



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Elizabeth Cristina Tavares Veloso

**Produção, caracterização e imobilização de lipase de
Aspergillus niger 11T53A14 em nanopartículas magnéticas de
ferrita de níquel e carvão ativado**

Rio de Janeiro

2024

Elizabeth Cristina Tavares Veloso

**Produção, caracterização e imobilização de lipase de *Aspergillus niger*
11T53A14 em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão
ativado**

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Marta Antunes Pereira Langone
Prof^a. Dr^a. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
Prof^a. Dr^a. Marcia Monteiro Machado Gonçalves

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

V443 Veloso, Elizabeth Cristina Tavares.

Produção, caracterização e imobilização de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão ativado. – 2024.

155 f.

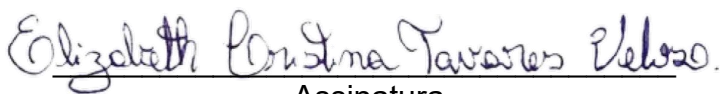
Orientador (a): Marta Antunes Pereira Langone
Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
Marcia Monteiro Machado Gonçalves

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Lipase – Teses. 2. Ferritas – Teses. 3. Carvão ativado – Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Sant'Ana, Gizele Cardoso Fontes. III. Gonçalves, Marcia Monteiro Machado. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 577.15

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

29 de setembro de 2024

Data

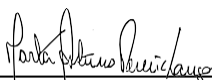
Elizabeth Cristina Tavares Veloso

Produção, caracterização e imobilização de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão ativado

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos.

Aprovado em 26 de junho de 2024

Banca examinadora:



Dra. Marta Antunes Pereira Langone (Orientadora)
Instituto de Química - UERJ.



Dra. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana (Coorientadora)
Instituto de Química - UERJ.



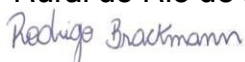
Dr. Felipe Valle do Nascimento. Instituto de Química - UERJ.



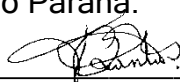
Dra Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras - Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Dra. Eliane Pereira Cipolatti - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Dr. Rodrigo Brackmann - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.



Dra. Tamires Carvalho dos Santos - Synth Biotec.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus e de forma especial a minha mãe Maria das Graças Tavares pelo amor, apoio e amizade; a minha avó Margarida Cardoso que é o amor da minha vida; ao meu marido Johnny pela força nos momentos difíceis; aos meus tios, primos e amigos.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por cada oportunidade, por ter abençoado meus caminhos, pela força e perseverança.

Agradeço a minha amada e querida mãe Maria das Graças que sempre me ensina através de atitudes e palavras. Pelos conselhos vindos de maneira sabia e que me levam sempre a escolher o que é melhor para minha vida.

Aos meus avós Margarida Cardoso Tavares e João Tavares Sobrinho (*in memoriam*) que são os amores da minha vida e que vivem no meu coração, que desde sempre me incentivaram a dar o melhor de mim e com sua paciência e bondade me ensinaram os princípios que guiam minha vida.

Aos meus tios e primos pelo carinho, atenção, por todos os momentos vividos juntos em que me proporcionaram alegrias dando mais cor a minha vida.

Agradeço também a meu marido Johnny Veloso pelo apoio, força, carinho, paciência, compreensão e principalmente por sempre me ajudar nos momentos difíceis.

Agradeço as minhas orientadoras, Dr^a Gizele Sant'Ana, Dr^a Márcia Gonçalves e Dr^a Marta Langone pela sua orientação dedicada, pelo apoio, oportunidades e sugestões. Por tudo que aprendi e ainda tenho a aprender.

A todos os colegas de laboratório por sua amizade e companheirismo no dia-a-dia. A Juliana e Thamires, aluna de iniciação pelo apoio técnico, companheirismo e comprometimento. A Tamires Carvalho, Mariana Silva, Michelle, João Hampshire, João Menezes e Nazaré por seus valiosos conselhos, por todo apoio e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao professor Dr Márcio Paredes por ceder seu laboratório para realização dos meus experimentos no uso de equipamento. Aos técnicos e alunos do laboratório por me receberem sempre tão bem.

A Verônica do Instituto Federal do Rio de Janeiro por ceder seu laboratório para realização de algumas análises e a técnica do laboratório Rafaela por seu auxílio na realização de análises.

A Embrapa Agroindústria de Alimentos que gentilmente cedeu o microrganismo utilizado nesse trabalho.

As professoras Eliane Cipolatti e Evelin Manoel do Laboratório de Biotecnologia Microbiana de Fármacos da UFRJ pela parceria.

O meu muito obrigada aos professores Rodrigo Brackmann e Alexandre Gaspar pela parceria e suporte.

A professora Priscilla Finotelli, ao Marcel Martins e toda sua equipe do Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional da UFRJ pela parceria e suporte na funcionalização das nanopartículas.

A Mayara Vidal e ao Centro de Pesquisa em Biologia Celular e Ômicas (BIO-IMICs) pelo apoio e parceria.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UERJ e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

VELOSO, E. C. T. *Produção, caracterização e imobilização de lipase de Aspergillus niger 11T53A14 em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão ativado*. 2024. 155 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Este trabalho teve como objetivo produzir e imobilizar a lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14. A produção foi realizada por Cultivo em estado sólido (CES) conduzido a 32°C por 40h, em meio contendo farelo de trigo (96,48 % m/m) e a borra de café (3,52 % m/m) como indutor, enriquecido com 0,6 % de nitrogênio, 55% de umidade e inoculado com 10⁷ conídios/g. Primeiramente, foram avaliados o tipo de borra de café (tipo A, B -grãos 100% arábica e C - arábica/ robusta/ conilon ou mistura deles) e, posteriormente, foi avaliado o tipo de reator usado no CES (placa de petri e frasco *erlenmeyer*). Adicionalmente, o CES foi realizado em reator de leito fixo (38,0 cm x 4,5 cm) variando a taxa de aeração com ar umedecido (0,2; 0,35; 0,5; 1,0; e 1,5 volume de ar/volume de meio/ minuto - vvm). Amostras foram retiradas de três regiões diferentes do biorreator: base (h= 10,5 cm), meio (h= 21 cm) e topo (h= 31,5 cm). A imobilização da lipase foi realizada por adsorção física usando como suporte ferrita de níquel e o carvão ativado. Os resultados obtidos revelaram que a maior atividade lipásica (120 U/g) foi obtida com a borra de café A (17,3% de lipídios). Em relação ao tipo de reator usado no CES, com o *erlenmeyer* foi obtida maior produção com 140,6 U/g. Com a borra de café A selecionada, foi estudada a CES em reator de leito fixo sendo a maior atividade lipásica (156,1 U/g) obtida com 0,5 vvm. A concentração do extrato enzimático bruto (EEB) foi feita por precipitação com sulfato de amônio nas condições de saturação (40, 50, 60, 70, 80 e 90%) e através de ultrafiltração com uso da membrana Amicon®, onde foram testados os tamanhos de 10, 30, 50 e 100 kDa. A concentração EEB foi mais eficaz usando a membrana Amicon® com 50 kDa obtendo uma atividade 3,0 vezes maior do que a inicial. A lipase apresentou atividade ótima a pH 6,0 e a temperatura de 50 °C. Para os testes de imobilização por adsorção foi obtido que o melhor tempo de contato foi 120 min a 25°C. A imobilização usando o carvão ativado alcançou uma eficiência de imobilização superior, atingindo 89 %, entretanto com a ferrita de níquel (NiFe₂O₄), nas mesmas condições, obteve cerca de 20 %. A fim de melhorar o processo de imobilização usando a NiFe₂O₄, foi realizada uma modificação do suporte com APTMS, seguida de uma ligação covalente utilizando glutaraldeído como agente ligante. As condições da imobilização covalente foram: 24 h de tempo de contato e 5°C de temperatura. A imobilização covalente utilizando a NiFe₂O₄ modificada resultou em uma eficiência de 99 %.

Palavras-chave: cultivo em estado sólido; imobilização de lipase; *Aspergillus niger*; biocatálise.

ABSTRACT

VELOSO, E. C. T Production, characterization and immobilization of lipase from *Aspergillus niger* 11T53A14 on magnetic nickel ferrite nanoparticles and activated carbon. 2024. 155 f. Thesis (DSc. in Chemical Engineering) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

This work aimed to produce and immobilize lipase from *Aspergillus niger* 11T53A14. Production was carried out by Solid State Cultivation (CES) conducted at 32°C for 40h, in a medium containing wheat bran (96.48% m/m) and spent coffee grounds (3.52% m/m) as inducer, enriched with 0.6% nitrogen, 55% moisture and inoculated with 107 conidia.mL⁻¹. Firstly, the type of coffee grounds was evaluated (type A, B - 100% Arabica beans and C - Arabica/Robusta/ Conilon or a mixture thereof) and, subsequently, the type of reactor used in the CES (Petri dish and *Erlenmeyer* flask). Additionally, the CES was carried out in a fixed bed reactor (38.0 cm x 4.5 cm) varying the aeration rate with humidified air (0.2; 0.35; 0.5; 1.0; and 1.5 volume of air/volume of half/minute - vvm). Samples were taken from three different regions of the bioreactor: base (h= 10.5 cm), middle (h= 21 cm), and top (h= 31.5 cm). Lipase immobilization was carried out by physical adsorption using nickel ferrite and activated carbon as support. The results revealed that the highest lipase activity (120 U.g⁻¹) was obtained with coffee grounds A (17.3% lipids). About the type of reactor used at CES, with the *Erlenmeyer* flask, a higher production was obtained with 140.6 U.g⁻¹. With the selected coffee grounds A, CES was studied in a fixed bed reactor, with the highest lipase activity (156.1 U.g⁻¹) obtained at 0.5 vvm. The concentration of the crude enzyme extract (EEB) was done by precipitation with ammonium sulfate under saturation conditions (40, 50, 60, 70, 80, and 90%) and through ultrafiltration using the Amicon® membrane, where the sizes of 10, 30, 50 and 100 kDa. The EEB concentration was more effective using the Amicon® membrane with 50 kDa, obtaining an activity 3.0 times greater than the initial one. The lipase showed optimal activity at pH 6.0 and a temperature of 50 °C. For the adsorption immobilization tests, the best contact time was found to be 120 min at 25°C. Immobilization using activated carbon achieved a higher immobilization efficiency, reaching 89%, however with nickel ferrite (NiFe₂O₄), under the same conditions, it achieved around 20%. To improve the immobilization process using NiFe₂O₄, a modification of the support was carried out with APTMS, followed by a covalent bond using glutaraldehyde as a binding agent. The covalent immobilization conditions were: 24 h contact time and 5°C temperature. Covalent immobilization using modified NiFe₂O₄ resulted in an efficiency of 99%.

Keywords: solid state fermentation; *Aspergillus niger*; immobilized lipase; biocatalysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reações catalisadas por lipases.....	22
Figura 2 - Mecanismo Catalítico da Lipase de Hidrólise de Éster	24
Figura 3- Ativação interfacial da lipase.....	25
Figura 4 – Demonstração da definição da CES	31
Figura 5 – Esquema do processo em microescala que ocorre durante o CES.....	37
Figura 6 - Aspecto microscópico do <i>A. niger</i>	39
Figura 7- Esquema dos métodos de imobilização enzimática.....	52
Figura 8- Ativação interfacial das lipases em suportes hidrofóbicos	53
Figura 9 – Esquema mostrando o processo de imobilização covalente, onde (A) resíduo de aminoácido ativo; (B) funcionalidade de ligação do suporte; (C) suporte e (D) espaçador.....	56
Figura 10- Tipos gerais de arranjos de nanopartículas magnéticas com polímeros, moléculas e nanopartículas inorgânicas.....	60
Figura 11- Estrutura cúbica cristalina da ferrita	62
Figura 12 – Matérias-primas da CES: (a) Farelo de trigo, (b) borra de café.....	66
Figura 13 – Esquema do aparato experimental usado na produção de lipase por CES: (1) compressor de ar, (2) rotâmetro, (3) umidificador, (4) biorreator de leito fixo e (5) estufa.	74
Figura 14- Esquema da imobilização de lipase na superfície de NiFe_2O_4 funcionalizado.	86
Figura 15- Efeito de diferentes tipos de borra de café na produção de lipase.	91
Figura 16- Efeito do tipo de reator usado na produção da lipase por CES	93
Figura 17- Efeito da variação da vazão da aeração em biorreator de leito fixo na atividade lipásica (U/g) (A) e na umidade do PES (B).....	96
Figura 18- Biorreator de leito fixo após CES variando a taxa de aeração: (a) 1,5 ; (b) 1,0; (c) 0,5; (d) 0,35 e (e) 0,2 vvm.....	98
Figura 19- Atividade lipásica (U/mL) no precipitado e no sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90 % de saturação.	102

Figura 20- Atividade específica (U/mg de proteína) do precipitado e do sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação.	102
Figura 21 - Efeito do pH na atividade da lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14	106
Figura 22- Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14	107
Figura 23- Estabilidade da lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14 à estocagem em geladeira (6 °C).	109
Figura 24 - Cinética de adsorção da lipase de <i>A. niger</i> e CalB no carvão ativado da palha de cana-de-açúcar.....	111
Figura 25 - Capacidade de imobilização de lipase por adsorção em carvão ativado. <i>A. niger</i> lipase (A) e CalB (B) no carvão ativado.....	113
Figura 26 - Efeito da concentração inicial de proteína no rendimento de imobilização da lipase de <i>A. niger</i> em nanopartículas de ferrita de níquel.	118
Figura 27 - Perfil do DRX do carvão ativado antes e depois do processo de imobilização.....	121
Figura 28 – Perfil do DRX da ferrita de níquel.....	123
Figura 29 - Espectros de FTIR do carvão antes e depois da imobilização com diferentes extratos enzimáticos.	124
Figura 30 - Espectros FTIR de ferrita de níquel pura, funcionalizada com APTMS e após imobilização da lipase de <i>A. niger</i> por ligação covalente (NiFe ₂ O ₄ -APTMS-GLU).....	126
Figura 31 - TPD-NH ₃ de carvão ativado a partir da palha de cana-de-açúcar.	128
Figura 32 - TPD-NH ₃ da ferrita de níquel.....	129
Figura 33 - Imagens MEV do carvão ativado antes (A) e após o processo de imobilização: 0,1 mg mL ⁻¹ <i>A. niger</i> lipase (B), 0,1 mg mL ⁻¹ CalB (C) e 0,5 mg mL ⁻¹ CalB (D).	130
Figura 34 – Imagens MEV de ferrita de níquel com diferentes ampliações: ..	131
Figura 35- Imagens de MEV da ferrita de níquel funcionalizada antes e depois da imobilização da lipase de <i>A. niger</i> : (A) NiFe ₂ O ₄ - APTMS e x200, (B) NiFe ₂ O ₄ - APTMS e x2000, (C) NiFe ₂ O ₄ - APTMS-GLU e x200, (D) NiFe ₂ O ₄ -APTMS - GLU e x2000.....	132

Figura 36 – Curvas de VSM da NiFe_2O_4 , NiFe_2O_4 - APTMS e NiFe_2O_4 – APTMS- GLU	133
Figura 37 -Cinética de reação de hidrólise enzimática	155
Figura 38 -Determinação do teor de proteína - Gráfico da curva padrão de albumina sérica bovina (BSA)	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de aplicações industriais das lipases.....	26
Tabela 2- Caracterização bioquímica em relação ao pH e temperatura ótimos de lipases.	28
Tabela 3- Cultivo em estado sólido para produção de lipases usando fungos filamentosos e subprodutos agroindustriais.	41
Tabela 5- Composição do meio básico SOCAREAN	70
Tabela 6- Soluções para preparo do meio de sabugo de milho	71
Tabela 7 - Caracterização físico-química da matéria-prima usadas na CES ...	89
Tabela 8- Avaliação da concentração de lipase, presente no EBB obtido por CES, após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação.....	101
Tabela 9 - Avaliação do processo de concentração da lipase, presente no EEB concentrado obtido por CES, após ultrafiltração com membrana Amicon® Ultra.	105
Tabela 10 - Parâmetros da isoterma de Langmuir para adsorção da lipase CalB e de <i>A. niger</i> no carvão ativado	113
Tabela 11- Efeito da concentração inicial da enzima na capacidade adsortiva (Q) e rendimento na imobilização da lipase.	114
Tabela 12 - Efeito da concentração inicial da lipase de <i>A. niger</i> na atividade hidrolítica do biocatalisador imobilizado	115
Tabela 13 - Imobilização de <i>A. niger</i> em NiFe ₂ O ₄ : rendimento de imobilização (RI) e atividade enzimática	119
Tabela 14 - Propriedades magnéticas de ferritas de níquel calculadas por MAV: saturação magnética (Ms), campo coercitivo (Hc) e magnetização remanente (Mr).....	134

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	21
1 REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1 Lipase	22
1.1.1 <u>Aspectos gerais das lipases</u>	23
1.1.2 <u>Aplicação das Lipases</u>	26
1.1.3 <u>Caracterização de lipase</u>	27
1.1.4 <u>Fontes de lipases</u>	28
1.2 Produção de lipases	29
1.2.1 <u>Cultivo Submerso (CS)</u>	30
1.2.2 <u>Cultivo em Estado Sólido (CES)</u>	31
1.2.3 <u>Produção de lipase por cultivo em estado sólido (CES)</u>	33
1.2.3.1 Fungos filamentosos utilizados para produção de lipase por CES	35
1.2.3.2 Matéria-prima para CES	40
1.2.3.3 Biorreatores de CES	43
1.3 Purificação de lipase	47
1.4 Imobilização de Enzimas	49
1.4.1 <u>Métodos de imobilização de enzimas</u>	51
1.4.1.1 Imobilização por adsorção	52
1.4.1.2 Imobilização por ligação covalente	55
1.4.2 <u>Suportes para imobilização</u>	57
1.4.3 <u>Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização</u>	59
1.4.4 <u>Carvão ativado proveniente da palha de cana-de-açúcar</u>	63
2 MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1 Preparo das matérias-primas	66
2.2 Caracterização físico-química das matérias-primas	66
2.2.1 <u>Determinação de Resíduo Mineral (Cinzas Totais)</u>	67
2.2.2 <u>Determinação de Nitrogênio Total</u>	68
2.2.3 <u>Determinação de Lipídios totais</u>	69
2.2.4 <u>Umididade</u>	69
2.2.5 <u>Carboidratos</u>	70

2.3 Microrganismo.....	70
2.4 Estocagem e ativação do microrganismo.....	70
2.5 Meio de manutenção do microrganismo.....	71
2.6 Meio de sabugo de milho.....	71
2.7 Produção de conídios.....	72
2.8 Preparo do inóculo para cultivo em estado sólido.....	72
2.9 Meio de cultivo para a produção de lipase por CES.....	72
2.10 Avaliação do tipo de borra de café usado na CES.....	73
2.11 Avaliação do reator de bancada usado na CES.....	73
2.12 Avaliação da aeração na CES para produção de lipase em reator de leito fixo.....	74
2.13 Obtenção do extrato enzimático.....	75
2.14 Concentração do extrato enzimático bruto da lipase.....	75
2.14.1 <u>Precipitação proteica com sulfato de amônio.....</u>	75
2.14.2 <u>Concentração por ultrafiltração.....</u>	76
2.15 Determinações analíticas.....	77
2.15.1 <u>Determinação da atividade lipásica.....</u>	77
2.15.2 <u>Atividade específica aparente.....</u>	79
2.15.3 <u>Determinação do teor de proteína.....</u>	79
2.16 Caracterização da lipase obtida no cultivo.....	80
2.17 Imobilização da lipase.....	81
2.17.1 <u>Suportes.....</u>	81
2.17.1.1 Ferrita de níquel.....	82
2.17.1.2 Carvão ativado.....	82
2.17.2 <u>Imobilização da lipase no Carvão Ativado.....</u>	83
2.17.2.1 Efeito da quantidade de proteína no processo de imobilização do carvão ativado e isoterma de adsorção de Langmuir.....	84
2.17.3 <u>Imobilização da lipase em nanopartículas de NiFe₂O₄.....</u>	85
2.17.3.1 Procedimento de imobilização.....	85
2.17.4 <u>Caracterização dos suportes e do biocatalisador.....</u>	86
2.17.4.1 Análise de difração de raios X (DRX).....	86
2.17.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	87
2.17.4.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	87

2.17.4.4 Dessorção de amônia com temperatura programada (TPD-NH ₃)	88
2.17.4.5 Magnetometria de amostra vibratória (VSM)	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1 Caracterização físico-química das matérias-primas	89
3.2 Estudo da produção de lipase por CES	90
3.2.1 <u>Avaliação de diferentes tipos de borra de café para produção de lipase</u>	90
3.2.2 <u>Avaliação do reator de bancada usado na CES</u>	92
3.2.3 <u>Produção de lipase em biorreator de leito fixo e avaliação da taxa de aeração na produção da lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14</u>	95
3.3 Concentração da lipase do extrato enzimático obtido no CES	100
3.3.1 <u>Concentração por precipitação com sulfato de amônio</u>	100
3.3.2 <u>Concentração por ultrafiltração</u>	104
3.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	106
3.5 Estabilidade a estocagem sob refrigeração.....	109
3.6 Imobilização da lipase.....	110
3.6.1 <u>Imobilização por adsorção física utilizando carvão ativado</u>	110
3.6.1.1 Cinética de adsorção da lipase no carvão ativado obtido da palha de cana-de-açúcar	110
3.6.1.2 Efeito da concentração de proteína no processo de imobilização.....	112
3.6.2 <u>Imobilização em ferrita de níquel</u>	117
3.7 Caracterização do biocatalisador	121
3.7.1 <u>Difração de Raio X (DRX)</u>	121
3.7.2 <u>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</u>	123
3.7.3 <u>Dessorção de amônia programada por temperatura (TPD-NH₃)</u>	126
3.7.4 <u>Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	129
3.7.5 <u>Magnetometria de amostra vibrante (VSM)</u>	132
CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICE- Determinações analíticas	155

INTRODUÇÃO

As lipases movimentam um mercado mundial de bilhões de dólares por ano, estima-se um valor de US\$ 448.78 milhões em 2024, e deve atingir US\$ 645.18 milhões até 2029, com 7.53 % CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) para o período 2024-2029. As lipases possuem um mercado com rápido crescimento, isso se deve principalmente aos medicamentos, que utilizam essa enzima para facilitar a digestão das gorduras e regular os níveis de colesterol no organismo através do controle do apetite, e ao seu uso industrial, em várias aplicações como aromatizantes, agentes de limpeza, nas indústrias alimentícias, entre outras (Lipase Market; Mordor Intelligence, 2024).

Lipases podem ser obtidas de origem animal, vegetal e microbiana, e suas propriedades variam de acordo com a fonte de obtenção. Industrialmente as mais utilizadas são de origem microbiana. Dentre os microrganismos produtores de lipases, os fungos filamentosos, como o *Aspergillus niger*, se destacam por produzirem lipases com propriedades catalíticas importantes para várias aplicações comerciais. Além disso, a maioria dos fungos produz lipases extracelulares, facilitando assim a extração da enzima do meio fermentativo (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

A produção de lipases por cultivo em estado sólido (CES) é um processo no qual o crescimento dos microrganismos ocorre em um suporte sólido em valores mais baixos de atividade de água (Hansen *et al.* 2015 e Nema *et al.* 2019). A CES apresenta-se como um processo mais vantajoso, pois requer menor demanda de energia; apresenta maior produtividade; utiliza meios mais simples e de baixo custo, tais como subprodutos da agroindústria; apresenta semelhanças com o *habitat* dos fungos, possui menor risco de contaminação no processo; a aeração é simplificada em virtude da porosidade do material e o extrato bruto obtido geralmente é mais concentrado em comparação com a CS, o que facilita a sua recuperação do meio de cultura (Colla *et al.*, 2010). A utilização de subprodutos da agroindústria como matéria-prima é uma das vantagens desse processo, já que estes possuem fontes de nutrientes para os microrganismos, favorecendo seu crescimento (Reinehr *et al.*, 2014). No Brasil,

a agroindústria e a indústria alimentícia geram uma grande quantidade de subprodutos, que são ricos em nutrientes. Entre os subprodutos gerados destaca-se a borra de café, que é um subproduto proveniente da extração aquosa dos compostos solúveis do café torrado para produção de café instantâneo ou do preparo da bebida e é rico em proteínas, lipídios e açúcares. O farelo de trigo é um coproduto com potencial de aplicação no CES, sendo este proveniente da produção de farinha de trigo, onde é rico em proteínas, carboidratos e fibras (Durán *et al.*, 2017).

Para produção da lipase pelo processo de CES a escolha do biorreator é de grande importância para obtenção de bons resultados. Os biorreatores mais empregados em CES são do tipo bandeja, tambor rotatório, reatores de leito fixo e de leito fluidizado (Robinson ; Nigam, 2003). O reator de leito fixo tem um bom desempenho para a CES devido às características de transferência de massa e de calor. Nesse tipo de configuração o ar é forçado através do leito estático, ajudando na reposição de O₂ e na manutenção da umidade, além de remover calor e CO₂ (Arora; Rani ; Ghosh, 2018a).

Após a produção da enzima, dependendo do tipo de aplicação, o extrato enzimático bruto obtido precisa ser purificado. Diversas estratégias podem ser utilizadas para purificação/concentração de lipases, podendo envolver um ou mais métodos, tais como métodos de precipitação; cromatografia de troca iônica, exclusão por tamanho, cromatografia por afinidade; processo envolvendo membranas e sistemas bifásicos. A escolha do método utilizado vai depender da aplicação e das características da lipase (Show *et al.*, 2015).

A aplicação da enzima na sua forma livre é dificultada pelas condições operacionais, pois muitas enzimas não são estáveis em tais condições, podendo dessa forma perder sua atividade catalítica. Portanto, um dos requisitos para utilização desses biocatalisadores em processos industriais é a sua imobilização. O uso de enzimas imobilizadas apresenta várias vantagens, tais como, o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, a facilidade de recuperação e a reutilização do biocatalisador no final do processo. Além disso, permite o emprego de reatores de leito fixo ou fluidizado em processos contínuos (Resende, 2017).

A escolha do método de imobilização é de grande importância. Não existe um método aplicável a todas as enzimas, é necessário levar em

consideração as características físico-químicas, as diferentes propriedades dos substratos e produtos e a aplicação que se deseja. Os principais métodos de imobilização de enzimas são: adsorção, ligação covalente ou ligação iônica, retenção física ou encapsulação; e entrecruzamento ou ligação cruzada. Dentre estes, a adsorção física proporciona uma rota simples e direta para imobilização de enzimas, na qual as enzimas são ligadas ao suporte por ligações fracas (interações hidrofóbicas, iônicas e forças de Van der Waals) (Resende; Rodrigo Ribeiro *et al.*, 2017). Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as lipases. Portanto, para cada aplicação é necessário avaliar o procedimento e o suporte mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (Mateo *et al.*, 2007).

Outro fator importante no processo de imobilização é a escolha do suporte. O suporte ideal deve ter uma boa biocompatibilidade, propriedades físico-químicas estáveis e proporcionar locais de ligação para a enzima. Segundo Vaghari *et al.* 2016, as nanopartículas magnéticas têm sido reconhecidas como suportes atrativos para a imobilização de enzimas, devido à sua elevada área superficial e à facilidade de separação do meio reacional sob a aplicação de um campo magnético externo. Além disso, possui flexibilidade para a modificação da superfície com ligações que podem facilitar e promover uma melhor e mais forte interação com a enzima, o que leva a um aumento da estabilidade no processo.

O carvão ativado (AC) é um suporte poroso com características interessantes para imobilização de enzimas, sendo destacado por possuir elevada área superficial e resistência térmica, química e mecânica (Gonçalves *et al.*, 2021).

O Brasil é um dos maiores produtores de etanol do mundo. A principal produção desse álcool no país é proveniente da cana-de-açúcar (Silveira *et al.*, 2020). A geração de palha de cana-de-açúcar tem crescido devido à substituição da colheita manual pela mecanizada, o que aumenta a quantidade desse resíduo (Alves *et al.*, 2022). Além disso, tradicionalmente, a cana-de-açúcar é pré-queimada para retirar a palha e facilitar a colheita. Legislações mais restritivas têm impedido essa prática, levando a uma maior oferta de

palha. Assim, a palha de cana-de-açúcar é uma matéria-prima alternativa para a produção de AC. Poucos relatos utilizam a palha da cana-de-açúcar como precursor de carbono para a produção de carvão ativado. A utilização de CA de subprodutos agroindustriais como suporte para a imobilização de enzimas é interessante, não só pelas características físico-químicas desse material, como também pelo seu menor custo, já que este é obtido através da palha de cana de açúcar.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção e a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 por CES em reator de leito fixo, visando dar continuidade aquele desenvolvido por Tavares (2018) que vislumbrou o potencial do uso da borra de café e farelo de trigo na produção de lipase de *A. niger* 11T53A14. Além disso, a imobilização da enzima foi avaliada visando o potencial de um novo biocatalisador. O processo de imobilização foi realizado utilizando dois suportes: carvão ativado da palha de cana-de-açúcar e nanopartícula magnética de ferrita de níquel. Foi investigada a imobilização de lipase por dois métodos: adsorção física e ligação covalente.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou a produção, caracterização parcial da lipase produzida pela linhagem mutante *Aspergillus niger* 11T53A14 por CES, em reator de leito fixo, e imobilização, utilizando nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão ativado obtido da palha de cana-de-açúcar, a fim de obter um biocatalisador enzimático promissor para aplicações industriais.

Objetivos específicos

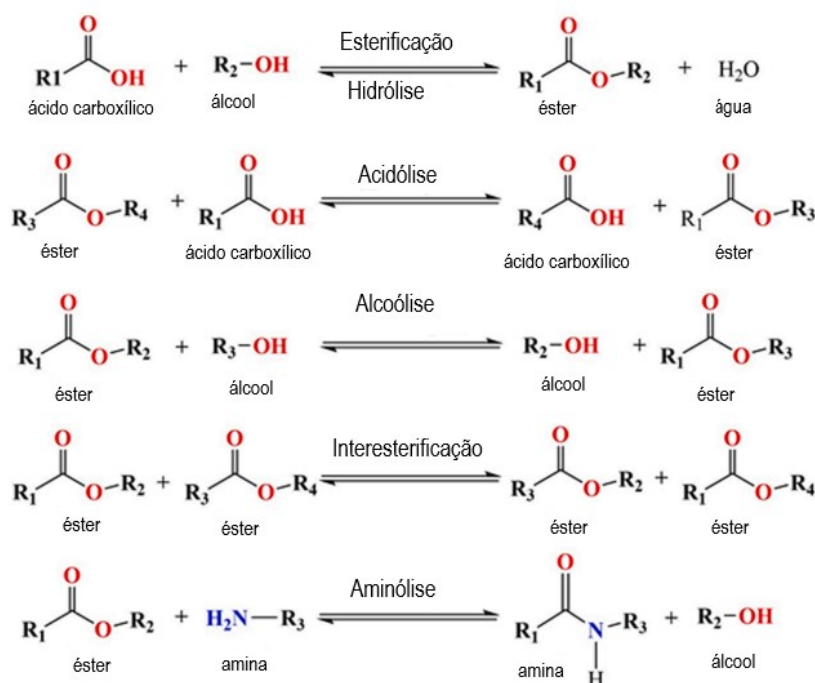
- Estudar a produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 por cultivo em estado sólido (CES) utilizando borra de café como indutor, verificando o efeito do tipo de borra de café usada;
- Estudar a configuração do reator tipo bandeja utilizado na produção da lipase por CES, avaliando a manutenção da umidade durante o processo fermentativo;
- Produzir lipase utilizando reator de leito fixo, avaliando o efeito da taxa de aeração e utilizando borra de café como indutor;
- Estudar a concentração do extrato enzimático bruto (EEB) pela técnica de precipitação com sulfato de amônio e também pela ultrafiltração utilizando tubos de centrífuga Amicon® Ultra–15 Centrifugal Filter Units, avaliando a eficiência das duas técnicas;
- Caracterizar a lipase presente no extrato enzimático bruto concentrado quanto à temperatura e ao pH ótimos, e estabilidade à estocagem;
- Estudar a imobilização da lipase presente no extrato bruto concentrado utilizando duas técnicas: adsorção física e ligação covalente;
- Avaliar dois suportes para imobilização da lipase: nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel e carvão ativado;
- Caracterizar os suportes e biocatalisadores produzidos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Lipase

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3). Sua função natural é catalisar a hidrólise de triglicerídeos com liberação de ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (Figura 1), porém, em meio aquo-restrito são capazes também de catalisar a reação reversa de esterificação, bem como reações de acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise (Figura 1), o que resulta na sua aplicação em várias áreas da biotecnologia, sendo uma das enzimas mais utilizadas em processos industriais (Salgado; Santos; Vanetti, 2022).

Figura 1- Reações catalisadas por lipases



Fonte: Remonatto *et al.*, 2022

Os substratos naturais das lipases são os triacilgliceróis de ácidos graxos que são preferencialmente de cadeias longas, com mais de 10 carbonos, porém, elas também podem catalisar a hidrólise de substratos de ácidos graxos de cadeias curtas e intermediárias (Salgado; Santos; Vanetti, 2022)

Diferentemente das esterases (hidrolases de ésteres carboxílicos, EC 3.1.1.1), as lipases possuem habilidade de catalisar a hidrólise de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa que são insolúveis em meio aquoso. As esterases apresentam maior especificidade por substratos de menor hidrofobicidade e triglicerídeos compostos por ácidos graxos com cadeia contendo menos do que seis átomos de carbono (Guncheva; Zhiryakova, 2011; Macrae; Hammond, 1985).

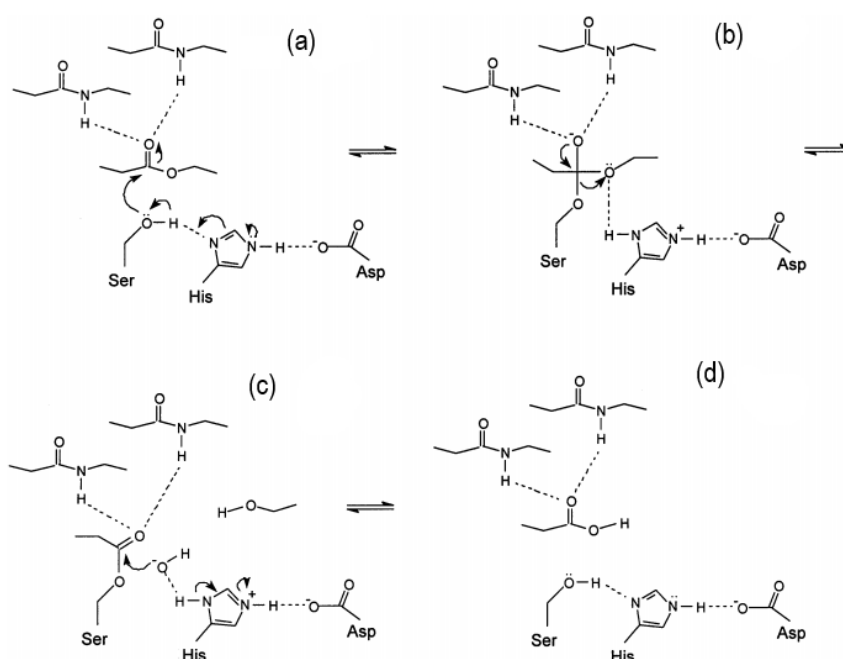
1.1.1 Aspectos gerais das lipases

As lipases são enzimas que fazem parte do grupo das α/β hidrolases. São carboxilesterases que atuam em triglicerídeos de cadeia longa. Seu sítio ativo é composto por uma tríade catalítica de resíduos de aminoácidos, que consiste em um resíduo nucleofílico (cisteína, serina ou aspartato), um resíduo catalítico ácido (aspartato ou glutamato) e um resíduo de histidina. A tríade mais comumente reportada é serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp) (Cortez; Castro ; Andrade, 2016; Melani; Tambourgi ; Silveira, 2020; Remonatto *et al.*, 2022).

O mecanismo catalítico (Figura 2) de hidrólise de éster catalisado por lipase é composto pelas seguintes etapas: inicialmente ocorre a ligação éster do lipídeo à enzima e o ataque do resíduo serina ao carbono carboxílico da ligação éster, formando um intermediário tetraédrico (a). Esse intermediário, por sua vez, é estabilizado por interações com dois grupos NH de peptídeos (b). Após a estabilização, o intermediário tetraédrico é desfeito pelo retorno da ligação C=O e, conseqüentemente, a clivagem da ligação éster, liberando assim um álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, formando-se assim o complexo acil-enzima. Em seguida ocorre novamente um

ataque nucleófilo por um íon hidroxila da água, abrindo assim a ligação C=O, formando um segundo intermediário (c). Por fim, o retorno da ligação C=O desfaz o intermediário tetraédrico, e ocorre assim a liberação do ácido graxo e a enzima é regenerada (d) (Cortez; Castro ; Andrade, 2016; Dijkstra ; Reetz, 1999; Reis *et al.*, 2009).

