Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

Tatiane de Souza Ribeiro

Produção de lipase por *Aspergillus niger* em farelo de algodão, trigo e óleo de mamona: Desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados

Rio de Janeiro
2024

Tatiane de Souza Ribeiro

Produção de lipase por *Aspergillus niger* em farelo de algodão, trigo e óleo de mamona: Desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos e tecnologia ambiental.

Orientador (as): Prof.ª Drª. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana.

Prof.ª Drª. Luciana da Cunha Costa.

Prof.ª Drª. Eliane Pereira Cipolatti.

Rio de Janeiro

2024

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

R484 Ribeiro, Tatiane de Souza.

Produção de lipase por *Aspergillus niger* em farelo de algodão, trigo e óleo de mamona: Desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados. – 2024.
109 f.

Orientador (a): Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana.
Luciana da Cunha Costa
Eliane Pereira Cipolatti

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química.

1. Lipase – Teses. 2. *Aspergillus niger* – Teses. I. Sant'Ana, Gizele Cardoso Fontes. II. Costa, Luciana da Cunha. III. Cipolatti, Eliane Pereira 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.

Tatiane de Souza Ribeiro
Assinatura

18 de fevereiro de 2025
Data

Tatiane de Souza Ribeiro

Produção de lipase por *Aspergillus niger* em farelo de algodão, trigo e óleo de mamona: Desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Bioprocessos e Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 01 de novembro de 2024.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª D Cardoso Fontes Sant'Ana (Orientadora)
Instituto

_____

Prof.ª Drª. Luciana da Cunha Costa (Orientadora)
Instituto de química – UERJ-ZO

_____

Prof.ª Drª. Eliane Pereira Cipolatti (Orientadora)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. M ereira Langone
Instituto de química - UERJ

Documento assinado digitalmente
gov.br ERIKA CRISTINA GONCALVES AGUIEIRAS
Data: 12/02/2025 15:57:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof.ª Dra. Érika Cristina Gonçalves Aguieiras
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
gov.br IVANA LOURENCO DE MELLO FERREIRA
Data: 14/02/2025 18:00:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof.ª Dra. Ivana Lourenço de Mello Ferreira
Instituto de química - UERJ

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado saúde e força interior para superar as dificuldades.

Agradeço à minha mãe, Regina, minha rainha, maior inspiração e força. Nenhuma palavra pode expressar o quanto sou grata por seu amor incondicional, por estar ao meu lado em cada passo dessa caminhada. Ao meu pai, Nelson, por sua sabedoria, amizade e encorajamento ao longo da minha vida. À minha irmã Priscila pela amizade e companheirismo de sempre, por transmitir força, e por sempre me ajudar em tudo! À minha sobrinha-afilhada Alice por trazer alegria e luz em minha vida! Meu namorado, Luan, por todo carinho do mundo, cuidado, paciência e por sempre me incentivar. Tenho muita admiração por todos vocês! Vocês são meu porto seguro, meus exemplos e maiores incentivadores! Obrigada por tudo!

Também agradeço às minhas orientadoras Luciana, Gizele e Eliane pela orientação, dedicação e por me ensinar a gostar mais ainda da pesquisa. Muito obrigada!

As amigas Nathália, Ezaine e Pamela, por sempre me apoiarem e incentivarem.

Aos órgãos de fomento à pesquisa – CAPES. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UERJ (PPG-EQ/UERJ).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RIBEIRO, Tatiane de Souza. **Produção de lipase por *Aspergillus niger* em farelo de algodão, trigo e óleo de mamona: Desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados**. 2024. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

RESUMO

A busca por soluções sustentáveis e de baixo custo na produção de enzimas tem ganhado destaque, especialmente com a utilização de coprodutos agroindustriais. Nesse contexto, o Cultivo em Estado Sólido (CES) mostra-se promissor para a produção de lipases. As cepas de *Aspergillus niger* são reconhecidas pela produção de lipases extracelulares e classificadas como "Geralmente Reconhecidas como Seguras" (GRAS). Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar uma estratégia de produção de lipase por *Aspergillus niger* em CES, utilizando farelo de algodão e uma mistura de farelo de algodão e trigo, ambos com e sem suplementação de óleo de mamona. Além disso, preparar biocatalisadores heterogêneos baseados na imobilização das lipases obtidas por CES em copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) e avaliar preliminarmente o emprego deste biocatalisador na hidrólise enzimática do óleo de mamona. Os experimentos da produção de lipase foram conduzidos em diferentes teores iniciais de umidade, suplementados com 2% de óleo de mamona e inoculados com 10^7 conídios/mL, a 32 °C por 48 horas. O copolímero Sty-DVB foi sintetizado por polimerização em suspensão aquosa, empregando como diluente uma mistura dos solventes tolueno e n-heptano (20:80 v/v), visando preparar partículas porosas. A imobilização da lipase no suporte Sty-DVB foi conduzida empregando as lipases produzidas por CES, além de uma solução comercial de lipase de *A. niger* para controle. O rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (Ra) foram determinados. Os biocatalisadores imobilizados foram submetidos a testes de hidrólise do óleo de mamona, realizando análise comparativa do desempenho entre os biocatalisadores produzidos neste trabalho e biocatalisadores heterogêneos comerciais, incluindo Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*), RM (*Rhizomucor miehei*) e 435 (lipase B de *Candida antarctica*). Os resultados mostraram que o suporte Sty-DVB apresentou uma área específica de 285,8 m²/g, sendo classificado como mesoporoso. A produção de lipase por *A. niger* em CES, utilizando farelo de algodão e óleo de mamona com 54,0% de umidade inicial, resultou na atividade máxima do estudo, atingindo 93,0 $U/g_{massa\ seca}$. Quando imobilizada no copolímero Sty-DVB, está lipase apresentou um rendimento de imobilização de 85,6%, Ra de 30% e eficiência de conversão na hidrólise do óleo de mamona de 45,0%. Dentre as lipases derivadas da composição de farelo de algodão, trigo e óleo de mamona com 58% de umidade inicial, obteve-se a maior atividade de 39,9 $U/g_{massa\ seca}$. A imobilização desta lipaseno copolímero Sty-DVB resultou em um RI de 98,2%, Ra de 17,1% e conversão na hidrólise do óleo de mamona de 36,0%. Esses resultados comparam-se aos alcançados para a imobilização da lipase comercial de *A. niger* no copolímero Sty-DVB, que resultou em um RI de 94,9%, Ra de 18,0% e conversão de 17,7% na hidrólise do óleo de mamona. Estes resultados indicam que as lipases de *A. niger* em CES e imobilizadas no suporte Sty-DVB mostraram-se competitivas frente à lipase comercial. A pesquisa enfatiza a importância da escolha de coprodutos e condições de CES na maximização da produção de lipases, destacando a sustentabilidade proporcionada pela utilização de coprodutos agroindustriais e óleo de mamona, promovendo princípios de economia circular.

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

RIBEIRO, Tatiane de Souza. **Productionof lipase by *Aspergillus niger* using cottonseed meal, wheat bran, and castor oil: Development of immobilized biocatalysts**. 2024. 109 f. Dissertation (Master's in Chemical Engineering) – Institute of Chemistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

ABSTRACT

The search for sustainable and low-cost solutions for enzyme production has gained prominence, especially with the use of agro-industrial by-products. In this context, solid-state culture (SSC) has shown promise for lipase production. *Aspergillus niger* strains are recognized for their production of extracellular lipases and are classified as "Generally Recognized as Safe" (GRAS). This study aimed to develop and evaluate a lipase production strategy by *Aspergillus niger* in SSC, using cottonseed meal and a mixture of cottonseed and wheat meal, both with and without castor oil supplementation. In addition, to prepare heterogeneous biocatalysts based on the immobilization of lipases obtained by SSC in styrene-divinylbenzene copolymer (Sty-DVB) and preliminarily evaluate the use of this biocatalyst in the enzymatic hydrolysis of castor oil. Lipase production experiments were carried out at different initial moisture contents, supplemented with 2% castor oil and inoculated with 10^7 conidia/mL, at 32°C for 48h. The Sty-DVB copolymer was synthesized by aqueous suspension polymerization, using a mixture of toluene and n-heptane (20:80 v/v) as diluent, aiming to prepare porous particles. Lipase immobilization on the Sty-DVB support was carried out using the lipases producedby SSC, in addition to a commercial solution of *A. niger* lipase as control. The immobilization yield (RI) and recovered activity (Ra) were determined. The immobilized biocatalysts were subjected to castor oil hydrolysis tests, performing a comparative analysis of the performance between the biocatalysts produced in this work and commercial heterogeneous biocatalysts, including Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*), RM (*Rhizomucor miehei*) and 435 (*Candida Antarctica* lipase B). The results showed that the Sty-DVB support presented a specific area of 285,8 m^2/g, being classified as mesoporous. The production of lipase by *A. niger* in SSC, using cottonseed meal and castor oil with 54% initial moisture, resulted in the maximum activity of the study, reaching 93,0 $U/g_{dry\ mass}$. When immobilized in the Sty-DVB copolymer, this lipase presented na immobilization yield of 85,6%, Ra of 30% and conversion efficiency in the hydrolysis of castor oil of 45,0%. Among the lipases derived from the composition of cottonseed meal, wheatand castor oilwith 58% initial moisture content, the highest activity of 39,9 $U/g_{dry\ mass}$ was obtained. The immobilization of this lipase in the Sty-DVB copolymer resulted in an RI of 98,2%, Ra of 17,1% and conversion in the hydrolysis of castor oil of 36,0%. These results are comparable to those achieved for the immobilization of the commercial lipase from *A. niger* in the Sty-DVB copolymer, which resulted in an RI of 94,9%, Ra of 18,0% and conversion of 17,7% in the hydrolysis of castor oil. These results indicate that the lipases from *A. niger* in SSC and immobilized in the Sty-DVB support were competitive against the commercial lipase. The research empha sizes the importance of choosing co-productsand SSC conditions in maximizing lipase production, highlighting the sustainability provided by the use of agro-industrial co-productsand castor oil, promoting circular economy principles.

