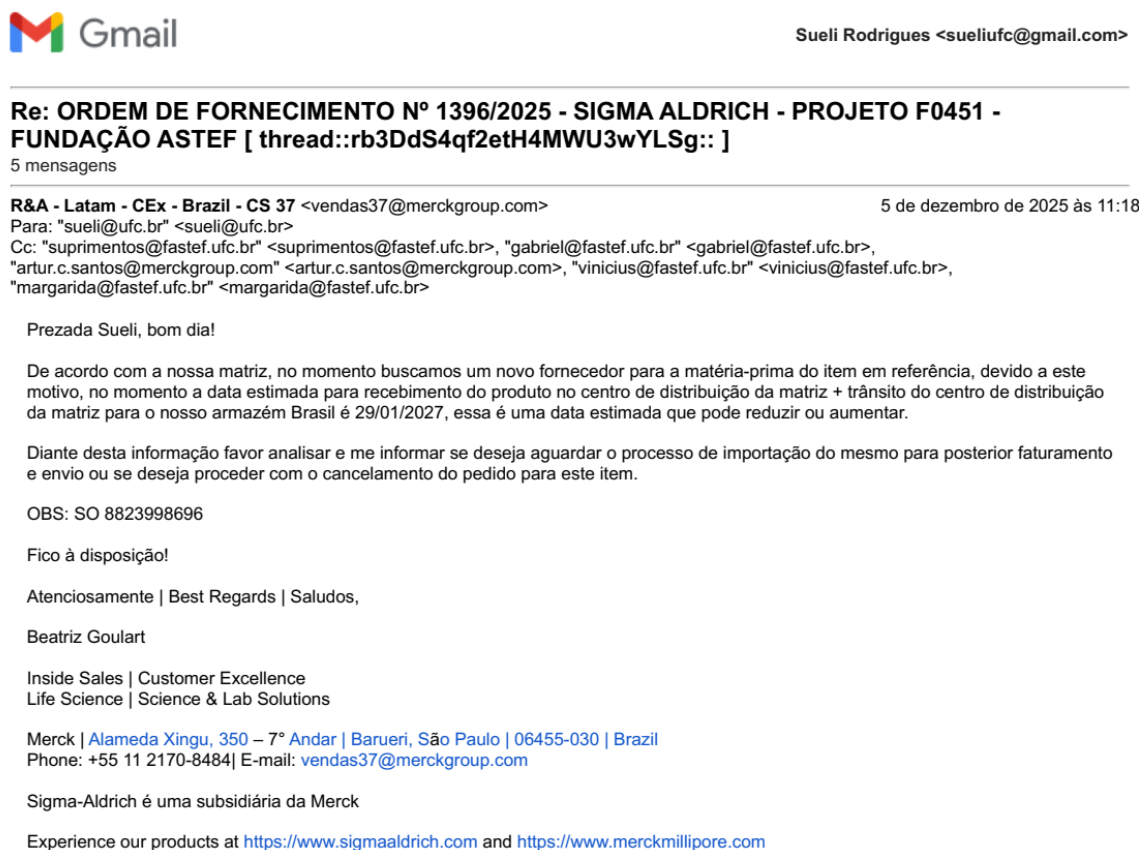
Figura 19 - Enzimas solicitadas e com atraso na entrega por parte do fornecedor.

| <b>Código do Produto</b> | <b>Descrição do produto</b>                  | <b>Quantidade</b> |
|--------------------------|--|-------------------|
| 1. 76546-50G             | Lipase, immobilized                          | 1                 |
|                          | Previsão de Entrega 18/8/2025 - Quantidade 1 |                   |
| 2. 52001-50G             | LIPASA DE RHIZOMUCOR MIEHEI, INMOVILIZAD     | 1                 |
|                          | Previsão de Entrega 25/6/2025 - Quantidade 1 |                   |
| 3. SAE0065-250ML         | LIPASE FROM ASPERGIL                         | 1                 |
|                          | Previsão de Entrega 8/7/2025 - Quantidade 1  |                   |

Fonte: Comunicação pessoal cedida por Profa. Dra. Sueli Rodrigues, 2026.

## ANEXO II – E-MAIL COM NOVA PREVISÃO DE ENTREGA PARA AS ENZIMAS

Figura 20 - E-mail resposta do fornecedor das enzimas com uma nova data para entrega apenas para 2027.



Fonte: Comunicação pessoal cedida por Profa. Dra. Sueli Rodrigues, 2026.