Figura 2 - Mecanismo Catalítico da Lipase de Hidrólise de Éster



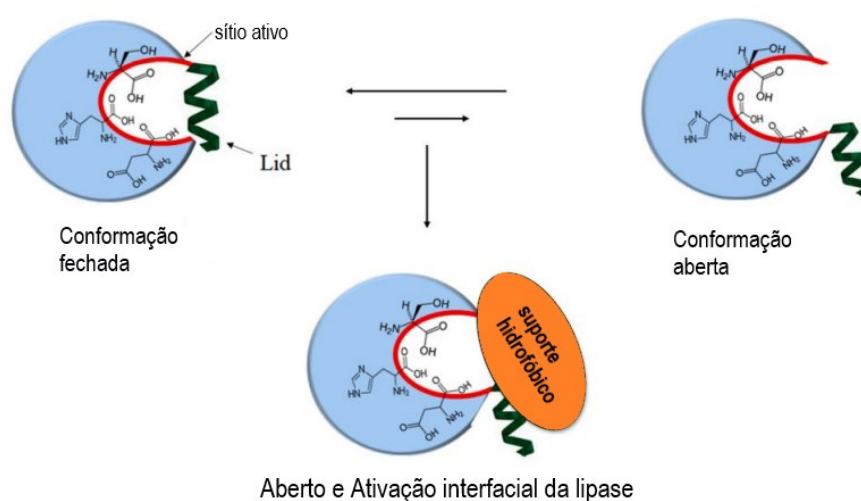
Fonte: Dijkstra ; Reetz, 1999

As reações catalisadas pelas lipases ocorrem na interface água/lipídio, onde ocorrem alterações conformacionais na sua estrutura. Essas mudanças estruturais estão associadas ao fenômeno cinético de ativação interfacial, que relaciona o aumento da atividade lipásica em função da presença de substratos insolúveis, que formam uma emulsão em meio aquoso (Dijkstra ; Reetz 1999; Jaeger ; Reetz 1998; Reis *et al.* 2009; Sharma; Chisti ; Banerjee 2001).

O sítio ativo da maioria das lipases em solução é protegido por uma superfície na forma de um laço, uma tampa, ou uma pequena α -hélice (conformação fechada). Quando ocorre a interação entre o substrato lipídico, a lipase sofre alterações sequenciais na sua estrutura tridimensional, onde a

tampa se adapta a uma nova conformação (conformação aberta), de modo que uma grande área hidrofóbica fica exposta, assim como o sítio ativo da lipase, o que facilita a ligação da lipase à interface água/lipídeo, como pode ser observado na Figura 3 (Remonatto *et al.*, 2022). A maioria das lipases apresenta ativação interfacial, porém existem exceções, de forma que o que melhor caracteriza as lipases é a sua capacidade de catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa (Cortez; Castro; Andrade, 2016; Rios *et al.*, 2018).

Figura 3- Ativação interfacial da lipase



Fonte: Adaptado de Remonatto *et al.*, 2022

As lipases são enzimas que possuem especificidade por determinados substratos, o que possibilita seu uso como biocatalisador em diversas aplicações industriais (Salgado *et al.*, 2022). Elas apresentam regioespecificidade, sendo divididas em três classes: (1) Lipases não específicas: catalisam a reação de quebra completa dos triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol, com mono- e diacilgliceróis como intermediários, removendo o ácido graxo de qualquer posição do substrato. (2) Lipases 1,3 específicas: catalisam a hidrólise e liberação de ácidos graxos das posições 1 e 3 do triglicerídeos formando 2-monoglicerídeo e 1,2 – ou 1,3- diglicerídeos. (3) Lipases ácidos graxos específicas: esse grupo mostra seletividade por ácidos graxos específicos ou por um grupo deles, onde as lipases possuem características de catalisar a hidrólise de ésteres de ácidos graxos de cadeia

longa insaturada, com ligação dupla na posição cis entre C-9 e C-10 (Javed *et al.*, 2018).

A enantiosseletividade das lipases é outra característica importante dessas enzimas. Algumas discriminam moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (Cortez, Castro, Andrade, 2016).

1.1.2 Aplicação das Lipases

As lipases podem ser usadas em diversas aplicações industriais, devido à sua versatilidade em catalisar diversos tipos de reações, aliada à sua seletividade por diferentes tipos de substratos. As lipases são utilizadas para o desenvolvimento de aroma e sabores, melhoramento de produtos lácteos, hidrólise de gorduras, transesterificação de gorduras e óleos, síntese de ésteres, produção de compostos orgânicos quirais, produtos de limpeza e vários processos de biorremediação (Melani, Tambourgi e Silveira, 2020).

Na Tabela 1 estão resumidas as principais aplicações das lipases em diferentes seguimentos industriais.

Tabela 1- Exemplos de aplicações industriais das lipases.

Indústria	Aplicações	Produtos	Referências
Alimentos	Hidrólise de óleo	Ésteres metílicos de ácidos graxos	(Elhussiny <i>et al.</i> , 2020)
	Modificação do resíduo do óleo de cozinha	Ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGS)	(Sorte <i>et al.</i> , 2019)
Combustíveis	Transesterificação do óleo de <i>Jatropha</i>	biodiesel	(Bose; Keharia, 2013)
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras.	Detergentes em geral	(Bben Bacha <i>et al.</i> 2018)

Farmacêutica	Hidrólise de ésteres racêmicos	Compostos quirais	(Badgujar; Bhanage, 2016)
--------------	--------------------------------	-------------------	---------------------------

Fonte: O autor, 2024

Uma das principais aplicações das lipases na indústria de alimentos é na modificação de óleos e gorduras, onde esses processos requerem tecnologias mais econômicas e verdes (Hasan; Shah ; Hameed, 2006).

A modificação de óleos e gorduras pode ser realizada por via enzimática, sendo uma alternativa mais interessante para obtenção de produtos mais específicos, com a geração de menos subprodutos, condições mais brandas de processamento e uma fácil recuperação do produto (Salgado; Santos; Vanetti, 2022).

A modificação de resíduos de óleos de frituras foi estudada por (Elhussiny *et al.* 2020). Os autores selecionaram e isolaram dois fungos do gênero *Aspergillus* capazes de produzir enzimas lipolíticas e transesterificar o resíduo de óleo para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos com rendimentos relativamente altos.

Uma importante aplicação na indústria de alimentos é a produção de lipídios estruturados, que são uma mistura triglicerídeos modificados, que tem se mostrado importante em funções biológicas da saúde humana, apresentando baixo valor calórico e alto valor nutricional (Salgado; Santos; Vanetti, 2022).

1.1.3 Caracterização de lipase

A caracterização da lipase é de grande importância para seu uso como biocatalisador em vários setores industriais. O conhecimento das características bioquímicas da enzima fornece ferramentas para compreender sua atuação e alterações ocorridas. Características como especificidade pelo substrato, condições de pH e temperatura, estabilidade em solvente, atividade

na presença de íons metálicos e não tóxicos, podem direcionar a aplicação do biocatalisador (Kumar Sharma; Sharma; Saxena, 2016; Mehta; Bodh ; Gupta, 2017).

Estudos que abordam o mecanismo de ação das lipases e sua caracterização se destacam por auxiliarem o entendimento das reações, principalmente aquelas de interesse industrial, e a produção de novos compostos biotecnológicos. São encontrados na literatura vários trabalhos que buscam analisar as características bioquímicas das lipases produzidas por diferentes microrganismos e meios de obtenção. Na Tabela 2 estão apresentados alguns desses trabalhos.

Tabela 2- pH e temperatura ótimos de lipases.

Lipase	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referências
<i>Aspergillus terreus</i> NCFT 4269.10	6,0	50	(Sethi, Nanda ; Sahoo, 2016)
<i>Aspergillus niger</i> AN0512	5,0	50	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aspergillus flavus</i> PW2961	7,0	45	(Kareem <i>et al.</i> , 2017)
<i>Aspergillus niger</i>	5,0	55	(Santos <i>et al.</i> , 2017)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	2,5	50	(Mhetras, Bastawde ; Gokhale, 2009)
<i>Aspergillus japonicas</i>	7,3	40	(Bharti <i>et al.</i> , 2013)
<i>Aspergillus niger</i> F044	7,0	45	(SHU, YANG ; YAN, 2007)
<i>Candida rugosa</i>	9,0	40	(Binhayeeding <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> PS3	7,0	55	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: O autor, 2024

1.1.4 Fontes de lipases

As lipases podem ser produzidas por fontes animais, vegetais ou microbiana, sendo as de origem microbiana as mais empregadas

industrialmente, principalmente devido a suma disponibilidade na natureza, altos rendimentos e versatilidade catalítica (Geoffry ; Achur, 2018).

Os microrganismos produtores de lipases incluem as bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Hasan; Shah; Hameed, 2006). As propriedades de especificidade, facilidade de produção, pH e temperatura ótima, variam de acordo com a fonte de obtenção da lipase. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de origem microbiana, obtidas por bioprocessos, são preferencialmente utilizadas (Geoffry ; Achur, 2018).

Dentre os microrganismos produtores de lipases, pode-se citar bactérias, destacando-se *Pseudomonas prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens* (Jaeger ; Reetz, 1998; Javed *et al.*, 2018). As leveduras *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformans*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia sivicola*, *Pichia xylosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis cratagenesis*, *Torulaspora globosa* e *Trichosporon asteroides* também se destacam como produtoras de lipases (Vakhlu ; Kour, 2006). Dentre os fungos, destacam-se *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Trichoderma sp.*, and *Mucor sp.*, *Rhizopus oryzae* R1, *Stemphylium lycopersici*, *Sordida sp.*, *Aspergillus niger* 13 F, *Fusarium solani* 7 F, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* AH-F2 e *Thermomyces lanuginosus* (Kumar *et al.*, 2023).

A obtenção dos microrganismos de interesse industrial, produtores de lipases, pode ser realizada através de isolamento a partir de recursos naturais, pela compra em coleções de cultura ou ainda através de mutações por engenharia genética (Borzani *et al.*, 2001).

1.2 Produção de lipases

As lipases podem ser produzidas por um processo, onde os microrganismos crescem e metabolizam os substratos, decompondo-os em

compostos mais simples e produzindo lipases e outros subprodutos (Fasim, More ; More, 2021). Portanto, elas podem ser produzidas por Cultivo Submerso (CS) ou Cultivo em estado sólido (CES).

1.2.1 Cultivo Submerso (CS)

A técnica de cultivo submersa é preferida industrialmente para a produção de enzimas, pois é possível ter um melhor controle dos parâmetros operacionais (Hansen *et al.*, 2015). Esse tipo de processo está associado ao crescimento microbiano em meio líquido e às possíveis variações da composição e das condições de cultivo. O CS em escala industrial geralmente é realizado em biorreatores equipados com sistemas de agitação, dispositivos de aeração e controle da temperatura, em processos contínuos ou descontínuos (Orlandelli ; Felber, 2012).

CS se destaca por apresentar como vantagens a facilidade de controle de temperatura, do pH e do oxigênio dissolvido no meio, facilitando dessa forma o monitoramento do sistema. O controle desses parâmetros se torna importante, pois eles influenciam no rendimento do produto de interesse. Outra vantagem desse processo é o teor de água presente no meio reacional, facilitando assim no controle da temperatura do meio de cultivo (Castro; Pereira 2010; Hansen *et al.*, 2015). Entre as desvantagens temos: uma maior dificuldade de transferência de oxigênio do meio para os microrganismos, que ocorre devido à baixa solubilidade do oxigênio na água; grande volume de efluentes (Durand, 2003).

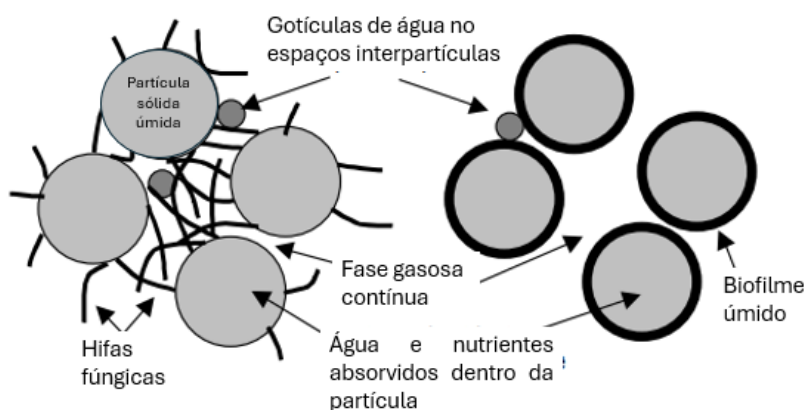
O CS apresenta alguns desafios, como a utilização de fungos filamentosos, que são considerados bons produtores de lipase, mas que se desenvolvem melhor em meios que contêm baixa atividade de água. Além disso, a produtividade pode ser afetada pelas transferências de massa e de oxigênio. Nesse caso, se o teor de oxigênio ficar muito limitado, afeta o metabolismo dos fungos e, conseqüentemente, a quantidade de enzimas produzidas (Hansen *et al.*, 2015).

1.2.2 Cultivo em Estado Sólido (CES)

Essa forma de processo é também denominado de “Fermentação em estado sólido (FES)”, “fermentação em substrato sólido (FSS)”, “fermentação em meio semi-sólido (FMS) ou simplesmente “fermentação semi-sólida (FSS)” (Schmidell *et al.*, 2001).

O cultivo em estado sólido (CES) é definido como um processo que envolve o crescimento e metabolismo de um microrganismo na presença de baixa atividade de água entre as partículas de um substrato sólido insolúvel (Lizardi-Jiménez ; Hernández-Martínez, 2017). O substrato deve possuir umidade suficiente para que ocorra o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (Costa *et al.*, 2018). O CES envolve o crescimento de microrganismos sobre as partículas sólidas úmidas, em ocasiões em que os espaços entre as partículas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água aparente. A maior parte do espaço entre as partículas sólidas é ocupada pela fase gasosa, mesmo com a possibilidade de ter películas finas de água na superfície das partículas, sendo a fase aquosa inter-partículas descontínua. A maior parte da água no sistema é absorvida pelas partículas sólidas úmidas (Figura 4) (Mitchell; Kriege ; Berovic, 2006).

Figura 4 – Demonstração da definição da CES



Fonte: Mitchell; Krieger; Berovic, 2006)

O CES tem grande potencial de aplicação na área de bioprocessos industriais, sendo utilizado na bioconversão de subprodutos agroindustriais em biocombustíveis, produção de enzimas, entre outros (Pandey, 2003). O processo de CES vem se destacando principalmente, devido a fatores, como maior estabilidade do produto final, já que as enzimas produzidas por CES são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo produto, menor repressão catabólica, menor necessidade de energia associada a maiores rendimentos do produto e utilização de subprodutos agroindustriais como matéria-prima (Geoffry ; Achur, 2018).

O uso de subprodutos sólidos da agroindústria como matéria-prima tem como vantagem a rica composição de nutrientes, os quais sevem como fonte de substrato, indutor ou apenas como suporte sólido para adesão microbiana, convertendo em vários produtos de importância industrial, como as enzimas, o que facilita a gestão de subprodutos e torna o processo mais ecológico (Fasim *et al.* 2021).

Como já mencionado, as melhores matéria-prima para o processo de cultivo em estado sólido são os subprodutos agroindustriais, pois possuem menor custo e maior disponibilidade. A escolha da matéria-prima deve levar em consideração sua composição química, pois por vezes a composição da matéria-prima não corresponde à demanda do microrganismo escolhido, assim como pode haver dificuldade de acessibilidade dos nutrientes a serem assimilados pelo microrganismo. Esses fatores devem ser estudados e otimizados para o melhor desempenho do processo (Costa *et al.*, 2018).

Existem vários fatores que interferem no cultivo em estado sólido, e como o cultivo é feito com baixa atividade de água, torna-se difícil o controle das variáveis físico-químicas do processo (pH, umidade, temperatura etc.), seleção a seleção do microrganismo e a seleção do substrato e a purificação dos produtos desejados. Os fungos filamentosos e as leveduras são os microrganismos mais utilizados nesse tipo de processo. Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam melhor capacidade de crescimento nestas condições. Mas existem alguns trabalhos que mostram que culturas bacterianas também podem ser utilizadas no processo de CES (Geoffry ;

Achur, 2018). A escolha do microrganismo no CES deve levar em consideração a fisiologia do microrganismo e os fatores físico-químicos necessários para seu crescimento, tais como, temperatura, pH, aeração, umidade, entre outros. Salientando que o desenvolvimento dos microrganismos ocorre na natureza em sua maior parte no ambiente terrestre com substratos sólidos, o CES simula o *habitat* natural de grande parte destes microrganismos, logo fornece um meio de cultivo mais próximo possível do seu ambiente natural (Barrios-González, 2012).

1.2.3 Produção de lipase por cultivo em estado sólido (CES)

As lipases microbianas, como já foi mencionado, podem ser produzidas tanto por CS como por CES, sendo a CES uma alternativa estudada devido ao seu baixo custo e simplicidade do processo (Fasim; More, 2021). A produção de lipase por CES pode ser influenciada pela composição do meio de cultivo e a sua seleção é primordial para este processo. Dentre os fatores que devem ser levados em consideração destacam-se as fontes de carbono (C) e de nitrogênio (N), a presença de indutores, a temperatura, o pH, o teor de umidade e a aeração (Oliveira *et al.*, 2017).

Como fonte de carbono para produção de lipase por CES pode-se citar o azeite de oliva e de palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, óleos de soja, de girassol, de algodão e de milho (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001a). Baloch *et al.* (2019) avaliaram diferentes fontes de carbono na produção de lipase de uma cepa de levedura, *Dipodascus capitatus* A4C, que incluíam óleo vegetal não comestível (óleo de *Jatropha curcas*), glicerol bruto e melaço. Dentre as fontes de carbono estudadas, o óleo de *J. curcas* a 2% foi a que apresentou maior produção de lipase extracelular (2.670 U/L) em 96 horas. Já Sumarsih *et al.*, (2018) investigaram a otimização da produção de lipase de *Micrococcus sp.* com diferentes tipos de fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol). O melhor resultado de atividade lipásica (70.857 U/mL) foi obtido utilizando glicose a 1% como fonte de carbono.

Alguns subprodutos agroindustriais são utilizados como suporte e fonte de carbono para produção da lipase, como o farelo de trigo, que possui alto teor de carboidratos e proteínas. Mala *et al.* (2007) produziram lipase de *Aspergillus niger* MTCC 2594 usando uma mistura de farelo de trigo e torta do óleo de gengibre (3:1 m/m) e obtiveram um aumento da atividade da lipase de 36,0 % (a atividade foi de $384,3 \pm 4,5$ U/g, a 30 ° C e 72 h), mostrando que os subprodutos estudados são matérias-primas com potencial de produção de enzimas.

De acordo com a literatura, as fontes de nitrogênio mais utilizadas na produção de lipase são peptona, uréia, extrato de levedura, sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos, nitritos, água de maceração de milho, farinha de soja e aminoácidos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001b). Vários trabalhos mostram a importância da fonte de nitrogênio (orgânico ou inorgânico) na produção da lipase microbiana por CES. Oliveira *et al.*, (2017) investigaram a produção de lipase de *Aspergillus ibericus* por CES avaliando diferentes fontes de nitrogênio (uréia, nitrato de sódio, cloreto de amônio e sulfato de amônio), cada uma a 2% (m/m) e como fonte carbono utilizaram bagaço de azeitona e farelo de trigo. Os autores observaram maior atividade lipásica (151 ± 7 U/g) com o uso do sulfato de amônio. Falony *et al.*, (2006) realizaram um estudo sobre a produção de lipase por *A. niger* por CES utilizando farelo de trigo e um meio de cultura mineral, verificaram a atividade máxima por CES foi de 9,14 U/g utilizando um meio suplementado com 0,75 % de sulfato de amônio e 0,34 % de uréia.

A maioria das lipases são normalmente produzidas em meios de cultura que contenham uma fonte lipídica, pois essas enzimas são induzíveis, ou seja, os microrganismos na presença de seu indutor (lipídios) aumentam a síntese da enzima. Os indutores comumente mencionados em trabalhos de produção de lipase microbiana são os óleos vegetais, como óleos de semente de soja, de milho, de girassol, de azeitona e de palma (Sethi; Nanda; Sahoo, 2016). Falony *et al.* (2006) utilizaram o *Aspergillus niger* para produzir lipase por CES e encontraram um efeito positivo na adição de 1,5 % de azeite de oliva ao farelo de trigo, obtendo 9,1 U/g de atividade lipásica.

A produção de lipase também é bastante influenciada pela temperatura, pH e umidade do meio fermentativo. O pH ótimo de cultivo depende da fonte

microbiana. O pH alcalino ou neutro é mais adequado para produção de lipases por bactérias, já o pH ácido é indicado para produção das lipases fúngicas (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

A umidade é um fator importante no processo fermentativo, pois este é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos. Na CES deve ser observado se o substrato possui umidade suficiente para o crescimento do microrganismo. Oliveira *et al.*, (2016) investigaram a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus* O-4 utilizando como matéria-prima farelo de soja (85%) e casca de soja (15%), óleo de soja como indutor e a umidade foi ajustada com água destilada estéril. Os autores estudaram a influência da umidade e da concentração do indutor no processo de cultivo em estado sólido e obtiveram a maior atividade hidrolítica da lipase (25 U/g) utilizando 65% de umidade e 2% de indutor.

A aeração no processo da CES tem a função de manter as condições aeróbicas, remover dióxido de carbono gerado, regular a temperatura do meio e regular o nível de umidade do meio. Portanto, a vazão volumétrica adequada em reatores de leito fixo, deve ser investigada já que esta pode afetar o crescimento celular e a produção da enzima de interesse (Farinas *et al.*, 2014). Oliveira, Salgado, *et al.* (2017) avaliaram diferentes vazões volumétricas (0,05; 0,1 e 0,2 L/min) na produção de lipase de *Aspergillus ibericus* em reator de leito fixo utilizando bagaço de azeitona e farelo de trigo, onde a melhor produção ocorreu com menores vazões, de 0,05 e 0,1 L/min, com atividades próximas a 140 U/g.

1.2.3.1 Fungos filamentosos utilizados para produção de lipase por CES

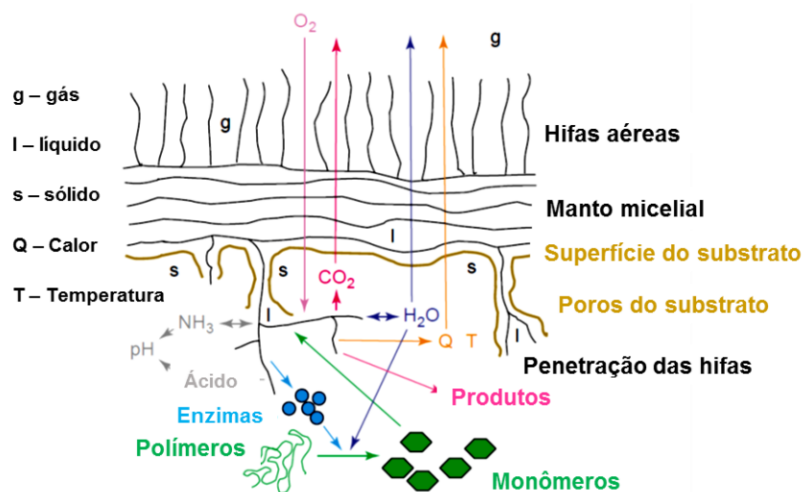
Os fungos constituem um grupo de microrganismos que são potenciais produtores de lipases por cultivo em estado sólido, produzindo lipases com propriedades catalíticas importantes para vários tipos de aplicações industriais (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

Os fungos filamentosos são preferencialmente utilizados para produção de lipases por CES, pois estes possuem seu modo de crescimento por meio de hifas. A penetração de hifas no interior das partículas permite uma maior acessibilidade aos nutrientes do que no caso dos microrganismos unicelulares, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Isso é de grande importância, principalmente nos estágios finais da fermentação, quando os nutrientes da superfície se encontram exauridos (Mitchell; Krieger; Berovic, 2006). Adicionalmente, são capazes de crescer em meios com baixa atividade de água e baixo pH, e produzem enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em CES. (Geoffry; Achur, 2018).

O processo que ocorre em microescala durante o cultivo de fungos filamentosos em estado sólido (CES) é ilustrado na Figura 5. Os fungos se desenvolvem formando uma camada de micélio sobre as partículas do substrato sólido. As hifas aéreas se estendem pelos espaços gasosos e penetram nos poros, concentrando suas atividades metabólicas principalmente perto da superfície do substrato e dentro dos poros. Entretanto, o micélio aéreo também pode realizar atividades metabólicas, e há um transporte de substâncias através das hifas aéreas que penetram nos poros. Os fungos têm a capacidade de decompor moléculas grandes em componentes menores que são absorvidos pelo micélio, servindo como nutrientes, enquanto produzem enzimas hidrolíticas que se espalham pela matriz sólida. Durante o cultivo, há consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, água, outros produtos bioquímicos e calor. Isso cria gradientes dentro do biofilme, impulsionando, por exemplo, a difusão de oxigênio da fase gasosa para as regiões mais profundas do biofilme e de dióxido de carbono das regiões mais internas para a fase gasosa. A geração de calor (Q) resulta em um rápido aumento de temperatura (T), o que representa um desafio técnico crucial durante a CES. O calor (Q) é dissipado do substrato através de condução e evaporação, processos complexos que afetam o equilíbrio de água no sistema. Esse equilíbrio inclui a absorção de água pelo micélio durante o crescimento, o consumo de água durante as reações de hidrólise e a produção de água através da respiração. Além disso, a liberação de ácidos orgânicos e amônia pode afetar o pH local. Os produtos bioquímicos de interesse são liberados na matriz sólida e nos

espaços preenchidos com líquido durante a fermentação, podendo necessitar de extração ao final do processo de CES (Hölker; Lenz, 2005).

Figura 5 – Esquema do processo em microescala que ocorre durante o CES.



Fonte: Hölker; Lenz, 2005).

Entre os gêneros de fungos filamentosos produtores de lipase com aplicações industriais, destacam-se os *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para definir condições ótimas para produção de lipases utilizando a fermentação em estado sólido com diferentes fungos filamentosos, buscando avaliar os fungos que são melhores produtores de lipase. Oliveira *et al.*, (2016) estudaram a produção de lipase utilizando bagaço de azeitona por CES avaliando diferentes cepas do gênero *Aspergillus*: *A. ibericus* MUM 03.49, *A. niger* MUM 03.58 e *A. tubingensis* MUM 06.152. Dentre os fungos testados, o melhor produtor de lipase foi o *A. ibericus* MUM 03.49, com máxima atividade lipásica de $90,5 \pm 1,5$ U/g, a 30 °C por 7 dias. Já Lanka; Trinkle (2017) realizaram um estudo de triagem e isolamento de fungos produtores de lipase de água marinha coletada na praia de Manginapudi em Machilipatnam, distrito de Krishna, AP Índia. Os autores isolaram cerca de 15 espécies e dentre elas escolheram 5 para o estudo, que foram *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Engydonitum* sp., *Trichophyton* sp. e

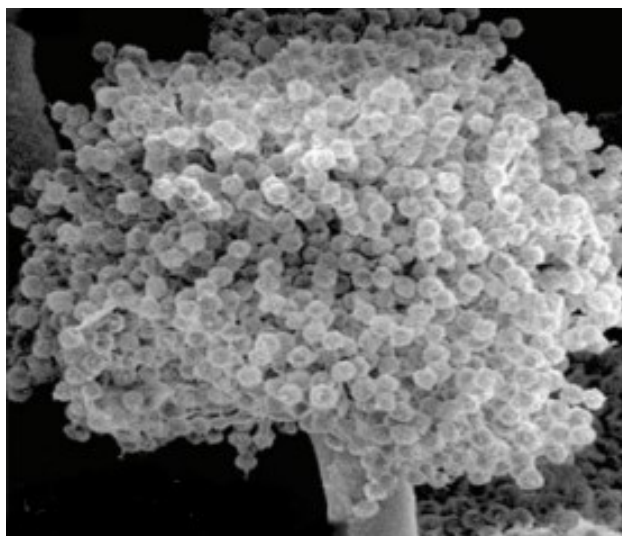
Aspergillus sp. O fungo que apresentou maior atividade lipásica (7,2 U/mL) foi o *Engydonitum* sp.

O *A. niger* é um fungo filamentoso importante nos processos biotecnológicos, ele é reconhecido principalmente pela produção de ácido cítrico e enzimas extracelulares (Baker, 2006).

Segundo Gautam (2011), a utilização desse fungo apresenta vantagens para sua aplicação quando comparado com outras espécies, pois ele possui uma boa facilidade de manipulação e habilidade de utilizar matéria-prima de baixo custo, como os subprodutos agroindustriais, o que mostra que esta espécie apresenta uma grande versatilidade metabólica e flexibilidade nutricional. De acordo com Schuster *et al.* (2002), o *A. niger* é considerado seguro para a utilização industrial, em relação à patogenicidade e baixa toxicidade, já que é considerado GRAS (*Generally Regarded as Safe*) conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA), o que aumenta o interesse para o seu uso industrial.

Aspergillus niger é um fungo de gênero anamorfo, são fungos mais abundantes em todo mundo compreendendo entre 260 e 837 espécies, podem crescer em ampla faixa de temperatura (6 - 55°C) e com teor de umidade relativamente baixo. Ele possui conidióforos longos, paredes lisas e hialinas, apresentam coloração escura na região próxima à vesícula, como mostrado na Figura 6 (Krijgsheld *et al.* 2013).

Figura 6 - Aspecto microscópico do *A. niger*



Fonte: Krijgsheld *et al.*, 2013

Na literatura são reportados vários estudos de produção de enzimas com aplicação biotecnológica produzidas pela espécie *A. niger*. Putri *et al.* (2020) estudaram a otimização da produção de lipase de *A. niger* por CES utilizando subprodutos agroindustriais. Os autores testaram diferentes matérias-primas (torta de farelo de arroz e sementes de pinhão), diferentes indutores (azeite, óleo de gergelim e óleo de pinhão) nas concentrações de 1 e 2% (m/m) de substrato. A maior produção de lipase encontrada pelos autores foi com o farelo de arroz suplementado com 1% m/m de azeite como indutor, produzindo 182 U/mL de atividade. Prabaningtyas *et al.* (2018) avaliaram a produção da lipase de *A. niger* por CES utilizando subprodutos agroindustriais (torta da semente da palma, farelo de soja e caroço do coco) suplementados com azeite como indutor em várias concentrações (2, 4 e 8% m/m) e obtiveram maior atividade de 163,33 U/g usando o farelo de soja suplementado com 4% m/m de azeite.

1.2.3.2 Matéria-prima para CES

A atividade de todos os setores produtivos apresenta geração de subprodutos, que tem como grande desafio equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico e sustentabilidade ambiental (Tacin *et al.*, 2019).

Os subprodutos provenientes da indústria agrícola e alimentar, em particular, são gerados em grandes quantidades. A destinação final deles muitas vezes é a utilização como ração animal, para adubo ou esse material é enviado para aterros sanitários. Muitos desses subprodutos são ricos em compostos com valor nutricional (fontes de carbono, nitrogênio e minerais) que têm grande potencial de uso em processos biotecnológicos, além do baixo custo (Tacin *et al.*, 2019). A utilização destes vem ganhando destaque no desenvolvimento de métodos novos e sustentáveis para produção de produtos de valor agregado, incluindo as enzimas de interesse industrial (Sodhi *et al.*, 2022).

O Brasil se destaca por ser um grande produtor da agroindústria, logo há uma grande geração de subprodutos que podem ser usados como matéria-prima barata para vários processos biotecnológicos (Sadh *et al.* 2018).

O CES se apresenta como uma tecnologia que propõe caminhos alternativos para a valorização de subprodutos, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável ao considerar a preocupação ambiental presente na sociedade atual (Sodhi *et al.*, 2022). Os subprodutos geralmente são grãos de cereais (arroz, trigo, cevada e milho), matérias fibrosas (bagaços, farelos, cascas e subprodutos do processamento de frutas), tortas de óleos e vários subprodutos da indústria de óleo vegetal (Sadh *et al.*, 2018).

Os subprodutos da indústria agrícola e alimentícia podem auxiliar na síntese da lipase, sendo utilizados como indutores, onde tem a função de estimular a produção da enzima (Roveda *et al.* 2010). Vários subprodutos agroindustriais têm sido relatados para produção de lipase (Tabela 3).

Tabela 3- Cultivo em estado sólido para produção de lipases usando fungos filamentosos e subprodutos agroindustriais.

Microrganismo	Matéria-prima	Atividade lipásica máxima (U/g)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 872	Casca de arroz, torta de semente de algodão, cascas de ervilha	28,2	Nema <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	163,3	Prabaningtyas <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus ibericus</i>	Bagaço de azeitona e farelo de trigo	223,0	Oliveira <i>et al.</i> 2017a
<i>Rhizopus microsporus</i>	Farelo de trigo e bagaço de cana	265,0	Pitol <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz	19,8	Costa <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus niger</i> O-4	Farelo de soja e casca de soja	25,0	Oliveira Reinehr <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus niger</i> AS-02	Torta de karité	49,4	Salihu <i>et al.</i> 2016

Fonte: O autor, 2024

Borra de café

O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, depois da água, é a segunda bebida mais popular (Atabani *et al.*, 2019). Ele foi descoberto há cerca de 1000 anos e pertence à família *Rubiaceae*. O gênero *Coffea* possui 103 espécies, que são divididas nos subgêneros *Coffea* e *Baracoffea*. As espécies do subgênero *Coffea* (café arábica e café robusta) são as mais usadas na produção do café, sendo o café arábica responsável por cerca de 70 a 80% da produção mundial de café (Atabani *et al.*, 2019).

Na produção e processamento do café são geradas grandes quantidades de subprodutos sólidos, tais como as cascas, a polpa do fruto, os grãos defeituosos e a borra de café (Rajesh *et al.*, 2020). Esses subprodutos provenientes do processamento do café são ricos em fontes de carbono, proteínas, taninos, pectinas e compostos bioativos. Por serem subprodutos da agroindústria, se tornam uma fonte renovável de baixo custo que deve ser explorada de maneira adequada (Atabani *et al.*, 2019).

Dentre os subprodutos do processamento do café, a borra de café é um resíduo sólido proveniente da extração dos compostos solúveis do café torrado após a preparação da bebida ou da produção do café solúvel. A borra de café possui compostos orgânicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos, fibras, cafeína, nitrogênio não proteico, aminoácidos, entre outros (Atabani *et al.*, 2019).

As aplicações relatadas na literatura do uso da borra de café em processos biotecnológicos são principalmente para produção de biocombustíveis, incluindo hidrogênio, biobutanol, biodiesel, bio-gás e bioetanol. Isso se deve principalmente ao teor de óleo, que varia de 10 a 20 %. Além disso, a borra de café também pode ser utilizada na produção de outros produtos com valor agregado, tais como compostos bioativos para alimentos, para a indústria cosmética e química, compostagem, biopolímeros, entre outros (Rajesh *et al.*, 2020).

Murthy; Naidu; Srinivas (2009) avaliaram a produção de α -amilase utilizando o cultivo em estado sólido e como fonte de carbono e empregaram a mistura dos subprodutos da indústria do café (polpa de café, casca e borra de café) utilizando *Neurospora crassa* CFR 308. A atividade de α -amilase, após otimização dos parâmetros, foi de 4.981 e 4.324 U/g usando pasta de café e a mistura dos subprodutos, respectivamente. Porém, a máxima atividade (7.084 U/g) foi obtida após pré-tratamento do substrato por vaporização, tratado com metanol (1,5 %), peróxido de hidrogênio (1%), hidrólise enzimática e hidróxido de sódio (1%). Os autores demonstraram que os subprodutos do café utilizados foram usados como substratos adequados para produção de α -amilase por CES, obtendo resultados promissores para utilização em aplicações industriais.

Farelo de Trigo

O farelo de trigo é um coproduto proveniente da produção de farinha de trigo, com ampla aplicação no CES. Durante a produção dos grãos de trigo, apenas as cascas são removidas, os grãos são processados posteriormente, e a farinha de trigo é gerada através da moagem industrial desses grãos (Matano; Meiswinkel; Wendisch, 2014). Durante esse processo, uma porcentagem de grãos não é aproveitado, originado o farelo de trigo, este em geral é destinado para alimentação animal e humana, mas considerando a sua composição e disponibilidade, se torna atraente para uso como matéria-prima em processos biotecnológicos (Belobrajdic *et al.*, 2011).

Esta matéria-prima se destaca no uso dos processos de CES principalmente por ser considerado uma boa fonte de carbono e nitrogênio, além disso seus teores de sais minerais são importantes para o crescimento de culturas fúngicas (Mandels *et al.*, 1981).