Keywords: lipase; *Aspergillus niger*; solid-state fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema geral da reação da lipase..... 17
Figura 2 - Reações catalisadas pela lipase..... 18
Figura 3 - Arranjo de partículas sólidas e fase aquosa em CES com fungo filamentoso..... 24
Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de *Aspergillus niger*..... 29
Figura 5 - Representação da estrutura do ácido ricinoleico (RA)..... 35
Figura 6 - Imobilização de lipases via ativação interfacial em suportes hidrofóbicos..... 38
Figura 7 - Esquema da reação de polimerização de estireno-divinilbenzeno em suspensão aquosa..... 40
Figura 8 - Fluxograma da metodologia experimental da pesquisa..... 47
Figura 9 - Moinho de facas utilizado para cominuir o farelo de algodão..... 47
Figura 10 - Unidades experimentais do Cultivo em Estado Sólido para produção de lipase..... 52
Figura 11 - Arranjo experimental para avaliação da umidade inicial na produção de lipase..... 53
Figura 12 - Farelo de algodão puro e a mistura do farelo de algodão e trigo após secagem..... 54
Figura 13 - Etapas de agitação (A), filtração (B) e a obtenção do extrato enzimático (C)..... 55
Figura 14 - Unidade experimental empregada para a imobilização enzimática..... 57
Figura 15 - Processo experimental para hidrólise com óleo de mamona..... 61
Figura 16 - Composição química utilizada na reação de polimerização..... 80
Figura 17 - Distribuição de tamanhos de poros dos copolímeros Sty-DVB com razão Tol/n-Hep de 20/80..... 81
Figura 18 - Microscopia óptica das partículas de Sty-DVB com aumento de 4 vezes. 82
Figura19 - Microscopia eletrônica de varredura de Sty-DVB com diferentes ampliações..... 82
Figura 20 - Espectro de FTIR do copolímero Sty-DVB..... 83
Figura 21 - Curvas de TG (a) e de DTG (b) do copolímero Sty-DVB..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de Cultivo em Estado Sólido dos estudos selecionados para revisão da produção de lipase de *Aspergillus niger* entre os anos de 2018 a 2023..... 30

Tabela 2 - Teores de ácido graxo presentes no óleo de mamona..... 34

Tabela 3 - Composição do meio básico sólido de ativação do microrganismo..... 51

Tabela 4 - Principais parâmetros usados na preparação do copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB)..... 63

Tabela 5 - Composição centesimal das matérias-primas: farelo de trigo e farelo de algodão..... 67

Tabela 6 - Parâmetros experimentais e atividade lipásica de *A. niger* do CES em erlenmeyer e frasco plástico..... 69

Tabela 7 - Parâmetros de cultivo e atividade lipásica em diferentes formulações e umidades..... 72

Tabela 8 - Dados da literatura e do presente trabalho referente a produção de lipase por *A. niger* em diferentes condições de CES..... 74

Tabela 9 - Características morfológicas do suporte Sty-DVB..... 77

Tabela 10 - Parâmetros de solubilidade de Hildebrand..... 80

Tabela 11 - Características morfológicas do copolímero de estireno-divinilbenzeno e atividades enzimáticas dos biocatalisadores imobilizados..... 85

Tabela 12 - Avaliação de biocatalisadores imobilizados na conversão de óleo de mamona..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área (m^2/g)
ASAP	Analisador de área, volume e diâmetro de poros
CES	Cultivo em Estado Sólido
D	Diâmetro de poros (Å)
DVB	Divinilbenzeno
Eq.	Equação
Exp.	Experimento
FTIR	Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	Geralmente Reconhecidas como Seguras (Generally Recognized as Safe)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
RA	Ácido Ricinoleico
Ra	Retenção de atividade enzimática imobilizada
Sty	Estireno (Styrene)
TGA	Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	**OBJETIVOS**	16
1.1	**Objetivo geral**	16
1.2	**Objetivos específicos**	16
2	**REVISÃO DA LITERATURA**	17
2.1	**Lipase**	17
2.1.1	Definição	17
2.1.2	Propriedades e classificação	18
2.1.3	Estrutura e mecanismo catalítico	20
2.1.4	Fonte das lipases	21
2.1.5	Aplicação das lipases	22
2.2	**Cultivo em Estado Sólido (CES)**	23
2.2.1	Processo do Cultivo em Estado Sólido	23
2.2.2	Fatores que afetam o crescimento e atividade microbiana no Cultivo em Estado Sólido (CES)	26
2.2.3	Influência da umidade no Cultivo em Estado Sólido	27
2.2.4	Produção de lipase a partir de *Aspergillus niger* por CES	28
2.2.5	Farelo de algodão	32
2.2.6	Farelo de trigo	33
2.2.7	Óleo de mamona	33
2.3	**Imobilização enzimática**	36
2.3.1	Imobilização de lipases pelo método de adsorção	37
2.4	**Suporte polimérico**	39
2.4.1	Copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) por suspensão aquosa	39
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	43
3.1	**Materiais**	43
3.1.1	Reagentes	43
3.1.2	Equipamentos	45
3.2	**Métodos**	46

3.2.1 Preparo das matérias-primas..... 47
3.2.2 Caracterização da composição centesimal parcial..... 47
3.2.2.1 Determinação de umidade..... 48
3.2.2.2 Determinação de cinzas totais..... 48
3.2.2.3 Determinação de lipídios..... 49
3.2.2.4 Determinação dos sólidos totais..... 49
3.3 **Análise do óleo de mamona por cromatografia gasosa**..... 50
3.4 **Microrganismo**..... 50
3.5 **Estocagem, ativação e manutenção do microrganismo**..... 50
3.6 **Preparo do inóculo para o Cultivo em Estado Sólido**..... 51
3.7 **Produção e extração enzimática proveniente da *A. niger* por CES**..... 51
3.7.1 Produção de lipase: avaliação do reator de bancada do tipo de bandeja..... 51
3.7.2 Produção de lipase: avaliação da porcentagem de umidade inicial dos meios..... 52
3.7.3 Determinação do teor de umidade: inicial e final dos meios de cultivo..... 53
3.7.4 Determinação do teor de pH..... 54
3.7.5 Obtenção do extrato enzimático..... 54
3.8 **Determinação da atividade da lipase**..... 55
3.9 **Imobilização de lipase em copolímero Sty-DVB e avaliação do desempenho dos biocatalisadores imobilizados**..... 56
3.9.1 Imobilização de lipase *A. niger* ao copolímero Sty-DVB..... 56
3.9.2 Avaliação do desempenho dos biocatalisadores imobilizados em reações de hidrólise..... 59
3.9.2.1 Determinação da atividade hidrolítica e retenção de atividade de enzimas imobilizadas..... 59
3.9.2.2 Determinação da atividade de hidrólise dos biocatalisadores usando óleo de mamona..... 60
3.10 **Síntese e caracterização do suporte polimérico estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB)**..... 62
3.10.1 Síntese do suporte polimérico Sty-DVB..... 62
3.10.2 Caracterização físico-química do suporte polimérico..... 63
3.10.2.1 Rendimento da reação de polimerização..... 63
3.10.2.2 Microscopia óptica (MO)..... 63
3.10.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... 64

3.10.2.4 Determinação da área específica, volume e diâmetro médio de poros através de dados de adsorção de nitrogênio (ASAP)..... 64
3.10.2.5 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)..... 64
3.10.2.6 Análise Termogravimétrica (TGA)..... 65
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 66
4.1 **Determinação da composição centesimal parcial dos farelos de algodão e trigo**..... 66
4.2 **Produção de lipase de *A. niger* em Cultivo em Estado Sólido**..... 69
4.2.1 Avaliação do reator de bancada do tipo de bandeja..... 69
4.2.2 Avaliação da porcentagem inicial de umidade na produção de lipase..... 71
4.3 **Síntese e caracterização do suporte polimérico Sty-DVB**..... 76
4.4 **Imobilização da lipase de *Aspergillus niger* ao suporte Sty-DVB por adsorção**..... 84
4.4.1 Avaliação das lipases por *A. niger* produzidas em CES na imobilização enzimática..... 84
4.5 **Avaliação dos biocatalisadores imobilizados na reação de hidrólise do óleo de mamona**..... 91
CONCLUSÕES..... 95
PERSPECTIVAS..... 96
REFERÊNCIAS..... 97

INTRODUÇÃO

Processos enzimáticos têm se destacado pela eficiência em condições brandas de reação, alta seletividade e estabilidade, além de gerarem produtos mais puros e sustentáveis, substituindo catalisadores químicos tradicionais (Cipolatti *et al*., 2019). As lipases (triacil glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de ligações éster em triacilglicerídeos, gerando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol, além de reações como esterificação, transesterificação e interesterificação. Essas enzimas podem ser aplicadas em diversos segmentos, como nas indústrias alimentícia, de biocombustíveis e cosmética (Sampaio *et al*., 2022). Entretanto, a viabilidade econômica desses processos depende dos custos de produção das enzimas (Medeiros *et a*l., 2023).

O Cultivo em Estado Sólido (CES) se apresenta como uma alternativa eficaz para a produção de lipases, destacando-se principalmente, pelo alto rendimento e produtividade, baixa contaminação e uso de biorreatores simples e baixo custo (MEDEIROS *et al*., 2023). Esse método também simula o habitat natural dos fungos filamentosos, favorecendo a secreção de enzimas. O uso de coprodutos agroindustriais no CES promove sustentabilidade ao fornecer carbono, nutrientes e umidade a baixo custo, com pouco ou nenhum tratamento prévio (Ohara *et al*., 2018). Carvalho *et al*. (2023) destacam que, na produção de lipase, é essencial que esses coprodutos tenham um teor lipídico considerável, pois o tipo de lipídio usado como fonte de carbono é o principal fator que influencia a expressão da atividade enzimática.

O uso de diversos coprodutos agroindustriais pode promover o aproveitamento sustentável da biodiversidade brasileira, contribuindo para o descarte correto e agregando valoras matrizes (EMBRAPA, 2020). Entre os coprodutos utilizados como matérias-primas para a produção de enzimas estão farelo de soja, sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana (Ohara *et al*., 2018). Dentre eles, o farelo de algodão se destaca pela sua capacidade de induzir a produção de lipase, devido ao seu perfil lipídico rico em ácido linoleico, ácido oléico e ácido palmítico (Medeiros *et al*., 2023). Em 2024, o Brasil superou os EUA na produção de algodão, alcançando mais de 3,7 milhões de toneladas (ABRAPA, 2024). Outro coproduto que se destaca é o farelo de trigo, devido ao seu baixo teor de lignina e alto valor nutricional, maior porosidade que favorecem o crescimento microbiano e a produção enzimática (El-Ghonemy *et al*., 2020). Atualmente, o Brasil ocupa a 14ª posição na produção mundial de trigo, com uma previsão de 10,3 milhões de toneladas para a safra 2023/24 (CONAB, 2024).

O óleo de mamona, ou rícino, também é uma fonte de carbono eficaz para o cultivo de *A. niger*, destacando-se pela produção ampla no Brasil, biodegradabilidade e custo-benefício (Gonçalves *et al*., 2022). O Brasil, como segundo maior produtor de mamona, concentra 87% da área cultivada na Bahia (CONAB, 2023). Dutra *et al*., (2008) demonstraram que cultivos sólidos de *A. niger* com óleo de mamona (2% m/m) proporcionaram a maior atividade de lipase, atingindo 23,7 U/mL, superando outros óleos, como soja, oliva, milho e palma. Além disso, a reação de hidrólise enzimática do óleo de mamona pode ser conduzida em condições suaves, sem a necessidade de alta pressão, o que reduz o consumo de energia e minimiza a degradação dos produtos (Gupta, 2016; Rathod; Pandit, 2009).

As cepas do fungo filamentoso *Aspergillus niger* são amplamente reconhecidas por sua capacidade de produzir lipases extracelulares. Além disso, essas cepas são classificadas como 'Geralmente Reconhecidas como Seguras' (GRAS) (Ohara *et al*., 2018). A lipase específica 1,3 termoestável produzida por *A. niger* destaca-se por sua estabilidade, seletividade e tolerância ao glicerol, conferindo vantagens competitivas em biotransformações. Essa enzima é uma escolha potencial em aplicações industriais, principalmente nos setores de alimentos e química, sendo amplamente utilizada na modificação de triglicerídeos e produção de biodiesel (Feng *et al*., 2020; Yuan *et al*., 2020).

No entanto, a aplicação de enzimas livres enfrenta desafios como baixa estabilidade e impossibilidade de reuso. A imobilização enzimática é uma solução eficiente, pois permite a recuperação do biocatalisador, reduz o risco de contaminação e pode melhorar as propriedades enzimáticas, como estabilidade e atividade (Xing *et al*., 2019). Dentre os diferentes métodos, a adsorção em matrizes poliméricas se destaca pela simplicidade e baixo custo do processo (Urrutia *et al*., 2018). A utilização de suportes porosos no processo pode oferecer alta área específica e proteção contra condições adversas, podendo ser ajustados para garantir biocatalisadores estáveis e ativos (Souza *et al*., 2017; Pinto *et al*., 2018). Entre os copolímeros, o suporte de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) se destaca por sua matriz hidrofóbica e simplicidade de síntese, permitindo características físicas adequadas para a adsorção (Coutinho; Rezende, 2001; Cardoso *et al*., 2004; Ribeiro *et al*., 2022).

Neste contexto, o presente trabalho visa adequar a produção de lipase de *A. niger* em CES, utilizando farelos de algodão e trigo, com óleo de mamona como indutor da síntese da lipase. Além disso, foi produzido um suporte poroso de Sty-DVB visando à imobilização da lipase por adsorção. Por fim, os biocatalisadores imobilizados foram testados em reações de hidrólise com *p*-NFL e óleo de mamona, comparando com biocatalisadores comerciais amplamente utilizados, como Lipozyme 435, Lipozyme TL e Lipozyme RM.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Objetivo geral**

O trabalho teve como objetivo avaliar uma estratégia para a produção de lipase por *Aspergillus niger* em cultivo sólido, utilizando farelo de algodão e farelo de trigo com óleo de mamona como indutor. Além disso, buscou-se analisar a eficiência de biocatalisadores imobilizados por adsorção e realizar uma análise preliminar da conversão na hidrólise do óleo de mamona.

1.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar a variação da umidade para indução da produção de lipase por *A. niger*, utilizando diferentes composições: farelo de algodão puro e a mistura de farelo de algodão e farelo de trigo (1:1), suplementadas com óleo de mamona;
- Estudar o processo de imobilização das lipases produzidas por *A. niger* e a lipase comercial de *A. niger*, ambas imobilizadas no suporte de Sty-DVB por adsorção;
- Avaliar o emprego dos biocatalisadores imobilizados em reações de hidrólise, usando óleo de mamona como substrato, e comparar com biocatalisadores heterogêneos comerciais, como Lipozyme RM (lipase de *Rhizomucor miehei*), Lipozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica*) e Lipozyme TL (lipase de*Thermomyces lanuginosus*).

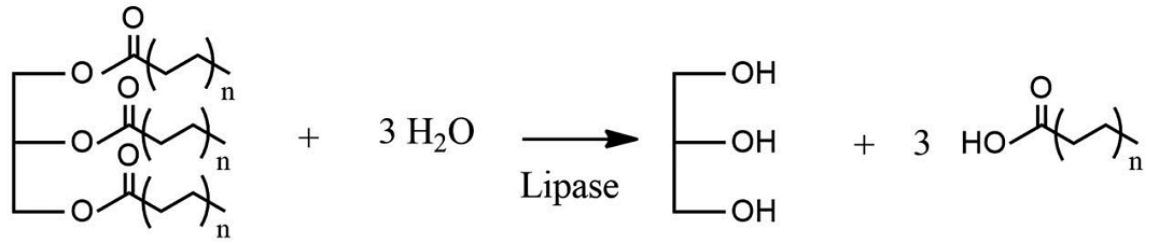
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 **Lipase**

2.1.1 Definição

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC.3.1.1.3) são enzimas que pertencem a classe de hidrolases capazes de catalisar a hidrólise de ligações éster de cadeia longa (principalmente triglicerídeos), formando os diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livrese glicerol em uma interface óleo-água (Figura 1) (Sampaio *et al*., 2022). A Figura 1 ilustra a ação catalítica da lipase.

Figura 1 - Esquema geral da reação da lipase

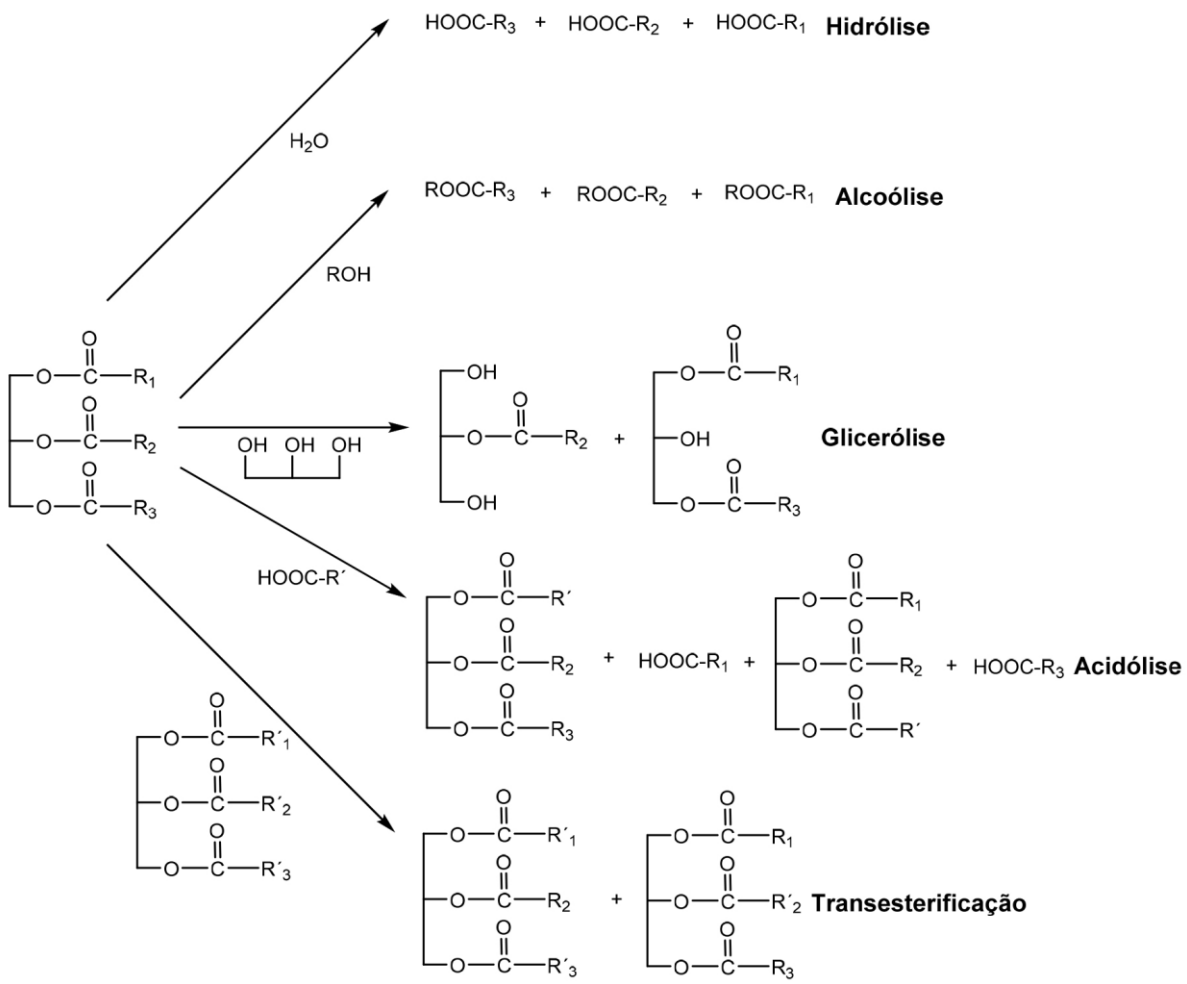


Triacilglicerol **Glicerol** **Ácido Graxo**

Fonte: Adaptado de Melani *et al*., 2020.

Na presença de baixas concentrações de água, estas enzimas são capazes de catalisar reações reversas como esterificação, alcóolise (transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um álcool), glicerólise (interesterificação do triacilglicerol com glicerol), acidólise (transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um ácido carboxílico), transesterificação (caracterizada pela troca de grupamentos acila entre dois acilgliceróis) (Figura 2) (Cortez *et al*., 2017; Monteiro *et al*., 2020) aminólise (síntese de amidas) e interesterificação, oximólise (adição de átomos de oxigênio a compostos orgânicos) e tiotransesterificação em solventes orgânicos anidros, sistemas bifásicos e em solução micelar, com especificidade quiral (Villeneuve *et al*., 2000). Na Figura 2 apresenta alguns exemplos de reações catalisadas por lipases.

Figura 2 - Reações catalisadas pela lipase



Fonte: Adaptado de Cortez *et al*., 2017; Castro *et al*., 2004.

2.1.2 Propriedades e classificação

As lipases catalisam diversas reações químicas, como hidrólise, esterificação e transesterificação, e são de grande interesse industrial pela sua capacidade de reconhecer umagama de substratos. Essas enzimas demonstram alta seletividade, incluindo enantiosseletividade, estereosseletividade e regiosseletividade, em variadas condições, como diferentes temperaturas, pH e meios reacionais (Ortiz *et al*., 2019; Monteiro *et al*., 2020). A enantiosseletividade das lipases permite discriminar entre enantiômeros em misturas racêmicas (Barros *et al*., 2010). A quiralidade da enzima restringe sua ação a substratos com orientações espaciais específicas, facilitando a criação de centros quirais e a resolução de racematos para a obtenção de ésteres e ácidos opticamente puros (Castro *et al*., 2004). A estereoespecificidade permite a discriminação entre enantiômeros, enquanto a

regiosseletividade, resultante da estrutura do centro ativo, possibilita a transformação seletiva de funções químicas semelhantes (Castro *et al*., 2004).

Para aplicações industriais, a especificidade da lipase é um fator importante. Essas enzimas podem exibir alta especificidade tanto em relação ao substrato, como ácidos graxos ou álcoois, quanto na diferenciação entre isômeros. As lipases podem ser classificadas em três grupos com base em sua especificidade, descritas a seguir (Castro *et al*., 2004; Barros *et al*., 2010; Ribeiro *et al*., 2011; Kapoor; Gupta, 2012).