1.2.3.3 Biorreatores de CES

No processo de cultivo em estado sólido a escolha do biorreator é de grande importância para obtenção de bons resultados. O biorreator tem duas funções básicas: a primeira consiste em sustentar o leito de substrato, fornecendo para este uma barreira a fim de impedir a liberação do microrganismo para o ambiente, assim como a contaminação do meio inoculado por outros microrganismos dispersos no ambiente; a segunda diz respeito ao controle adequado das condições ótimas para o crescimento microbiano e a formação de produtos (Mitchell *et al.* 2005).

Os biorreatores utilizados para cultivo em estado sólido (CES) diferem em muitos aspectos dos biorreatores utilizados no cultivo submerso (FS), principalmente devido à natureza dos substratos e microrganismos, neste caso,

geralmente apresentam mistura heterogênea do meio de cultivo para CES, dificultando desta forma a transferência de calor e massa. Neste sentido, foram estudados e projetados diferentes tipos de biorreatores para CES para obtenção de equipamentos cada vez mais eficientes (Ge; Vasco-Correa; Li, 2017).

Segundo Mitchell *et al.* (2006), os biorreatores são classificados em quatro grupos: com base no tipo de aeração (forçada ou não forçada) e sistema de agitação (infrequente ou ausente, ou contínua) empregado, sendo eles: Grupo 1: Aeração não-forçada, sem mistura Grupo 2: Aeração Forçada, sem mistura, Grupo 3: Aeração não forçada, mistura contínua ou intermitente e Grupo 4: Aeração Forçada, mistura contínua ou intermitente .

- ✓ Grupo 1 - Biorreatores de bandeja: são biorreatores (bandejas que podem ser de plástico, madeira ou metal) que possuem leito estático ou que são movimentados com pouca frequência, em que o ar é circulado ao redor dele naturalmente, sem uso de força externa. Segundo Doriya; Kumar, (2018), esse tipo de reator tem como vantagem a fácil utilização e por ser estático evita gastos de energia. Soccol *et al.*, (2017) apresentam uma configuração em que os substratos são dispostos nas bandejas, que podem ser feitas de madeira ou aço inoxidável, estas são projetadas de forma a ter perfurações para auxiliar na convecção do ar. Esse modelo de biorreator também é de fácil escala, porém possui dificuldades de controle operacionais e de contaminações.
- ✓ Grupo 2 - Biorreatores de leito fixo ou colunas aeradas: nessa configuração de biorreator são utilizadas colunas preenchidas com os substratos ou o suporte sólido onde aeração é forçada e o leito de substrato não sofre mistura. Essas colunas possuem um sistema fechado onde a aeração é forçada. A vantagem desse tipo de biorreator é a possibilidade de controle da taxa da aeração. O uso da convecção forçada nesse tipo de configuração permite também a diminuição de gradientes de temperatura (Soccol *et al.*, 2017).
- ✓ Grupo 3 - Biorreatores de tambor rotativo e tambores agitados: esse tipo de configuração consiste em cilindros horizontais, onde a mistura do meio sólido se dá pelo movimento rotatório e que pode ser auxiliado pelo

uso de chicanas nas paredes internas do equipamento. Sua agitação pode ser por movimentos constantes ou de maneira intermitente (Soccol *et al.*, 2017).

- ✓ Grupo 4: Biorreator de mistura contínua com circulação de ar forçado: Os biorreatores deste grupo podem ser agrupados de acordo com a forma que o leito é agitado. Eles podem ser semelhantes aos tambores agitados, que utilizam misturadores mecânicos, semelhantes aos tambores rotativos, que realizam a rotação do corpo do biorreator, e podem ser homogeneizados através do movimento do ar. Neste último caso, são denominados biorreatores de leito fluidizado (Lima, 2009). Os biorreatores de leito fluidizado possuem aeração e agitação forçada através da passagem de ar. Esse tipo de configuração é constituído por um recipiente vertical, no qual as partículas do meio (substrato e microrganismo) são fluidizadas pela passagem do ar (Ge; Vasco-Correa; Li, 2017). Nesse tipo de biorreator a agitação também pode ocorrer de duas formas, podendo ser contínua ou de forma intermitente (Mitchell *et al.* 2005).

Biorreator de leito fixo

Dentre os biorreatores descritos acima, o de leito fixo é o mais utilizado no estudo de CES. Sua principal característica, como já mencionado acima, é a aeração forçada através do leito estático, o que facilita o reabastecimento de oxigênio e umidade, além de remover calor e CO₂ (Arora *et al.*, 2018).

Em escala de laboratório, esse biorreator consiste em uma coluna, no qual possui um projeto simples e de baixo custo, além de apresentar baixas exigências de manutenção (Durand, 2003). O design desse tipo de biorreator é caracterizado por ser tipicamente cilíndrico, as partículas constituídas de substratos e microrganismo estão dispostas no leito apoiado em uma base perfurada, através da qual é aplicada a aeração forçada. Nesse tipo de configuração o meio não é misturado (Ge; Vasco-Correa; Li, 2017). Além das

vantagens já mencionadas, o uso desse tipo de biorreator permite também a possibilidade de aumento de escala, já que o uso da aeração forçada permite um controle mais efetivo dos parâmetros do processo, através da manipulação da taxa da aeração e da temperatura do ar (Arora *et al.*, 2018). Segundo Robinson; Nigam (2003), esses biorreatores geralmente têm sido utilizados nos processos de produção de enzimas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários. Ele é preferencialmente usado em processo utilizando CES, onde a mistura do leito é indesejável durante o processo de cultivo, evitando dessa forma possíveis efeitos prejudiciais ao crescimento microbiano (Mitchell; Krieger; Berovic, 2006). Isso torna o uso deste biorreator mais indicado para processos que utilizam fungos filamentosos, uma vez que a agitação pode danificar a estrutura das hifas.

O principal problema associado à ampliação de escala dos biorreatores de leito empacotado é a remoção do calor gerado pelas atividades metabólicas dos micro-organismos. As altas temperaturas nos processos fermentativos podem comprometer o metabolismo microbiano e desnaturar enzimas, de modo que o controle desta variável é chave para ter um processo estável e de produtividade elevada (Rani *et al.*, 2009).

Os fatores que podem interferir na atividade lipásica quando se utiliza o biorreator de leito fixo estão relacionados aos efeitos da vazão volumétrica. O efeito da aeração forçada foi estudado na produção de lipase de *Aspergillus ibericus* por fermentação por estado sólido utilizando como matéria-prima o bagaço de azeitona e farelo de trigo (Oliveira; Salgado *et al.*, 2017). A maior produção de lipase foi obtida com a vazão volumétrica de 0,05 e 0,1 L min⁻¹, utilizando 25 g de substrato. Os autores realizaram um ensaio onde foi empacotada a mesma quantidade de substrato sem aeração, e observaram que o crescimento do fungo foi limitado pela ausência de oxigênio, demonstrando dessa forma a importância do oxigênio no meio de fermentação. Por outro lado, eles também observaram que o aumento na taxa de oxigênio pode levar a uma diminuição na atividade lipásica, que pode ocorrer devido a mudanças no metabolismo do fungo.

Melikoglu; Lin; Webb (2015) avaliaram o efeito da aeração forçada sobre a produção de glicoamilase e protease durante a fermentação de restos de pão

por *Aspergillus awamori*. A vazão volumétrica considerada ideal para produção foi 1,5 vvm), onde as atividades de glicoamilase e protease foram 130,8 U/g de e 80,3 U/g, respectivamente. Salgado *et al.* (2015) obtiveram resultados semelhantes estudando a produção de celulasas de *Aspergillus uvarum* MUM 08.01 utilizando resíduo de azeite e vinho. Na CES com vazão volumétrica de 0,2 L/min foi obtida atividade de 38,51 U/g.

1.3 Purificação de lipase

O uso da lipase como biocatalisador será direcionado para sua aplicação industrial dependendo do seu nível de pureza, ou seja, as preparações enzimáticas contendo lipases, dependendo da sua aplicação industrial, após a sua produção por cultivo em estado sólido, podem ser submetidas a um processo de purificação antes de serem utilizadas (Show *et al.*, 2015).

Diversas estratégias podem ser utilizadas para purificação de lipases, podendo envolver um ou mais métodos, tais como, concentração, cromatográfica e sistemas aquosos bifásicos (Melani; Tambourgi; Silveira, 2020). A escolha do método utilizado vai depender da aplicação que será utilizada e das características da lipase, tais como fonte de microrganismo proveniente e tamanho de proteína (Bharathi; Rajalakshmi, 2019; Saxena; Davidson, *et al.*, 2003; Show *et al.*, 2015).

As lipases microbianas em sua maior parte são extracelulares, sendo desta forma de fácil extração. As técnicas convencionais de extração e purificação incluem ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e extração com solventes orgânicos, como etanol frio e acetona (Melani; Tambourgi; Silveira, 2020). A técnica mais utilizada é a concentração por precipitação com sulfato de amônio ou por extração com solventes, sendo que cerca de 60% dos processos utilizam a precipitação com sulfato de amônio e 35% com etanol, acetona ou ácido (geralmente clorídrico). A precipitação do extrato enzimático bruto é uma das técnicas mais simples, econômica e é geralmente utilizada como uma separação de proteínas. Dependendo da

aplicação, esta técnica pode ser usada como uma etapa de pré-purificação, sendo necessária a combinação dessa com outras técnicas (Saxena *et al.* 2003). O processo de precipitação é uma técnica que se baseia na solubilidade da biomolécula-alvo e pode ser induzida pela adição de sais neutros, solventes orgânicos, polímeros não iônicos, ligantes de afinidade e ácidos ou bases (ajuste de pH). Esse processo tem como vantagem ser uma técnica relativamente de baixo custo, de fácil manuseio sendo realizada em equipamentos simples e o precipitado normalmente é estável. A precipitação com sulfato de amônio é usualmente empregada para concentração de proteínas e se baseia no efeito *salting out*, que está relacionado à diminuição da solubilidade das proteínas em altas concentrações salinas, ocorrendo, assim, a sua precipitação (Pringels *et al.*, 2018). O *salting out* é geralmente usado para concentrar proteínas que estão diluídas em solução e, após essa etapa, é necessário realizar um processo de diálise para remoção do sal (Berg; Tymoczko; Stryer, 2004).

A cromatografia é uma técnica de purificação tradicionalmente utilizada. Dentre os métodos de cromatografia, destacam-se: cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração em gel e a cromatografia de afinidade. Nem sempre se consegue a pureza desejada com uma única etapa cromatográfica, podendo se fazer necessário a combinação delas (Tan *et al.*, 2015).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na fixação de substâncias carregadas a um suporte com carga oposta. Isso ocorre pelo fato das interações eletrostáticas entre os grupos ser reversível e dependente da afinidade de cada uma das substâncias pelo trocador. Esses trocadores podem ser catiônicos (que possuem grupamento ácido, como o carboximetil) ou aniônicos (que possuem grupamento básico, como o dietilaminoetil (DEAE)) (Melani; Tambourgi; Silveira, 2020). A cromatografia de filtração em gel se baseia na separação das moléculas de acordo com seu peso molecular, utilizando matrizes (ou géis) com porosidade definida. Por fim, o método cromatográfico por afinidade baseia-se na afinidade que o suporte apresenta pela substância a ser isolada, ela pode ser por interação hidrofóbica ou por adsorção (Saxena; Sheoran *et al.*, 2003). Para o aperfeiçoamento dos métodos cromatográficos é utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que é um equipamento que faz uso de bombas de alta pressão que

aceleram o movimento das moléculas de proteínas ao percolar a coluna, além de poder limitar a dispersão por difusão das bandas proteicas melhorando dessa forma a resolução (Nelson; Cox, 2014).

Sethi *et al.* (2016) realizaram a purificação da lipase produzida por *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. Os autores utilizaram duas técnicas de purificação: a precipitação com sulfato de amônio (80 %) e a cromatografia de exclusão molecular utilizando o Sephadex G-100, que resultaram em um fator de purificação de 10,6 e rendimento de 18,84 % após as duas técnicas.

A purificação da lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 foi realizada através da precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia em gel de Fenil Sepharose e Sephacryl-100, que resultou em uma purificação de 149 vezes com uma recuperação final de 54% (Mhetras; Bastawde; Gokhale, 2009).

T. Nakajima-Kambe et al. (2012) estudaram a purificação da lipase de *Aspergillus niger* MTCC 2594. A purificação foi realizada pelo método de cromatografia por interação hidrofóbica, os autores utilizaram octil sepharose e obtiveram uma purificação de 53,8 vezes.

A lipase de *Trichosporon* sp. F1-2 foi purificada usando precipitação com sulfato de amônio (50% de saturação) seguido de cromatografia DEAE-Sepharose (Cao; Liao; Feng, 2020).

1.4 Imobilização de Enzimas

O crescente aumento com a preocupação ambiental nas últimas décadas levou a criação do conceito de química verde e sustentabilidade, que vem ganhando destaque nos processos industriais. A busca por produtos biodegradáveis e não tóxicos à biosfera está sendo uma alternativa mais atrativa para os processos industriais, logo a tecnologia enzimática se torna interessante para ser empregada em diversas aplicações industriais. A utilização das enzimas nos processos industriais vem crescendo cada vez mais

e esse crescimento ocorre principalmente pelas vantagens que esses biocatalisadores apresentam frente aos catalisadores químicos convencionais, tais como elevada atividade catalítica, aumento na velocidade da reação, especificidade, não somente pela reação mas por determinado substrato, alta eficiência em condições reacionais brandas (temperatura e pH) e diminuição da geração de subprodutos (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004; Hasan, Shah; Hameed, 2006; Resende, Rodrigo *et al.*, 2017).

O uso de enzimas na sua forma solúvel se torna uma desvantagem para aplicação industrial, pois é limitada pela falta de estabilidade da estrutura tridimensional da enzima, pela perda da atividade enzimática devido às condições operacionais do processo e pela dificuldade de recuperar e reciclar o biocatalisador. Mesmo quando a enzima é usada na forma de pó, através da liofilização ou outros métodos, a enzima pode ficar aderida as paredes do reator (López-Gallego *et al.*, 2005; Resende; Rodrigo *et al.*, 2017).

A imobilização de enzimas é uma estratégia interessante para o biocatalisador industrialmente, desde que seja passível de reuso e se obtenha um processo economicamente viável. As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: possibilidade de aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, a manutenção da atividade catalítica por mais tempo, a aplicação em processos contínuos, a facilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador no final do processo, e permitir a separação do produto e a obtenção de efluentes livres do catalisador. Como desvantagens pode-se ter uma alteração na conformação nativa da enzima, a perda de atividade durante o processo de imobilização e o custo do suporte e do derivado imobilizado (Mendes *et al.*, 2011; Rodrigo; Resende *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2013; Sneha *et al.*, 2019).

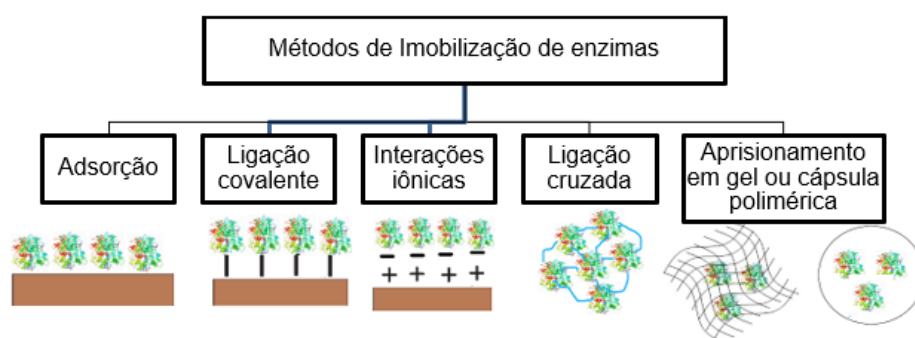
A utilização de enzimas imobilizadas vem crescendo no setor industrial, principalmente na indústria farmacêutica, de alimentos, detergentes, couro e panificação. Para que o emprego desse biocatalisador imobilizado seja economicamente viável, deve-se escolher bem o tipo de suporte e o método de imobilização, que irá influenciar diretamente na atividade e no reuso. Portanto, são importantes o estudo e a escolha do procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um biocatalisador com boa retenção de atividade e uma alta estabilidade operacional (Mendes *et al.*, 2011b).

1.4.1 Métodos de imobilização de enzimas

Existe uma grande diversidade de métodos desenvolvidos para imobilizar as enzimas em suportes, onde estes dependem das propriedades de suas superfícies, ou seja, não existe um método geral que pode ser aplicado para qualquer processo, porém é essencial a seleção do método mais adequado para o processo de imobilização. Na literatura muitos métodos são descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidades das enzimas e também otimizar as várias aplicações. Portanto, é de grande importância o estudo dos componentes presentes na superfície tanto da enzima como do suporte. Em relação à superfície da enzima, alguns grupos polares, apolares e açúcares podem influenciar suas propriedades, e o suporte deve ser selecionado e preparado de forma a combinar com as propriedades presentes na superfície da enzima. O suporte também deve ser quimicamente e mecanicamente estável e ter uma grande área superficial (Hanefeld; Gardossi; Magner, 2009; Sneha, Beulah; Murthy, 2019).

Todos os métodos desenvolvidos e descritos na literatura apresentam vantagens e limitações, portanto a maioria dos protocolos de imobilização ocorrem de forma randômica, ou seja, na tentativa e erro, com a finalidade de encontrar o melhor protocolo em que se obtenha uma maior retenção da atividade enzimática, maior estabilidade e durabilidade no processo (Resende; Rodrigo *et al.*, 2017). Entre os métodos mais abordados estão: adsorção física, interação iônica, ligação covalente, ligação cruzada e aprisionamento em gel ou cápsula polimérica (Hanefeld, Gardossi; Magner, 2009). Dentre esses métodos, a adsorção tem sido considerada a metodologia mais simples e econômica para imobilização de enzimas. A imobilização por adsorção também permite uma faixa mais ampla de aplicabilidade, pois há pouca alteração na estrutura nativa da enzima (Resende *et al.*, 2017). Na Figura 7 está demonstrado um esquema com os principais métodos de imobilização descritos na literatura.

Figura 7- Esquema dos métodos de imobilização enzimática.



Fonte: O autor, 2024

1.4.1.1 Imobilização por adsorção

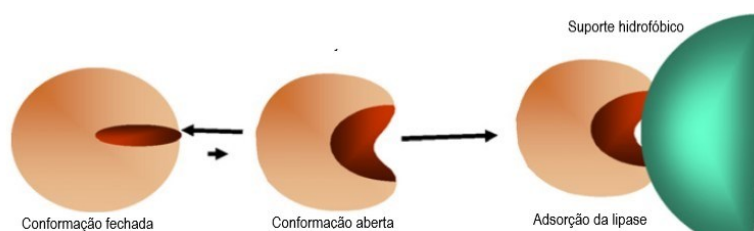
Este método é considerado simples e barato, uma vez que não é necessária a ativação do suporte e possibilita a regeneração da matriz utilizada. Ele se baseia na imobilização da enzima em um suporte sólido por meio de diferentes tipos de interações, que são ligações tipo interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Para reações que são conduzidas em meio orgânico não é necessário que haja forte interação entre a enzima e o suporte e o uso do método de adsorção pode ser interessante (Resende, 2017).

A adsorção física possui como vantagem a facilidade de operação do método, o suporte não precisa de pré-tratamento ou modificações químicas em sua estrutura, também existe a possibilidade de usar preparações enzimáticas brutas, a adsorção ao suporte é reversível possibilitando dessa forma a reutilização do suporte após a inativação da enzima. Como desvantagem tem-se que a enzima tende a se desorver do suporte mais facilmente quando utilizada em meio aquoso, ocorrendo assim a lixiviação (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Hanefeld, Gardossi; Magner, 2009; Resende;Ribeiro *et al.*, 2017).

A imobilização por adsorção em suportes hidrofóbicos resulta em melhorias na atividade enzimática principalmente para as lipases, que têm características hidrolítica e hidrofóbica na sua superfície. Algumas dessas

enzimas apresentam o fenômeno de ativação interfacial, onde a lipase possui uma cadeia polipeptídica hidrofóbica chamada de tampa (*lid*) que bloqueia o contato entre o sítio ativo e o meio reacional, onde nesta conformação é chamada de fechada ou inativa, porém quando a lipase entra em contato com uma superfície hidrofóbica (como gotas de óleo que são seus substratos naturais) passa para a conformação chamada de aberta ou ativa, expondo seus sítios ativos para o meio reacional. Por possuir esta característica, as lipases, quando imobilizadas por adsorção com suporte hidrofóbico, simulam o processo de ativação interfacial, deslocando sua conformação para a forma aberta, visto que a região dos seus sítios ativos interage com o suporte hidrofóbico, uma vez que estes suportes são similares aos seus substratos naturais, como demonstrado na Figura 8. Portanto, a lipase é imobilizada na sua conformação aberta e sob essas condições é mais ativa, neste sentido muitos autores dizem que a enzima foi hiperativada (Hanefeld, Gardossi; Magner, 2009; Resende; Ribeiro *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2013).

Figura 8- Ativação interfacial das lipases em suportes hidrofóbicos



Fonte: Adaptado de Mateo *et al.*, 2007

A eficiência no processo de imobilização por adsorção também está relacionada com a escolha do suporte. Assim, são descritos na literatura diversos suportes e sua escolha vai depender das suas propriedades, tais como: hidrofóbico ou hidrofílico, orgânico ou inorgânico, presença de cargas na sua superfície, estabilidade química e mecânica, tamanho da área superficial, porosidade, tamanho da partícula e seu custo (Fernández-Fernández, Sanromán; Moldes, 2013; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Hanefeld; Gardossi; Magner, 2009).

Feng *et al.* (2020) realizaram a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em seis resinas acrílicas macroporosas diferentes (sintetizadas pelos autores com diferentes tamanhos de poros) a fim de avaliar o efeito das propriedades de cada resina na estabilidade do biocatalisador e seu potencial de aplicação. A resina com menor porosidade, maior densidade aparente e hidrofbicidade média foi a que apresentou melhor desempenho, com 98,40% de eficiência de imobilização e foi possível sua reutilização continuamente por 15 ciclos na reação de desacidificação do óleo de resíduo de molho de soja com alto teor ácido.

A adsorção em suportes hidrofóbicos tem sido estudada na literatura para obtenção de lipases com maior especificidade, atividade e estabilidade. (Almeida *et al.*, 2018) realizaram a imobilização da lipase de *Candida viswanathii* em suporte hidrofóbico de octil-agarose. Inicialmente os autores realizaram a purificação da enzima por cromatografia de interação hidrofóbica em octil-sepharose, obtendo um rendimento de 78,4% e a enzima foi 8,7 vezes purificada. O processo de imobilização desta enzima apresentou rendimento de 72,5 % e um derivado com 101% de atividade (109,2 U/g), indicando que a enzima foi hiperativada com 101% de eficiência de imobilização.

Quilles Junior *et al.* (2016) estudaram a imobilização da lipase obtida do fungo filamentoso *Acremonium-like* ROG2.1.9 por adsorção hidrofóbica em meio iônico, o suporte foi o octil- e fenil-sepharose, obtendo uma atividade recuperada de 25 e 140% para o octil-sepharose e fenil-sepharose, respectivamente. Além disso, os autores demonstraram que além de servir para imobilizar a lipase, as resinas estudadas também podem ser utilizadas para purificar a lipase.

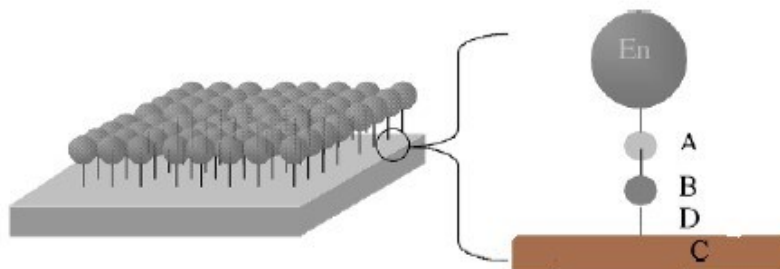
Zhou *et al.* (2012) avaliaram a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em diferentes suportes de organosílicas mesoporosas (PMOs) contendo grupos etano e benzeno com grandes poros (LP bezeno, LP sílica, LP etano). Os autores verificaram que as propriedades estruturais do suporte influenciam muito na capacidade de adsorção e seus resultados mostraram que a lipase imobilizada no material mais hidrofóbico (LP benzeno) apresentou um melhor desempenho catalítico. De acordo com os autores, a enzima apresentou ativação interfacial no processo de imobilização e,

consequentemente, hiperativação da enzima, pela interação entre a lipase e a superfície hidrofóbica do material.

1.4.1.2 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais estudados e a seleção das condições de imobilização é mais difícil do que os demais métodos. Este método consiste na ligação da enzima a um suporte ativado através de resíduos de aminoácidos ativos localizados na superfície da enzima (A) e as funcionalidades ativas ligadas à superfície do suporte (B), como pode ser visualizado na Figura 9. Os resíduos de aminoácidos podem ser grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de amina química), grupos carboxilatos de moléculas de aspartato e glutamato, grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano. Dentre os grupos dos aminoácidos citados o mais utilizado para imobilização covalente é o grupo amino, já que este está presente na maioria das proteínas. Para ativação dos suportes geralmente é utilizado o glutaraldeído, que reage com a superfície do suporte e a enzima, formando um braço espaçador, e as enzimas se ligam covalentemente no suporte através da reação com seus grupos, geralmente amino, ligando-se aos grupos aldeídos no suporte e formando as bases de Schiff. Este método geralmente é realizado em três etapas sucessivas: a ativação inicial do suporte, seguido por modificação do suporte ativado e, finalmente, ligação da enzima com o suporte (Bukhari *et al.* 2014; Liu; Chen; Shi, 2018, Resende, 2017, Cao, 2005).

Figura 9 – Esquema mostrando o processo de imobilização covalente, onde (A) resíduo de aminoácido ativo; (B) funcionalidade de ligação do suporte; (C) suporte e (D) espaçador.



Fonte: Adaptado de Cao, 2005

A ligação covalente não é um método tão simples como a adsorção, porém ela tem como vantagem evitar o fenômeno de dessorção, já que a enzima é fixada covalentemente no suporte, portanto, esse tipo de imobilização deve ser escolhido quando se precisa trabalhar em meio aquoso e quando existem fatores de desnaturação, tais como presença de grande concentração de solventes, presença de inibição enzimática, efeitos de partição, entre outros. Por outro lado, é um método complicado e caro, podendo levar a mudanças na conformação nativa da enzima após a imobilização. A enzima quando é firmemente ligada ao suporte por ligação covalente tem sua flexibilidade conformacional reduzida e as vibrações térmicas também são diminuídas, conferindo ao biocatalisador uma maior estabilidade e impedindo, dessa forma, o desdobramento da estrutura nativa das proteínas e, conseqüentemente, a sua desnaturação. Por outro lado, como as interações entre a enzima e o suporte são fortes, tem-se como desvantagem a modificação na estrutura conformacional da enzima e alteração no sítio ativo, e, conseqüentemente, perda de atividade catalítica. Portanto, a escolha do suporte é de grande importância. Logo, deve-se considerar para a escolha do suporte alguns fatores como: natureza física (tamanho do poro/partícula, porosidade, forma); natureza química (composição química, funcionalidade ativa e outras funcionalidades não ativas), natureza da ligação, conformação da enzima no momento a ser imobilizada e também após a imobilização, a orientação em que a enzima está sendo imobilizada, a natureza e o comprimento do espaçador, o número de ligações formadas entre a enzima e o suporte e a distribuição das enzimas

dentro do suporte (Cao, 2005; Hanefeld; Gardossi; Magner, 2009; Lonappan *et al.*, 2018; Sneha; Beulah; Murthy, 2019).

1.4.2 Suportes para imobilização

No processo de imobilização não há um método ou um suporte que seja aplicável para todas as enzimas, logo a sua seleção dependerá da reação na qual o derivado imobilizado será aplicado e dos custos que estão envolvidos nesse processo (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004). A escolha correta do suporte é de grande importância, pois o desempenho da enzima depende muito da sua interação com o suporte. Existe uma diversidade de materiais que podem ser utilizados, mas a sua escolha vai depender muito das características da enzima a ser imobilizada e das interações que serão realizadas entre a enzima e o suporte (Resende; Rodrigo R *et al.*, 2017).

As características do suporte são importantes na determinação do desempenho do sistema enzimático imobilizado. Portanto deve-se levar em consideração na escolha do suporte a área superficial, a permeabilidade, a estabilidade química e mecânica, a insolubilidade, a capacidade de regeneração, a morfologia e composição, a natureza hidrofóbica ou hidrofílica, a resistência ao ataque microbiano, as cargas dos grupos reativos presentes na superfície, a porosidade, o tamanho da partícula, a natureza orgânica ou inorgânica e a disponibilidade a baixo custo. Eles podem ser classificados de acordo com a sua origem: orgânico e inorgânico, e de acordo com a sua morfologia como materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (Hanefeld; Gardossi; Magner, 2009; Mateo *et al.*, 2007; Mendes; Adriano *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2017).

A vantagem do uso de materiais porosos é devido à grande área superficial que esse material oferece para imobilização de enzimas, de forma que a enzima fica protegida dentro dos poros das condições adversas do meio externo. Já as desvantagens do uso desse tipo de material estão relacionadas

aos efeitos difusionais, já que o substrato deve se difundir do meio para a superfície externa, depois para o interior dos poros do suporte e por fim chegar até as enzimas localizadas no interior dos poros (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004; Resende *et al.*, 2017).

Vários trabalhos são encontrados na literatura que tratam de diferentes técnicas de imobilização em diferentes tipos de suportes. Um exemplo é a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em esferas de fibroína-alginato (FA-LPf) pelo método de encapsulamento no trabalho realizado por (Ferreira *et al.*, 2017). Os autores usaram a lipase imobilizada para catalisar a transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel (ésteres etílicos de ácidos graxos) e obtiveram rendimento de 63% após 96 horas a 32 °C e 40 rpm na condição de 30% (v/v) de hexano, utilizando 20% (m/m) da lipase imobilizada. (Binhayeeding *et al.*, 2020) realizaram a imobilização da lipase pela combinação de dois processos de imobilização, onde primeiro, a lipase de *Candida rugosa* foi adsorvida em partículas de polihidroxibutirato (PHB), seguida de reticulação com glutaraldeído. Eles obtiveram para esse processo de imobilização um rendimento 92%, onde a enzima imobilizada proporcionou uma melhoria na estabilidade térmica, na estabilidade ao armazenamento e na reutilização. A enzima imobilizada foi aplicada na produção de monoacilglicerol (MAG) obtendo um rendimento de 48% de MAG produzido.

Mosayebi *et al.* (2020) estudaram a produção de um novo suporte para imobilização da lipase de *Candida rugosa* tipo VII (CRL7), onde foi utilizado como suporte um nanocompósito de óxido de grafeno magnético funcionalizado covalentemente com octil (GO-Fe₃O₄) e obtiveram bons resultados em comparação com a enzima livre. A lipase imobilizada demonstrou 94,7% de atividade em relação a enzima livre (34,5 U/mg) e foi obtido um rendimento de transesterificação de 89% com 63% da atividade retida após 10 ciclos com a enzima imobilizada. Os autores mostraram que o novo suporte (nanocompósito de óxido de grafeno magnético funionalizado com octil) teve um desempenho melhor do que o óxido de grafeno (GO), aumentando a quantidade de enzima imobilizada no suporte, resultando em uma maior atividade específica e maior estabilidade térmica.

1.4.3 Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização

O uso das nanopartículas magnéticas (NPMs) surgiu como uma ferramenta versátil para obtenção de suportes para imobilização de enzimas com objetivo de melhorar a estabilidade, a atividade e a quantidade final de enzima imobilizada.

As nanopartículas magnéticas são compostos que podem ser manipulados usando um campo magnético e possuem tamanho muito pequeno na faixa de 10-1000 nm (Arsalan; Younus, 2018).

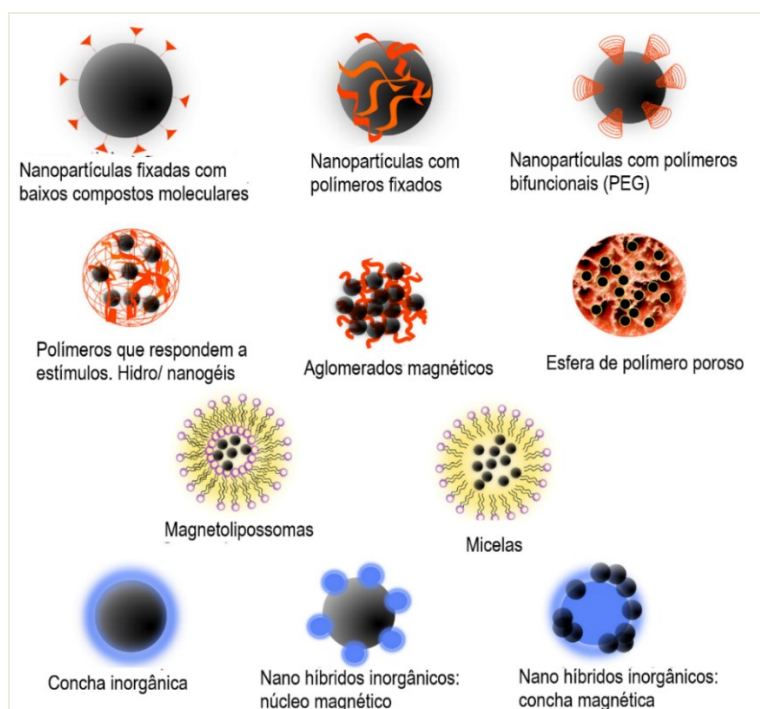
Para imobilização de enzimas, as nanopartículas magnéticas atuam como um suporte eficiente, pois possuem características bastante atrativas a esses processos, visto que um dos desafios dos processos de imobilização é a separação dos biocatalisadores da mistura de reação enzimática ao final do processo. Neste sentido, uma das principais características das nanopartículas magnéticas é a facilidade de extração do meio reacional, utilizando apenas um campo magnético. Destacam-se também por possuir grande área superficial e a presença de grupos hidroxilas em sua superfície, o que facilita a funcionalização e a ligação da molécula enzimática, resistência à transferência de massa, estabilidade térmica e baixa toxicidade (Arsalan; Younus, 2018; Bilal *et al.*, 2018; Thangaraj; Solomon, 2019; Vaghari *et al.*, 2016).

As NPMs se destacam por possuírem propriedades magnéticas, onde o termo magnetismo está associado ao fenômeno de atração e repulsão. As propriedades dos materiais com características magnéticas baseiam-se na sua suscetibilidade magnética (razão da magnetização induzida ao campo magnético aplicado). Os materiais magnéticos são classificados de acordo com seu comportamento magnético e são conhecidos como diamagnético, paramagnético, ferromagnético, antiferromagnético e ferrimagnético. O prefixo refere-se à natureza da interação da ligação entre os dipolos dentro do material (Cullit; Graham, 2009; Vaghari *et al.*, 2016).

As pesquisas de NPMs como suporte para imobilização de enzimas vem crescendo na área da biotecnologia. Na Figura 10 é apresentada uma visão

geral de vários tipos de estruturas de nanopartículas magnéticas em diferentes tipos de arranjo núcleo-casca (*core-shell*).

Figura 10- Tipos gerais de arranjos de nanopartículas magnéticas com polímeros, moléculas e nanopartículas inorgânicas.



Fonte: Adaptada de Hola *et al.*, 2015.

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos apresentando as vantagens das nanopartículas para imobilização de lipase. Ashjari *et al.* (2020) relataram os resultados obtidos usando nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$) de sílica e funcionalizadas com grupos aldeídos, usadas para a imobilização das lipases de *Rhizomucor miehei* (RML) e da *Thermomyces lanuginosa* (TLL). Os resultados mostraram que houve uma rápida imobilização em ambas as enzimas (1,5 a 12 horas) com altos rendimentos de imobilização (81-100%). Os autores determinaram a carga do suporte e a estabilidade térmica, obtendo valores de 81 mg para a RML e 97 mg para a TLL e em relação a estabilidade térmica das duas enzimas imobilizadas observou-se uma retenção da atividade de 54 e 97% a 65 °C, respectivamente.

Pashangeh *et al.* (2017) usaram nanopartículas magnéticas amino-funcionalizadas (Fe_4O_3) para imobilizar lipases de *Rhizopus oryzae*. Os resultados obtidos mostraram que foi possível imobilizar 7 mg de proteína/g de

nanopartícula sintetizada. O pH ótimo da enzima imobilizada foi de 8,0 a 40 °C. Os autores verificaram que houve uma rápida separação da lipase imobilizada da mistura da reação com uso de um suporte magneticamente ativo, além de ser termicamente estável e possível de reutilização, mantendo 64% da atividade após 10 ciclos.