I. As lipases não específicas quebram as moléculas de acilglicerole produzem ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilglicerídeos como intermediários. Esses intermediários são hidrolisados mais rapidamente do que o triglicerídeo, evitando seu acúmulo na reação. Esses produtos são semelhantes aos obtidos por catálise química, mas com menor degradação térmica devido à temperatura mais baixa na biocatálise. Exemplos dessas lipases incluem as produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp.* e *Thermomyces lanuginosus*.

II. Lipases específicas para as posições 1 e 3, liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triglicerídeos, formando ácidos graxos livres e di- ou monoglicerídeos. Por essa razão, produzem produtos com composições distintas daquelas obtidas por lipases não regiosseletivas ou mesmo por catalisadores químicos. Geralmente, a hidrólise de triglicerídeos para diglicerídeos ocorre de maneira muito mais rápida do que a hidrólise de diglicerídeos para monoglicerídeos. Exemplo dessas lipases: *Aspergillus niger, Mucor javanicus, Humicola lanuginosa, Rhizopus delemar, Rhizopus oryzae, Candida lipolytica, Rhizopus niveus, Yarrowia lipolytica e Penicillium roquefortii*.

III. Lipases específicas para ácidos graxos, como a de *Geotrichum candidum*, têm uma ação seletiva na hidrólise de ésteres com ácidos graxos de cadeia longa e duplas ligações cis no carbono 9, hidrolisando lentamente ésteres sem essa insaturação. Essa especificidade, embora rara, é valiosa para criar misturas de triacilglicerídeos, especialmente no setor de óleos e gorduras. A lipase de *Geotrichum candidum* é um dos exemplos mais estudados dessa característica.

2.1.3 Estrutura e mecanismo catalítico

As enzimas apresentam dobras muito semelhantes, apesar da falta de similaridade de sequência de aminoácidos. Comparações com a estrutura de raios-x revelam que a maioria compartilha o mesmo padrão de dobramento, denominado dobra de hidrolase α/β. Essa dobra é composta por uma folha β central, consistindo em até oito fitas β diferentes, conectadas por até seis hélices α. O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica formada por resíduos de serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. A serina está localizada em um pentapeptídeo altamente conservado GXSXG, onde ocorre o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster do substrato, iniciando a formação de um intermediário acil-enzima estabilizado por ligações de hidrogênio com resíduos da cavidade de oxiânion. O álcool é liberado, e o complexo acil-lipase é finalmente hidrolisado, liberando o ácido graxo e regenerando a enzima livre, completando o processo catalítico (Jaeger; Reetz, 1998; Illanes, 2008).

As lipases são enzimas cuja atividade aumenta na presença de interfaces lipídio-água, como em substratos micelares ou emulsionados. Esse aumento na atividade enzimática é causado por rearranjos estruturais específicos no sítio ativo da lipase (Illanes, 2008). Na ausência de tais interfaces, o sítio ativo da lipase é coberto por uma estrutura secundária conhecida como “tampa”. Essa tampa é composta por elementos de estrutura secundária, como hélices α e folhas β, que bloqueiam o acesso ao sítio ativo, tornando inacessível aos substratos. Quando a lipase se encontra em presença de uma interface lipídica, ocorre uma alteração conformacional significativa. A tampa se move, transformando a “estrutura fechada” da lipase em uma “estrutura aberta”. Essa mudança expõe uma superfície hidrofóbica ao redor do sítio ativo, permitindo a interação direta com a interface lipídica, funcionando como elemento de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica. A exposição dessa superfície hidrofóbica facilita a adsorção da lipase na interface lipídica, aumentando a eficiência da catálise da reação. A “tampa” das lipases pode variar em forma, tamanho e movimentação, dependendo da origem do microrganismo, podendo impactar a eficiência enzimática. A compreensão desse mecanismo pode ser utilizada para desenvolver novas estratégias de imobilização de lipases, empregando a ativação interfacial como princípio para técnicas de engenharia de lipases via imobilização direcionada (Fernandez-Lafuente *et al*., 1998; Jaeger; Reetz, 1998). Vale ressaltar que dependendo da fonte da lipase e das condições de produção, as lipases podem diferir nas características da tampa. Por exemplo, algumas lipases, como a de *Geobacillus thermocatenulatus*, possuem duas tampas,

enquanto outras, como a lipase B de *Candida antarctica*, têm tampas tão pequenas que não isolam completamente o sítio ativo do meio de reação (Adlercreutz, 2013; Sampaio *et al*., 2022).

2.1.4 Fonte das lipases

As lipases podem ser classificadas de acordo com suas fontes: microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), animais (pancreáticas, hepáticas e gástricas) e plantas (como látex de papaia, lipase de semente de aveia e de rícino). Apesar de seu potencial industrial, a aplicação dessas enzimas em larga escala ainda enfrenta desafios devido ao alto custo de produção. As lipases vegetais, por exemplo, oferecem vantagens como especificidade, baixo custo e facilidade de purificação, tornando-se alternativas viáveis em comparação com lipases de origem animal e microbiana. Por outro lado, as lipases microbianas são preferidas na produção industrial devido à boa estabilidade térmica, e a possibilidade de manipulações genéticas (Thangaraj; Solomon, 2019) que permitem um fornecimento contínuo e em larga escala. Além disso, são amplamente utilizadas devido à sua ampla gama de atividades catalíticas, a facilidadee controle de produção, alto rendimento de produção, alta eficiência na conversão de substratos e versatilidade em diferentes condições ambientais. Essas enzimas possuem massa molecular entre 20 e 75 kDa, com atividade enzimática ideal em faixas de pH de 4 a 9, e melhor desempenho em temperaturas de 30 a 40 °C (Castro *et al*., 2004; Ribeiro *et al*., 2011).

Fontes microbianas importantes de lipases incluem *Aspergillus niger*, *Bacillus thermoleovorans*, *Diutina rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium heterosporum*, *F. oxysporum*, *Humicola lanuginosa*, *Oospora lactis*, *Penicillium cyclopium*, *P. roqueforti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia, P. fluorescens*, *P. putida*, *Rhizopus arrhizus*, *R. boreas*, *R. thermosus*, *R. usamii*, *R. stolonifer*, *R. fusiformis*, *R. circinans*, *R. delemar*, *R. chinensis*, *R. japonicus* NR400, *R. microsporus*, *R. miehei*, *R. nigricans*, *R. niveus*, *R. oryzae*, *R. rhizopodiformis*, *R. stolonifer* NRRL 1478, *Rhodotorula rubra* e *Staphylococcus hyicus*. Para a produção industrial, as fontes microbianas são preferidas, com destaque para os gêneros *Candida*, *Rhizopus* e *Pseudomonas*. Entre os fungos, os gêneros *Aspergillus sp*., *Rhizopus sp*. e *Penicillium sp*. são considerados os principais produtores de lipase devido às suas características favoráveis à produção em larga escala (Thangaraj; Solomon, 2019; Ali *et al*., 2023).

2.1.5 Aplicação das lipases

A crescente demanda por práticas industriais sustentáveis em diversos setores têm levado à preferência por biocatalisadores enzimáticos em vez de catalisadores químicos tradicionais. Os biocatalisadores se destacam por minimizar problemas de corrosão em reatores industriais, oferecendo alta especificidade, seletividade e atividade em condições brandas. Essas características resultam em processos mais energeticamente eficientes e na redução de custos operacionais. Além disso, suas propriedades ecológicas e não tóxicas contribuem para a obtenção de produtos mais puros, diminuindo os custos de purificação. A capacidade de reutilização das enzimas não apenas reduz os custos associados às transformações químicas, mas também promove práticas sustentáveis. Dessa forma, os biocatalisadores refletem a busca por processos mais econômicos, eficazes e ambientalmente responsáveis, alinhando-se às exigências atuais do mercado e às preocupações ambientais (Cipolatti *et al*., 2019; Miguel Júnior *et al*., 2022). Segundo a pesquisa e consultoria de inteligência realizada pela Mordor (junho de 2023), o mercado de lipases, avaliado em US$ 448,78 milhões em 2024, tem previsão de atingir US$ 645,18 milhões até 2029, experimentando um notável crescimento com uma Taxa de Crescimento Anual Composta (CAGR) de 7,53% no período de 2024 a 2029. No contexto do mercado global, destaca-se a ampla aplicação das lipases microbianas na indústria alimentícia, onde beneficiam processos como a modificação de sabores, a hidrólise de triglicerídeos e a redução de teor de gordura em produtos alimentícios (Mordor Intelligence, 2023).

As lipases microbianas são altamente valorizadas na indústria devido à sua versatilidade e eficiência em catalisar uma gama de reações, tanto hidrolíticas quanto sintéticas. Pertencentes à classe das hidrolases (EC 3.1.1.3), as lipases catalisam a hidrólise de ligações éster em triacilglicerídeos, formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. Além disso, podem catalisar a síntese de ésteres através de reações como esterificação, transesterificação, interesterificação e acidólise. Uma das principais vantagens dessas enzimas é a capacidade de operar em condições variadas de pH e temperatura, sem a necessidade de cofatores. Essas enzimas também demonstram uma ampla gama de desempenhos em diferentes tipos de reações, exibindo alta seletividade e especificidade, o que permite a aplicação das lipases para a obtenção de inúmeros produtos utilizados em diversos setores industriais (Sharma *et al*., 2001; Sampaio *et al*., 2022). Essa diversidade possibilita a aplicação das lipases em uma ampla gama de setores, incluindo os setores alimentício, farmacêutico, químico, cosmético (Costa-Silva *et al*., 2021). Entre os principais processos

industriais que utilizam essas enzimas, destacam-se o processamento de óleos e gorduras, panificação, laticínios (recuperação de queijo, melhoria de sabor e produção de queijo modificado por enzimas) (Rafiee; Rezaee, 2021), formulações de detergentes e desengordurantes, além da resolução de enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases também são empregadas na modificação de triacilgliceróis, no enriquecimento de ácidos graxos e na produção de ésteres. Além disso, essas enzimas são essenciais na síntese debiossurfactantes, indústrias de couro e têxtil (Costa-Silva *et al*., 2021), papel e celulose, nas formulações de biopolímeros, nos kits de diagnóstico médico, na fabricação de biossensores, biodiesel (Sampaio *et al*., 2022) e síntese de fármacos (Rafiee; Rezaee, 2021). Entretanto, a viabilidade econômica dos processos industriais pode estar diretamente ligada aoscustos de obtenção dessas enzimas (Medeiros *et al*., 2023).