Osuna, *et al.* (2015) realizaram a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana (CNMP) usando dois métodos de ligação covalente, empregando glutaraldeído ou glicidol. Foi verificado que a imobilização melhorou a estabilidade da enzima frente a temperatura e ao pH. Após incubação de 4h nos pHs 7, 8 e 9, a enzima perdeu 10% da atividade com o derivado obtido com glutaraldeído e 20% com o derivado obtido do glicidol. Os resultados de estabilidade térmica foram realizados em três temperaturas (30, 40 e 50 °C) e, comparados com a enzima livre, mostraram maior estabilidade. A estabilidade ao armazenamento da enzima livre e imobilizada foi estudada por 50 dias a 4 °C, e os resultados mostraram que a enzima imobilizada com glutaraldeído e glicidol manteve 85 e 95 % da atividade, respectivamente, enquanto a enzima livre manteve 75% da atividade. Além da maior estabilidade ao armazenamento, foi possível reutilizar a enzima imobilizada por 15 ciclos (reação de hidrólise do p-nitrofenil propionato-p-NPP) com retenção de 80% da atividade inicial.

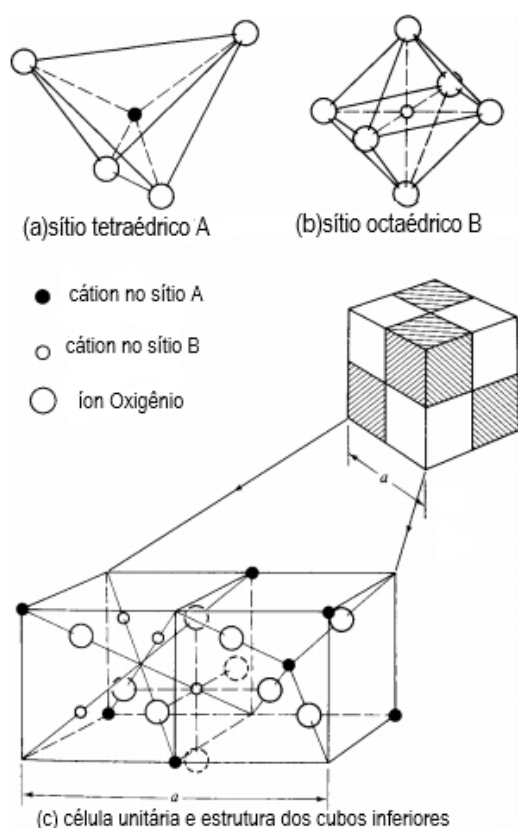
Ferrita de níquel (NiFe_2O_4)

Ferritas são compostos do tipo espinélio com fórmula AB_2O_4 , onde A é o metal divalente (ou seja, Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) e B é o metal trivalente (ou seja, Fe^{3+} , Mn^{2+}). Dentre esses materiais a ferrita de níquel vem ganhando atenção devido a suas propriedades físico-químicas, alta resistência mecânica, durabilidade térmica e estabilidade química (Ashjari *et al.*, 2020; Dumitrescu *et al.*, 2013).

A ferrita de níquel é um material ferrimagnético que tem estrutura de espinélio inverso do tipo $\text{A}^{2+}\text{B}_2^{3+}\text{O}_4$. Nessa estrutura os íons Fe^{3+} se localizam

nos sítios tetraédricos e os íons Ni^{2+} nos sítios octaédricos. A distribuição de cátions entre os locais A e B influenciam a energia e as propriedades magnéticas de compostos do tipo espinélio. O comportamento ferrimagnético na ferrita de níquel ocorre devido ao momento magnético dos spins antiparalelos entre os íons Fe^{3+} em sítios tetraédricos e Ni^{2+} em sítios octaédricos (Zheng *et al.*, 2015). Na Figura 11 podemos observar o tipo de estrutura cúbica cristalina da ferrita.

Figura 11- Estrutura cúbica cristalina da ferrita



Fonte: Adaptado de Cullit; Graham, 2009

As ferritas de níquel de espinélio inverso são atraentes devidos às suas propriedades de magnetização de saturação, baixa coercividade, dureza e alta estabilidade eletroquímica. Esse material pode ser sintetizado por diferentes rotas, tais como método sol-gel, coprecipitação, reação por combustão, entre outras. Algumas das aplicações da ferrita de níquel são como fluido magnético, sensor de gás, dispositivo micro-ondas, removedor de corante por separação magnética, adsorvente, em fotocatalise, catalisador e em materiais fotomagnéticos (Özçelik *et al.*, 2020).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca da síntese e projeto de nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel. (Atacan *et al.*, 2019) utilizaram nanopartículas magnéticas de NiFe_2O_4 para imobilização da enzima glicose oxidase e observaram que a enzima imobilizada neste suporte foi mais estável do que a enzima livre em relação ao pH, temperatura e à estabilidade ao armazenamento. Os testes de reutilização mostraram que a enzima manteve 50% da sua atividade inicial após 10 ciclos. Leal *et al.*, (2018) também avaliaram a obtenção de nanopartículas magnéticas para imobilização da glicose oxidase. Os autores obtiveram um híbrido de $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ a partir da modificação da superfície da ferrita de níquel com 3-aminopropiltietoxissilano com o objetivo de avaliar a formação e suas propriedades estruturais, magnéticas e morfológicas. Como resultados, os autores constataram que a funcionalização da ferrita NiFe_2O_4 , com a impregnação do agente silano na superfície das suas partículas, tornou possível a obtenção do híbrido $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Em relação à imobilização por ligação covalente da enzima, eles observaram um bom comportamento da NiFe_2O_4 , o mesmo não foi observado para o suporte $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Porém, a modificação proporcionou uma maior área superficial e melhoramento no comportamento magnético, indicando que este suporte pode ser testado para outras aplicações.

A papaína foi imobilizada por ligação covalente por Güy (2018) em MNPs de NiFe_2O_4 funcionalizada com ácido gálico. Como resultado obteve-se uma maior atividade da papaína imobilizada do que na forma livre. A enzima imobilizada reteve 75,5% da sua atividade inicial após 8 semanas de armazenamento e 51% de sua atividade inicial após 10 ciclos de reutilização.

1.4.4 Carvão ativado proveniente da palha de cana-de-açúcar

O carvão ativado (CA) é um material carbonáceo poroso, caracterizado por possuir elevada área superficial e resistência térmica, química e mecânica (Gonçalves *et al.*, 2021). Esse material tem sua adsorção determinada principalmente pela sua porosidade interna, área superficial, distribuição de

tamanho de poro e pela presença de grupos funcionais em sua superfície. Devido a estas características o carvão ativado tem sido amplamente utilizado, principalmente como adsorvente, em diversas aplicações, tais como, purificação de água, adsorção de metais pesados, adsorção de corantes e imobilização de enzimas (Nguyen *et al.* 2021; Sharma *et al.* 2022a).

A produção do CA é realizada basicamente pela carbonização e ativação do seu precursor. O precursor e o método de preparação são fatores que influenciam a característica final do material. Levando em consideração a crescente busca por novos materiais sustentáveis, a utilização de subprodutos agroindustriais como precursores para produção de carvão ativado vem ganhando bastante destaque nas pesquisas. A cana-de-açúcar é uma biomassa utilizada como importante fonte de energia renovável, além de ser uma boa alternativa para a substituição de combustíveis fósseis. A principal fonte de produção de etanol no Brasil vem dessa biomassa (Silveira *et al.*, 2020), o que gera grande quantidade de subprodutos. Em razão disto e pensando no reuso do resíduo gerado, temos a utilização da palha cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de carvão ativado.

A utilização do carvão ativado como suporte para imobilização de enzimas com fins de aplicação industrial é uma estratégia promissora. Neste sentido, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com foco em diversos subprodutos agrícolas utilizados como precursores para obtenção do CA e aplicação na imobilização de enzimas. Veeramalai *et al.*, (2022) estudaram a imobilização da lipase em carvão ativado produzido a partir de subprodutos de abacaxi, obtendo eficiência de imobilização de 92,99%. Zhao *et al.*, (2022) investigaram a imobilização da lipase de *Bacillus licheniformis* utilizando o carvão ativado mesoporoso que foi adicionado a nanopartículas magnéticas e funcionalizado com polidopamina, por ligação covalente. Os autores encontraram máximo de rendimento, eficiência e quantidade de lipase imobilizada de 45%, 54% e 36,9 mg/g, respectivamente. Gonçalves *et al.*, (2021) avaliaram a imobilização da lipase pancreática de porco utilizando o carvão ativado, obtendo uma máxima atividade hidrolítica de 239,6 U/g na presença de 0,6 mM do surfactante Triton-X. O biocatalisador estudado foi aplicado na esterificação do butirato de butila, obtendo cerca de 82% de rendimento. A imobilização da lipase utilizando carvão ativado foi estudada por

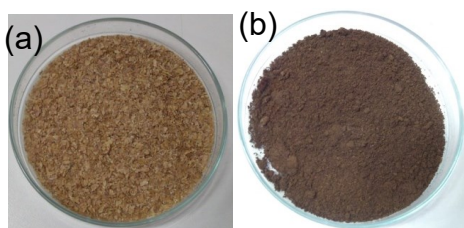
Brito *et al.*, (2020). Os autores obtiveram o CA a partir de palmito de pupunha e os resultados de imobilização se mostraram promissores com capacidade de imobilização de 576 mg/g e máximo de atividade hidrolítica de 4,727 U/mg. Com base nesses estudos os autores concluíram que o carvão ativado é um suporte promissor no uso de imobilização de enzimas, por ser um suporte barato e renovável.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das matérias-primas

As matérias primas (Figura 12) utilizadas para produção de lipase em CES foram farelo de trigo (Arma Zen[®]), adquirido em mercado local (Rio de Janeiro-RJ), e borra de café. Três tipos de borras de café foram avaliados como possíveis indutores da síntese de lipase. As duas borras de café provenientes de grãos 100% arábica (*Coffea arabica*) foram gentilmente cedidas pela cafeteria Casa do Pão de Queijo[®] (Norte Shopping- Rio de Janeiro), denominada de borra A, e pela Kopenhagen[®] (Norte Shopping- Rio de Janeiro), denominada de borra B. A terceira borra testada foi proveniente do Café Melitta[®] tradicional, denominado de borra C. O café Melitta[®] (café tradicional) é constituído de cafés arábica, robusta/conilon (*Coffea canefora*) ou uma mistura deles.

Figura 12 – Matérias-primas da CES: (a) Farelo de trigo, (b) borra de café



Fonte: O autor, 2024

As borras de café, após coletadas, foram secas em estufa a 105 °C por 6 horas e armazenadas em congelador a - 4°C.

2.2 Caracterização físico-química das matérias-primas

Para caracterização das matérias-primas (farelo de trigo e borra de café), foram realizadas análises de determinação do teor de umidade, cinzas, lipídios, nitrogênio total e carboidratos. A metodologia das análises foi realizada segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). As análises de lipídios e nitrogênio total foram realizadas no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), as demais análises foram realizadas na UERJ.

2.2.1 Determinação de Resíduo Mineral (Cinzas Totais)

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada pelo método gravimétrico, baseado na perda de massa da amostra após o processo de incineração. Para esta análise, um cadinho de porcelana foi previamente incinerado, resfriado em dessecador e tarado. Foram pesados dois gramas das amostras no cadinho, essas amostras foram incineradas com auxílio do bico de Bunsen, procurando aquecer de maneira uniforme todo o cadinho, até completa carbonização da amostra. Em seguida, o sistema foi levado à mufla, previamente aquecida entre 500 - 550°C, para incineração completa da amostra, até eliminação completa do carvão e obtenção de cinzas claras.

$$Cinzas \text{ (\%)} = \frac{m_{cinzas} \times 100}{m_{amostra}} \quad (1)$$

onde: m_{cinzas} = massa de cinzas após carbonização da amostra (g)

$m_{amostra}$ = massa inicial da amostra (g)

2.2.2 Determinação de Nitrogênio Total

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Kjeldhal. A análise foi realizada em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na etapa de digestão, a matéria orgânica existente na amostra foi digerida com ácido sulfúrico e uma mistura catalítica (Na_2SeO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4). Nessa etapa foram pesados 0,5 g da amostra em papel celofane que foi fechado cuidadosamente e transferido para o tubo de Kjeldhal. Da mesma forma, foram pesados 1 g da mistura catalítica em papel celofane, que foi fechado e colocado no mesmo tubo da amostra. Em seguida, foram adicionados ao tubo de Kjeldhal, 20 mL de ácido sulfúrico e o sistema foi transferido ao digestor Buchi K-437 até sua completa digestão.

Após a etapa de digestão, procedeu-se a etapa de destilação, onde os tubos de Kjeldhal foram retirados do digestor, adicionados 30 mL de água destilada para seu resfriamento, sendo em seguida acoplado o tubo de Kjeldhal com a amostra digerida ao destilador de nitrogênio BUCHI-350. A amostra foi destilada com hidróxido de sódio (40% m/v) e condensada em solução de ácido bórico, contendo indicador misto (fenolftaleína e 1 g de zinco em pó). Ao adicionar hidróxido de sódio, a solução apresentou uma cor castanha e durante a destilação a solução receptora ficou azul.

Por fim, na etapa de titulação ocorreu a titulação do destilado com uma solução de ácido sulfúrico 0,1 N. O teor de nitrogênio total foi calculado de acordo com a equação 2.

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{V \times N \times f \times meq \ N \times 100}{m} \quad (2)$$

onde:

V = volume de ácido sulfúrico gasto na titulação

N = normalidade do ácido sulfúrico

f = fator de correção do ácido

m = massa da amostra em gramas

meq N= miliequivalente grama do Nitrogênio

2.2.3 Determinação de Lipídios totais

O teor de lipídios totais foi determinado pelo método do Soxhlet, que se baseia na extração contínua dos lipídios das amostras através do uso de solventes orgânicos. Foram pesados 3 g de amostra em um cartucho de papel de filtro qualitativo, transferiu-se o cartucho para o extrator de Soxhlet. Os balões de fundo chato foram secos em estufa a 105 °C, resfriados em dessecador e tarados. A extração ocorreu utilizando a solução éter etílico/éter de petróleo (1:1 v/v) continuamente, totalizando 5 horas de extração. O solvente foi recuperado e os balões com lipídios foram secos em estufa 105 °C por 1 hora, resfriados e aferidos. Esse procedimento foi repetido até obter peso constante. O teor de lipídios foi calculado pela diferença da massa do balão com lipídios e do balão vazio. A análise foi realizada em duplicata e o teor de lipídios foi calculado pela equação 3.

$$Lipídios (\%) = \frac{(B - A) \times 100}{M} \quad (3)$$

onde:

A = massa do balão

B = massa do balão + lipídios

M = massa da amostra

2.2.4 Umidade

As análises do teor de umidade foram realizadas com amostras de 3 g, em triplicata, que foram analisadas em Analisador de Umidade Mettler Toledo, modelo HB43S.

2.2.5 Carboidratos

Os teores de carboidratos foram determinados por diferença, subtraindo de 100 a soma dos valores obtidos de umidade, cinzas, proteínas totais e lipídios totais, conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

2.3 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma linhagem mutante do fungo filamentoso *Aspergillus niger* 11T53A14, cedida da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Brasil.

2.4 Estocagem e ativação do microrganismo.

Os conídios de *A. niger* 11T53A14 foram estocados em solo estéreo a -4 °C. O fungo foi ativado a 32°C (estufa B.O.D 411D) em tubos de ensaio contendo gelose inclinada com o meio básico SOCAREAN (Tabela 5). Para a ativação do fungo foram realizados repiques sucessivos. Os conídios ativados foram utilizados para a inoculação do meio de sabugo de milho (Couri; Farias, 1995).

Tabela 4- Composição do meio básico SOCAREAN

Nutriente/Reagentes	Concentração (g/L)
Agar-agar	30,00
Cloreto de potássio (KCl)	0,50
Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄)	1,00

Nitrato de Sódio (NaNO_3)	3,00
Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,50

Fonte: Couri; Farias, 1995

2.5 Meio de manutenção do microrganismo

O *Aspergillus niger* 11T53A14 foi mantido a 4 °C após 7 dias de crescimento em tubo de ensaio contendo o meio básico descrito por (Couri; Farias, 1995), denominado SOCAREAN, apresentado na Tabela 5. Todos os nutrientes/reagentes foram pesados em balança analítica Mettler Toledo, modelo AL204.

2.6 Meio de sabugo de milho

O meio de sabugo de milho tem como objetivo a propagação de conídios do fungo *A. niger* 11T53A14. O meio de sabugo de milho foi preparado segundo a metodologia descrita por (C.A.O. Gomes, 1995), que utiliza 4,6 g de sabugo de milho (seco, triturado e peneirado) enriquecido com 6 mL da solução C (Tabela 6). O meio, contido em frasco *erlenmeyer* de 125 mL, foi devidamente homogeneizado, tampado com rolha de algodão cardado e esterilizado a 1 atm (120 °C) por uma hora.

Tabela 5- Soluções para preparo do meio de sabugo de milho

Solução A: Preparo de 100 mL	Solução B: Preparo de 100 mL	Solução C: Preparo de 50 mL
KH_2PO_4 = 20g	ZnSO_4 = 3,96 g	Peptona = 2,80 g
H_2O destilada	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 4,60 g	HCl 2N = 1 gota
	MnSO_4 = 0,01 g	Solução A = 0,19 mL
	H_2SO_4 = 0,5 mL	Solução B = 0,025 mL
	H_2O destilada	H_2O destilada

Fonte: O autor, 2024

2.7 Produção de conídios

Para inoculação do meio do sabugo de milho, adicionou-se aproximadamente 10 mL de solução 0,3% v/v de Tween 80 ao tubo contendo gelose inclinada (item 2.5) para o desprendimento dos conídios. Em seguida, esta suspensão foi transferida para um tubo de ensaio estéril. Com auxílio de pipeta estéril, 1 mL da suspensão foi adicionado ao meio de sabugo de milho contido em frasco *erlenmeyer*. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada e incubada em estufa (B.O.D 411D) por 5 dias a 32°C.

2.8 Preparo do inóculo para cultivo em estado sólido

Após os 5 dias de incubação dos conídios no meio de sabugo de milho, foram adicionados 20 mL de solução 0,3 % v/v de Tween 80 em cada frasco *erlenmeyer*. A mistura foi agitada e filtrada em gaze estéril para a obtenção da suspensão de conídios. Esta suspensão foi diluída e o número de conídios/mL foi determinado através de contagem em câmara de *Neubauer* em microscópio (Nikon Eclipse, modelo E100). O volume de inóculo a ser empregado no CES foi calculado visando permitir uma concentração final de 10^7 conídios/g de meio de cultivo.

2.9 Meio de cultivo para a produção de lipase por CES

Os meios de cultivo para produção de lipase por CES foram preparados em frascos *erlenmeyer* de 250 mL e de 500 mL, contendo 15 g e 40 g de meio de cultivo, respectivamente, para os ensaios em *erlenmeyer* e em biorreator de leito fixo. O meio de cultivo era constituído por farelo de trigo (96,48 %, m/m), borra de café (3,52 %, m/m) e foi suplementado com sulfato de amônio (0,6 %, m/m) e solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (110 mL para 100 g de meio)

(Veloso *et al.*, 2019). Os meios de cultivos foram homogeneizados e esterilizados a 121°C, 1 atm por 15 minutos. Posteriormente, os meios foram inoculados com uma suspensão de 1×10^7 conídios/g.

2.10 Avaliação do tipo de borra de café usado na CES

As três borras de café (A, B e C), descritas no item 2.1, foram avaliadas como indutores da produção de lipase por FES. Os ensaios foram conduzidos em frascos *erlenmeyers* de 250 mL contendo 15 g de meio de cultivo (item 2.9), em incubadora (B.O.D 411D) (32°C por 40 horas). O ensaio controle foi realizado com o meio de cultivo (100% m/m de farelo de trigo, enriquecido com 0,6% de nitrogênio (sulfato de amônio) e 55% de umidade (110 mL para 100 g de meio- solução de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e inoculado com uma suspensão de 10^7 conídios/mL), sem a presença do indutor (borra de café).

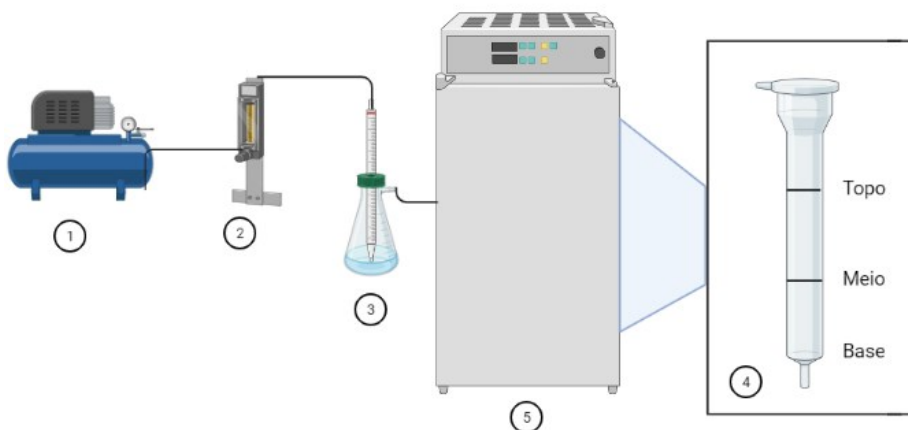
2.11 Avaliação do reator de bancada usado na CES

Ensaio preliminares foram realizados para avaliar a produção de lipase por CES em dois reatores tipo bandeja com configurações diferentes. Para esse estudo, 20 g do meio de cultivo (item 2.9) foram colocados em frasco *erlenmeyer* de 8,5 cm de diâmetro e 56,7 cm² de área superficial (reator 1) e em placa de petri de 9,9 cm de diâmetro e 77 cm² de área superficial (reator 2), perfazendo um leito de 1,5 cm de altura, em ambos. O frasco *erlenmeyer* foi tampado com uma rolha de algodão e a placa de petri com um filtro de papel contendo alguns furos para passagem do ar. Os reatores foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm por 15 minutos.. O teor de umidade foi determinado no meio de cultivo antes da inoculação e depois do cultivo (Preparado Enzimático Sólido- PES). As análises foram realizadas com uma massa de 3 g de amostra utilizando o Analisador de Umidade Mettler Toledo, modelo HB43-S.

2.12 Avaliação da aeração na CES para produção de lipase em reator de leito fixo

A produção de lipase foi realizada em reator de leito fixo (38,0 cm x 4,5 cm), perfazendo uma altura de leito de 31,5 cm. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo descrito no item 2.9. Foi empregada aeração forçada variando a vazão específica de ar (0,2; 0,35; 0,5; 1,0 e 1,5 volume de ar/ volume de meio/ minuto – vvm) regulados por um rotâmetro ligado a linha de ar comprimido. O ar foi esterilizado utilizando um filtro com membrana de abertura 0,2 μm e umedecido em água para evitar o ressecamento do leito. O CES foi conduzido em estufa a 32 °C (B.O.D 411D) por 40 horas. Amostras foram retiradas de três regiões do reator com diferentes alturas: base (h = 10,5 cm), meio (h = 21 cm) e topo (h = 31,5 cm) como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Esquema do aparato experimental usado na produção de lipase por CES: (1) compressor de ar, (2) rotâmetro, (3) umidificador, (4) biorreator de leito fixo e (5) estufa.



Fonte: O autor, 2024

2.13 Obtenção do extrato enzimático

Após o cultivo e produção da enzima, foi feita a extração enzimática de acordo com o método descrito por (Couri *et al.*, 2000), através da adição de 2,5 mL de tampão citrato de sódio 0,1 mol/L pH 6,0 por grama de meio de cultivo inicial. Os meios fermentados com o tampão foram agitados a 170 rpm, por 1 h, em incubadora rotatória (shaker Tecnal, modelo TE-420) a 32 °C. Posteriormente, os meios fermentados foram prensados com auxílio de gaze e espremedor e, em seguida, microfiltrados em kitassato usando membrana de nanocelulose (Millipore®) de 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. O filtrado obtido foi denominado extrato enzimático bruto (EEB).

2.14 Concentração do extrato enzimático bruto da lipase

2.14.1 Precipitação proteica com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto foi concentrado pela precipitação das proteínas com sulfato de amônio utilizando as seguintes condições de saturação: 40, 50, 60, 70, 80 e 90 %.

Para o processo de concentração por sulfato de amônio, foram adicionadas, lentamente, quantidades determinadas de sulfato de amônio, sob agitação e em banho de gelo, até obter a saturação desejada 40, 50, 60, 70, 80 e 90 %, a 40 mL do EEB (Muruci, 2012). Em seguida, as amostras foram mantidas em geladeira (6°C) (*over night*). Decorrido este tempo, a suspensão foi centrifugada a 5580 g (5500 rpm) (Thermo Scientific Sorvall ST16R), a 4°C, por uma hora. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em 15 mL de tampão citrato de sódio 0,1 mol/L (pH 6,0). As amostras (precipitado e sobrenadante) foram, então, acondicionadas em

membrana de diálise (Sigma-Aldrich), que foi suspensa em 2L de tampão citrato de sódio 0,1 mol/L, contidos em béquer de 2000 mL. O sistema de diálise foi mantido sob refrigeração por 24 horas com trocas sucessivas do tampão citrato de sódio 0,1 mol/L.

Para determinar a eficiência do processo de precipitação com sulfato de amônio foram avaliados o rendimento e o grau de purificação, calculados pelas equações 4 e 5 (Muruci, 2012).

Rendimento: Este parâmetro é a medida da atividade mantida após cada etapa de purificação, na forma de percentagem da atividade total no extrato bruto. A quantidade total de atividade no extrato inicial é considerada como 100% (Equação 4).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{atividade enzimática total do concentrado}}{\text{atividade enzimática total da amostra}} \times 100 \quad (4)$$

Grau de Purificação: Este parâmetro é uma medida do aumento de pureza e é obtido dividindo-se a atividade específica, calculada após cada etapa de purificação, pela atividade específica do extrato inicial (Equação 5).

$$\text{Grau de purificação} = \frac{\text{atividade específica do concentrado}}{\text{atividade específica da amostra}} \quad (5)$$

2.14.2 Concentração por ultrafiltração

Os extratos enzimáticos produzidos no CES foram concentrados através do sistema de ultrafiltração molecular em tubos de centrífuga Amicon® Ultra-15. Membranas com diferentes tamanho de poros (10, 30, 50 e 100 NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*, kDa)) foram avaliadas. Para a concentração, foram adicionados 15 mL do EEB no tubo do sistema de filtração e centrifugados a 4000 g por 15 min a 4 °C em centrífuga (Thermo® ST16R). Alíquotas das porções filtrada e retida pelo sistema de ultrafiltração foram recolhidas para posteriores análises de atividade enzimática.

2.15 Determinações analíticas

2.15.1 Determinação da atividade lipásica

A atividade lipásica do EEB ou da solução enzimática obtida após concentração com sulfato de amônio foi determinada pelo método titulométrico de acordo com o procedimento descrito por Pereira et al. (2001), com pequenas modificações.

Para determinação da atividade foi preparada primeiramente uma emulsão constituída por goma arábica (VETEC®), água e azeite de oliva extra-virgem (Andorinha®) na proporção 1:1 (48 mL de água destilada, 48 mL de azeite de oliva extra virgem e 7 g de goma arábica). Em seguida, foi feita uma mistura reacional em frascos plásticos, contendo 5 mL da emulsão, 4 mL de tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0 e 1 mL da solução enzimática. O meio reacional foi mantido em banho-maria (Quimis, Q215) a 30 °C e sob agitação, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida após esse tempo pela adição de 25 mL de uma solução acetona/etanol/água na proporção de 1:1:1.

Os ácidos graxos formados pela hidrólise enzimática dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados através da volumetria de neutralização, empregando titulador automático (Mettler Toledo, modelo T50) e solução de NaOH 0,05 mol/L (até pH final de 11,0). A análise foi realizada em triplicata. O ensaio em branco foi realizado nas mesmas condições, exceto pelo fato de que o volume da solução enzimática (1 mL) foi adicionado após a adição de 25 mL da solução acetona/etanol/água, no momento da titulação. O ensaio em branco foi realizado em duplicata. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições de ensaio padrão. O valor da atividade da enzima em U/g foi calculado conforme a equação 6.

$$A_L = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{V \times t} \quad (6)$$

onde:

A_L = atividade lipásica (U/mL)

V_a = média do volume de solução de NaOH 0,05 mol/L, de fator de correção conhecido, gasto para titular os ácidos graxos produzidos na reação enzimática (mL).

V_b = média do volume de solução de NaOH 0,05 mol/L, de fator de correção conhecido, gasto para titular o ensaio em branco.

M = Concentração (mol/L) da solução de NaOH (0,05 mol/L).

V = volume do extrato enzimático usado na reação (mL) = 1 mL.

T = tempo de reação (minutos) = 10 min.

A partir do cálculo da atividade lipásica em U/mL, foi feito cálculo da atividade lipásica em U/g do meio de cultivo a partir da equação 7:

$$A_{(U/g)} = \frac{A_L \times V_{\text{tampão}}}{Q_{mf} - \left(\frac{Q_{mf} \times U}{100} \right)} \quad (7)$$

onde:

$A_{(U/g)}$ = atividade em U/g

A_L = atividade lipásica em U/mL

Q_{mf} = quantidade de massa (g) usada no cultivo

$V_{\text{tampão}}$ = volume da solução tampão usada na extração do EEB (mL)

U = umidade inicial do meio de cultivo

Como a atividade enzimática é determinada a partir da velocidade inicial da reação, a cinética da reação de hidrólise enzimática do óleo de oliva foi acompanhada durante 25 minutos, conforme apresentado Apêndice.

2.15.2 Atividade específica aparente

A atividade lipásica específica aparente (U/g de proteína) foi calculada pela razão entre os resultados de atividade lipásica U/mL e concentração de proteínas g/mL (Equação 8).

$$\textit{Atividade específica} = \frac{\textit{atividade enzimática (U/mL)}}{\textit{concentração de proteína (g/mL)}} \quad (8)$$

2.15.3 Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteínas no EEB e nas amostras do processo de concentração com sulfato de amônio foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (Bradford, 1976).

Primeiramente foi preparado o reagente de Bradford, dissolvendo-se o pigmento azul brilhante (0,1 g) em 50 mL etanol (95%) e agitando-se com auxílio de uma placa de agitação por 10 minutos para total dissolução, em seguida, adicionou-se 100 mL do ácido orto-fosfórico (85%) e homogeneizou-se. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de um litro, embrulhado com papel alumínio, e avolumou-se com água Mili-Q. A solução foi homogeneizada e mantida em repouso por cerca de uma hora. Em seguida, a solução foi filtrada com papel de filtração média, com auxílio de um kitassato e uma bomba a vácuo, e armazenada em frasco âmbar.

Para determinação do teor proteico das amostras, 3 mL do reagente de Bradford foram adicionados a 0,3 mL da amostra em tubo de ensaio, a mistura foi agitada com auxílio de um 79rimet e, após 5 minutos de reação, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (HACH, modelo DR 5000) a 595 nm. O ensaio em branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro e foi realizado substituindo o volume da amostra por água

destilada. A concentração de proteínas foi calculada a partir da curva de calibração (Apêndice), obtida com o padrão de albumina sérica bovina (BSA).

2.16 Caracterização da lipase obtida no cultivo

Os ensaios de caracterização da lipase foram realizados com o extrato enzimático concentrado (EEBC) obtido após precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação, conforme descrito no item 2.14.1.

Efeito do pH e da temperatura na atividade lipásica

Para os experimentos do efeito do pH e da temperatura na atividade lipolítica, o extrato enzimático concentrado obtido após precipitação com sulfato de amônio a 90%, foi previamente diluído em tampão citrato de sódio 0,1 mol/L na proporção 1:2 e a reação de hidrólise de óleo de oliva foi conduzida de acordo com item 2.15.1.

A atividade enzimática foi determinada em diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8). Para os pHs 5,0 e 6,0 foi utilizada solução tampão citrato de sódio 0,1 mol/L, enquanto para as reações em pH 7,0 e 8,0, foi utilizada a solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L. A reação de hidrólise de óleo de oliva foi conduzida durante 10 minutos a 30 °C.

O efeito da temperatura foi avaliado na determinação da atividade lipásica, na hidrólise de óleo de oliva, nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Para determinação da atividade lipásica foi utilizada a solução de tampão citrato de sódio 0,1 mol/L (pH 6,0), com tempo de reação de 10 minutos, seguindo protocolo descrito no item 2.15.1.

Estabilidade à estocagem

Para os testes de estabilidade à estocagem (6 °C), amostras do extrato enzimático concentrado obtido após precipitação com sulfato de amônio a 90% foram acondicionadas em tubo Eppendorf de 15 mL e mantidas em geladeira (6°C). Amostras do extrato enzimático foram retiradas periodicamente (em tempos determinados) para determinação da atividade hidrolítica residual empregando o método titulométrico, conforme metodologia descrita anteriormente item 2.15.1.

2.17 Imobilização da lipase

O processo de imobilização foi realizado utilizando dois tipos de métodos: adsorção física e ligação covalente. Dois suportes foram selecionados para o estudo, sendo o carvão ativado utilizado na adsorção física e a nanopartícula de ferrita de níquel utilizada tanto para imobilização por adsorção como por ligação covalente. A imobilização foi realizada com o extrato enzimático concentrado obtido pelo método de ultrafiltração com a membrana de corte de 50 kDa. Foi utilizada também a enzima comercial CalB (enzima livre de *Candida antarctica* da Novozymes) em alguns ensaios a fim de comparação.

2.17.1 Suportes

2.17.1.1 Ferrita de níquel

As nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel (NiFe_2O_4) foram cedidas gentilmente pelo laboratório de Matérias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campos Pato Branco.

O método do precursor polimérico foi empregado para obtenção das nanopartículas de NiFe_2O_4 . Soluções aquosas de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 98,8%) 1 mol L^{-1} e $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Neon, 99,5%) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram misturadas em temperatura ambiente para obtenção da estequiometria molar de Ni:Fe (1:2). A esta solução foi adicionada, sob agitação vigorosa, uma solução aquosa de ácido cítrico anidro (CA) (Neon, 99,5%) $1,6 \text{ mol L}^{-1}$ para obter uma proporção CA:cátions metálicos de 3:1. O pH do meio reacional foi ajustado para 4,0 pelo uso de NH_4OH (Neon). A mistura foi então aquecida a 60°C sob agitação constante e mantida nesta condição por 30 min. Após esse período, as temperaturas foram elevadas para 90°C , e etilenoglicol (EG) (Neon, 99,9%) foi adicionado à solução para obter uma proporção mássica de CA:EG de 3:2. A mistura foi mantida sob agitação constante a 90°C até a formação de uma resina polimérica. O polímero formado foi então seco em estufa a 110°C durante a noite, pré-calcinado a 400°C por 2,5 horas a uma taxa de aquecimento de 1°C min^{-1} e calcinado a 800°C por 3 h (taxa de aquecimento de 5°C min^{-1}).

2.17.1.2 Carvão ativado

O carvão ativado (CA) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Divisão de Catálise e Processos Químicos (INT). Esse material foi obtido através da palha-de-açúcar utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) como precursor. A palha de cana-de-açúcar foi tratada em moinho de bolas e peneirada, gerando frações em torno de 1 mm. O precursor foi impregnado com H_3PO_4 (85% m/m) a

temperatura ambiente e seco em rotovaporizador por 24 h, a 60 °C. A amostra foi lavada e filtrada com água destilada (60 °C) até pH neutro. Após secagem a 100 °C por 72 h, a ativação foi realizada em reator tubular convencional, sob fluxo de N₂ (60 mL/min), a 500 °C, por 2 h, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ (Alves *et al.*, 2022).

2.17.2 Imobilização da lipase no Carvão Ativado

A imobilização da lipase no carvão ativado foi realizada utilizando o método de adsorção física e foi realizado utilizando a lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 e a lipase comercial CalB.

O suporte (0,15 g) foi misturado com diferentes quantidades da lipase (CalB ou *A.niger*) em 15 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mmol/L (pH 7,0), concentração de proteína de 0,1 mg/mL, sob leve agitação, usando agitador de rolos a 25±1 °C por 180 min. Periodicamente, as amostras de sobrenadante foram retiradas e analisadas quanto a concentração de proteína 2.15.3 e determinação da atividade enzimática. A lipase imobilizada no carvão ativado foi recuperada por filtração a vácuo, lavada com o tampão fosfato de sódio 25 mmol/L (pH 7,0) e seca durante a noite a 25°C. A atividade da lipase foi determinada conforme item 2.15.1, no início e no final da imobilização e a eficiência de imobilização foi calculada conforme a equação 9, Silva *et al.* (2012).

$$IY_{mob(\%)} = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}} \times 100 \quad (9)$$

onde, A_{ti} é a atividade lipásica (U/mL) inicial antes da imobilização e A_{tf} é atividade final do sobrenadante após a imobilização.