2.2 **Cultivo em Estado Sólido (CES)**

2.2.1 Processo do Cultivo em Estado Sólido

Segundo Mitchell *et al*. (2006), o Cultivo em Estado Sólido (CES), fermentação em estado sólido ou fermentação semissólida, envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas, onde os espaços entre as partículas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água visível. Embora gotículas de água possam estar presentes entre as partículas e possa haver películas finas de água na superfície das partículas, a fase aquosa interpartícula é descontínua e a maior parte do espaço interpartícula é preenchida pela fase gasosa, com a maior parte da água sendo absorvida dentro das partículas sólidas úmidas. Schmidell *et al*. (2002) definem que esse método inclui processos que cultivam microrganismos sobre ou dentro de partículas em uma matriz sólida (matéria-prima ou material inerte), onde o conteúdo de líquido está a um nível que assegure o crescimento e metabolismo das células sem exceder a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida. A Figura 3 mostra o arranjo de partículas sólidas úmidas e a fase gasosa contínua em sistemas de CES envolvendo um fungo filamentoso.

Figura 3 - Arranjo de partículas sólidas e fase aquosa em CES com fungo filamentoso

*Hifas: Filamentos constituintes do micélio dos fungos, responsáveis pela absorção de nutrientes. Fonte: Adaptado de Mitchell *et al*., 2006.

Os principais passos envolvidos no processo de Cultivo em Estado Sólido incluem a preparação da matéria-prima, o desenvolvimento do inóculo, o cultivo em um biorreator específico, a recuperação do produto e o processamento subsequente (Mitchell *et al*., 2002).

Para otimizar o uso desses coprodutos agroindustriais, muitas vezes é necessário reduzir o tamanho das partículas por meio de processos como esmagamento, moagem e peneiramento, a fim de tornar o interior das partículas mais acessível aos microrganismos (Melani *et al*., 2020). Além disso, tratamentos prévios, como pré-tratamento térmico ou hidrólise química, podem ser necessários para tornar as macromoléculas presentes nos coprodutos mais susceptíveis à ação das enzimas microbianas (Mitchell *et al*., 2002). As matrizes sólidas, como farelos resultantes da moagem de grãos, são amplamente utilizadas como matérias-primas no CES. Esses farelos, que variam em proteína e óleo, são essenciais para a estrutura do meio, mas muitas vezes não fornecem nutrientes em quantidade suficiente. Para contornar essa limitação, é fundamental considerar estratégias práticas, como a incorporação de suplementos exógenos ou a exploração de combinações de matérias-primas. Comumente, a combinaçãode farelos com outros materiais visa manter os custos acessíveis. Esta prática de complementar coprodutos agroindustriais com fontes adicionais de carbono, nitrogênio e sais tem o objetivo de otimizar o crescimento microbiano e impulsionar a produção de lipases durante o CES (Aguieiras *et al*., 2019; Medeiros *et al*., 2023).

Na escala industrial e laboratorial do processo, são empregados biorreatorespara simular as condições do habitat natural de microrganismos. Entre os tipos de biorreatores

utilizados, pode-se citar leito fixo, de bandeja e tambor rotativo. Esses equipamentos desempenham um papel essencial na redução de custos de produção de enzimas. Contudo, os desafios persistem na eficiente remoção de calor e na manutenção da umidade da matéria-prima, fatores essenciais para a viabilidade econômica em larga escala (Teixeira *et al*., 2019). Entre os biorreatores utilizados no CES, os do tipo bandeja são amplamente valorizados por sua simplicidade, versatilidade e eficácia. As bandejas podem ter fundo intacto ou uma tela perfurada, o que melhora a circulação de ar. Exemplos de grandes bandejas, com áreas variando de 1,4 a 4,5 m², são utilizadas em processos mecanizados e colocadas em câmaras de incubação, com a temperatura ajustada pela passagem de ar (Schmidell *et al*., 2002). Em escalas menores, como placas de petri, erlenmeyers e sacos plásticos de poliestireno, não se utiliza agitação ou aeração forçada. O controle se concentra na matéria-prima, altura do leito operacional, microrganismo, solução inoculante e temperatura eteor de umidade na matéria-prima. A arquitetura dos biorreatores desse tipo de bandeja é projetada para garantir uma aeração eficiente, oxigenação adequada, remoção de calor e uniformidade da matéria-prima, facilitando a esterilização e recuperação da biomassa (Teixeira *et al*., 2019).

O CES representa uma abordagem promissora em processos biotecnológicos, como baixos níveis de água livre, ausência da produção de espuma (López-Gómez *et al*., 2020), reduçãodo risco de contaminaçãoespecialmente contaminação bacteriana, devido ao baixo teor de água do meio. Outras vantagens incluem baixa degradação de proteínas, o que é importante quando a enzima é o produto alvo, baixos custos de energia para esterilização, baixo volume do fermentador, baixa repressão catabólica (Carvalho *et al*., 2023). Além disso, promove um aumento no rendimento e produtividade de extratos enzimáticos, destaca-se pela simplicidade do processo, a viabilidade de utilização de biorreatores simples e a menor demanda energética (Medeiros *et al*., 2023).

A utilização de coprodutos agroindustriais no CES reduz os custos operacionais e se alinha a práticas ambientalmente amigáveis ao aproveitar recursos abundantes e acessíveis. Esse método se revela particularmente atraente para fungos filamentosos devido às suas características semelhantes ao habitat natural desses microrganismos, como nutrientes, água e suporte ao crescimento. No entanto, é importante reconhecer que essa estratégia também apresenta desafios, como a dificuldade em controlar parâmetros como pH, temperatura, recuperação do produto (Pandey *et al*., 2000; Aguieiras *et al*., 2019; Carvalho *et al*., 2023) e a difusão limitada de oxigênio na matriz sólida (López-Gómez *et al*., 2020).

A produção de enzimas industriais, como lipases, proteases, celulases e α-amilases, destacam-se como uma aplicação promissora de coprodutos em CES (Ohara *et al*., 2018).

Segundo Carvalho *et al*. (2023), na produção de lipase, é importante que as matrizes agroindustriais utilizadas tenham um teor lipídico considerável, pois o tipo de lipídio empregado como fonte de carbono é o principal fator que influencia na expressão da atividade da lipase. Castro *et al*. (2015) observam que, embora muitos estudos utilizem altos níveis de produção ou produtividade como critério para selecionar coprodutos agroindustriais, a expressão e secreção de enzimas, bem como suas propriedades bioquímicas, podem ser reguladas pelo tipo de matéria-prima utilizada como fonte de carbono e nitrogênio.

Diversos coprodutos agroindustriais da extração de óleo vegetal têm sido utilizados como matéria-prima para a produção de lipase por meio de CES, incluindo torta de mamona (Athanázio-Heliodoro *et al*., 2018), torta de soja, casca de arroz, torta de gengibre, torta de azeite (Nema *et al*., 2019), farelo de trigo, borra de café (Veloso *et al*., 2024), torta de óleo de canola, farelo de soja, pinhão-manso, cascas de melancia, andiroba, torta de óleo de babaçu, borras de sabão de girassol, farelo e bagaço de cana. Além disso, a produção de lipase é frequentemente induzida na presença de substratos hidrofóbicos, como azeite de oliva e ácido oleico, que também podem ser utilizados como matéria-prima (Aguieiras *et al*., 2019; Carvalho *et al*., 2023).

2.2.2 Fatores que afetam o crescimento e atividade microbiana no Cultivo em Estado Sólido (CES)

No Cultivo em Estado Sólido, as condições biológicas, físico-químicas e ambientais desempenham papéis importantes, variando de acordo com a matéria-prima e microrganismo de interesse. Diversos fatores influenciam diretamente a produção de enzimas, como tempo de cultivo, pH, temperatura, componentes nutricionais,umidade, atividade de água (Santos *et al*., 2018), porosidade e densidade de empacotamento do suporte sólido. Logo, é importante configurar e monitorar com precisão esses parâmetros do cultivo para alcançar o desenvolvimento ideal do processo (Zambrano *et al*., 2023).

O tempo de Cultivo em Estado Sólido está ligado ao esgotamento nutricional, impactando o crescimento microbiano e, por conseguinte, a produção enzimática. O pH pode afetar o transporte celular e a estabilidade enzimática, alterando as interações eletrostáticas da estrutura proteica e, consequentemente, a atividade e estabilidade da lipase. A temperatura e a estabilidade enzimática estãorelacionadas à transferência de massa e oxigênio (Mitchell *et al*., 2006; Mandari *et al*., 2020; Santos *et al*., 2018). Nesse processo, a matéria-prima frequentemente apresenta baixa condutividade térmica, o que significa que a remoção de calor

é um processo mais lento, aumentando o risco de acúmulo excessivo de calor. Nas fases iniciais, a temperatura e a concentração de oxigênio mantêm-se uniformes, proporcionando um ambiente controlado. No entanto, à medida que o processo avança, o metabolismo dos microrganismos e a interação com a matéria-prima podem gerar mais calor. Isso exige uma gestão cuidadosa para evitar elevações indesejadas de temperatura (Pandey, 2003).

Os parâmetros de porosidade e densidade de empacotamento do suporte sólido influenciam o crescimento dos microrganismos e processos como transferência de massa, calor e eliminação de CO_2 (Zambrano *et al*., 2023). Além disso, mudanças na densidade do leito podem ocorrer devido à agitação, crescimento de hifas e variações no tamanho, que são influenciadas por alterações no teor de umidade. A umidade refere-se à quantidade total de água presente na matéria-prima, enquanto atividade de água mede a disponibilidade desta água para reações biológicas. Ajustar ambos os parâmetros são essenciais para evitar contaminações e garantir que as reações biológicas dos microrganismos ocorram de forma eficiente. O aumento da altura do leito, por sua vez pode estar associado a uma diminuição na atividade da lipase, possivelmente devido a dificuldades na penetração dos esporos na matéria-prima, no acesso aos nutrientes e devido à dificuldade de transferência de oxigênio e remoção de calor metabólico (Mitchell *et al*., 2006; Mandari *et al*., 2020; Santos *et al*., 2018).

2.2.3 Influência da umidade no Cultivo em Estado Sólido

De acordo com Mitchell *et al*. (2002), a umidade adequada da matéria-prima é importante para otimizar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. A matéria-prima devidamente umedecida deve ter um filme superficial de água, que facilita esses processos, enquanto mantém canais entre as partículas para permitir a difusão de gases e a dissipação de calor.

No Cultivo em Estado Sólido, o teor de umidade do resíduo agroindustrial pode variar entre 18% e 85%, dependendo da capacidade de absorção da matéria-prima (Schmidell *et al*., 2002). Segundo Medeiros *et al*. (2023) os níveis elevados de umidade, como 80%, podem diminuir a porosidade da matéria-prima e aumentar a viscosidade do meio, o que restringe a difusão de oxigênio e aumenta o risco de contaminação bacteriana. Mandari *et al*. (2020), observaram que, em uma mistura de três matérias-primas, como *Prosopis juliflora* (PJ), casca de grama vermelha (RGH) e torta de semente de algodão (CSC), o aumento do teor de umidade inicial acima de 70%, resultou em um declínio da atividade da lipase, em função da

possibilidade de aglomeração do substrato sólido, o que diminui a porosidade e afeta negativamente o crescimento dos fungos.