2.17.2.1 Efeito da quantidade de proteína no processo de imobilização do carvão ativado e isoterma de adsorção de Langmuir

O efeito da concentração de proteína na eficiência da imobilização foi estudado usando uma solução de lipase diluída em tampão fosfato de sódio (25 mmol /L) em pH 7,0, sob agitação suave, usando um agitador de rolo a 25 ± 1 °C por 120 min. CalB foi imobilizada em carvão ativado para testar o efeito da quantidade de proteína nas concentrações de proteína de 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/ mL. As concentrações da lipase *de A. niger* de 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ mL foram testadas na imobilização do carvão ativado. O isoterma de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais e é descrita como mostrado na Equação 10, onde Q_e é a concentração de equilíbrio de proteína adsorvida no suporte (mg/g), K é a constante de equilíbrio de adsorção (mL/mg), Q_m é a massa máxima adsorvida de proteína no suporte (mg/g), e C_e é a concentração de equilíbrio de proteína livre em solução (mg/mL).

$$Q_e = \frac{C_e \times K \times Q_m}{1 + K \times C_e} \quad (10)$$

O modelo de isoterma de Langmuir para adsorção admite que a adsorção ocorreria em locais ativos na área de superfície de suporte. Também estabelece que a superfície seria homogênea e, portanto, a energia de adsorção de cada adsorvato seria idêntica. Devido à quantidade limitada de sítios ativos por g de suporte, o adsorbato estaria limitado a adsorvido em uma massa de suporte específica denominada Q_m .

Os parâmetros desse modelo não linear foram estimados numericamente com base no algoritmo de Levenberg-Marquardt usando o software Origin 9.0.

2.17.3 Imobilização da lipase em nanopartículas de NiFe₂O₄

O processo de imobilização da lipase utilizando como suporte nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel foi realizado utilizando dois métodos: adsorção física e a ligação covalente (com suporte funcionalizado).

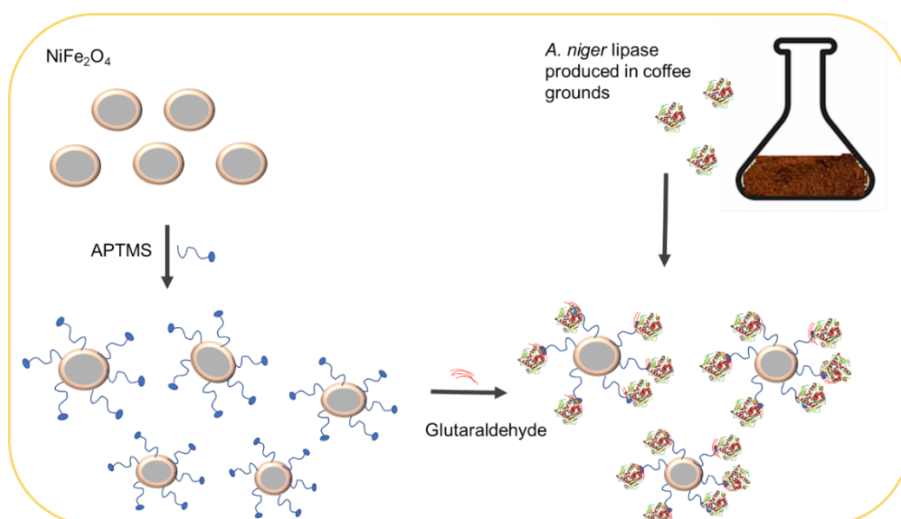
As nanopartículas de ferrita de níquel foram revestidas com APTMS ((3-aminopropil)trimetoxissilano) seguindo um procedimento baseado em Santos et al. (2018). Nanopartículas magnéticas de NiFe₂O₄ (100 mg) foram dispersas em 100 mL de etanol e 100 mL de água deionizada através de ultrassom por 5 min. Neste procedimento, 10 mL de APTMS foram adicionados às partículas dispersas. O meio reacional foi homogeneizado em um frasco lacrado e, então, mantido em agitação a 150 rpm em agitador durante a noite a 60 °C. As nanopartículas magnéticas funcionalizadas obtidas (NiFe₂O₄-APTMS) foram coletadas por um campo magnético externo e lavadas com água deionizada e etanol para remover os reagentes de organossilanos não reagidos.

2.17.3.1 Procedimento de imobilização

A lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 foi imobilizada em nanopartículas de ferrita de níquel (NiFe₂O₄) por adsorção física e ligação covalente. Para a adsorção física, 0,1 g de nanopartículas de ferrita de níquel foram adicionados a 10 mL da solução enzimática, usando tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7) como diluente da solução, e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 180 min a 25 °C. Para a ligação covalente, os grupos amino-terminais do NiFe₂O₄-APTMS foram ativados com glutaraldeído (NiFe₂O₄-APTMS-GLU) para promover a ligação covalente entre a enzima e o suporte. Neste procedimento, foi utilizada solução (1mL) de glutaraldeído (2,5 % v/v) e 0.1 mL (0,25 v/v), que foi colocada em contato direto com 0,1 g de suporte previamente seco, e adicionada a solução enzimática (9 mL) e (9,9 mL)

respectivamente, diluída em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7). O sistema foi mantido sob agitação constante por 24 horas, a 8 °C. Uma solução enzimática idêntica foi mantida nas condições, porém na ausência de suporte, como referência. Não foi observada diminuição da atividade da solução enzimática de referência. Finalmente, a lipase imobilizada foi separada da solução por decantação magnética. A quantidade de enzima imobilizada no suporte foi determinada medindo-se a atividade inicial e final no sobrenadante da suspensão de imobilização e a eficiência de imobilização (IY, %) foi determinada pela Eq. (9) (Silva *et al.*, 2012). A Figura 14 ilustra o esquema de imobilização covalente da enzima.

Figura 14- Esquema da imobilização de lipase na superfície de NiFe_2O_4 funcionalizado.



Fonte: O autor, 2024

2.17.4 Caracterização dos suportes e do biocatalisador

2.17.4.1 Análise de difração de raios X (DRX)

As análises de DRX dos suportes foram realizadas em um difratômetro de raios X Rigaku Miniflex II que opera com radiação $\text{CuK}\alpha$ (30 kV e 15 mA) e um monocromador de grafite. A análise foi feita variando o ângulo 2θ de 5 a 90° , com passo de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1 segundo por passo.

Para a ferrita de níquel o tamanho do cristalito foi calculado pela equação de Scherrer (Eq.11), usando o pico mais intenso, centrado em $35,6^\circ$.

$$X_s = (k \lambda) / (\beta \cos(\theta)) \quad (11)$$

onde X_s – Tamanho médio do cristalito;

k – Constante que depende da forma das partículas (para esfera, $k = 0,94$);

λ – comprimento de onda dos raios X (para $\text{Cu } k\alpha$, $\lambda = 1,5488 \text{ \AA}$);

β – Largura do pico a meia altura em radianos;

θ – Ângulo de difração.

2.17.4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Espectros de FTIR foram usados para verificar a funcionalização da ferrita de níquel com APTMS e a imobilização da enzima nos suportes utilizados. Para a análise, foi utilizado um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo PRESTIGE-21. As amostras foram preparadas pela diluição de 3% m/m do pó em KBr (agente dispersivo). A faixa de frequência utilizada foi $400\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ com resolução espectral de 1 cm^{-1} .

2.17.4.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar aspectos morfológicos dos suportes antes e após a imobilização da lipase. As amostras foram colocadas em fita de carbono para melhorar o contraste das imagens e inseridas na câmera do microscópio, na qual foi realizado vácuo. O equipamento utilizado foi um microscópio Hitachi, modelo TM-3030, com

filamento de tungstênio. A voltagem de aceleração foi de 15kV, e os detectores avaliaram elétrons secundários e retroespalhados.

2.17.4.4 Dessorção de amônia com temperatura programada (TPD-NH₃)

O TPD-NH₃ foi usado para determinação da acidez do suporte. Antes da adsorção da amônia, aproximadamente 150 mg do suporte foram pesados, colocados em um reator de quartzo e secos a 150 °C por 30 minutos sob fluxo de hélio de 30 mL/min dentro de uma estufa aquecida. As amostras foram resfriadas até a temperatura de 70 °C, na qual foi realizada adsorção de amônia por 30 minutos, utilizando 30 mL/min de uma mistura de 4% NH₃/He.

Após a adsorção da amônia, foi realizada uma purga com fluxo de hélio (30 mL/min) por 1h para remover a amônia fisiossorvida na superfície. Em seguida, a dessorção de amônia quimisorvida foi realizada por aquecimento até 800 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹. Um espectrômetro de massa QMG-220 monitorou o sinal de amônia ($m/z = 15$) de Pfe

2.17.4.5 Magnetometria de amostra vibratória (VSM)

As propriedades de magnetização da ferrita de níquel foram medidas por VSM a 300 K. O equipamento utilizado foi um magnetômetro de amostra vibratória modelo VersaLab da Quantum Design.

As amostras foram pesadas, envoltas em teflon e colocadas em um bastão longo, que foi inserido no equipamento no centro das bobinas. As medições foram realizadas no modo de campo persistente, no qual o campo aplicado é mantido constante em cada etapa de coleta de dados. A faixa de campo magnético aplicada variou de -20000 a 20000 Oe, com passo de 20Oe/s na região de -2000 a 2000 Oe, e passo de 5Oe/s na região de campos magnéticos maiores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das matérias-primas

Vários subprodutos da indústria agrícola e de alimentos vêm sendo investigados como matéria-prima para produção de lipase por cultivo em estado sólido. Dentre eles, neste trabalho, destacam-se o farelo de trigo, como principal fonte de carbono e suporte, e a borra de café, como indutor na síntese de lipase. Os resultados da caracterização do farelo de trigo e das três borras de café que foram avaliados no CES para produção de lipases estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 - Caracterização físico-química da matéria-prima usadas na CES

Matéria-prima	Cinzas (%)	Umidade (%)	Lipídios (%)	Proteína (%)	Carboidrato (%)
Farelo de Trigo	5,1±0,0	9,49±0,1	4,3±0,0	7,7±1,4	73,4±0,4
Borra de café A*	1,2±0,6	4,8±0,5	17,3±1,4	12,1±1,2	64,7±0,9
Borra de café B*	1,5±0,0	2,9±0,1	16,3±1,3	14,1±1,1	65,3±0,4
Borra de café C**	1,0±0,0	2,6±0,1	15,9±1,3	12,93±0,1	67,5±0,4

*A e B – borras de café com grãos 100% arábica e **C- borra de café tradicional, constituído de cafés arábica, robusta/conilon ou uma mistura deles.

Fonte: O autor, 2024

Dentre as matérias-primas avaliadas, o farelo se destaca por conter um maior teor de carboidratos (73,4%), um importante componente na síntese da lipase, pois o carboidrato é uma das fontes de energia, assim como as proteínas (7,7%) para o crescimento do microrganismo. Em relação ao teor de lipídios, o farelo de trigo apresentou o teor de 4,3%, valor aproximado ao

encontrado na literatura, que variou de 5,2 a 1% (Azis; Araújo; 2007; Rui Wesendonck *et al.*, 2013; Silveira; Furlong, 2007).

Um dos indutores utilizados para síntese de lipases são os lipídios. Segundo Cortez; Castro; Andrade (2017), o mecanismo de síntese das lipases varia de acordo com o fungo produtor. As lipases podem ser produzidas de forma constitutiva e não depender de uma fonte lipídica, mas a presença dessa fonte pode aumentar a atividade lipolítica. A maioria das lipases normalmente é produzida em meios de cultivos que possuem uma fonte lipídica, ou seja, por indução. Neste trabalho, foi investigado o uso de borra de café como indutor da síntese de lipases. Em relação à composição das borras de café estudadas (A, B e C), os valores do teor de cinzas, lipídios, carboidratos e proteínas foram semelhantes para os três tipos de borras de café. O teor de lipídios encontrado ficou entre 15,9 a 17,3%, bem superior ao do farelo de trigo. Al-Hamamre *et al.*, (2012) investigaram a extração de lipídios da borra de café pelo método de extração Soxhlet utilizando diferentes solventes e obtiveram teores entre 11 e 15% de lipídios, valores estes similares ao obtido nesse trabalho. Durán *et al.*, (2017) estudaram o café e o aproveitamento dos seus subprodutos com o objetivo de acrescentar valor agregado aos subprodutos do café e encontraram para a borra de café valores de proteína entre 11,2 e 13,6% e de lipídios de 9 a 24%. Estes valores estão de acordo com os apresentados na Tabela 7.

3.2 Estudo da produção de lipase por CES

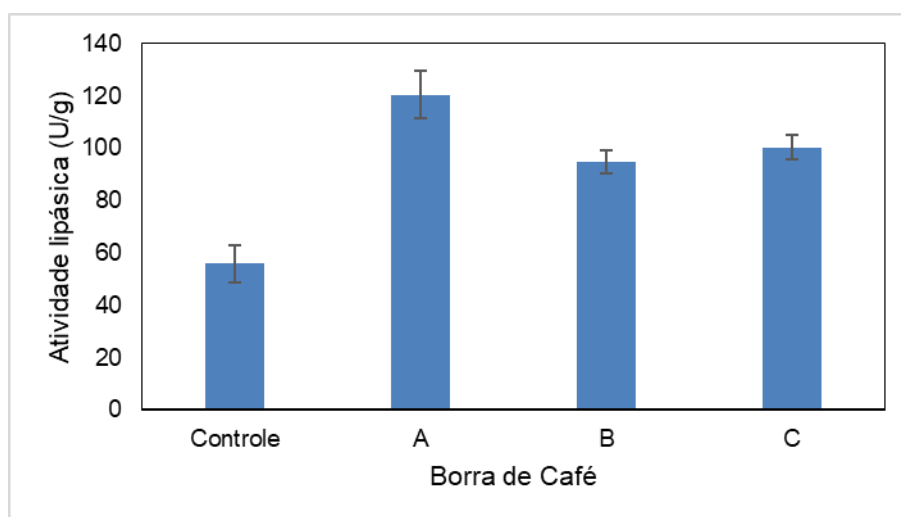
3.2.1 Avaliação de diferentes tipos de borra de café para produção de lipase

Com o intuito de avaliar o potencial de diferentes tipos de borra de café na indução da produção da lipase, foram realizadas CES utilizando três diferentes tipos de borras de café. As borras de café do tipo A e B são provenientes de grãos de café 100% arábica; enquanto a borra do tipo C é proveniente de café tradicional, ou seja, constituída de cafés arábica e

robusta/conilon ou uma mistura de ambos. O cultivo foi realizado com 3,5% m/m de borra de café e 96,5% m/m de farelo de trigo, com 55% de umidade inicial. foram as melhores condições obtidas por Veloso *et al.*, (2019). O CES na ausência de indutor também foi realizado (ensaio controle).

Verificou-se que os três tipos de borras de café utilizados induziram a produção da lipase quando comparada com o CES na ausência de indutor, como pode ser observado na Figura 15. Esses resultados mostram o potencial que a borra de café apresenta como indutor na síntese da lipase.

Figura 15- Efeito de diferentes tipos de borra de café na produção de lipase.



Controle: sem presença do indutor (borra de café), 100% farelo de trigo; os tipos A e B são borras de café com grãos 100% arábica e o tipo C é a borra de café tradicional, constituída de cafés arábica, robusta/conilon ou blindados. Condições: a CES foi realizada com 96,48 % de farelo de trigo e 3,52% de borra, sendo conduzida em frasco *erlenmeyer* de 250 mL a 32 °C por 40 horas. Fonte: O autor, 2024

A maior atividade lipásica (120,5 U/g) foi encontrada na CES empregando a borra de café A, que apresentou um aumento de 115% em relação ao controle (56 U/g) - CES sem adição de indutor. A borra apresenta 4 vezes mais lipídios que o farelo de trigo (Tabela 7), conforme discutido anteriormente.

Na literatura existem poucos relatos sobre o uso da borra de café para produção de lipase. Dantas; Lins; Aquino (2010) estudaram o potencial de

vários subprodutos agroindustriais, dentre eles a borra de café, na produção de lipase por CES por *A. niger* e obtiveram atividade enzimática máxima de 25 U/g quando utilizaram torta de babaçu e 20 U/g utilizando a borra de café, ou seja, 6 vezes inferior ao obtido neste trabalho.

Outros subprodutos oleosos são encontrados na literatura como indutor da síntese de lipase. Oliveira *et al.* (2017) utilizaram diferentes tortas de óleo (Andiroba, cupuaçu, macaúba, canola, soja, palmiste, farelo de soja e de café verde) na produção de lipase de *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 por CES e obtiveram maior produção da lipase com o uso de torta de palmiste, produzindo 127 ± 17 U/g de lipase (por massa de substrato seco). Putri *et al.* (2020) avaliaram a produção de lipase de *Aspergillus niger* por CES utilizando farelo de arroz e torta de semente de *Jathropa* e como indutores foram testados azeite, óleo de gergelim e óleo de *Jatropha*. Os resultados da otimização do indutor mostraram que 1% de azeite foi a melhor condição, produzindo atividade lipásica de 176 U/mL de enzima. Prabaningtyas *et al.* (2018) produziram lipase de *Aspergillus niger* por CES utilizando como subprodutos torta de palmiste, farelo de soja e caroço de coco e testaram proporções diferentes de azeite como indutor (2, 4 e 8%). Os autores obtiveram melhor resultado quando utilizaram o farelo de soja com 4% do indutor, apresentando atividade lipásica de 163,33 U/g.

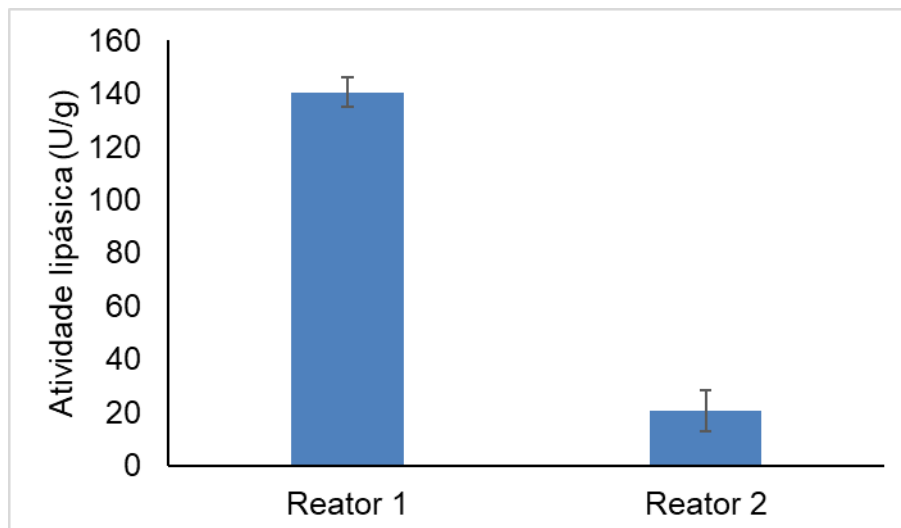
Desta forma, a borra de café utilizada como indutor neste trabalho demonstrou potencial na síntese da lipase no teor estudado (3,5%), similar ao reportado por outros autores, apresentando maiores valores de atividade lipásica em comparação com o ensaio controle (na ausência de indutor).

3.2.2 Avaliação do reator de bancada usado na CES

A avaliação do efeito do reator usado no CES na atividade lipolítica, foi realizada através de ensaios com dois tipos diferentes: frasco *erlenmeyer* – reator 1 (diâmetro de 8,5 cm e área da superfície de 56,7 cm²) e placa de petri – reator 2 (diâmetro de 9,9 cm e área da superfície de 77 cm²), com a finalidade de avaliar a importância da manutenção do teor de umidade no CES,

sendo avaliado o teor de umidade final após a cultivo. Os resultados desse ensaio encontram-se na Figura 16.

Figura 16- Efeito do tipo de reator usado na produção da lipase por CES



Reator 1- frasco *erlenmeyer* e Reator 2 – placa de petri. Condições da CES: 20 g de meio de cultivo (3,5% de borra de café, 96,5% de farelo de trigo, 0,6% de nitrogênio e 55% de umidade inicial) à temperatura de 32 °C por 40 horas.

Fonte: O autor, 2024

Pode-se observar na Figura 16 que a maior atividade lipásica (140,6 U/g) foi obtida no CES conduzida no reator 1 (frasco *erlenmeyer*). O valor de atividade obtido nesse tipo de frasco (140,6 U/g) foi 7,3 vezes maior do que o observado no reator 2 (placa de petri) (20,6 U/g). A diferença da produção de lipase observada nos dois CES, conduzidos com a mesma quantidade de meio fermentativo e inóculo (20 g e 10^{-7} conídios/mL de inóculo) provavelmente é decorrente do teor de umidade do meio durante a cultivo. O teor de umidade final do produto enzimático sólido (PES), após 40 h de CES, no reator 1 (frasco *erlenmeyer*) foi de 60,6%, enquanto a umidade do PES no CES conduzida no reator 2 (placa de petri) foi de 14,3%. O frasco *erlenmeyer* é um recipiente cônico com boca estreita, dificultando a perda de umidade. Já a placa de petri tem uma área superficial exposta maior do que no frasco *erlenmeyer*, e, conseqüentemente maior contato com o ar, o que pode ter contribuído para o ressecamento do meio ao longo do processo fermentativo, diminuindo assim o teor de umidade. Baixos teores de umidade reduzem a solubilidade dos nutrientes presentes no meio de cultivo, dificultando dessa forma o crescimento

microbiano (Oliveira; Souza, *et al.*, 2017). O reator utilizado para o CES deve proporcionar uma boa troca de oxigênio e a manutenção da umidade ao longo do cultivo, uma vez que haverá perda durante o processo ocasionada pelo calor gerado pelo metabolismo dos microrganismos. Industrialmente e em escala de laboratório, o CES é conduzida em câmaras com temperatura controlada e com circulação de ar úmido. Neste estudo a câmara não possui ar úmido, sendo necessário a utilização de uma bandeja com água dentro da incubadora a fim de propiciar a manutenção da circulação do ar umedecido durante o processo de cultivo.

O teor de umidade do PES é um parâmetro muito estudado por diversos trabalhos na literatura, devido a sua importância no crescimento microbiano e no rendimento de bioprodutos produzidos por CES. Produção de lipase por *Aspergillus niger* em diferentes subprodutos agroindustriais foi estudada por Costa *et al.* (2017). Os autores avaliaram a composição e as condições do meio de cultura para produção de lipase de *A. niger*, sendo avaliado o teor de umidade no início e no final do cultivo. Os subprodutos estudados foram farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de soja e casca de arroz, suplementados com 1% de uma das seguintes fontes de carbono: glicose, glicerol ou óleo de soja. Os ensaios foram realizados em frascos cilíndricos de 500 mL com tampa perfurada (2,54 cm de diâmetro), cobertos com papel filtro, contendo 40 g do meio de cultivo (85% farelo e 15% casca de arroz). Casca de arroz foi adicionada para ajudar na porosidade e transferência de oxigênio. O cultivo ocorreu por 7 dias, na temperatura de 28 °C e umidade inicial de 50%, sendo avaliado o teor de umidade no início e ao final do processo. A máxima atividade lipásica obtida foi de 19,84 U/g com a mistura de farelo de arroz e glicerol. O teor de umidade do meio de cultivo permaneceu estável até o final do cultivo em torno de 50±0,02%. Com base nos resultados obtidos pelos autores, pode-se notar que o frasco do tipo *erlenmeyer* foi capaz de manter a umidade durante o processo do cultivo, resultado similar ao encontrado neste trabalho.

Martins; Kalil; Costa (2008) estudaram a produção de lipase por cultivo em estado sólido utilizando os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp. e testaram o meio de fermentação utilizando casca e farelo de arroz como substratos e óleo de soja e óleo diesel como indutor, avaliando o teor de umidade desse meio ao final da fermentação.

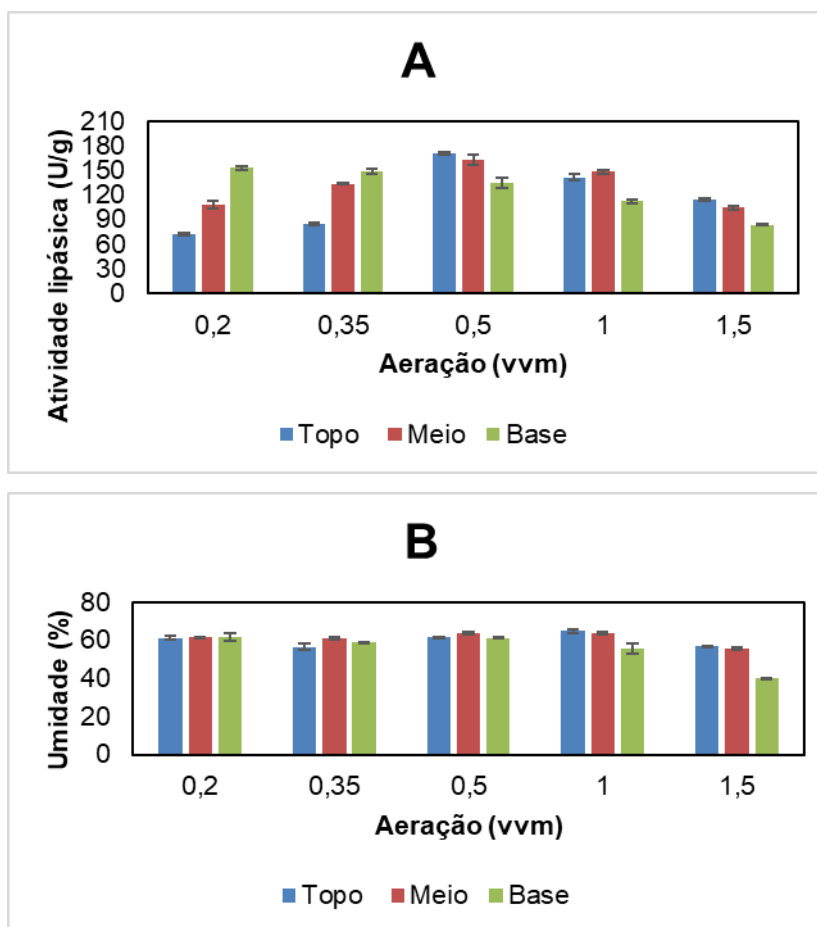
Ensaio foram realizados com um meio contendo a mistura de casca e farelo de arroz e outro apenas com a casca de arroz. O cultivo foi conduzido em *erlenmeyer* de 1000 mL e em biorreatores de coluna (50 mm de diâmetro e 250 mm de altura) por 120 h, com umidade inicial de 50% e a 30 °C. Os autores observaram que no CES conduzido com o meio contendo apenas a casca de arroz, a umidade ao longo da fermentação diminuiu em torno de 20% para o ensaio em reator de coluna. Porém na fermentação em frasco *erlenmeyer*, não houve alteração no valor da umidade. O reator de coluna com aeração forçada para esse meio de cultivo não foi adequado, já que a diminuição da umidade prejudicou a produção da lipase.

3.2.3 Produção de lipase em biorreator de leito fixo e avaliação da taxa de aeração na produção da lipase de *A. niger* 11T53A14

A utilização de biorreatores de leito fixo na produção de lipase por CES pode proporcionar um maior controle de parâmetros operacionais (temperatura e teor de umidade do leito) e o aumento de produtividade em relação ao biorreator de bandeja.

Para o estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo (38,0 x 4,5 cm), o biorreator foi dividido em zonas de coleta do meio fermentado: topo (31,5 cm de altura), meio (21 cm de altura) e base (10,5 cm de altura). Tal procedimento teve por objetivo permitir uma melhor análise da atividade enzimática em todo o biorreator. Inicialmente, foi investigado o efeito da aeração (0,2; 0,35; 0,5; 1,0 e 1,5 vvm), onde o ar injetado foi borbulhado em água destilada e injetado na coluna. Os CES foram conduzidos em meio de cultivo composto de farelo de trigo (96,5% m/m), borra de café A (3,5% m/m), 0,6 % m/m de nitrogênio do sulfato de amônio e 55% de umidade. Ao término do CES, o material (produto enzimático sólido - PES) contido no reator foi coletado separadamente das três amostras de acordo com a altura do leito do biorreator de leito fixo. O teor de umidade (%) e a atividade lipásica (U/g) do produto enzimático sólido (PES) foram determinados para cada amostra. Os resultados obtidos neste experimento podem ser observados na Figura 17.

Figura 17- Efeito da variação da vazão da aeração em biorreator de leito fixo na atividade lipásica (U/g) (A) e na umidade do PES (B)



Fonte: O autor, 2024

Na Figura 17a observa-se que a atividade lipásica (U/g), e, portanto, a produção de lipase no CES, variou de acordo com a região (topo, meio e base) amostrada no biorreator com o aumento da aeração. As amostras retiradas da base ($h=10,5$ cm) em menores aerações, 0,2 e 0,35 vvm, mostraram maiores atividades lipásicas, $153\pm 2,6$ e $148\pm 3,0$ U/g, respectivamente, do que das camadas de meio e topo. Já para aerações iguais ou maiores que 0,5 vvm, observou-se maior atividade lipásica nas camadas superiores (meio e topo) e menor atividade na base do biorreator. De acordo com os resultados obtidos (Figura 17), a vazão da aeração que obteve melhor desempenho no processo de produção de lipase em biorreator de leito fixo em estudo foi 0,5 vvm com

atividade lipásica de $170,5 \pm 1,7$ U/g no topo, $163,0 \pm 6,0$ U/g no meio e $135 \pm 5,9$ na base.

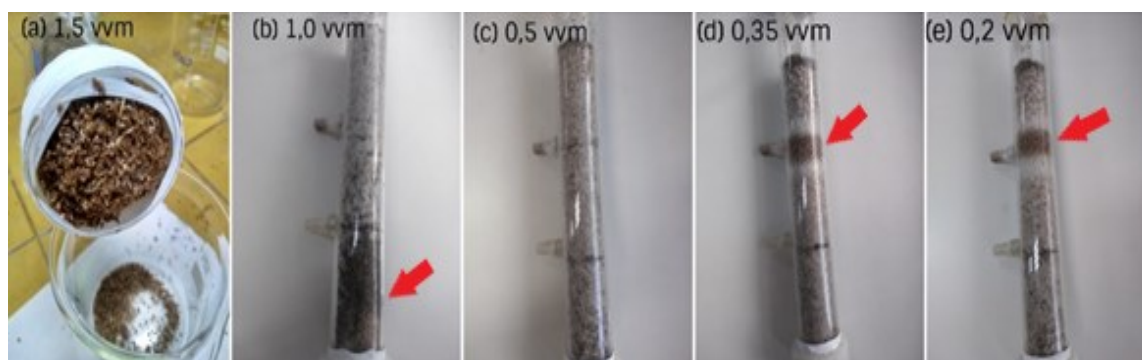
Em relação ao teor de umidade (%) do PES retirado das três regiões do biorreator (topo, meio e base), conforme observado na Figura 18b, não houve diferença para as aerações 0,2; 0,35 e 0,5 vvm, e o valor de umidade ficou em torno de 61%. Entretanto, com maiores aerações, 1,0 e 1,5 vvm, nota-se uma redução do teor de umidade (em torno de 40 a 50%) para as amostras retiradas da base do reator. Embora o ar injetado no biorreator de leito fixo seja umedecido, este procedimento parece não ter sido suficiente para evitar o ressecamento no meio de cultivo na entrada do biorreator.

Este ressecamento do meio fermentativo na base do biorreator (1 e 1,5 vvm) foi observado visualmente, como mostrado na Figura 18 (pelas setas), que conseqüentemente, acarretou a diminuição do teor de umidade e da produção da enzima. Segundo Ávila *et al.* (2019), o teor de umidade no meio de fermentação pode influenciar no processo de produção da lipase, assim como na atividade/estabilidade da enzima.

Na Figura 18a (1,5 vvm) percebe-se o meio seco e esfarelado ao ser retirado da região da base do biorreator. Na Figura 18b (1,0 vvm) nota-se um escurecimento na base da coluna causado pelo ressecamento do meio de cultivo, à medida que aumenta a altura do leito (meio e topo) percebe-se o meio todo branco, característica do meio fermentado e da produção da enzima. Esse ressecamento da base do biorreator de leito fixo não é observado nas demais aerações 0,5 vvm (c), 0,35 vvm (d) e 0,2 vvm (e). Observa-se que nas aerações de 0,35 vvm e 0,2 vvm na altura do topo (como indicado na Figura 18d e 18e) nota-se uma parte do meio caracterizado pela cor marrom claro, indicando que não ocorreu crescimento do fungo. Esse não crescimento do fungo, também pode estar associado ao possível aumento de temperatura dentro do leito ao longo do cultivo (dados não avaliados). A geração de calor no interior do leito é em função do metabolismo dos microrganismos e o aumento da temperatura ocorre devido à baixa condutividade térmica dos meios sólidos. Além disso, o crescimento microbiano, principalmente de fungos filamentosos, causa agregação e redução da porosidade do leito, diminuindo a dissipação do calor. O aumento da temperatura dentro do leito ao longo da fermentação é um dos principais problemas do CES. O aumento da vazão de aeração é uma

estratégia bastante utilizada para melhorar a transferência de massa e de calor, removendo o calor simultaneamente por condução e evaporação. Que foi o observado neste trabalho quando utilizada um aumento de vazão para iguais ou acima de 0,5 vvm. Consequentemente, a falta de oxigênio limitou o crescimento do fungo, o que pode ser comprovado pela menor atividade lipásica determinada nas amostras retiradas da região do topo do biorreator nas CES conduzidas com aerações de 0,2 vvm ($72 \pm 1,1$ U/g) e 0,35 vvm ($85 \pm 1,4$ U/g).

Figura 18- Biorreator de leito fixo após CES variando a taxa de aeração: (a) 1,5 ; (b) 1,0; (c) 0,5; (d) 0,35 e (e) 0,2 vvm.



Fonte: O autor, 2024

Muruci *et al.* (2012) avaliaram a produção de lipase de *Aspergillus niger* por CES utilizando farelo de trigo (resíduo agroindustrial) e diferentes tipos de indutores (borras de milho, de girassol e de canola). Os autores investigaram, através de um planejamento fatorial completo 2^2 , a influência da taxa da aeração (0; 0,5 e 1,0 vvm) e da adição de borra de milho (0; 0,5 e 1,0) em biorreator de leito fixo (21,0cm x 2,2cm) com 17g de meio de cultivo e obtiveram a maior produção de lipase (215,9 U/g) com 1,0 vvm de aeração e 1% de borra de milho. Porém, elevada atividade lipásica (189,2 U/g) também foi observada no ensaio sem adição de borra e com 1 vvm de aeração. Os autores observaram que as maiores atividades lipásica foram obtidas com maiores níveis de aeração. Esse comportamento foi diferente do observado neste trabalho, onde a atividade foi menor com aerações maiores.

A variação da aeração (0,5; 1,0 e 1,5 vvm) e da umidade inicial do meio de cultivo (40, 60 e 80%) (farelo de trigo, 0,1 % de nitrogênio do sulfato de amônio e borra de milho ou azeite como indutor), realizada em reator de leito fixo com 15g de meio de cultivo a 32 °C por 48 horas de cultivo em estado solido, para produção de lipase de *A. niger* por CES foi investigada por Macedo *et al.*, (2009). Os autores utilizaram um planejamento experimental Plackett e Burman e obtiveram a maior atividade lipásica (279,30 U/g) quando o CES foi conduzido empregando taxa de aeração de 0,5 vvm e 80% de umidade. Eles constataram que a umidade foi estatisticamente significativa para o processo, influenciando-o positivamente. No entanto, a aeração influenciou de forma negativa a produção da lipase, indicando que, dentro da faixa de vazão volumétrica (0,5, 1,0. e 1,5 vvm) avaliada, os melhores resultados de atividade foram obtidos nos menores níveis de aeração. Os resultados obtidos pelos autores mostraram assim como este trabalho, que menores aerações favorecem o cultivo, uma vez que em maior aeração (1,5 vvm) foi obtida a menor atividade lipásica (77,6 U/g).

Oliveira *et al.* (2017) avaliaram aerações (0,05; 0,1 e 0,2 L/min) em reator de leito fixo (34 cm de altura x 3 cm de diâmetro) para produção de lipase de *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 por CES utilizando bagaço de azeitona e farelo de trigo como substrato. Os autores obtiveram maior produção da lipase (136 U/g) com menores aerações (0,05 L/min). Com aerações maiores, eles observaram visualmente uma desidratação do substrato no início da coluna, o mesmo comportamento foi observado neste trabalho. Eles também realizaram um ensaio sem aeração e verificaram que não houve crescimento do fungo e, conseqüentemente, não houve produção da lipase devido à falta de oxigênio.