No entanto, níveis insuficientes de umidade dificultam a difusão de nutrientes e baixo inchaço da matéria-prima, resultando em menor crescimento microbiano e produção reduzida do produto desejado (Costa *et al*., 2017; Mandari *et al*., 2020). Além disso, com um teor de umidade abaixo de 12%, não há desenvolvimento microbiano significativo (Schmidell *et al*., 2002). Essas considerações destacam a importância do controle preciso do teor de umidade durante o Cultivo em Estado Sólido, a fim de assegurar condições ideais para o crescimento microbiano e a produção enzimática.

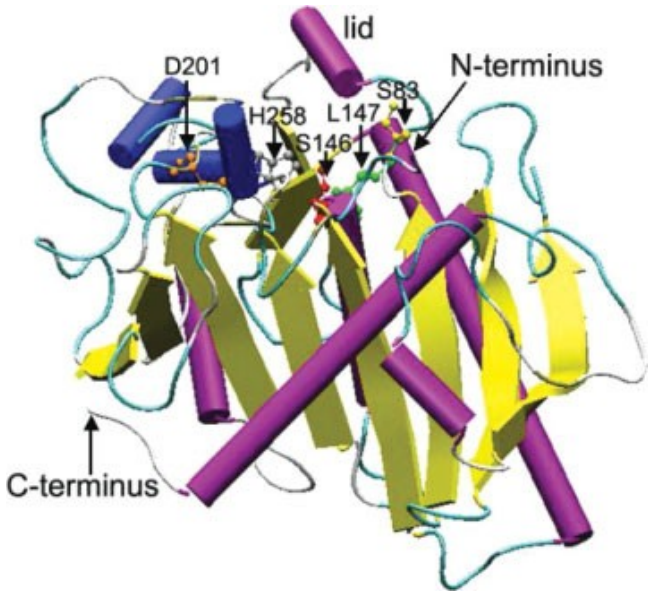
2.2.4 Produção de lipase a partir de *Aspergillus niger* por CES

As cepas de *Aspergillus niger* têm sido historicamente reconhecidas por seu uso em processos industriais como produtores de lipases extracelulares, proteases e celulases (Ohara *et al*., 2018). A lipase 1,3 específica de *A. niger* destaca-se por sua eficácia em ambientes ácidos, exibindo alta estabilidade, seletividade e maior tolerância ao glicerol, preferência de substrato para ácidos graxos de cadeia média, temperatura ótima entre 40 Cº e 50 Cº, pH ótimo variandode 4 a 7. A massa molecular pode variar dependendo das condições experimentais e dos métodos de purificação utilizados. Estudos relatam que a massa molecular pode variar entre 25 e 50 kDa (Namboodiri; Chattopadhyaya, 2000). Esta enzima, devido à sua termoestabilidade e à classificação do microrganismo como "Geralmente Reconhecidos como Seguros" (GRAS) apresenta vantagens competitivas em biotransformações, tornando uma escolha potencial em aplicações industriais, principalmente nos setores de alimentos e química (Xu *et al*., 2016; Yuan *et al*., 2020). Dentre os principais processos industriais, destacam-se modificação de triglicerídeos, produção de biodiesel (Feng *et al*., 2020), produtos farmacêuticos, ingredientes alimentícios, aditivos para detergentes, síntese de lipídios estruturados, hidrólise de gordura e desacilação regiosseletiva (Xu *et al*., 2016; Bellaouchi *et al*., 2021). Além disso, *o A. niger* tem se mostrado uma fonte de lipase mais eficiente para bioconversão de glicerol em carbonato de glicerol após triagem enzimática (Feng *et al*., 2020).

A estrutura tridimensional da lipase de *A. niger*, modelada por homologia, é ilustrada na Figura 3. Nesta representação, os fios β aparecem como setas, enquanto as hélices α são mostradas como cilindros, refletindo as características típicas da hidrolase α/β. A tríade catalítica da enzima é composta pelos resíduos Ser146, Asp201 e His258. A cavidade de

oxiânion, que desempenha um papel importante na estabilização do intermediário tetraédrico formado temporariamente durante a reação de hidrólise, é composto por Ser83 e Leu147, ambos doando seus prótons amida da estrutura principal. O resíduo Ser83 está localizado próximo a um resíduo de glicina conservado. A hélice que se estende de Leu86 a Asp92 forma a estrutura de "tampa" ou "lid", posicionada no canto superior direito do centro ativo. A estrutura tridimensional detalhada desta lipase raramente é relatada na literatura, principalmente devido às dificuldades encontradas na cristalização (Shu *et al*., 2009).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da lipase de *Aspergillus niger*



Fonte: Shu *et al*., 2009.

Diversos estudos destacaram a superioridade da atividade enzimática do *A. niger* no CES em comparação com o Cultivo Submerso (CS), evidenciando a eficácia desse método. Falony *et al*. (2006) revelaram que a lipase derivada do fungo *A. niger* pode alcançar até três vezes mais atividade lipásica ao utilizar coprodutos agroindustriais como matéria-prima, comparado com o meio convencional do CS. Resultados semelhantes foram obtidos por Melani *et al*. (2020), demonstrando que a atividade lipase do *A. niger* em meio de cultivo sólido atingiu seu pico de 77 UI/g de matéria-prima seca após 72 horas de cultivo, enquanto no CS, o pico foi de apenas 10,5 UI/g após 48 horas. Na pesquisa de El-Ghonemy *et al*. (2020), a produção de lipase por *A. niger* em 2019 sob CES (6,3 ± 0,34 U/g) foi relatada como 5,4 vezes maior do que aquela produzida sob condições de cultura CS (1,172 U/mL).

Além da produtividade superior, o CES também apresenta menor repressão catabólica, baixos requisitos de energia e menor produção de águas residuais em comparação com o CS.

As lipases são enzimas majoritariamente induzidas pela presença de uma fonte lipídica, ou seja, elas são produzidas pelos microrganismos na presença de uma fonte lipídica ou do produto de sua hidrólise. Esse indutor pode ser adicionado ao meio de cultura para estimular a produção, incluindo os óleos vegetais como óleo de palma, óleo de canola, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de rícino e óleo de algodão (Mendes *et al*., 2019). A presença desses lipídios no meio de cultivo não só estimula a produção de lipase, mas também pode aumentar o nível de atividade lipolítica da enzima (Lima *et al*., 2019).

Diversos coprodutos agroindustriais têm sido utilizados no Cultivo em Estado Sólido de *A. niger* para a produção de lipases, incluindo farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho, casca de arroz, torta de óleo de gengibree bagaço de cana (Veana *et al*., 2014; Ohara *et al*., 2018). Além disso, diferentes combinações desses coprodutos têm sidotestadas para a produção de lipase, como óleo de mamona com farelo de trigo, torta de babaçu com óleo de oliva, e farelo de trigo com torta de algodão, dentre outras (Penha *et al*., 2016; Medeiros *et al*., 2023). Diversas variáveis influenciam a produção de lipase, incluindo a fonte de carbono e nitrogênio, a composição e pH do meio de cultura, a temperatura e a geometria do biorreator, dentre outras (Costa *et al*., 2017). A atividade da lipase produzida por esse fungo dependerá da fonte lipídica da matéria-prima utilizada e das condições de cultivo, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de Cultivo em Estado Sólido dos estudos selecionados para revisão da produção de lipase de *Aspergillus niger* entre os anos de 2018 a 2023

Matéria-prima	**Outros componentes**	**Tempo de incubação (horas)**	**pH**	**T (Cº)**	**Umid (%)**	**Atividade lipásica máxima**	**Referências**
Folha de goiabeira	nd*	48	6,87	40	45	11,76 U/g*	(Ali *et al*., 2023)
Casca de laranja	nd	96	nd	30	nd	11.68 U/g	(Athanázio-Heliodoro *et al*., 2018)
Farelo de trigo; Caroço de algodão	nd	144	7	30	60	8,68 ± 0,54 U/g 4,83 ± 0,45U/g	(El-Ghonemy *et al*., 2020)

Combinação dos substratos: casca de arroz, torta de semente de algodão e casca de grama vermelha	nd	48	6,0	40	75	27,2 U/g (5g) 24,38 U/g (100g) 21,62 U/g (1000g)	(Nema *et al*., 2019)
Farelo de arroz e torta de Jathropa	Azeite, óleo de gergelim e óleo de pinhão-manso	120	nd	30	nd	176 U/mL* (1% de azeite) 282 U/mL (1% de solução de NaCl-0,5% de Tween 80)	(Putri *et al*., 2020)
Farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão	nd	96	nd	30	50	323 U g-¹ (farelo de algodão) 319 U g-^{1} (farelo de trigo e farelo de soja)	(Ohara *et al*., 2018)
Pena de galinha	nd	48	nd	30	50	90 U g^{-1}	(Oliveira *et al*., 2019)
Torta de dendê	Medula de coco, Farelo de soja e Azeite (4%)	216	7	Ambiente	nd	163,33 U/g	(Prabaningtyas *et al*., 2018)
Combinação dos substratos: Vagens de Prosopis Juliflora, Red Gram Husk e torta de semente de algodão	nd	72	7	30	70	269,87 U/g	(Mandari *et al*., 2020)
Farelo de trigo e torta de algodão	Azeite de oliva, óleo da tilápia, tween 80 e triton X	240	7	30	70	0,091 U/g	(Medeiros *et al*., 2023)
Farelo de trigo, sabugo de milho e melaço de cana de açúcar	Óleo de soja	96	nd	30	60	7,77 U/g	(Kreling *et al*., 2021)
Polpa de coco	nd	168	7	30	60	10,83 U.mL^{-1}	(Suyanto *et al*., 2019)
Sementes de abóbora	nd	24	7	30	70	235,7 U g^{-1}	(Travália *et al*., 2018)
Bagaço de cana	Azeite	336	4,5	28-30	70	0,027 U/L*	(Zambrano *et al*., 2023)

*U/g: unidade de atividade lipásica por grama de meio; U/mL: unidade de atividade lipásica por mililitro de meio; U/L: unidade de atividade lipásica por litro de meio; nd: não determinado (dados não apresentados pelo autor). Fonte: O autor, 2024.

2.2.5 Farelo de algodão

O Brasil é um dos principais produtores de algodão globalmente, juntamente com Índia, China, Paquistão e Estados Unidos, contribuindo para o avanço na utilização sustentável desses recursos. Em 2024, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos na produção de algodão, atingindo mais de 3,7 milhões de toneladas durante a safra 2023/24 (ABRAPA, 2024). No processamento de caroço de algodão, uma parte significativa do peso do produto é representada pela semente. As sementes de algodão contêm uma quantidade considerável de óleo, e o processamento das sementes para produzir óleos gera coprodutos como cascas, tortas, farelo, farinhas e linters. Além disso, esses coprodutos também podem ser utilizados como matriz de suporte e fonte de nutrientes para diversos processos biotecnológicos, incluindo a produção de enzimas industriais, como xilanases, glucoamilases, canamicina e lipases, agregando valor aos coprodutos e oferecendo vantagens econômicas (Aguieiras *et al*., 2019; Shaji *et al*., 2021). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e relatórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o setor de produção de algodão herbáceo (caroço) no Brasil registrou um valor de produção significativo em 2022, totalizando aproximadamente R$ 33,1 milhões de reais.

O farelo de algodão, derivado da extração de óleo de sementes de algodão, é notável por sua composição versátil. Comumente apresenta altos teores de lipídios, uma faixa de proteína bruta entre 22,2% e 56,2%, e energia metabolizável de 7,4 a 11,99 MJ/kg (Olukomaiya *et al*., 2019). O óleo proveniente da torta possui um perfil rico em ácido linoleico (56,9%), ácido oleico (16,9%) e ácido palmítico (23,3%). O alto valor nutricional sugere um potencial para induzir a produção de lipase (Medeiros *et al*., 2023). De acordo com Ohara *et al*. (2018), a literatura indica que coprodutos com maior teor de lipídios resultam em maior atividade de lipase. Estudos de Ohara *et al*. (2018, 2015) mostraram que o farelo de algodão, com seu alto teor lipídico, gerou a maior atividade de lipase produzida por *Aspergillus niger* quando utilizado como resíduo agroindustrial em Cultivo em Estado Sólido.

Aguieiras *et al*. (2019) relataram que a utilização de um biocatalisador de lipase *Rhizomucor miehei*, desenvolvido a partir de farelo de algodão, resultou em conversões superiores a 80% na esterificação de ácido oleico e o biocatalisador foi reutilizado em até quatro reações sucessivas de 4 horas cada, após lavagem com etanol. Esses resultados indicam um promissor potencial para a aplicação do biocatalisador na síntese de biodiesel. No entanto, é importante observar que a composição do farelo de algodão apresenta algumas limitações, como deficiências em lisina e a presença de fatores antinutricionais, notadamente o gossipol

(Dharmakar *et al*., 2022). Entretanto, a quantidade de gossipol encontrada no farelo de algodão é relativamente baixa, não sendo motivo de grande preocupação, conforme atestam diversos estudos científicos (Wang *et al*., 2012).

2.2.6 Farelo de trigo

A farinha de trigo é obtida pela moagem do grão de *Triticum aestivum* ou outras espécies do gênero *Triticum*, exceto *Triticumdurum*. Predominantemente cultivado no inverno, o trigo é mais produzido no sul do Brasil, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, com menor cultivo em São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Costa *et al*., 2008). Atualmente, o Brasil ocupa a 14ª posição mundial na produção de trigo, com previsão de 10,3 milhões de toneladas para a safra 2023/2024 (CONAB, 2024). O farelo de trigo apresenta um baixo teor de lignina e alto valor nutricional, que favorece o início do crescimento e replicação de microorganismos (El-Ghonemy *et al*., 2020). A ampla aplicabilidade do farelo de trigo pode ser atribuída à sua composição rica em nutrientes e à capacidade de permanecer solto, mesmo sob condições úmidas, o que favorece uma grande área de superfície. Além disso, sua adição em misturas é frequentemente utilizada para aumentar a porosidade de misturas, desempenhando um papel estratégico como suplemento em bioprocessos (Arora *et al*., 2018).

Diversos estudos destacam sua eficácia na produção de lipase de *A. niger* em cultivo em estado sólido (Oliveira *et al*., 2019; Zubiolo *et al*., 2014; El-Ghonemy *et al*., 2020). Por exemplo, Mala *et al*. (2007) relataramatividade máxima de 384,3 U/g em 72 horas, utilizando *A. niger* com uma mistura de farelo de trigo e torta de gergelim. El-Ghonemy *et al*. (2020) obtiveram 8,68 ± 0,54 U/g em 6 dias com farelo de trigo a 60% de umidade e pH 7, enquanto Falony *et al*. (2006) registraram 9,14 U/g em condições similares. Adicionalmente, *A. niger* NCIM 1207 produziu 630 U/g ao utilizar farelo de trigo e azeite de oliva como fonte de carbono lipídico, reforçando sua eficiência em processos de cultivo em estado sólido (Mahadik *et al*., 2002).

2.2.7 Óleo de mamona

O óleo de semente de mamona, também conhecido como óleo de rícino, é extraído da planta *Ricinus communis L.* por métodos químicos e mecânicos. A planta *Ricinus communis* L., conhecida por sua adaptabilidade e cultivo eficaz em regiões tropicais e subtropicais, tem

sido objeto de estudos no Brasil devido à diversidade de aplicações de seu óleo, que é extraído de suas sementes (Gonçalves *et al*., 2022). O óleo de mamona é fundamental para a agricultura familiar no nordeste, especialmente na Bahia, onde se prevê um aumento de 100% na produtividade para a safra 2022/2023, passando de 42,8 mil para 91,4 mil toneladas. O município de Irecê, localizado na Chapada Diamantina-BA, é responsável por 87% da área cultivada. Pequenos e médios produtores utilizam sementes híbridas, de variedades produtivas e resistentes a estresse hídrico, desenvolvidas pela Embrapa. As características da mamona, como sua alta adaptabilidade ao ambiente semiárido e a baixa perda por pragas e doenças, favorecem a longevidade dessa cultura, especialmente para agricultores com recursos limitados (CONAB, 2023).

O óleo de mamona destaca-se pela sua disponibilidade, custo-benefício, biodegradabilidade e facilidade de extração das sementes de mamona. Apresenta-se como um líquido viscoso, não comestível, não volátil e coloração amarelada (Gonçalves *et al*., 2022). A composição dos ácidos graxos presentes no óleo de mamona pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2 - Teores de ácido graxo presentes no óleo de mamona

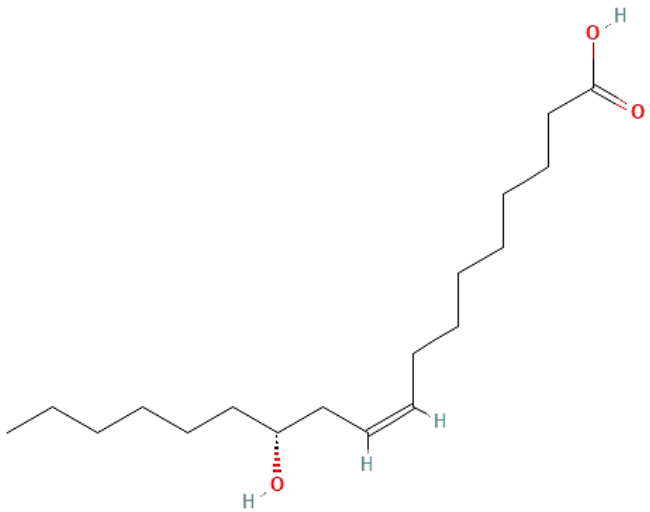
Ácido graxos	**Teor (%)**
Ácido ricinoleico	89,0
Ácido linoleico	4,2
Ácido oleico	3,0
Ácido esteárico	1,0
Ácido palmítico	1,0
Ácido palmítico	0,7
Ácido licosanoico	0,3
Ácido eicosonoico	0,3

Fonte: Gonçalves *et al*., 2022.

O óleo de mamona é um lipídio composto predominantemente por triacilgliceróis, mas também contém ácidos graxos livres em menor proporção. Dentre os ácidos graxos livres, o ácido ricinoleico (12-hidroxi-9-cisoctadecenóico) é o mais abundante, podendo representar aproximadamente 89% dessa fração. Este ácido graxohidroxilado é caracterizado por ser um poliol natural trifuncional, devido aos três grupos reativos funcionais presente na sua estrutura

química: um grupo carboxila, uma hidroxila (Gonçalves *et al*., 2022) em seu décimo segundo carbono e uma insaturação entre os carbonos 9 e 10, conferindo uma estrutura única à molécula, conforme representado na Figura 5. Essa peculiaridade proporciona propriedades físico-químicas distintas, como maior miscibilidade em álcool e alta viscosidade. Devido a essas características, o óleo de mamona é amplamente utilizado na indústria para a produção de plásticos, tintas, xampus, lubrificantes (Trenz *et al*., 2023), aditivos alimentares (Greco-Duarte *et al*., 2017), dentre outros produtos.

Figura 5 - Representação da estrutura do ácido ricinoleico (RA)



Fonte: Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia, 2024.

Como já comentado, o óleo de mamona, rico em ácido ricinoleico (RA) na forma de triglicerídeos, requer hidrólise para isolar o RA, processo geralmente realizado por métodos como altas temperaturas, vapor, alta pressão e saponificação. No entanto, essas técnicas podem ser ineficazes para óleos com grupos hidroxila, ligações duplas conjugadas e termicamente degradáveis, além de apresentarem desvantagens como polimerização, formação de coprodutos, alto consumo de energia e coloração indesejada. Em busca de métodos mais sustentáveis, o uso de biocatalisadores tem ganhado destaque, oferecendo seletividade na reação, produção reduzida de coprodutos e condições operacionais mais suaves. Diversos microrganismos, como *Diutina rugosa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*., *Propionibacterium acidipropionici* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como lipases de pâncreas suíno e mamona, têm sido estudados para a hidrólise do óleo de mamona. No

entanto, melhorias na biotransformação e otimização do processo são necessárias para aplicações comerciais (Singh *et al*., 2023).

Segundo Rathod; Pandit (2009), a hidrólise enzimática é uma alternativa para a produção de ácidos graxos que opera a temperaturas amenas (35–40 °C) e tende a produzir melhores resultados. Parâmetros como agitação, homogeneização e adição de solventes podem reduzir a viscosidade e aumentar a porcentagem de hidrólise do óleo de mamona em 5–6% quando se usa enzima imobilizada. No entanto, enfrenta desafios como a lenta taxa de reação e o alto custo das enzimas.

A estabilidade oxidativa do ácido ricinoleico (RA) é questionada devido à presença do grupo hidroxila em sua estrutura. A conservação desse grupo hidroxila inviabiliza a utilização da catálise química para gerar ésteres. Deste modo catálise enzimática também tem sido explorada para a modificação desse ácido, possibilitando condições mais suaves de produção. Entretanto, a rigidez estrutural do ácido pode representar um desafio na busca por uma lipase capaz de reconhecê-lo como substrato (Greco-Duarte *et al*., 2017).

Adicionalmente o óleo de mamona tem sido amplamente utilizado como indutor na produção de enzimas, especialmente em processos de CES. Dutra *et al*. (2008) avaliaram vários óleos vegetais como fontes suplementares de carbono para a produção de lipase de *A. niger* pela cepa 11T53A14 em CES, utilizando farelo de trigo como matéria-prima. Entre os óleos testados, o óleo de mamona (2% m/m) proporcionou a máxima atividade lipásica de 23,7 U/mL, sugerindo ser a melhor fonte suplementar de carbono para a produção dessa lipase. A lipase de *P. aeruginosa* demonstrou máxima atividade quando cultivada com óleo de mamona (2% m/m) como fonte de carbono a pH 6,9, apresentando até 90% de eficiência na reação de hidrólise do óleo de mamona (Sharma *et al*., 2001).