Salgado *et al.* (2015) estudaram a produção de celulases por CES usando *Aspergillus uvarum* MUM 08.01 a partir de subprodutos do processamento de azeite (bagaço de azeitona) e de vinho (bagaço de vinho) em biorreator de leito fixo (26,3 cm x 2,62 cm). As aerações testadas foram 0; 0,2; 0,4 e 0,6 L/min, também foi realizado um ensaio sem aeração. Eles obtiveram a maior atividade da celulase ($38,51 \pm 0,53$ U/g) com 0,2 L/min. Os autores verificaram que a alta taxa de aeração diminuiu a produção de celulases, visto que a maior produção ocorreu com aeração mais baixa e foi

18% superior à atividade obtida no ensaio sem aeração e 15% superior à atividade obtida nos ensaios realizados em frascos *erlenmeyer*.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o uso do biorreator de leito fixo aumentou a produção de lipase de *A. niger* por CES. A condição ideal observada com o estudo da aeração foi de 0,5 vvm, com atividade máxima alcançada na região do topo, meio e na base do biorreator de $170,5 \pm 1,6$, 163 ± 6 e 135 ± 5 U/g, respectivamente, com média equivalente a $156,1 \pm 4,5$ U/g. Este valor de atividade é aproximadamente 1,3 vezes maior do que o resultado obtido no estudo em frasco *erlenmeyer* (120 ± 9 U/g).

3.3 Concentração da lipase do extrato enzimático obtido no CES

A purificação de uma enzima é utilizada para um melhor estudo de suas características bioquímicas e muitas vezes a obtenção de um produto com maior atividade para aplicações nos processos industriais. Quando se deseja realizar um processo simples de purificação de enzima, a etapa de concentração é realizada nos estágios iniciais do processo de recuperação da enzima e, geralmente, esta etapa tem rendimento maior em comparação com as etapas cromatográficas (Tan *et al.*, 2015).

3.3.1 Concentração por precipitação com sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto (EEB), obtido no CES em biorreator de leito fixo (coluna toda, 0,5 vvm de aeração, 3,5% m/m da borra de café A, 96,5% m/m de farelo de trigo, 0,6% m/m de nitrogênio do sulfato de amônio e 55% de umidade inicial), foi submetido à etapa de concentração através da técnica de precipitação com sulfato de amônio, avaliando diferentes condições de saturação de sulfato de amônio (40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação). Os resultados obtidos após a precipitação estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 7- Avaliação da concentração de lipase, presente no EBB obtido por CES, após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação.

	Volume da fração (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade (U)	Atividade lipásica (U/mL)	Atividade específica (U/mg) ¹	Rendimento (%) ²	Grau de purificação ³
EEB	40	44,4	727,6	18,2	16,4	100,0	1
40%	15	1,6	39,8	2,6	24,1	5,5	1,5
50%	15	3,8	140,7	9,4	37,5	19,3	2,3
60%	15	9,9	357,6	21,6	36,1	49,2	2,2
70%	15	17,1	435,0	29,0	25,4	59,8	1,6
80%	15	26,1	456,2	30,4	17,5	62,7	1,1
90%	15	28,0	521,3	34,8	18,6	71,6	1,1

EEB – Extrato enzimático bruto obtido após CES

¹Calculada dividindo-se a atividade total pela proteína total.

²Calculado pela atividade mantida após cada etapa de precipitação, na forma de percentagem da atividade total no extrato bruto. A quantidade total de atividade no extrato inicial é considerada como 100%.

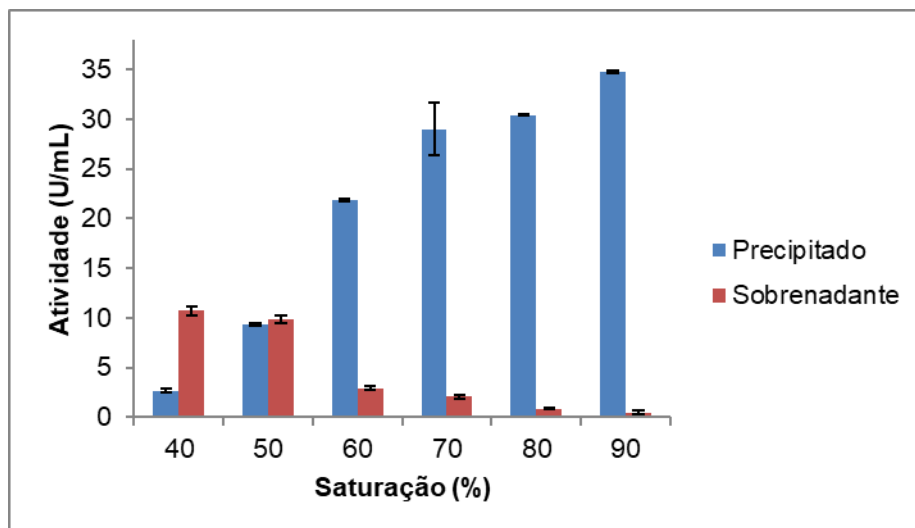
³Calculado pela razão da atividade específica em cada etapa de saturação pela atividade específica do extrato bruto.

Fonte: O autor, 2024

Analisando os resultados de atividade lipásica (U/mL), que é a atividade presente nas amostras dos precipitados com sulfato de amônio (40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação), o maior valor (34,8 U/mL) foi obtido após precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação. Nesta condição também foi observado o maior rendimento (%) no processo de concentração (71,6 %) (Tabela 8 e Figura 19). Com 50% de saturação, observou-se a maior atividade específica (37,5 U/ mg de proteína) e o maior grau de purificação (2,3 vezes).

A Figura 19 ilustra o efeito da precipitação com sulfato de amônio em diferentes saturações estudadas (40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação) do precipitado e do sobrenadante.

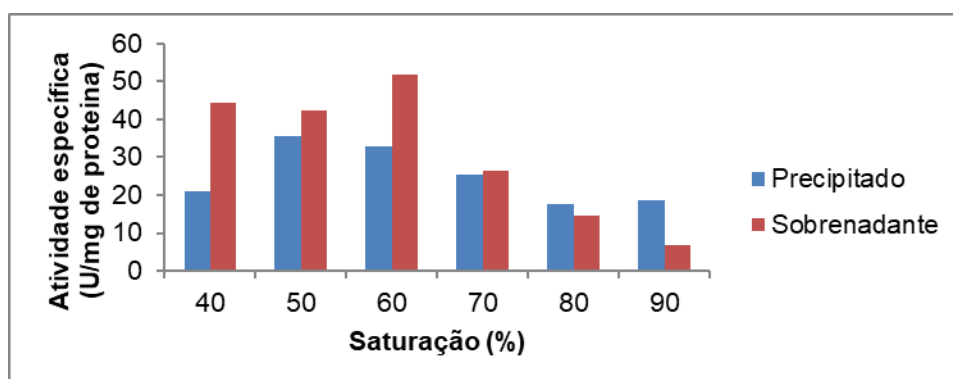
Figura 19- Atividade lipásica (U/mL) no precipitado e no sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90 % de saturação.



Fonte: O autor, 2024

Na Figura 20 estão apresentados os resultados da atividade específica (U/mg de proteína) avaliado após cada etapa de precipitação com sulfato de amônio para o precipitado e o sobrenadante em todas as condições estudadas (40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação).

Figura 20- Atividade específica (U/mg de proteína) do precipitado e do sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio a 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de saturação.



Fonte: O autor, 2024

As Figuras 19 e 20 mostram que a precipitação com sulfato de amônio até 50% de saturação não é adequada para a concentração da lipase, pois a atividade específica do sobrenadante foi maior do que a obtida a partir do precipitado, obtendo um baixo rendimento (19,3%) (Tabela 8). No processo de concentração da enzima deve-se considerar tanto os níveis de purificação quanto o rendimento da concentração da enzima, pois um alto grau de purificação com baixo rendimento resulta numa massa de proteína pequena para ser utilizada nos ensaios de caracterização. Por outro lado, um alto rendimento com baixo grau de purificação deixa muitos contaminantes na fração (proteínas diferentes das de interesse) (Berg *et al*, 2004). Desta forma, para a concentração da lipase, foi escolhida a precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação, pois verificou-se uma purificação de 1,6 e um rendimento de 59,8 %.

Sethi; Nanda; Sahoo, (2016) caracterizaram a lipase extracelular de *Aspergillus terreus* NCFT42 69.10 após concentração da enzima por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia. Os autores realizaram a precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e, em seguida, a cromatografia em coluna de exclusão por tamanho usando SephadexG-100. Eles conseguiram um rendimento de 18,38% e uma purificação de 2,01 vezes com a etapa de precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. Após a etapa cromatográfica, o rendimento foi de 8,48% e a purificação de 2,56 vezes. A massa molecular da lipase, determinada por eletroforese, foi de 46,3 kDa. Em relação a etapa de precipitação com sulfato de amônio, resultados melhores foram obtidos neste trabalho (70% de saturação com 1,6 de purificação e 59,8% de rendimento).

Nakajima-Kambe *et al.*, (2012) purificaram a lipase de *Aspergillus niger* MTCC 2594, usando a técnica de precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação, seguida de uma etapa de cromatografia de interação usando octyl sepharose CL-4B. Os autores obtiveram para a etapa de precipitação com sulfato de amônio um rendimento de 32,7% e uma purificação de 13,9 vezes. Já a etapa cromatográfica permitiu uma purificação de 53,8 vezes com rendimento de 13,3%. A massa molecular da lipase, determinada por SDS-Page, foi de aproximadamente 35-37 kDa.

A lipase de *Aspergillus niger* F044 foi purificada e caracterizada por

(Shu; Yang; Yan, 2007). Os autores utilizaram várias etapas para purificação da enzima: precipitação com sulfato de amônio (60% de saturação), seguido da cromatografia de troca aniônica DEAE-Sepharose e cromatografia de filtração em gel Sephadex G-75. Para a etapa de precipitação, um fator de purificação de 1,37 vezes e rendimento de 95,01% foram alcançados. Já as etapas cromatográficas conseguiram uma purificação de 73,71 vezes com rendimento final de 33,39% e a proteína com massa molecular de aproximadamente 35-40 kDa determinada por SDS_PAGE.

A produção e caracterização da lipase de *A. niger* produzida por CES foi avaliada por Muruci, (2012), onde foi avaliada a concentração enzimática por precipitação com sulfato de amônio do extrato bruto obtido em quatro condições de saturação (40, 60, 80 e 90%). A melhor condição adotada pelo autor foi de 90% de saturação com rendimento de 38% e fator de purificação de 1,3. Os resultados da técnica de precipitação com sulfato de amônio obtidos neste trabalho para melhor condição escolhida (70% de saturação) com grau de purificação de 1,6 e rendimento de 59,8% foram melhores do que os obtidos por Muruci, (2012), pois em uma saturação de sal mais baixa foram obtidos maiores valores de purificação e rendimento.

3.3.2 Concentração por ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada a partir do extrato enzimático bruto obtido na CES usando o sistema de filtração molecular com uso da membrana Amicon®, onde foram testados os tamanhos de 10, 30, 50 e 100 kDa. A característica dessas membranas é a retenção de um peso molecular acima de um peso molecular específico. Os resultados obtidos após o processo de ultrafiltração estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 8 - Avaliação do processo de concentração da lipase, presente no EEB concentrado obtido por CES, após ultrafiltração com membrana Amicon® Ultra.

	Atividade inicial (U/mL)	Atividade do concentrado (U/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade do concentrado (U)	Atividade específica do concentrado (U/mg) ¹
10 KDa	16	2,5	24,0	37,5	1,56
30 KDa	16	45,3	75,0	679,5	9,06
50 KDa	16	47,6	51,0	714,0	14,00
100 KDa	16	56,8	75,0	852,0	11,36

¹Calculada dividindo-se a atividade total pela proteína total.

Fonte: O autor, 2024

Através dos resultados obtidos (Tabela 9), observou-se que o maior valor de atividade específica (14,00 U/mg) foi obtido com a utilização da membrana de 50 KDa. Nessa condição também foi obtido um valor de atividade lipásica do concentrado (47,6 U/mL), sendo 3 vezes maior do que a obtida com extrato enzimático bruto inicial (16,0 U/mL).

Esses resultados vão de acordo com a literatura, onde é reportado que os valores médios de peso molecular esperados para lipase são de 30-50kDa (Sharm; Chisti; Banerjee, 2001a). O fato da membrana de 50 kDa ter desempenho melhor do que a de 30 kDa pode ser explicado pelo fato da lipase estudada possuir um peso molecular mais próximo de 30 kDa, pois se a solução possuir um peso molecular próximo do peso molecular da membrana, as proteínas serão parcialmente retidas.

Levando em consideração as duas técnicas utilizadas neste trabalho para concentração do extrato enzimático bruto obtido na CES, percebeu-se que aquela que obteve melhor resultado de concentração foi utilizando a ultrafiltração com Amicon® Ultra (membrana com tamanho de corte de 50 kDa). Sendo assim, a fim de concentrar a enzima para imobilização, decidiu-se utilizar esta técnica.

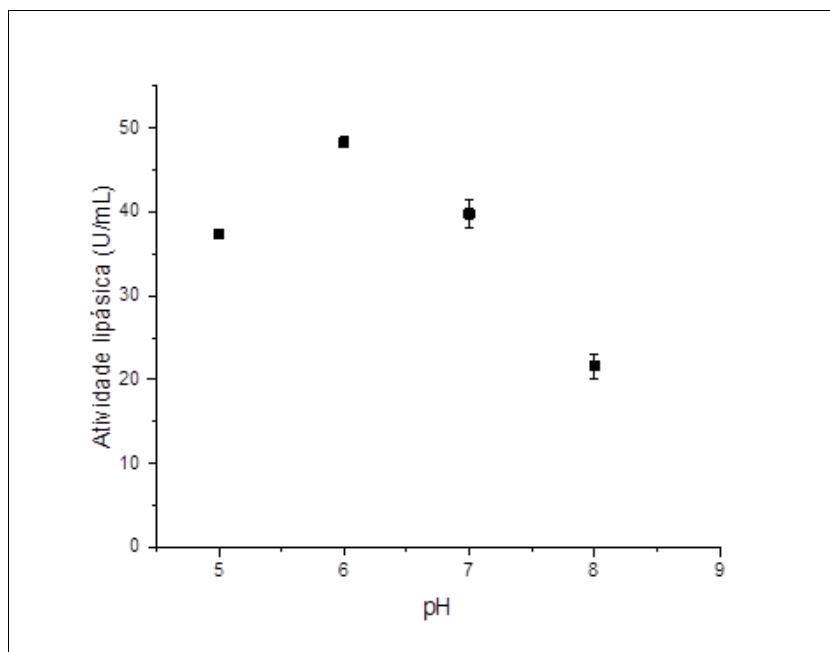
3.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

O conhecimento e a análise das propriedades bioquímicas da lipase são de grande importância, pois permite avaliar as particularidades da atuação enzimática e a melhor condição para aplicá-la na indústria. O estudo do pH e da temperatura ótima de atuação da lipase é uma das propriedades fundamentais a serem estudadas para aplicação em bioprocessos.

Manter o pH ótimo de trabalho da enzima afeta na sua aplicação, pois as reações catalíticas geralmente envolvem grupos que são ionizáveis tanto na enzima como no substrato, assim como a transferência de prótons, por isso o primeiro e mais simples passo é a determinação do efeito do pH na atividade enzimática.

Os valores de pH avaliados, na reação de hidrólise de óleo de oliva, foram 5, 6, 7 e 8. Os resultados obtidos nesses experimentos estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Efeito do pH na atividade da lipase de *A. niger* 11T53A14



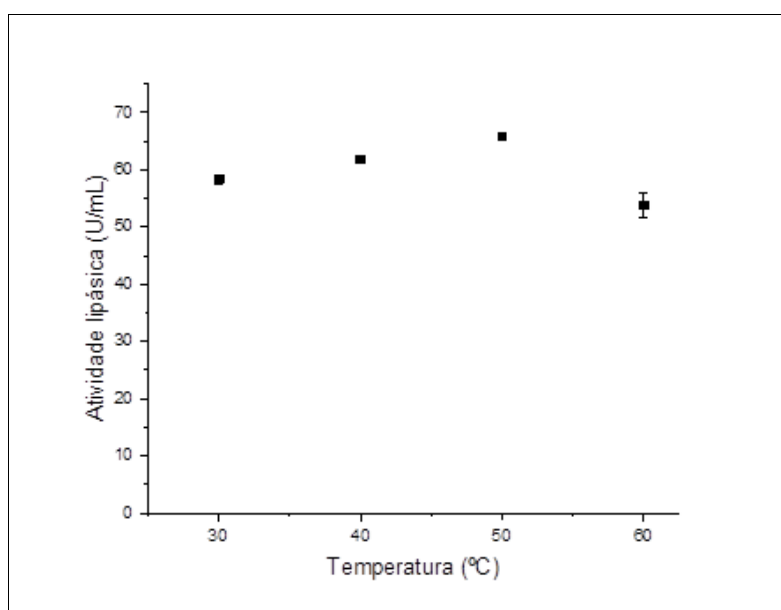
Fonte: O autor, 2024

De acordo com a Figura 21, verifica-se que a lipase de *A. niger* 11T53A14 no EBBC (extrato enzimático bruto) apresentou maior atividade no pH 6,0 ($48,3 \pm 0,6$) e a menor atividade no pH 8,0 ($21,6 \pm 1,4$ U/mL). Nos pHs 5 e 7, os valores de atividade foram próximos ao valor máximo observado ($37,4 \pm 0,0$ e $39,8 \pm 1,6$ U/mL, respectivamente). A maioria das enzimas exibe uma curva de pH em forma de um sino, e esse perfil também foi observado para a lipase de *A. niger* 11T53A14, mostrando que essa enzima pode ser usada, sem perda considerável da atividade, na faixa de pH entre 5-7 (Punekar, 2018)

A temperatura é outro fator importante a ser avaliado na atividade lipásica, pois ela influencia na catálise enzimática. As enzimas podem ser desnaturadas pela temperatura, que tem efeitos complexos nas interações fracas da proteína (principalmente sobre as ligações de hidrogênio). Quando a temperatura de uma reação é aumentada, a conformação proteica da enzima em geral permanece no seu estado conformacional nativo até que, a partir de uma faixa de temperatura, ocorre a perda da sua estrutura e, conseqüentemente, da sua função (Nelson; Cox, 2014).

A reação de hidrólise do óleo de oliva foi conduzida nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. A atividade enzimática determinada nessas reações está apresentada na Figura 22.

Figura 22- Efeito da temperatura na atividade da lipase de *A. niger* 11T53A14



Fonte: O autor, 2024

Pela Figura 22, pode-se observar que a enzima exibiu o maior valor de atividade ($65,8 \pm 0,6$ U/mL) na temperatura de 50 °C e uma diminuição da atividade lipásica ($53,8 \pm 2$ U/mL) na temperatura de 60 °C, mostrando o efeito da desnaturação térmica.

Zavarise; Pinotti (2020) realizaram uma revisão sobre caracterização bioquímica de lipases de fungos filamentosos e verificaram que o pH ótimo dessas enzimas se encontra na região próximo à neutralidade em pH 6,5 a 7,5. Já em relação à temperatura, observaram uma variação da temperatura ótima na faixa de 35 - 60 °C, sendo que a maioria das lipases obtidas de *Aspergillus niger* possui temperatura ótima de 37 °C a 55 °C. Esses dados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. A lipase de *A. niger* 11T53A14 apresentou atividade lipásica máxima na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 30 e 60 °C (Figuras 21 e 22). Portanto, apresentou um perfil de acordo com o esperado para enzimas mesofílicas.

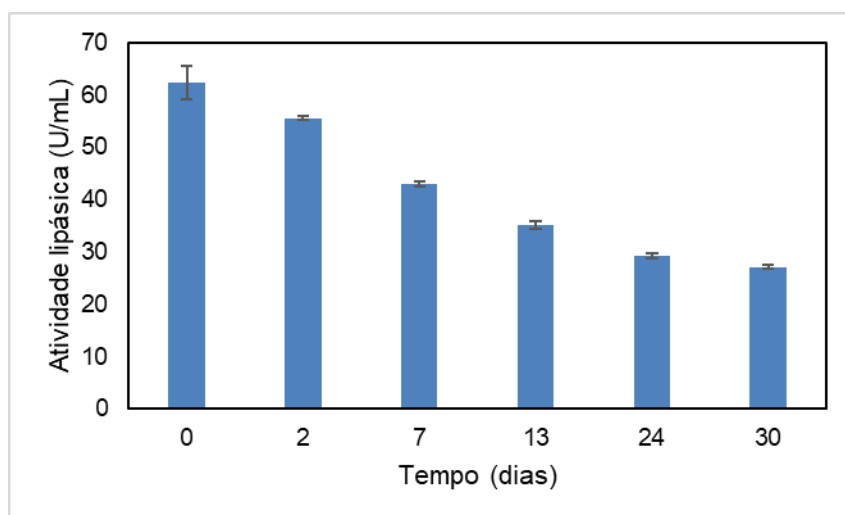
Sethi *et al.* (2016) fizeram a caracterização da lipase de *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 produzida por CES. Os autores verificaram que a lipase purificada foi mais ativa em pH 6,0 e temperatura de 50 °C. Santos *et al.*, (2017) avaliaram o pH e a temperatura ótimos para a lipase de *Aspergillus niger* obtida por CES, encontrando os valores de pH 5,0 e temperatura de 55 °C. Liu *et al.*, (2015) investigaram a purificação e a caracterização da lipase de *Aspergillus niger* AN0512, após a concentração e purificação da enzima por precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de exclusão por tamanho. A lipase apresentou pH ótimo de 5,0 e temperatura de 50 °C. Andrade *et al.* (2016) estudaram a estabilidade da lipase de *Aspergillus niger* quanto ao pH e temperatura e encontraram pH e temperatura ótimos de 5,5 e 50 °C, respectivamente. A lipase foi estável entre pH 5,5-6,5 e nas temperaturas de 40-50 °C.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e a comparação com os resultados obtidos por outros autores é possível corroborar informações de que as lipases atuam em diferentes faixas de temperatura e pH ótimos, mesmo quando são da mesma classe de fungos filamentosos.

3.5 Estabilidade a estocagem sob refrigeração

A fim de avaliar a capacidade da lipase produzida manter sua atividade ao longo do tempo, foi realizado o estudo da estabilidade à estocagem na geladeira (6 °C), durante 30 dias, cujos resultados estão apresentados na Figura 23. Essa análise é importante para o uso da enzima em escala industrial, bem como para realização dos experimentos no laboratório.

Figura 23- Estabilidade da lipase de *A. niger* 11T53A14 à estocagem em geladeira (6 °C).



Fonte: O autor, 2024

Observa-se na Figura 23, que a enzima perdeu 30% de atividade após ser mantida a 6 °C por 7 dias. Após 30 dias, a perda de atividade foi de 56,5%.

Muruci (2012) estudaram a estabilidade da lipase produzida por *Aspergillus niger* à estocagem a 5 °C (geladeira) e ao congelamento (-18 °C). A enzima perdeu cerca de 24% da atividade em 15 dias de armazenamento a 5 °C e, a partir de 30 dias, a perda foi mais acentuada. Já no armazenamento a -18 °C, a lipase manteve 100% da atividade inicial após 150 dias. Lazari (2010) observou que a lipase de *S. thermophilum*, mantida em geladeira, perdeu atividade rapidamente, restando apenas 50% do valor inicial em 7 dias.

As propriedades de estabilidade das enzimas podem sofrer variações significativas dependendo da sua origem, tempo de incubação, pH e

temperatura, componentes presentes no extrato enzimático e do método utilizado, sendo desta forma difícil a comparação (Carvalho *et al.*, 2005; Lopez-Hernandez; Garcia; Hill, 2006). Existe opções de armazenamento que podem ser usadas com mais eficácia para manutenção da atividade, como liofilização ou até mesmo o armazenamento a temperaturas mais baixas (-18 °C).

3.6 Imobilização da lipase

3.6.1 Imobilização por adsorção física utilizando carvão ativado

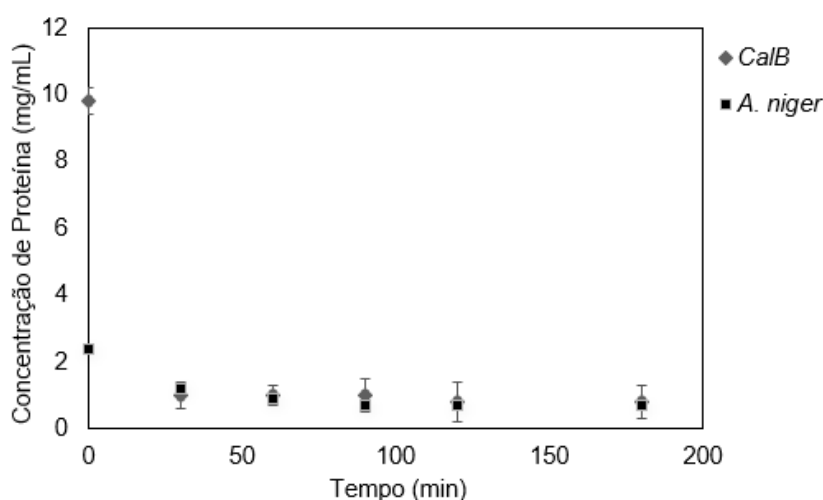
A imobilização utilizando como suporte carvão ativado foi realizada pelo método de adsorção física. Foram utilizados o extrato enzimático de *A. niger* 11T53A14 concentrado por ultrafiltração (50 kDa) e a lipase comercial líquida CalB (lipase B de *Candida antarctica*).

3.6.1.1 Cinética de adsorção da lipase no carvão ativado obtido da palha de cana-de-açúcar

Inicialmente, foi investigada a cinética de adsorção das lipases do extrato enzimático bruto de *A. niger* e da lipase comercial CalB no carvão ativado a fim de determinar o tempo necessário de imobilização. A adsorção é um fenômeno de superfície e, no equilíbrio, o processo deve estar em um estado dinâmico, em que a taxa de processo direto é igual à taxa do processo reverso. Para determinar o tempo de contato necessário para atingir o equilíbrio de adsorção da imobilização da lipase no carvão ativado, os experimentos foram conduzidos por 180 min a 25°C. A quantidade de proteína adsorvida versus tempo de imobilização é mostrada na Figura 24. Os resultados para lipase de *A. niger* mostram que com o aumento do tempo de

imobilização, diminuiu a quantidade de proteína livre, que permaneceu praticamente constante após 90 min. O resultado da imobilização de CalB no carvão ativado foi semelhante, não sendo observadas alterações marcantes para tempos de imobilização superiores a 120 min. Portanto, o tempo de contato de 120 min foi selecionado para o estudo por garantir o equilíbrio de adsorção nas condições do ensaio.

Figura 24 - Cinética de adsorção da lipase de *A. niger* e CalB no carvão ativado da palha de cana-de-açúcar.



Condição de imobilização: 0,15 g de carvão ativado em 15 mL de extrato enzimático (CalB ou lipase de *A. niger*) na concentração inicial de proteína 0,1 mg/mL, preparada em solução de tampão fosfato (25 mM a pH = 7), T = 25°C.

Fonte: O autor, 2024

Lipases como a lipase de pâncreas suíno (Brito *et al.*, 2020, Brito *et al.* 2017; (Gonçalves *et al.*, 2021), de *Candida rugosa*(Lee *et al.*, 2019), de *Rhizopus oryza*, de *Burkholderia cepacian* (Almeida *et al.*, 2017) , de *Candida antarctica* B (Naranjo *et al.*, 2010) e de *Pseudomonas gessardii* (Ramani *et al.*, 2012) foram imobilizadas em carvão ativado pelo método de adsorção. De acordo com os resultados desses trabalhos, pode-se constatar que o carvão ativado apresentou alta capacidade de imobilização e o derivado enzimático obtido teve boa atividade. Desta forma, o carvão ativado é um material que pode ser considerado uma alternativa promissora como suporte para imobilização de lipase.

Brito *et al.*, (2020) observaram que a adsorção enzimática é mais rápida nos estágios iniciais do processo e mais lenta próximo ao equilíbrio devido a muitos sítios de adsorção disponíveis na superfície do carvão no início do processo, e que diminui com o tempo. Além disso, há um aumento das forças repulsivas entre as moléculas de enzimas adsorvidas, o que dificulta o processo de adsorção nos sítios remanescentes. O carvão ativado possui grupos carboxílicos na sua superfície, o que pode favorecer a ligação dos grupos amino da enzima com o suporte (Rodrigues *et al.*, 2019).

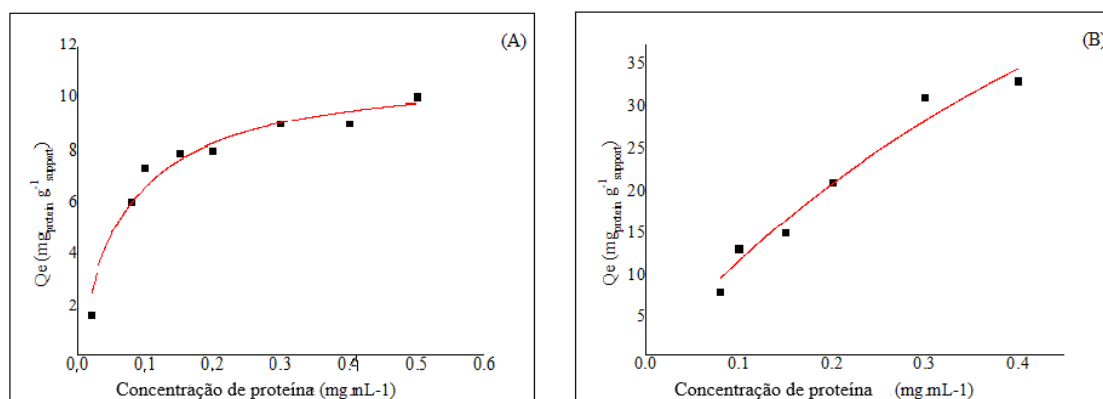
3.6.1.2 Efeito da concentração de proteína no processo de imobilização

A imobilização de lipases foi estudada usando diferentes concentrações de proteína para entender a natureza da imobilização da lipase no carvão ativado. Assim, diferentes concentrações da lipase de *A. niger* e CalB foram imobilizadas por 120 min. O aumento na concentração de proteína resultou em aumento da massa de proteína adsorvida no suporte até atingir o valor máximo de 10,0 e 33,0 mg proteína/g suporte para *A. niger* lipase e CalB, respectivamente. Essa diferença na capacidade de adsorção pode ser explicada considerando que nem todas as lipases têm a mesma afinidade por um determinado suporte (Rodrigues *et al.*, 2019). Além disso, segundo análise de eletroforese (dados não apresentados), o extrato enzimático de *A. niger* contém maior quantidade de outras proteínas além da lipase de interesse. Portanto, o fato do extrato enzimático de *A. niger* estar sendo testado na mesma concentração de proteína que CalB pode não significar que ele contém a mesma concentração de lipase. As lipases são as únicas proteínas solúveis em água extensivamente imobilizadas em suportes hidrofóbicos (Rodrigues *et al.*, 2019). Por esse motivo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos também pode ser usada como um método de purificação de lipases de outras enzimas (Rodrigues *et al.*, 2019).

Os dados de adsorção são convenientemente representados por isotermas, que ajudam a determinar a capacidade de imobilização do suporte. A capacidade do carvão ativado para adsorver a lipase foi avaliada usando o

modelo não linear de isoterma de Langmuir. A isoterma de adsorção representa a quantidade de equilíbrio de proteína adsorvida (Q_e) em função de sua concentração de equilíbrio (C_e). A Figura 25 mostra o ajuste de Langmuir aos dados experimentais da quantidade de proteína adsorvida em função da concentração de proteína empregada no processo de imobilização. Os parâmetros da isoterma e o coeficiente de determinação (R^2) estão resumidos na Tabela 10. O modelo de isoterma de Langmuir ajustou-se bem aos dados experimentais, mostrando um alto coeficiente de determinação para a lipase de *A. niger* ($R^2 = 0,95$) e CalB ($R^2 = 0,96$). O valor da constante de equilíbrio de adsorção estimado pelo modelo foi igual a $14,4 \pm 2,9$ para a lipase de *A. niger* e $1,33 \pm 0,64$ mL/mg para CalB. O modelo de Langmuir assume que apenas uma camada monomolecular de adsorvato não interativo é formada na superfície do adsorvente (Brito *et al.*, 2020; Latour, 2015). Nesse caso, esses resultados indicariam que a adsorção de proteínas no carvão ativado ocorre como uma camada monomolecular sem interações entre as espécies adsorvidas.

Figura 25 - Capacidade de imobilização de lipase por adsorção em carvão ativado. *A. niger* lipase (A) e CalB (B) no carvão ativado.



Condições: As imobilizações foram realizadas em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 120 min, utilizando 15 mL de solução enzimática, que foi preparada diluindo-se o extrato enzimático em tampão fosfato (25 mmol L^{-1} , pH 7), e 0,15g de suporte.

Fonte: O autor, 2024

Tabela 9 - Parâmetros da isoterma de Langmuir para adsorção da lipase CalB e de *A. niger* no carvão ativado

Enzima	Q_m (mg _{proteína} g _{suporte} ⁻¹)	K (mL mg _{proteína} ⁻¹)	RL	R^2
--------	--	--	----	-------

CalB	99,3 ± 34,5	1,33 ± 0,64	0.007	0.96
<i>A.niger</i>	11,1 ± 0,6	14,4 ± 2,9	0.006	0.95

As imobilizações foram realizadas em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 120 min, utilizando 15 mL de solução enzimática, que foi preparada diluindo-se o extrato enzimático em tampão fosfato (25 mmol L^{-1} , pH 7), e 0,15g de suporte.

Fonte: O autor, 2024

Com relação ao parâmetro RL, que representa o inverso da razão das constantes de adsorção/dessorção ($1/(1+(K \cdot Q_m))$), foram obtidos valores abaixo de 1, o que indica um fenômeno de adsorção favorável para todas as enzimas avaliadas, demonstrando assim a viabilidade da imobilização da enzima em carvão ativado.

A quantidade de enzima que deve ser carregada no suporte é uma das principais características a serem consideradas na preparação de um biocatalisador por imobilização (Secundo, 2013). Diferentes concentrações iniciais de proteína foram estudadas para avaliar o efeito da concentração inicial da enzima na imobilização da lipase por adsorção (Tabela 11). Observou-se que o aumento da concentração de proteína inicial no processo levou a um aumento da capacidade adsortiva no suporte para ambas as lipases. Com relação a eficiência de imobilização (Tabela 11), o valor máximo foi observado para concentrações intermediárias (0,1 mg/L) para ambas as lipases.

Tabela 10- Efeito da concentração inicial da enzima na capacidade adsortiva (Q) e rendimento na imobilização da lipase.

Concentração de proteína (mg/L)	Q (mg/g)	RI imobilização (%)	Q (mg/g)	RI imobilização (%)
	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	CalB	CalB
0,08	6,0	70,0	7,9	72,9
0,1	7,3	89,0	13,0	99,8
0,15	7,9	68,0	15,0	93,5
0,2	8,0	52,6	21,0	94,5
0,3	9,0	30,0	31,0	87,8
0,4	9,0	31,3	33,0	68,1

Condições: pH 7,0; temperatura 25°C; carvão ativado 0,15 g; tempo 120 min.

Q = capacidade adsorptiva (massa de proteína (mg) adsorvida por grama de suporte)

RI = rendimento de imobilização

Fonte: O autor, 2024

A análise das interações entre a enzima e o suporte pode explicar o comportamento observado quando se variou a concentração da enzima (Tabela 11). A imobilização da lipase pode ser influenciada pela interação proteína/suporte utilizada no processo de imobilização. Quando há baixo teor de proteína/suporte (mg proteína/g suporte), alguns locais de adsorção podem estar disponíveis e alguma interação (proteína/suporte) pode ser observada. Por outro lado, em altas concentrações iniciais de proteína, os sítios de ligação no suporte sólido estão saturados, resultando em menos sítios de ligação disponíveis para moléculas adicionais de lipase adsorverem. Além disso, maiores concentrações enzimáticas possibilitam a formação de mais interações proteína-proteína, levando a alterações conformacionais e, conseqüentemente, a uma diminuição mais acentuada da atividade hidrolítica.

Em relação à atividade hidrolítica da lipase imobilizada, os valores de atividade enzimática dos derivados imobilizados de lipase *A.niger* em carvão ativado (CA-*A.niger*), obtidos a partir de diferentes concentrações iniciais de proteína, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 11 - Efeito da concentração inicial da lipase de *A. niger* na atividade hidrolítica do biocatalisador imobilizado

Concentração de proteína (mg/L)	Atividade lipásica (U/g)
0,08	139,8
0,1	300,2
0,15	155,1
0,2	108,5
0,3	45,0
0,4	59,6

Condições: pH 7,0; temperatura 25°C; carvão ativado 0,15 g; tempo 120 min.

Fonte: O autor, 2024

Este resultado mostra que a atividade máxima (300,2 U/g) foi observada para o biocatalisador obtido a partir do extrato enzimático na concentração de 0,1 mg/mL de proteína. Os valores decrescentes da atividade enzimática com o aumento da carga de lipase indicam que, embora a maior parte da proteína tenha sido adsorvida na superfície do suporte (resultados mostrados na Tabela 11), poucas lipases permaneceram ativas. A atividade enzimática ótima depende dos efeitos do suporte na conformação enzimática e de limitações difusionais devido à concentração da enzima na superfície do suporte (Secundo, 2013). A sobrecarga de moléculas enzimáticas causa algumas interações proteína-proteína desfavoráveis, levando a multicamadas ou aglomerados de moléculas enzimáticas na superfície do suporte (Anand; Weatherley, 2018; Pashangeh *et al.*, 2017; Secundo, 2013). Além disso, algumas enzimas, como CalB, são mais suscetíveis a mudanças conformacionais após a adsorção e, portanto, perda de atividade (Anand; Weatherley, 2018; Secundo, 2013).

Secundo (2013) relatou três regimes de carregamento de superfície em relação à atividade catalítica do suporte enzimático. O primeiro regime mostra uma redução da atividade catalítica devido à interação máxima enzima-suporte que ocorre quando a superfície do suporte está coberta por poucas moléculas enzimáticas. O terceiro regime ocorre quando a concentração da enzima é alta, com elevada cobertura superficial do suporte. Nesse regime, as moléculas enzimáticas são empacotadas em multicamadas na superfície do suporte e as limitações de transferência de massa são responsáveis pela menor atividade enzimática. O segundo regime é observado quando ocorre a cobertura intermediária da superfície. Nesse caso, as interações enzima-enzima evitam interações excessivas da enzima com o suporte, preservando a conformação da enzima ativa.

Brito *et al.* (2017) avaliaram o efeito da concentração inicial de proteína na imobilização da lipase por adsorção em carvão ativado de caroços de cajá. Segundo os autores, observou-se que o aumento da concentração da enzima levou a um aumento da carga proteica no carvão ativado, mas a atividade máxima foi observada para concentrações intermediárias. Pashangeh *et al.*, (2017) também estudaram o efeito da concentração inicial da lipase *Rhizopus oryzae* na imobilização covalente em nanopartículas magnéticas

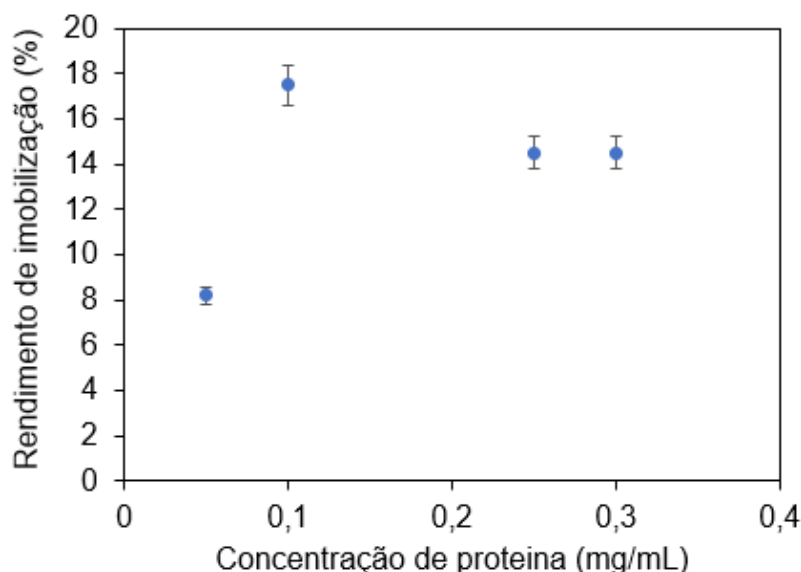
funcionalizadas com grupo amino. Eles variaram a concentração inicial de lipase (0,1-0,3 mg/mL) e observaram que a atividade relativa atingiu um valor máximo quando se utilizou 0,1 mg/mL de lipase. De acordo com os autores, como os sítios de ligação na superfície do suporte são limitados, a sobrecarga (saturação) das moléculas enzimáticas causa o aumento de algumas interações proteína-proteína desfavoráveis na superfície do suporte. Consequentemente, menos moléculas de enzimas, imobilizadas no suporte, estão disponíveis para catalisar a reação. Isso também restringe a difusão do substrato e do produto, respectivamente, para dentro e para fora da superfície do suporte.

3.6.2 Imobilização em ferrita de níquel

A lipase de *A. niger* foi imobilizada por adsorção física e ligação covalente em nanopartículas de NiFe_2O_4 .

Inicialmente foi avaliado o processo de imobilização da lipase de *A. niger* em NiFe_2O_4 por adsorção física, verificando o efeito da concentração inicial de proteína (0,05 a 0,3 mg mL⁻¹) em 24 horas para avaliar a eficiência de imobilização. Os resultados podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 - Efeito da concentração inicial de proteína no rendimento de imobilização da lipase de *A. niger* em nanopartículas de ferrita de níquel.



Condição de imobilização: $t = 24$ h., 0,1 g de carvão ativado na solução enzimática (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH = 7) $T = 25$ °C).

Fonte: O autor, 2024

Com base nos resultados da Figura 26, a concentração inicial de proteína que permitiu a maior eficiência de imobilização (17%) também foi de 0,1 mg/mL, no entanto, com uma eficiência bem menor do que a observada na imobilização em carvão ativado (89%). A quantidade de enzima imobilizada é fundamental, mas a atividade resultante da interação é o que vai garantir a viabilidade e aplicabilidade do biocatalisador final. As soluções enzimáticas de referência (ensaio realizado com a enzima, em condições idênticas, mas na ausência de suporte) mantiveram plena atividade durante todo o processo de imobilização por 24h, indicando que o decaimento da atividade observado no sobrenadante, durante o processo de imobilização, está diretamente relacionado à adsorção da enzima ao suporte. O biocatalisador obtido na imobilização a partir da solução de proteína na concentração de 0,1 mg/mL apresentou atividade lipásica de 39,5 U/g, valor bem abaixo do observado com o carvão ativado (300,2 U/g).

Aghabeigi *et al.* (2023) utilizaram o óxido de grafeno sintetizado e magnetizado a partir de nanopartículas de ferrita de níquel como suporte para a imobilização da lipase de *Candida rugosa*. Eles avaliaram o efeito da

concentração de lipase (30–160 µg/mL) e a concentração inicial ideal de lipase também foi de 0,1 mg/mL (para 10 mg de suporte).

A fim de melhorar o processo de imobilização na ferrita de níquel, o método de ligação covalente foi avaliado. Para isso, foi realizada inicialmente a modificação da superfície do suporte, ou funcionalização das nanopartículas, com o auxílio do agente de acoplamento 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS). Os organossilanos, tais como o APTMS, são agentes de acoplamento promissores, pois apresentam sítios reativos adequados para modificação química da superfície, permitindo a interação de materiais inorgânicos com orgânicos.

O processo de silanização ocorre entre os grupos hidroxilas da superfície da NiFe_2O_4 e os grupos alcóxidos do APTMS. Os grupos amino ($-\text{NH}_2$) do APTMS podem interagir com os grupos de aminoácidos da enzima e com os grupos aldeído ($-\text{CHO}$) do glutaraldeído (Kim; Kwon, 2017). Neste trabalho, após a funcionalização da ferrita com APTMS, a lipase foi ligada por uma união covalente ao grupo amino- NiFe_2O_4 pelo glutaraldeído.

A imobilização da lipase em nanopartículas magnéticas (MNPs) foi investigada para obter um derivado com alta atividade. Para a imobilização covalente foi estudada a influência do percentual de glutaraldeído em solução enzimática (2,5 e 0,25 %). A Tabela 13 mostra os resultados da atividade do biocatalisador e o rendimento da imobilização.

Tabela 12 - Imobilização de *A. niger* em NiFe_2O_4 : rendimento de imobilização (RI) e atividade enzimática

Método de imobilização	RI (%)	Atividade do biocatalisador (U/g_{bio})
NiFe_2O_4 (Adsorção física)	17,5	$39,0 \pm 1,2$
NiFe_2O_4 -APTMS-GLU (2,5%) (Ligação covalente)	99,8	$225,2 \pm 1,3$
NiFe_2O_4 -APTMS-GLU (0,25%) (Ligação covalente)	83,4	$46,5 \pm 1$

Condições de imobilização: 10 mL de solução enzimática, em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7), 0,1 g de suporte, concentração de proteína: 0,1 mg. mL⁻¹. Adsorção física: 25 °C e ligação covalente 8 °C.

Fonte: O autor, 2024

A modificação do processo de imobilização melhorou o desempenho do biocatalisador, como pode ser observado na Tabela 13. A atividade do biocatalisador aumentou quase 6 vezes quando glutaraldeído a 2,5% foi usado na imobilização covalente. Ressalta-se que este é o primeiro relato de imobilização de lipase de *A. niger* imobilizada em nanopartículas de NiFe_2O_4 . Atacan *et al.* (2019) relataram a imobilização de glicose oxidase em nanopartículas de NiFe_2O_4 modificadas com tanino. Ashjari *et al.* (2020) ligaram covalentemente a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e de *Thermomyces lanuginosa* lipase (TLL) a nanopartículas magnéticas de núcleo de sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Os autores obtiveram imobilização rápida de ambas as enzimas (1,5-12 h) com altos rendimentos de imobilização (81-100%).

Ibrahim *et al.* (2016) mostraram que a imobilização covalente teve uma alta eficiência de imobilização em comparação com a adsorção física, mas a atividade da enzima imobilizada foi menor que a da enzima livre. Assim, uma simples estratégia de imobilização pode não garantir um processo rápido e com alta atividade ao mesmo tempo.

O glutaraldeído, nas condições utilizadas, favoreceu a imobilização da lipase. Estudos anteriores relataram um resultado semelhante. Osuna *et al.* (2015) imobilizaram lipase de *Aspergillus niger* em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativadas com glutaraldeído, alcançando um rendimento de imobilização de $90,1 \pm 1,1\%$ e atividade de $309,5 \pm 2,0$ U/g. Monteiro *et al.*, (2019) imobilizaram lipase A de *Candida antarctica* por ligação covalente em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativadas com glutaraldeído, obtendo nesta condição $84,1\% \pm 1,0$ de rendimento de imobilização e $208,0 \pm 3,0$ U/g $\pm 1,1$ de atividade enzimática.

Portanto, a ligação covalente da ferrita de níquel com APTMS permitiu uma ligação entre a lipase e o suporte, e o glutaraldeído pode ser usado como um agente ativador no processo de imobilização (Mohamad *et al.*, 2015).

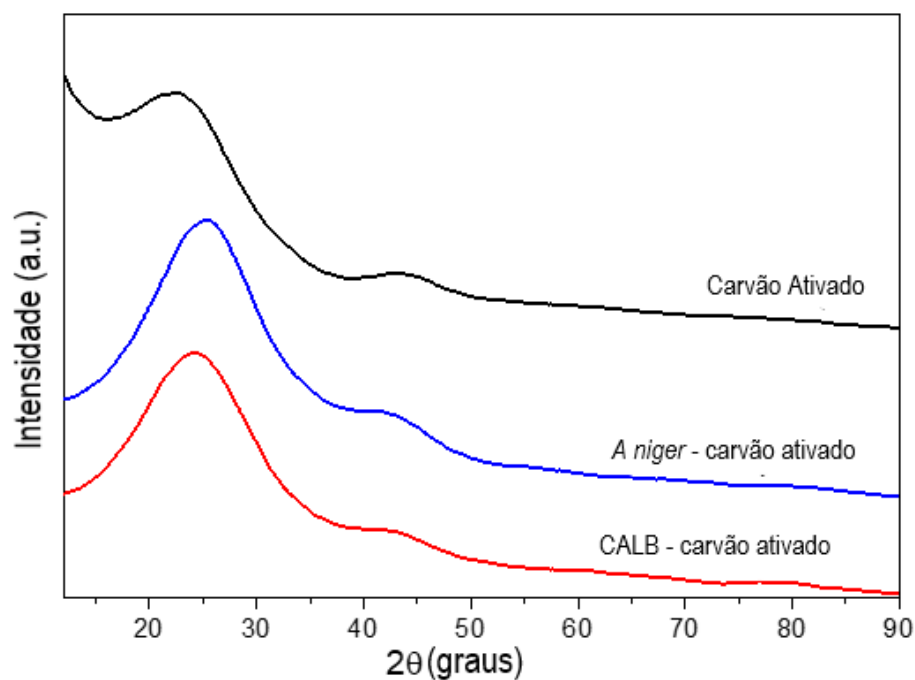
3.7 Caracterização do biocatalisador

3.7.1 Difração de Raio X (DRX)

Os padrões de difração de raios X foram realizados para o carvão ativado antes e após a imobilização e para a ferrita de níquel pura e após a funcionalização com APTMS.

O DRX do carvão ativado e da lipase imobilizada no suporte (*A. niger* e CalB) são mostrados na Figura 27. Nota-se que todos os perfis exibem grandes picos centrados em aproximadamente 22 e 45°C, relacionados à estrutura amorfa de carvão ativado (Silveira *et al.*, 2020). A presença da enzima não promoveu mudanças significativas nos difratogramas, apenas aumentou a intensidade do pico e deslocou levemente o pico principal para a direita, o que pode sugerir uma reestruturação do carvão ativado após o processo de imobilização.

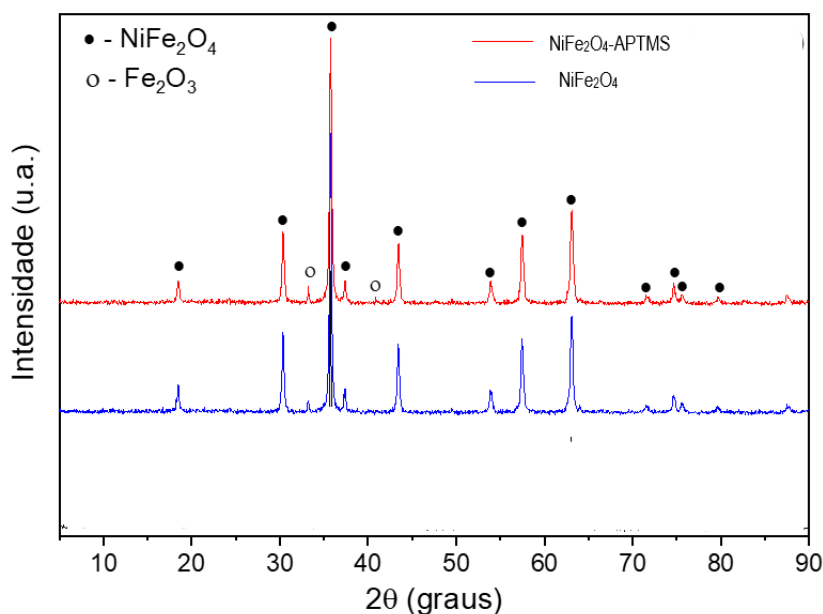
Figura 27 - Perfil do DRX do carvão ativado antes e depois do processo de imobilização.



Fonte: O autor, 2024

A Figura 28 exibe o perfil DRX da ferrita de níquel e da ferrita de níquel após modificação com APTMS. Todos os perfis são semelhantes, indicando que a adição de APTMS não promoveu uma transformação de fase cristalina significativa. Os picos localizados em 2θ iguais a 18,5, 30,4, 35,8, 37,4, 43,5, 53,9, 57,5, 63,1, 71,6, 74,7, 75,6 e 79,7° são atribuídos à fase ferrita de níquel (JCPDS-86-2267), indicando o sucesso em sua síntese, enquanto os picos menores em 2θ 33,2 e 40,9 estão relacionados à fase hematita (JCPDS 40-1139), indicando uma pequena presença de partículas ferrosas que não interagiram com o níquel.

Figura 28 – Perfil do DRX da ferrita de níquel



Fonte: O autor, 2024

Com base nesses resultados, foi possível observar que não houve modificação da fase cristalina, tanto no processo de imobilização por adsorção da lipase no carvão ativado quanto no processo de funcionalização da ferrita de níquel.

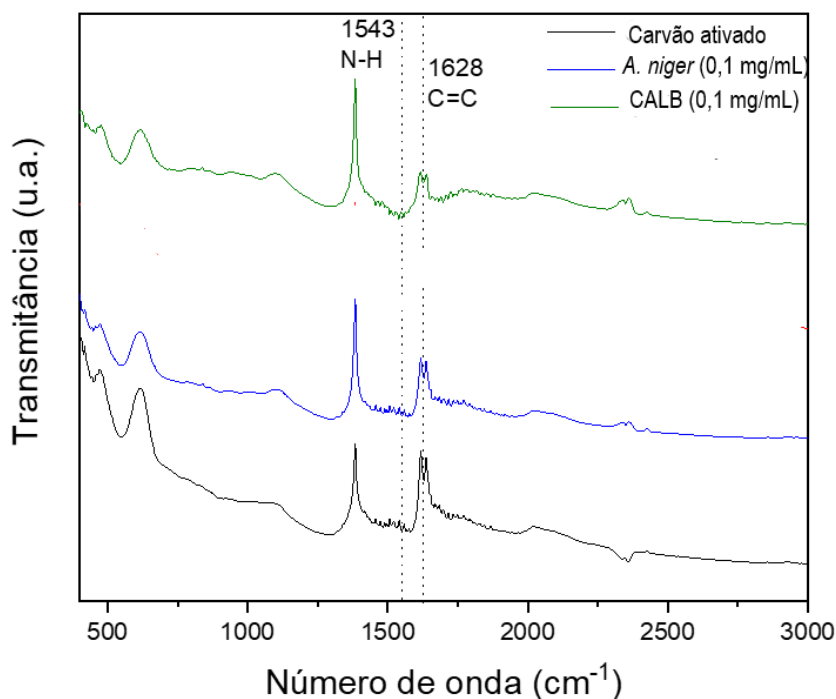
3.7.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada para caracterizar os suportes e verificar a interação entre o suporte e o extrato enzimático (CalB e *A. niger*). Para esse estudo foram analisados o carvão ativado antes e após a imobilização por adsorção física utilizando duas concentrações de extrato enzimático (0,1 e 0,5 mg/mL) para lipase de *A. niger* e uma concentração (0,1 mg/mL) para lipase CalB. A ferrita de níquel foi estudada na sua forma pura, funcionalizada com APTMS e após a imobilização por ligação covalente na concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

Os espectros de FTIR do carvão ativado e do biocatalisador nas duas concentrações de extrato enzimático (0,1 mg/mL) de *A. niger* e 0,1 mg/mL de CalB são mostrados na Figura 29. Todos os espectros mostraram uma banda em 1628 cm^{-1} , que pode ser atribuída à vibração C=C fora do plano apresentado no carvão ativado (Wang *et al.*, 2016). Essa banda também diminuiu de intensidade com o aumento da concentração da enzima, sugerindo que a adsorção da enzima na superfície do carbono contribui para a quebra das ligações C=C. Além disso, a banda em 1543 cm^{-1} atribuída ao alongamento da ligação C-N e dobramento da ligação N-H na região conhecida como Amida II Sjahfirdi; Nasikin (2012) sugere a presença de proteína no carvão imobilizado.

Silveira *et al.* (2020) atribuíram uma banda em 1690 cm^{-1} a grupos carboxílicos ou lactonas e em 1250 cm^{-1} a lactonas e anidridos carboxílicos presentes em carvões ativados derivados de palha e madeira de cana-de-açúcar. Neste trabalho, essas bandas foram observadas em 1280 cm^{-1} para todas as amostras e em 1690 cm^{-1} apenas para o suporte de carvão.

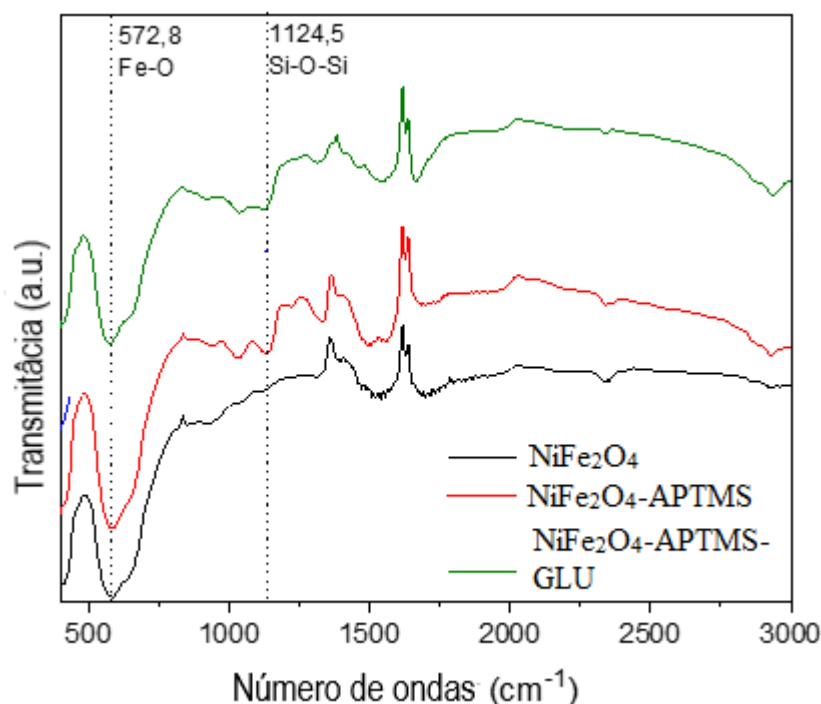
Figura 29 - Espectros de FTIR do carvão antes e depois da imobilização com diferentes extratos enzimáticos.



A Figura 30 mostra os espectros de FTIR da ferrita de níquel e da ferrita de níquel funcionalizada com APTMS. Além disso, os espectros da ferrita de níquel após imobilização por ligação covalente com a lipase de *A. niger* (0,1 mg/mL). Observou-se uma banda em $572,8\text{ cm}^{-1}$ em todos os espectros atribuída ao estiramento da ligação Fe-O. Além disso, a banda relacionada à vibração Fe-O-Si na ferrita modificada se sobrepõe à ligação Fe-O, como também observado por Palimi *et al.* (2014). Assim, a banda em $572,8\text{ cm}^{-1}$ é mais intensa para a ferrita de níquel funcionalizada com APTMS.

Palimi *et al.* (2014) também relataram uma banda em 1120 cm^{-1} para a ferrita de níquel funcionalizada com APTMS, atribuída à vibração das ligações Si-O-Si, o que confirmou a presença de grupos funcionais silano na superfície da ferrita. Neste trabalho, a banda relacionada ao Si-O-Si foi observada em $1124,5\text{ cm}^{-1}$ no espectro do $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-APTMS}$, sugerindo o sucesso do processo de funcionalização. A adição da lipase de *A. niger* promoveu uma diminuição na intensidade desta banda, o que pode estar relacionado à quebra de algumas ligações Si-O-Si pela enzima. Além disso, foi observada uma banda em 1550 cm^{-1} após a imobilização, atribuída à flexão da ligação N-H na região conhecida como Amida II (Nasikin; Sjahfirdi, 2012), o que sugere a presença dos grupos amino da enzima.

Figura 30 - Espectros FTIR de ferrita de níquel pura, funcionalizada com APTMS e após imobilização da lipase de *A. niger* por ligação covalente (NiFe₂O₄-APTMS-GLU)



Fonte: O autor, 2024

Com base nos resultados expostos acima foi possível verificar a presença da enzima no suporte para os dois processos de imobilização estudados (adsorção utilizando o carvão ativado e ligação covalente com a ferrita de níquel funcionalizada) através da presença bandas atribuídas a ligação N-H na região conhecida como Amida II II (Nasikin; Sjahfirdi, 2012). Além disso, foi possível identificar que houve a funcionalização da ferrita de níquel no APTMS.

3.7.3 Dessorção de amônia programada por temperatura (TPD-NH₃)

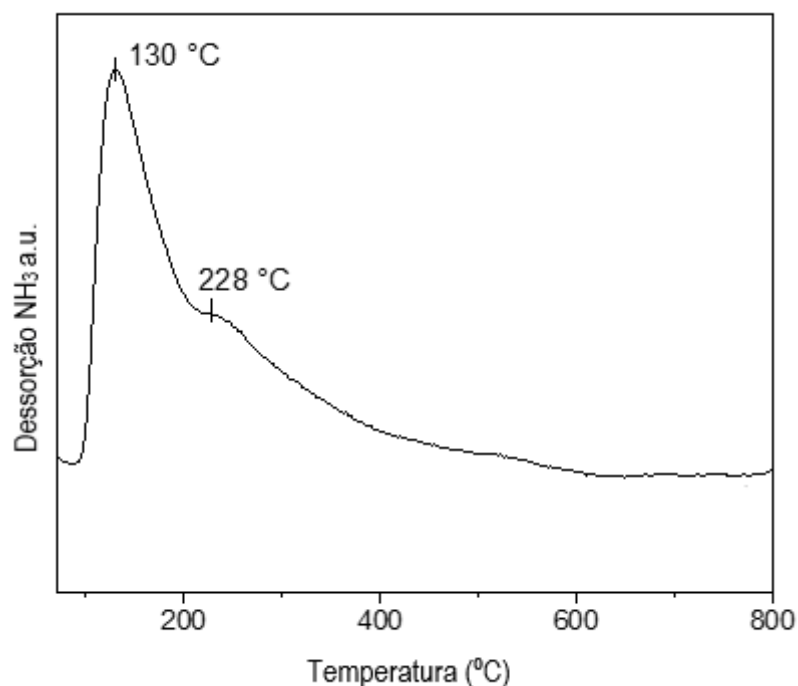
A técnica de dessorção de amônia à temperatura programada (TPD-NH₃) é empregada na caracterização da acidez de sólidos. Através do método

é possível determinar a distribuição de força e a concentração de sítios ácidos presentes na amostra (Moreno-Castilla *et al.*, 2000).

A Figura 31 mostra o perfil TPD-NH₃ do carvão ativado. É bem conhecido na literatura que o caráter ácido dos materiais de carvão ativado está relacionado aos grupos carboxila, lactona e fenol (Moreno-Castilla *et al.*, 2000). Este trabalho observou dois picos de dessorção a 130 e 228 °C atribuídos a sítios ácidos fracos e médios (Frusteri *et al.* 2015 e Ribeiro *et al.* 2005) correspondentes aos diferentes grupos ácidos mencionados anteriormente. Esses resultados seguem os relatados por Li *et al.*, (2014). Os autores relataram picos de dessorção de NH₃ na faixa de 153-277 °C para o carvão ativado.

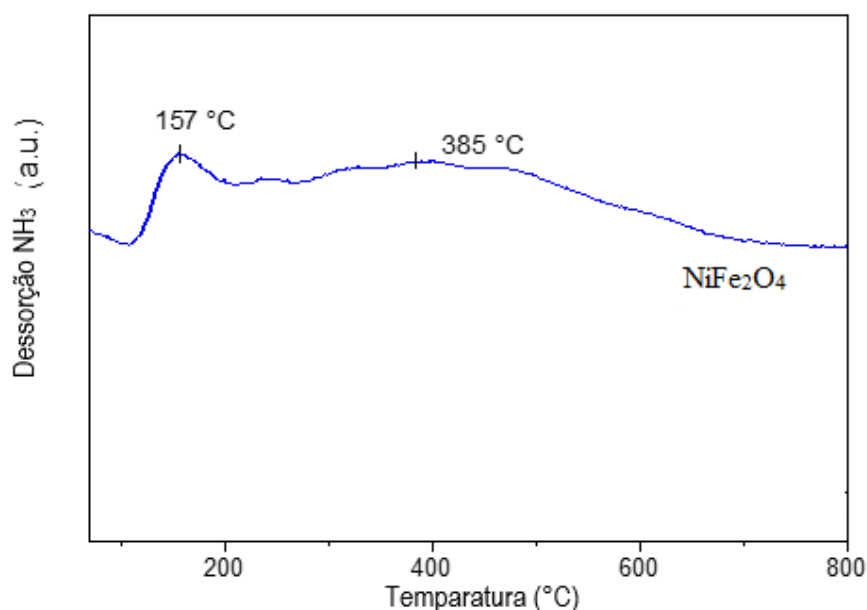
Além disso, a acidez total por massa e área, calculada pela integração das curvas TPD-NH₃, foi de 252,89 µmol NH₃/g e 0,12 µmol NH₃/m², respectivamente. A baixa quantidade de acidez e a fraca força do ácido podem diminuir a capacidade de adsorção da enzima. No entanto, também minimiza a desnaturação enzimática proporcionada por uma forte ligação com grupos amino. Li *et al.* (2014) relataram uma quantidade total de grupo ácido de 140 µmol/g, medida pela titulação de Boehm, valor inferior ao deste trabalho, o que pode ser explicado pela menor área superficial BET (1267 m²/g). A acidez normalizada por área seria de 0,11 µmol/m² por este trabalho.

Figura 31 - TPD-NH₃ de carvão ativado a partir da palha de cana-de-açúcar.



Fonte: O autor, 2024

A Figura 32 mostra o perfil de dessorção de amônia com aumento de temperatura (TPD-NH₃) para a ferrita de níquel. O suporte apresentou uma ampla faixa de dessorção de amônia, apresentou principalmente sítios ácidos fracos, já que o pico principal está centrado em 150 °C. Este comportamento sugere um enfraquecimento dos sítios ácidos, que pode estar relacionado ao processo de sinterização e diminuição do volume dos poros, uma vez que a amônia adsorvida no interior dos poros é mais difícil de dessorver do que a amônia adsorvida na superfície do suporte. Além disso, partículas menores de ferrita de níquel podem promover uma interação mais forte com a amônia, pois a área de superfície de contato é aumentada para adsorção.

Figura 32 - TPD-NH₃ da ferrita de níquel

Fonte: O autor, 2024

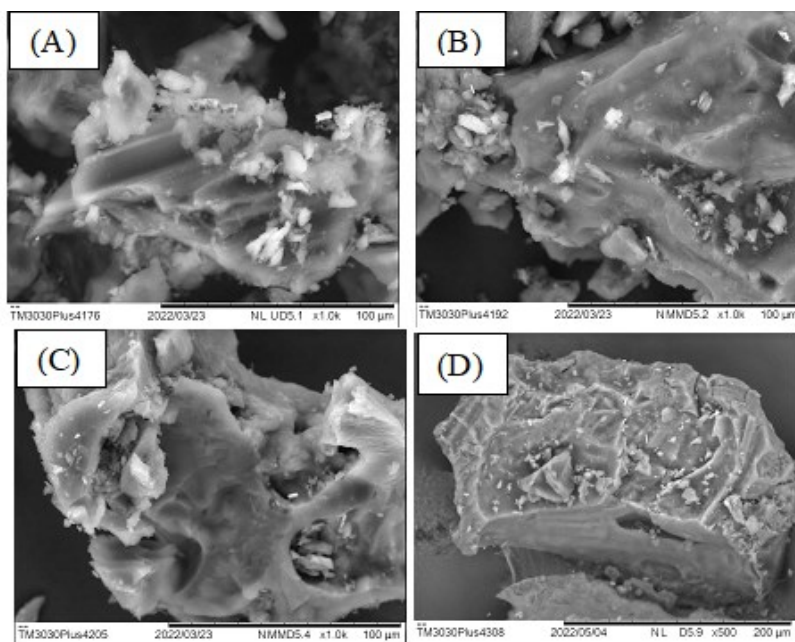
As curvas de dessorção de amônia para os suportes estudados neste trabalho apresentaram sítios ácidos na região de baixa temperatura, e não foi observada formação de picos referentes aos sítios ácidos fortes (acima de 320 °C) (Frusteri *et al.*, 2015). Dessa forma os ácidos são considerados sítios de ácidos fracos em sua maioria.

3.7.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 33 mostra as microscopias eletrônicas de varredura do carvão ativado antes (A) e após o processo de imobilização com lipase de *A. niger* 0,1 mg/mL (B), CalB 0,1 mg/mL (C) e CalB 0,5 mg/mL (D). Antes da imobilização (Fig.33 A), observa-se uma estrutura lamelar e em placa com rugosidade, que pode contribuir para a elevada área superficial do carvão, potencializando a adsorção da enzima. Por outro lado, as amostras após a imobilização apresentam uma morfologia mais espessa e densa, principalmente a amostra imobilizada com maior concentração de enzima, indicando um processo de

aglomeração durante a imobilização e bloqueio dos poros pela carga enzimática.

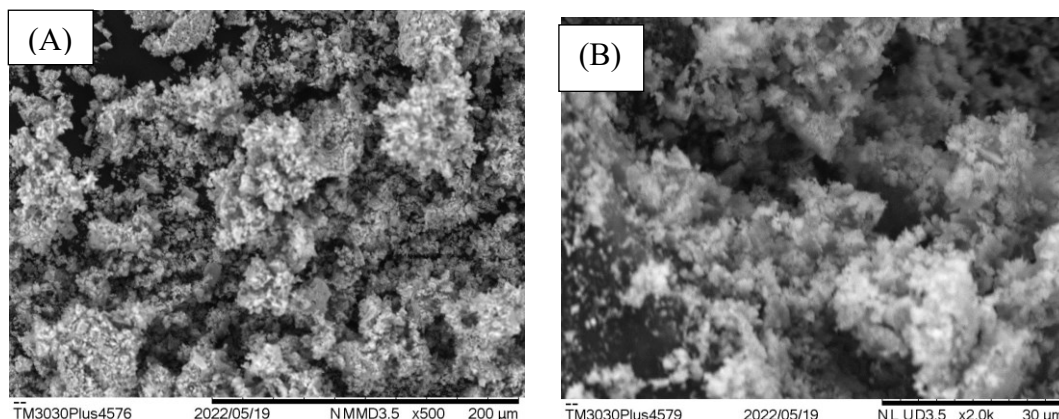
Figura 33 - Imagens MEV do carvão ativado antes (A) e após o processo de imobilização: 0,1 mg mL⁻¹ *A. niger* lipase (B), 0,1 mg mL⁻¹ CalB (C) e 0,5 mg mL⁻¹ CalB (D).



Fonte: O autor, 2024

Para o perfil da ferrita de níquel temos a Figura 34, que apresenta as imagens MEV da ferrita de níquel (A e B) com duas ampliações diferentes (500 e 2000 x). Observou-se que a ferrita de níquel apresentou partículas maiores e menor porosidade devido aos processos de agregação e sinterização, corroborando os resultados encontrados por DRX.

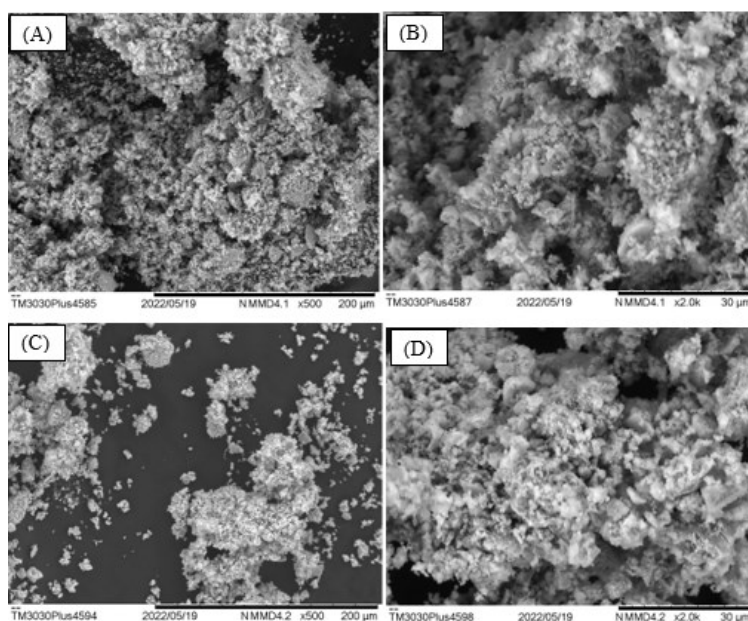
Figura 34 – Imagens MEV de ferrita de níquel com diferentes ampliações:
(A) NiFe_2O_4 x500, (B) NiFe_2O_4 x 2000.



Fonte: O autor, 2024

A Figura 35 mostra as imagens MEV da ferrita de níquel funcionalizada com APTMS e da mesma ferrita após a imobilização. Todos os materiais apresentaram a mesma morfologia, um agregado de partículas com baixa porosidade, assemelhando-se à ferrita, indicando que os processos de funcionalização e imobilização não alteraram significativamente a morfologia do suporte. No entanto, também foi observado que esses processos contribuíram para uma certa desagregação das partículas, pois partículas menores são observadas nessas imagens em comparação com as imagens de ferrita de níquel não modificada.

Figura 35- Imagens de MEV da ferrita de níquel funcionalizada antes e depois da imobilização da lipase de *A. niger*: (A) NiFe_2O_4 - APTMS e x200, (B) NiFe_2O_4 - APTMS e x2000, (C) NiFe_2O_4 - APTMS-GLU e x200, (D) NiFe_2O_4 -APTMS - GLU e x2000.

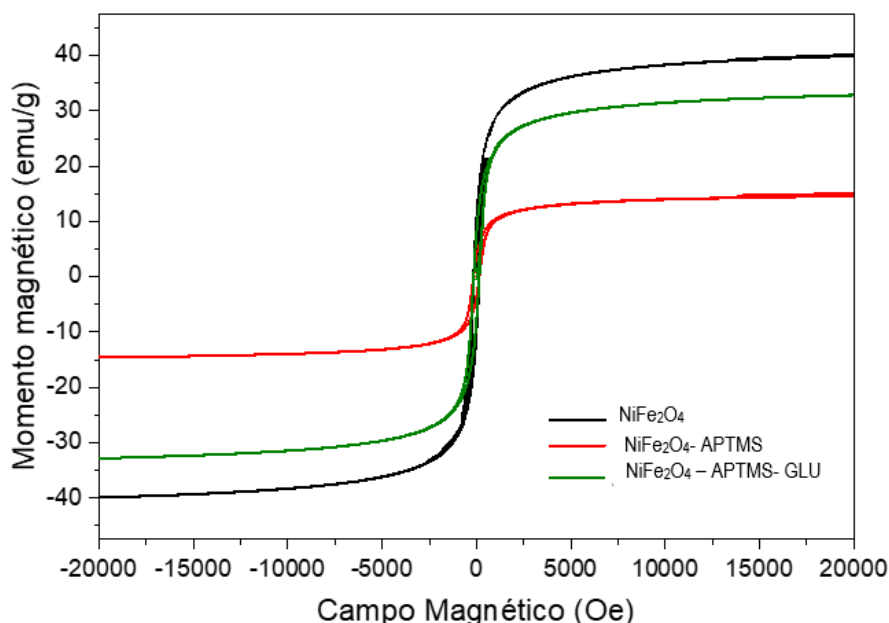


Fonte: O autor, 2024

3.7.5 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

O comportamento de magnetização da ferrita de níquel, a ferrita de níquel modificada com APTMS e imobilizada por ligação covalente foi estudado e está apresentado na Figura 36. Nota-se que todos os materiais apresentaram histerese magnética, o que indica uma magnetização remanescente mesmo após a remoção do campo magnético externo devido à orientação dos domínios magnéticos. A Tabela 36 mostra as propriedades magnéticas obtidas pelas curvas. Observa-se que a ferrita de níquel apresentou propriedades magnéticas, indicando magnetização. A saturação magnética ligeiramente maior da ferrita de níquel pode ser justificada pelo seu maior tamanho de cristalito e menor volume de poros (Li *et al.*, 2017), o que promove o aparecimento de domínios magnéticos maiores

Figura 36 – Curvas de VSM da NiFe_2O_4 , NiFe_2O_4 - APTMS e NiFe_2O_4 – APTMS- GLU



Fonte: O autor, 2024

A modificação com APTMS promoveu uma diminuição significativa na saturação magnética de 39,93 para 14,61 emu/g, devido à presença de sílica, que é diamagnética e pode recobrir a superfície ferromagnética da ferrita. Esse comportamento também foi observado por (Thangaraj; Solomon, 2019) com a adição do ligante tetraetila ortossilicato (TEOS) na magnetita. Os autores observaram uma diminuição da saturação magnética de 67,16 para 41,27 emu/g pela diminuição da proporção $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{SiO}_2$ de 1:0,25 para 1:2.

Para a ferrita funcionalizada com APTMS após imobilização na presença de glutaraldeído (2,5%), observa-se uma recuperação na saturação magnética em comparação com a ferrita modificada antes da imobilização. Este comportamento sugere a quebra das ligações Si-O-Si da sílica, diminuindo a cobertura de partículas ferromagnéticas. No entanto, a recuperação não é completa, pois nem todas as ligações de sílica são quebradas, e sua presença contribui para um menor valor de saturação magnética (32,53 emu/g) em comparação com a ferrita de níquel não modificada.

O campo coercitivo representa o campo externo necessário para a perda de magnetização. Observou-se que todas as amostras apresentaram valores semelhantes de um campo coercitivo, portanto, apresentam resistência à desmagnetização semelhante. A magnetização remanescente é a magnetização do material quando o campo externo aplicado é removido. Os valores seguem a mesma tendência da saturação magnética. Além disso, também foi observado que a relação entre a saturação magnética e a magnetização remanescente é aproximadamente a mesma (0,26) para as ferritas antes da imobilização, o que significa que 26 % da saturação magnética é mantida após a remoção do campo magnético. Essa relação (0,19) é um pouco menor para a ferrita modificada após o processo de imobilização.

Tabela 13 - Propriedades magnéticas de ferritas de níquel calculadas por MAV: saturação magnética (M_s), campo coercitivo (H_c) e magnetização remanente (M_r).

Amostra	M_s (emu/g)	H_c (Oe)	M_r (emu/g)	M_r/M_s
NiFe ₂ O ₄	39.93	150.27	10.29	0.26
NiFe ₂ O ₄ -APTMS	14.61	157.82	3.63	0.25
NiFe ₂ O ₄ -APTMS-GLU	32.53	150.43	6.31	0.19

Fonte: O autor, 2024

CONCLUSÕES

A linhagem mutante *A. niger* 11T53A14 foi capaz de crescer e produzir lipase em CES utilizando borra de café (como indutor) e farelo de trigo, que são matérias-primas de baixo valor comercial. A borra de café A (borra de café 100% arábica) apresentou maior indução da síntese da lipase, com aumento de 115% da produção dessa enzima em relação ao cultivo de controle (sem a presença da borra). Portanto, este rejeito (subproduto da indústria alimentícia) foi escolhido para ser usado como indutor da produção de lipases por CES em biorreator de leito fixo.

Em relação ao tipo de reator de bancada utilizado na CES (frasco 1- erlenmeyer e frasco2- placa de petri), o maior valor de atividade lipásica (140,6 U/g) foi obtido utilizando o reator 1- frasco *erlenmeyer*, pois permitiu a manutenção do teor de umidade do meio fermentativo.

A melhor condição para produção da lipase de *A. niger* 11T53A14 por CES utilizando biorreator de leito fixo variando a aeração foi observada com aeração de 0,5 vvm, nessa condição obteve-se atividade lipásica em torno de 156,1 U/g.

A concentração enzimática foi mais eficiente utilizando a ultrafiltração com membrana de 50 kDa. Nessa condição também foi obtido o maior valor de atividade lipásica (47,6 U/mL), sendo 3 vezes maior do que a obtida com extrato enzimático bruto inicial (16,0 U/mL).

A lipase de *A. niger* 11T53A14 apresentou um perfil esperado para enzimas mesofílicas, com máximo de atividade nas reações de hidrólise do óleo de oliva nas temperaturas de 30°C a 60°C. A lipase apresentou a maior atividade em pH de 6,0. Em relação ao armazenamento, a enzima manteve 70% da sua atividade inicial após 7 dias quando estocada sob refrigeração (geladeira 6 °C).

A imobilização da lipase em carvão ativado foi um processo muito rápido e simples, indicando que o processo de imobilização por adsorção física foi eficaz. O rendimento de imobilização foi de 89% e 100% nas condições experimentais ótimas para lipase de *A. niger* e CalB, respectivamente. A

concentração otimizada e o tempo de reação da etapa de imobilização foram determinados como $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e 120 min, respectivamente. O carvão ativado da palha de cana-de-açúcar pode potencialmente ser empregado na imobilização de lipases, visto que as enzimas imobilizadas apresentaram boa atividade enzimática. A isoterma de Langmuir ajustou-se aos dados de equilíbrio de adsorção das lipases no CA e mostrou adsorção favorável para as enzimas imobilizadas. A caracterização do biocatalisador permitiu avaliar as forças envolvidas na ligação enzima/suporte, permitindo-nos compreender este processo. O DRX mostra que a presença das enzimas não promoveu alterações significativas nos difratogramas. O FTIR mostra imobilização bem-sucedida. Portanto, devido ao baixo custo e às características físico-químicas favoráveis, o carvão ativado pode ser um suporte promissor para a imobilização de enzimas para diversas aplicações biotecnológicas e industriais.

O processo de imobilização utilizando como suporte a nanopartícula de ferrita de níquel foi mais eficaz utilizando a imobilização por ligação covalente, enquanto a adsorção com carvão ativado obteve bons resultados tanto para lipase de *A. niger* quanto para enzima comercial (CalB). Portanto, a imobilização por ligação covalente utilizando a ferrita de níquel modificada é um método promissor, a fim de obter um biocatalisador com a vantagem de uma separação simples utilizando apenas uma força eletromagnética, além de ser um suporte inédito para imobilização de lipases. Em relação ao suporte de nanopartículas de NiFe_2O_4 . A imobilização por ligação covalente foi realizada utilizando glutaraldeído como agente de acoplamento em duas concentrações (0,25 e 2,5%), onde a maior concentração foi mais eficiente, obtendo o rendimento de imobilização de 99,8% e maior atividade enzimática ($225,5 \text{ U g}_{\text{bio}}^{-1}$). A caracterização das amostras através de espectroscopia FTIR, análises SEM, TPD- NH_3 e VSM determinaram o sucesso da modificação das nanopartículas magnéticas e a imobilização bem sucedida da lipase de *A. niger* nas nanopartículas. A lipase imobilizada em nanopartículas funcionalizadas de NiFe_2O_4 apresenta grande potencial para uso comercial devido à sua simplicidade e utilização por separação magnética. Além disso, o desenvolvimento de novos biocatalisadores abre muitas possibilidades dentro da biocatálise. As nanopartículas de NiFe_2O_4 podem servir como suporte para

a imobilização enzimática e trazer vantagens, sendo que vale a pena investigar mais para a imobilização da lipase.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar um material compósito de ferrita de níquel e carvão ativado, a fim de verificar se existe efeito sinérgico entre os dois.
- ✓ Avaliar a imobilização da lipase com outros sistemas de ferritas tais como Mn-Zn, ferrita de potássio, ferrita de cálcio, ferrita de zinco, entre outras;
- ✓ Analisar diferentes concentrações do agente silano ou do agente funcionalizador;
- ✓ Testar os biocatalisadores em estudo de aplicações, como na hidrólise de óleos.

REFERÊNCIAS

AGHABEIGI, F. et al. Immobilization of lipase on the graphene oxides magnetized with NiFe₂O₄ nanoparticles for biodiesel production from microalgae lipids. **Process Biochemistry**, v. 126, p. 171–185, 1 mar. 2023.

AL-HAMAMRE, Z. et al. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. **Fuel**, v. 96, p.70-76. 2012.

ALMEIDA, A. F. de et al. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. **Process Biochemistry**, v. 65, September, p. 71–80, 2018.

ALMEIDA, L. C. et al. Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 124–129, 1 out. 2017.

ALVES, L. S. et al. Use of activated carbon obtained from sugarcane straw for PAH adsorption - a comparative study with commercial materials. **Environmental technology**, v. 43, n. 6, p. 861–875, Aug. 2022.

ANAND, A.; WEATHERLEY, L. R. The performance of microbial lipase immobilized onto polyolefin supports for hydrolysis of high oleate sunflower oil. **Process Biochemistry**, v. 68, n. September 2017, p. 100–107, 2018.

ANDRADE, P. et al. Avaliação da estabilidade da lipase de *Aspergillus niger* em soluções aquosas de Líquidos Iônicos da família das colinas. In. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 12., 2016. Rio Grande do Sul. **Resumos...** Rio Grande do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2016.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16–34, mar. 2018b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816561830018X>. Acesso em: 10 set. 2019.

ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles **International Journal of Biological Macromolecules Elsevier B.V.**, 15 out. 2018.

ASHJARI, M. et al. Application of multi-component reaction for covalent immobilization of two lipases on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles; production of biodiesel from waste cooking oil. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 156–167, 1 mar. 2020.

ATABANI, A. E. et al. Valorization of spent coffee grounds into biofuels and value-added products: Pathway towards integrated bio-refinery. **Fuel**, v. 254, 15 out. 2019.

ATACAN, K. et al. Efficiency of glucose oxidase immobilized on tannin modified NiFe₂O₄ nanoparticles on decolorization of dye in the Fenton and photo-biocatalytic processes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 382, 1 set. 2019.

ÁVILA, S. N. S. et al. Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 1–7, 15 abr. 2019.

AZIS, W.; DE ARAÚJO, G. Alimentos energéticos alternativos para suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n° 1, p.384-394, Janeiro/fevereiro 2007.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of β -amino ester compounds. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1420–1433, 1 out. 2016.

BAKER, S. E. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v. 44, p. 17–21, 2006. Disponível em: https://academic.oup.com/mmy/articleabstract/44/Supplement_1/S17/1746935. Acesso em: 18 mar. 2020.

BALOGH, K. A.; UPAICHIT, A.; CHEIRSILP, B. Use of low-cost substrates for cost-effective production of extracellular and cell-bound lipases by a newly isolated yeast *Dipodascus capitatus* A4C. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 1 maio 2019.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p.175-185, nov. 2012.

BELOBRAJDIC, D. P. et al. **Cereal based diets modulate some markers of oxidative stress and inflammation in lean and obese Zucker rats**. Disponível em: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/8/1/27>. Acesso em: 1 abr. 2020.

BEN BACHA, A. et al. Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 409–417, 1 mar. 2018.

BERG, M. J.; TYMOCZKO, L. J.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5 ed. [S.l.]: Gen Grupo Editorial Nacional Participacoes, 2004.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. [S.l.]: Elsevier, 2019.

BHARTI, M. K. et al. Purification and Characterization of Lipase From *Aspergillus japonicus*: A Potent Enzyme for Biodiesel Production. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 2, p. 151–156, 4 abr. 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40009-013-0112-8>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules Elsevier B.V.*, 1 dez. 2018.

BINHAYEEDING, N. et al. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, 2020.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial**. [S.l.]: Edgard Blücher, 2001. v.2, p. 1-540,

BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 255–266, 1 jul. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRITO, M. J. P. et al. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421–428, 1 fev. 2017.

BRITO, M. J. P. et al. Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: Effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 104391, 1 out. 2020.

C.A.O. GOMES. **Producao de enzimas despolimerizantes por fermentacao em meio semi-solido por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Producao_de_enzimas_despolimerizantes_po.html?id=_7eZwEACAAJ&redir_esc=y. Acesso em: 31 mar. 2020.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes**. [S.l.]: Wiley, 2005. 563 p.

CAO, X.; LIAO, L.; FENG, F. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Trichosporon* sp. and its application in enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **LWT - Food Science and Technology**, p. 118. set. 2020

CARVALHO, P. D. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614–621, 2005. Disponível em: <http://www-org.tu-graz.ac.at>. Acesso em: 30 jul. 2020.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.

181–188, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000100031&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 4 set. 2019.

COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308–8314, 2010.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 30 ago. 2016. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6518&nomeArquivo=RV20160296.pdf. Acesso em: 31 ago. 2019.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. A. Potencial Catalítico de Lipases Ligadas ao Micélio de Fungos Filamentosos em Processos de Biotransformação. **Quim. Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

COSTA, J. A. V. et al. Advances in Solid-State Fermentation. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 1–17.

COSTA, T. M. et al. Lipase Production by *Aspergillus Niger* Grown in Different Agro-Industrial Wastes by Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 02, p. 419–427, jun. 2017. Disponível em: www.abeq.org.br/bjche. Acesso em: 13 jul. 2020.

COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, 2000.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. microbiol**, p. 314–7, 1995.

CULLIT, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2 ed [S.l.]: IEEE Press Editorial Board, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DANTAS, É. M.; LINS DE AQUINO, L. C. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n. 1, p. 81–87, 2010.

DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.** 1999. 53:315–51, 1999.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate for L-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 188–196, 2018.

DOS SANTOS, E. A. L. et al. Lipase de *Aspergillus niger* obtida a partir da fermentação do resíduo de mangaba: Caracterização bioquímica das enzimas livre e imobilizada em matriz de sol-gel. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 24 fev. 2017. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/29887>. Acesso em: 25 mar. 2020.

DUMITRESCU, A. M. et al. Study of the chelating/fuel agents influence on NiFe₂O₄ samples with potential catalytic properties. [S.l.]: **Elsevier**, 2013.

DURÁN, C. A. A.; et al. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Rev. Virtual Quim.** 9 (1), nov. 2017. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br>. Acesso em: 2 abr. 2020.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 113–125, 1 mar. 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X02001249>. Acesso em: 4 set. 2019.

ELHUSSINY, N. I. et al. Assessment of waste frying oil transesterification capacities of local isolated *Aspergilli* species and mutants. **Mycoscience**, v. 61, n. 3, p. 136–144, 1 maio 2020.

FALONY, G. et al. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, 44 (2) 235–240 (2006).

FARINAS, C. S.; et al. **Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1031069/desenvolvimentos-em-fermentacao-em-estado-solido-para-producao-de-enzimas-de-interesse-agroindustrial>. Acesso em: 17 mar. 2020.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 68–76, 1 jun. 2021.

FENG, K. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. **Bioresource Technology**, v. 298, 1 fev. 2020.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061–1067, 2008.

FERREIRA, I. M. et al. Ethylic Biodiesel Production Using Lipase Immobilized in Silk Fibroin-Alginate Spheres by Encapsulation. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 1, p. 269–280, 25 jan. 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10562-016-1917-0>. Acesso em: 21 jul. 2020.

FRUSTERI, F. et al. Multifunctionality of Cu–ZnO–ZrO₂/H-ZSM5 catalysts for the one-step CO₂-to-DME hydrogenation reaction. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 162, p. 57–65, 1 jan. 2015.

GAUTAM, A. K. , S. S. A. S. and B. Rekha. **Diversity, pathogenicity and toxicity of Aspergillus niger: an important spoilage fungi**. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/270451057_Diversity_pathogenicity_and_toxicity_of_AspERGILLUS_niger_an_important_spoilage_fungi. Acesso em: 18 mar. 2020.

GE, X.; VASCO-CORREA, J.; LI, Y. **Solid-State Fermentation Bioreactors and Fundamentals**. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 381–402.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241–253, 1 abr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117305674>. Acesso em: 27 abr. 2019.

GONÇALVES, G. R. F. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 114–123, 1 dez. 2021.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.68,n.1,p.1–21,1jan.2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111771000233X>. Acesso em: 30 ago. 2019.

GÜY, N. Papain Immobilization on NiFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles Functionalized with Gallic Acid and Microwave Assisted Digestion of Bovine Serum Albumin. **Celal Bayar University Journal of Science**, v. 14, n. 4, p. 449–454, 2018.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

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

HOLA, K. et al. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. [S.l.]: **Elsevier**, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015000282>. Acesso em: 22 jul. 2020.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 1 jun. 2005.

IBRAHIM, A. S. S. et al. Enhancement of Alkaline Protease Activity and Stability via Covalent Immobilization onto Hollow Core-Mesoporous Shell Silica Nanospheres. **International Journal of Molecular Sciences** 2016, Vol. 17, Page 184, v. 17, n. 2, p. 184, 29 jan. 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/184/htm>. Acesso em: 23 out. 2022.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396 – 403. 1998.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, jan. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610717300809>. Acesso em: 30 ago. 2019.

KAREEM, S. O. et al. Lipase purification *Aspergillus flavus* PW2961 magnetic nanoparticles. **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 77, 24 abr. 2017. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/155273>. Acesso em: 4 maio. 2019.

KIM, H.; KWON, J. Y. Enzyme immobilization on metal oxide semiconductors exploiting amine functionalized layer. **RSC Advances**, v. 7, n. 32, p. 19656–19661, 31 mar. 2017. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra01615h>. Acesso em: 12 set. 2022.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, n. 1, p. 1, 2013.

KUMAR, A. et al. Industrial applications of fungal lipases: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1142536, 28 abr. 2023.

KUMAR SHARMA, A.; SHARMA, V.; SAXENA, J. A Review Paper on Properties of Fungal Lipases. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 5, n. 12, p. 123–130, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.512.014>. Acesso em: 23 mar. 2020.

LANKA, S.; TRINKLE, T. Screening and Isolation of Lipase Producing Fungi from Marine Water Obtained from Machilipatnam Coastal Region. Available online on www.ijppr.com **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 9, n. 7, p. 928–932, 2017. Disponível em: www.ijppr.com. Acesso em: 18 mar. 2020.

LATOUR, R. A. The Langmuir isotherm: a commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. **Journal of biomedical materials research**. Part A, v. 103, n. 3, p. 949–958, 1 mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24853075/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

LAZARI, S. A. Caracterização bioquímica da atividade lipásica de *Scytalidium thermophilum* RP-250: uma linhagem hipersecretora de lipases, 2010. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

LEAL, E. et al. Avaliação da formação do híbrido $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e sua performance na imobilização da GOX. **Revista Materia**, v. 23, n. 1, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762018000100403&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 4 ago. 2020.

LEE, J. H. et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100248, 1 set. 2019.

LI, Q. et al. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe_3O_4 nanoparticles. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–7, 30 ago. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09897-5>. Acesso em: 1 nov. 2022.

LI, Y. et al. Activation of a Carbon Support Through a Two-Step Wet Oxidation and Highly Active Ruthenium–Activated Carbon Catalysts for the Hydrogenation of Benzene. **ChemCatChem**, v. 6, n. 2, p. 572–579, 1 fev. 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cctc.201300873>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LIMA, T. de. **Modelo de inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná,, 2009. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/24023>. Acesso em: 30 abr. 2024.

LIPASE Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2024 – 2029). Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lipase-market>. Acesso em: 17 jan. 2022.

LIU, G. et al. Purification and Characterization of a Lipase with High Thermostability and Polar Organic Solvent-Tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. **Lipids**, v. 50, n. 11, p. 1155–1163, 28 nov. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-015-4052-6>. Acesso em: 25 mar. 2020.

LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 **Biotech**, v. 7, n. 1, p. 44, maio 2017.

LONAPPAN, L. et al. Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, p. 985–994, 2018

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005.

LOPEZ-HERNANDEZ, A.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G. Lipase-catalyzed Transesterification of Medium-chain Triacylglycerols and a Fully Hydrogenated Soybean Oil. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 6, p. c365–c372, 31 maio 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11430.x>. Acesso em: 30 jul. 2020.

MACEDO, L. N. et al. Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. **Biotechnology**, v. 1. 1-6. 2009.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and Future Applications of Lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–218, set. 1985. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.1985.10647813>. Acesso em: 30 ago. 2019.

MALA, J. G. S. et al. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247–53, ago. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878664>. Acesso em: 12 maio. 2019.

MANDELS, M. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 9, p. 2009–2026, 1 set. 1981. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.260230907>. Acesso em: 13 jul. 2024.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942–1947, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 14 jul. 2020.

MATANO, C.; MEISWINKEL, T. M.; WENDISCH, V. F. Amino Acid Production from Rice Straw Hydrolyzates. In: **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 493–505.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. **Fungal lipases: a review**. Disponível em: <http://www.led.uni-stuttgart.de>. Acesso em: 23 mar. 2020.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications Separation and Purification Reviews. **Taylor and Francis**, 2020. . Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15422119.2018.1564328>. Acesso em: 26 jul. 2020.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of airflow rate on enzyme production in packed bed bioreactors. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 63–75, jul. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308515000395>. Acesso em: 7 abr. 2019.

MENDES, ADRIANO A.; OLIVEIRA, P. C. DE; CASTRO, H. F. DE; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486–1490, 1 fev. 2009.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Disponível em: https://biotechengineeringuvraj.files.wordpress.com/2008/02/solid-state-fermentation-bioreactors_-_fundamentals_of_design__operation_by_mitchellkrieger__berovic.pdf. Acesso em: 22 mar. 2019.

MOHAMAD, N. R. et al. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes**. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2015.1008192>. Acesso em: 22 out. 2022.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipases a and b from *Candida antarctica* immobilized onto magnetic nanoparticles. Improvement of biocatalysts' performance under ultrasonic irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, 2 nov. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31752306/>. Acesso em: 31 maio. 2021.

MORENO-CASTILLA, C.; LÓPEZ-RAMÓN, M. V.; CARRASCO-MARÍN, F. Changes in surface chemistry of activated carbons by wet oxidation. **Carbon**, v. 38, n. 14, p. 1995–2001, 1 jan. 2000.

MOSAYEBI, M. et al. Amine, thiol, and octyl functionalization of GO-Fe₃O₄ nanocomposites to enhance immobilization of lipase for transesterification. **Renewable Energy**, v. 154, p. 569–580, 1 jul. 2020.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M.; SRINIVAS, P. Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1246–1249, 1 ago. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2142>. Acesso em: 23 mar. 2020.

MURUCI, L. Produção e caracterização de lipase de *aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria. 2012. 127 f. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 201. Disponível em: <http://eol.org/pages/2920814/details>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MURUCI, L. N. M. et al. **Produção de lipase de *aspergillus niger* utilizando co-produtos da indústria de refino de óleos**. Búzios, Rio de Janeiro: COBEQ, 2012.

NAKAJIMA-KAMBE, T. et al. Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone). **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 2, p. 139–144, 2012.

NARANJO, J. C. et al. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 166–171, set. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6.ed. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1Zjx6kNJYzEsiVd6qBz9If-Vls3fiMOLx/view?ts=5dbc871d>> Acesso em: 31 mar. 2020.

NEMA, A. et al. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 82, 24 dez. 2019. Disponível em: <<https://BNRC.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0125-7>>. Acesso em: 14 out. 2019.

NGUYEN, V. H. et al. Activated carbon with ultrahigh surface area derived from sawdust biowaste for the removal of rhodamine B in water. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 101811, 1 nov. 2021.

OLIVEIRA, F. et al. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3583–3589, 1 ago. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7544>. Acesso em: 18 mar. 2020.

OLIVEIRA, F. et al. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 268–277, 1 mar. 2017a.

OLIVEIRA, F. et al. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1123–1132, 9 jul. 2017b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28488139>. Acesso em: 14 out. 2019.

OLIVEIRA REINEHR, C. et al. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol Lipases, 2016. p. 97–115.

ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, p. 97–109, 2012.

OSUNA, Y. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. **Bioprocess Biosyst Eng**, p. 1437–1445, 2015a.

OSUNA, Y. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 2015 38:8, v. 38, n. 8, p. 1437–1445, 11 mar. 2015b. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-015-1385-8>. Acesso em: 6 jul. 2021.

ÖZÇELİK, B. et al. High speed processing of NiFe_2O_4 spinel using a laser furnace. **Journal of Materiomics**, v. 6, n. 4, p. 661–670, 1 dez. 2020.

PALIMI, M. J. et al. Surface modification of Fe_2O_3 nanoparticles with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS): An attempt to investigate surface treatment on surface chemistry and mechanical properties of polyurethane/ Fe_2O_3 nanocomposites. **Applied Surface Science**, v. 320, p. 60–72, 30 nov. 2014.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, mar. 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02001213>. Acesso em: 12 maio. 2020.

PASHANGEH, K. et al. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 300–307, 1 dez. 2017.

PEREIRA, E. B. et al. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91–93, p. 739–52, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11963902>. Acesso em: 31 mar. 2020.

PITOL, L. O. et al. Optimization studies to develop a low-cost medium for production of the lipases of *Rhizopus microsporus* by solid-state fermentation and scale-up of the process to a pilot packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 37–47, nov. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511317306281>. Acesso em: 10 set. 2019.

PRABANINGTYAS, R. K. et al. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. **Energy Procedia**, v. 153, p. 242–247, out. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876610218308221>. Acesso em: 28 set. 2019.

PRINGELS, L. et al. Abundant plasma protein depletion using ammonium sulfate precipitation and Protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1089, n. April, p. 43–59, 2018.

PUNEKAR, N. S. **Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. Singapore: Springer, 2018.

PUTRI, D. N. et al. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. In: *Energy Reports*, **Anais...**, 2020.

QUILLES JUNIOR, J. C. et al. Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 12, p. 1933–1943, 2016.

RAJESH BANU, J. et al. **Biorefinery of spent coffee grounds waste: Viable pathway towards circular bioeconomy**. [S.l.]: Elsevier, 2020.

RAMANI, K. et al. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 435–445, 1 mar. 2012.

REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *aspergillus niger* e *aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, mar. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868608001000>. Acesso em: 30 ago. 2019.

REMONATTO, D. et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 1 mar. 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511322000046>. Acesso em: 17 jan. 2022.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agroindústria**. [S.l.: s.n.], 2014. v. 4. p. 529–530. Disponível em: <http://openaccess.blucher.com.br/article-list/biotecnologia-aplicada-a-agro-e-industria-326/list#articles>. Acesso em: 1 nov. 2022.

RESENDE, R. R. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agroindústria**. Editora Blucher, 2017b. v.4, p. 529–568.

RIBEIRO, N. F. P.; HENRIQUES, C. A.; SCHMAL, M. Copper-based Catalysts for Synthesis of Methylamines: The Effect of the Metal and the Role of the Support. **Catalysis Letters** 2005 104:3, v. 104, n. 3, p. 111–119, nov. 2005.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10562-005-7939-7>. Acesso em: 1 nov. 2022.

RIOS, N. S. et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99–120, 1 dez. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135951131831081X>. Acesso em: 30 ago. 2019.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 197–203, 1 mar. 2003.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 1 set. 2019.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.

RUI WESENDONCK, W. et al. Valor nutricional e energia metabolizável de subprodutos do trigo utilizados para alimentação de suínos em crescimento. **Pesq. agropec. bras**, n. 2, p. 203–210, 2013.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; SINGH DUHAN, J. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, p. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SALGADO, C. A.; DOS SANTOS, C. I. A.; VANETTI, M. C. D. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101509, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429221006349>. Acesso em: 9 jan. 2022.

SALGADO, J. M. et al. Enhancing the Bioconversion of Winery and Olive Mill Waste Mixtures into Lignocellulolytic Enzymes and Animal Feed by *Aspergillus uvarum* Using a Packed-Bed Bioreactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 42, p. 9306–9314, 28 out. 2015. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b02131>. Acesso em: 7 abr. 2019.

SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, Md. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**, 2016.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, 1 jan. 2003a.

SAXENA, R. K. et al. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239–247, 31 out. 2003b. .

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. Disponível em: https://www.academia.edu/31932965/Biotecnologia_Industrial_Vol_2_Willibaldo_Schmidell. Acesso em: 26 abr. 2024.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002. 59:426–435

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6250–6261, 8 jul. 2013.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.

SHARMA, G. et al. Activated Carbon as Superadsorbent and Sustainable Material for Diverse Applications. **Adsorption Science and Technology**, 2022.

SHARMA, P. et al. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369–377, 2017.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 2001.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 1 dez. 2001b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975001000866?via%3Di> hub. Acesso em: 31 ago. 2019.

SHOW, P.-L. et al. Review of Microbial Lipase Purification Using Aqueous Two-phase Systems. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 19–29, 2015. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=19&issue=1&spage=19>. Acesso em 31ago. 2019.

SHU, Z.-Y.; YANG, J.-K.; YAN, Y.-J. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 96–101, 1 jan. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872207507600077>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, 15 jan. 2012. .

SILVEIRA, F. J. L. *et al.* Activated Carbon from Renewable Sugarcane Straw: Support for Ru catalyst in glycerol hydrogenolysis to 1,2 Propanodiol, Ethyleneglycol and Propanols. **Chemistry Select**, v. 5, n. 42, p. 13376–13386, 13 nov. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/slct.202004058>. Acesso em: 25 fev. 2023.

SILVEIRA, C. M. da; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 805–811, out. 2007.

SJAHFIRDI, L.; NASIKIN, M. Protein identification using fourier transform infrared (ftir). **IJRRAS**, v. 10, n. 3, 2012. Disponível em: www.arpapress.com/Volumes/Vol10Issue3/IJRRAS_10_3_06.pdf418. Acesso em: 25 fev. 2023.

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, P. S. Enzyme Immobilization Methods and Applications in the Food Industry. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. Elsevier, 2019. p. 645–658.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452072116300144>. Acesso em 25 Jan. 2020.

SODHI, A. S. *et al.* Insights on sustainable approaches for production and applications of value added products. **Chemosphere**, v. 286, p. 131623.

SORTE, S. *et al.* Study of fame production from waste cooking oil: Operation in batch and continuous regime with regeneration of enzyme catalyst. In: Energy Reports, **Anais...**, 2019.

SUMARSIH, S. *et al.* Carbon and Nitrogen Sources for Lipase Production of *Micrococcus* sp. Isolated from Palm Oil Mill Effluent Contaminated Soil. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci**, v. 217, 2018.

TACIN, M. V. *et al.* Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 369–378, 1 jan. 2019.

TAN, C. H. *et al.* Novel lipase purification methods - a review of the latest developments. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 31–44, 2015.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBio Eng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157–166, 4 out. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cben.201900016>. Acesso em: 21 jul. 2020.

VAGHARI, H. *et al.* Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, 38, p. 223 – 233. 2016.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–85, 15 jan. 2006. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/9/index.html>. Acesso em: 2 set. 2019.

VEERAMALAI, S. *et al.* Development of organic porous material from pineapple waste as a support for enzyme and dye adsorption. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114823, 1 jul. 2022.

VELOSO, E. C. T. *et al.* **Lipase production using agro-industrial by-product by solid-state fermentation by aspergillus niger mutant 11t53a14.** Disponível em: <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-sheb-2019/papers/-lipase-production-using-agro-industrial-by-product-by-solid-state-fermentation-by-aspergillus-niger-mutant-11t53a14>. Acesso em: 12 jul. 2020.

WANG, J. *et al.* Research on quantifying the hydrophilicity of leached coals by FTIR spectroscopy. **Physicochemical Problems of Mineral Processing**, v. 53, n. 1, p. 227–239, 1 ago. 2016. Disponível em: <https://www.journalssystem.com/ppmp/Research-on-quantifying-the-hydrophilicity-of-leached-coals-by-FTIR-spectroscopy,63784,0,2.html>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ZAVARISE, J. P.; PINOTTI, L. M. Avanços em caracterização bioquímica de lipases microbianas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 104942897, mar. 2020.

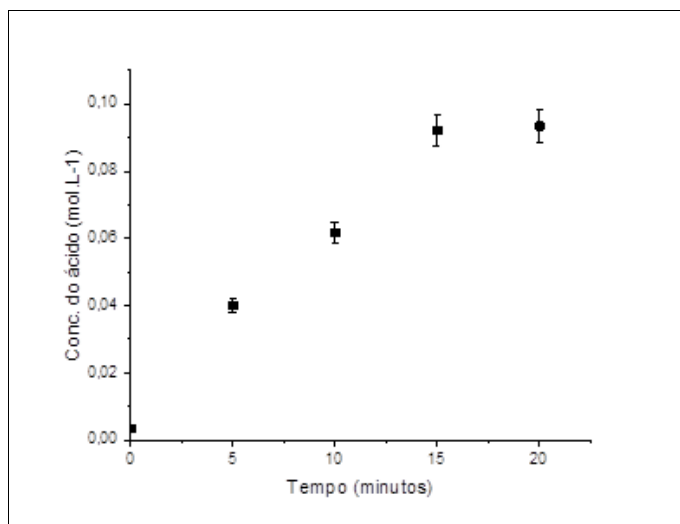
ZHAO, J. *et al.* Green synthesis of polydopamine functionalized magnetic mesoporous biochar for lipase immobilization and its application in interesterification for novel structured lipids production. **Food Chemistry**, v. 379, p. 132148, 15 jun. 2022.

ZHENG, H. *et al.* Solvothermal synthesis of octahedral NiFe₂O₄ nanocrystals and catalytic properties for the reduction of some aromatic nitrocompounds. **Materials Chemistry and Physics**, v. 158, p. 82–88, 5 maio 2015.

ZHOU, Z. *et al.* Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, p. 133–141, 2012.

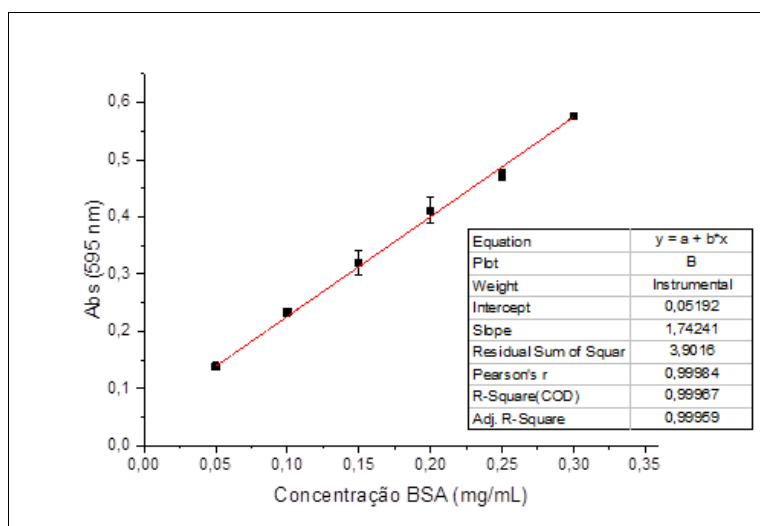
APÊNDICE- DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Figura 37 -Cinética de reação de hidrólise enzimática



Fonte: O autor, 2024

Figura 38 -Determinação do teor de proteína - Gráfico da curva padrão de albumina sérica bovina (BSA)



Fonte: O autor, 2024