2.3 **Imobilização enzimática**

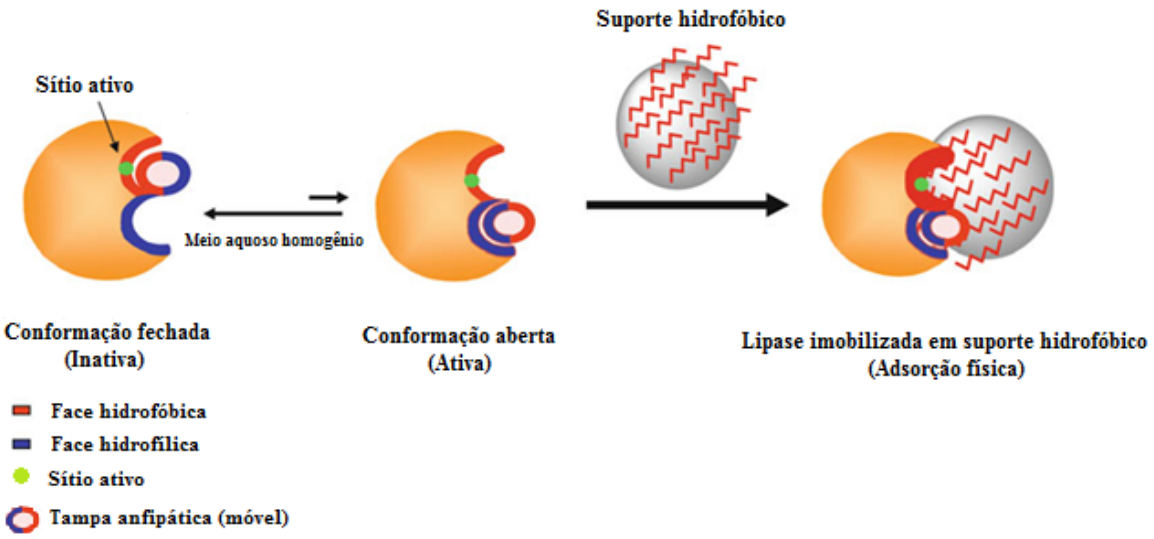
De acordo com a Primeira Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), as enzimas imobilizadas são definidas como catalisadores confinados fisicamente em uma região específica, que mantêm suas atividades catalíticas e podem ser reutilizadas de forma contínua. A ligação entre as enzimas e os suportes pode ocorrer através de diferentes métodos, como adsorção, ligação covalente, interações iônicas e encapsulamento (Cipolatti *et al*., 2016; Fernandez-Lafuente *et al*., 1998; Guisan *et al*., 2006). Dentre essas metodologias, a adsorção se destaca pela sua simplicidade e baixo custo (Urrutia *et al*., 2018).

2.3.1 Imobilização de lipases pelo método de adsorção

A adsorção é uma técnica simples, onde a estrutura conformacional da enzima é levemente alterada, permitindo a imobilização em suportes sólidos por meio de forças de baixa energia, como Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas. A imobilização de lipases por adsorção em matrizes poliméricas é apontada como uma técnica promissora para aplicação em meios orgânicos e frequentemente mostra aumento da atividade e estabilidade das lipases. Além disso, com baixa força iônica, as lipases são as únicas proteínas solúveis em água que são massivamente imobilizadas em suportes hidrofóbicos (Rodrigues *et al*., 2019).

A maioria das lipases são enzimas interfaciais, que funcionam na interface de gotas de substratos insolúveis, como óleos ou gorduras. Elas possuem uma estrutura com uma tampa anfipática ou "lid", composta por uma face hidrofóbica e uma face hidrofílica. Em meio aquoso, a lipase geralmente apresenta uma conformação fechada, com a tampa isolando o sítio ativo e tornando-a inativa. No entanto, quando a face interna hidrofóbica da tampa interage com superfícies hidrofóbicas, a tampa é deslocada, expondo o sítio ativo e permitindo que a lipase se torne ativa. Esse fenômeno é conhecido como ativação interfacial. Na Figura 6, ambas as conformações da lipase estão em equilíbrio, mas na presença de um suporte hidrofóbico, o equilíbrio é deslocado para conformação aberta e a lipase é adsorvida na superfície do suporte hidrofóbico (Arana-Peña *et al*., 2021; Rodrigues, *et al*., 2019; Ortiz *et al*., 2019).

Figura 6 - Imobilização de lipases via ativação interfacial em suportes hidrofóbicos



Fonte: Adaptado de Palomo; Guisan, 2012.

A imobilização enzimática representa uma estratégia altamente eficaz para reutilização em múltiplas reações, mesmo em condições adversas como variações de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos (Rafiee; Rezaee, 2021). A imobilização possibilita a fácil separação dos biocatalisadores no final do processo e a melhoria de diversas características da enzima, como estabilidade, seletividade e especificidade. Além disso, a imobilização pode ser combinada com a purificação enzimática, resultando em processos mais eficientes e econômicos. No entanto, é fundamental destacar que o sucesso da imobilização depende de um protocolo bem projetado e controlado, pois vários fatores influenciam as características da enzima imobilizada (Miguel Júnior *et al*., 2022).

Uma das principais desvantagens da imobilização por adsorção é a possibilidade de dessorção, especialmente em sistemas aquosos, o que pode comprometer a estabilidade do biocatalisador e pode contaminar o produto. Além disso, esse método é sensível a variações em condições específicas, como pH e temperatura, bem como à força iônica do tampão (Ismail; Baek, 2020). A interação por adsorção é relativamente fraca em comparação com outras formas de imobilização, e os biocatalisadores produzidos por esta metodologia podem ser instáveis (Carvalho *et al*., 2015; Reis *et al*., 2019). Portanto, é necessário estudar a influência da porosidade dos suportes para melhorar essa estabilidade.

Substratos grandes ou hidrofílicos podem enfrentar impedimento estérico, na catálise mediada por biocatalisadores heterogêneos, devido à proximidade da superfície do suporte

hidrofóbico em relação ao sítio ativo da lipase, resultando na redução da atividade enzimática. A formação de dímeros lipase-lipase em superfícies hidrofóbicas também pode dificultar o manuseio e afetar as propriedades da enzima (Rodrigues *et al*., 2019; Reis *et al*., 2019; Hanefeld *et al*., 2009).

2.4 **Suporte polimérico**

Diversos materiais, tanto inorgânicos quanto orgânicos, têm sido testados como suportes para a imobilização de enzimas, incluindo sílica, carvão ativado, zeólitas e polímeros (Cipolatti *et al*., 2019; Menoncin *et al*., 2008). A escolha do suporte depende de uma série de fatores, como tamanho de proteína, o processo reacional e as características do suporte, tais como a área específica, porosidade, estabilidade química e mecânica e natureza hidrofóbica ou hidrofílica (Dalla-Vecchia, 2004; Souza *et al*., 2017).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos pode contribuir para o bom desempenho em processos industriais. Essa técnica é amplamente empregada para otimizar as propriedades catalíticas e viabilizar o uso em larga escala. Além de permitir o reaproveitamento de enzimas, a imobilização pode aumentar sua estabilidade sob condições variáveis de temperatura e pH, além de reduzir custos operacionais (Ferreira *et al*., 2018; Wang *et al*., 2020).

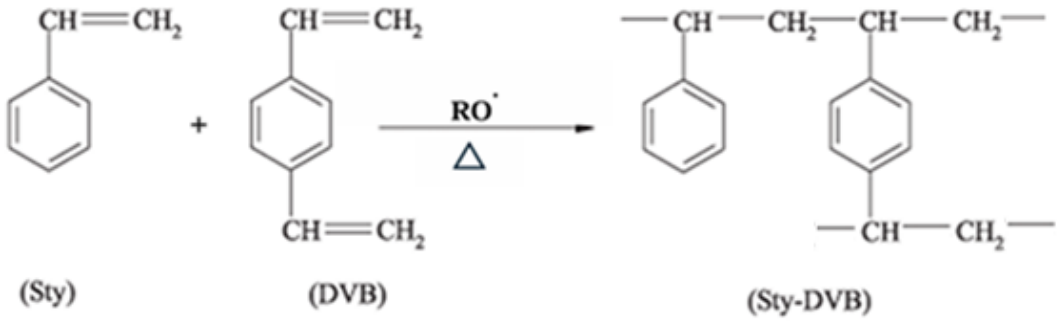
Entre eles, os polímeros sintéticos oferecem vantagens significativas, como a possibilidade de controle dos parâmetros físicos (tamanho de partículas, porosidade, hidrofobicidade, área específica, diâmetro dos poros) através do ajuste dos parâmetros de polimerização. Isso permite o desenvolvimento de suportes otimizados para a imobilização de enzimas, garantindo maior estabilidade e atividade, além de uma adsorção mais eficiente devido à personalização da estrutura do suporte (Cardoso *et al*., 2004; Ribeiro *et al*., 2022).

2.4.1 Copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) por suspensão aquosa

Entre as várias metodologias de síntese de suportes poliméricos, a polimerização por suspensão aquosa se destaca por sua simplicidade, baixo custo, além da possibilidade de ajustar características finais do suporte, como formato esférico e ampla distribuição de tamanho de poros (5–1000 μm) (Machado *et al*., 2007; Chaudhary; Sharma, 2019). Dentre diversos suportes, os copolímeros de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB), obtidos por suspensão aquosa, apresentam características vantajosas, como alta área específica e alto grau

de hidrofobicidade, o que os torna excelentes suportes para a imobilização de lipases. Além disso, exibem resistência a oxidação, hidrólise e a variações térmicas (Coutinho *et al*., 2006; Silva *et al*., 2018) e são adequados para adsorver lipases de várias fontes (Miguel Júnior *et al*., 2022). A Figura 7 ilustra o esquema simplificado da reação de polimerização de estireno-divinilbenzeno em suspensão aquosa.

Figura 7 - Esquema da reação de polimerização de estireno-divinilbenzeno em suspensão aquosa



Fonte: Adaptado de Coutinho; Rezende, 2001.

As partículas de polímero obtidas podem ser classificadas em dois tipos: gel e porosas. As partículas poliméricas do tipo gel são não porosas e apresentam baixo grau de reticulação, enquanto as partículas porosas contêm maior grau de reticulação. A porosidade pode ser classificada em três categorias: microporosa (< 2 nm), mesoporosa (2-50 nm) e macroporosa (> 50 nm) (Gokmen; Du Prez, 2012; Chaudhary; Sharma, 2019).

A formação da estrutura porosa do copolímero de Sty-DVB pode ser controlada pelos parâmetros de síntese, principalmente, o grau de reticulação do polímero (como a quantidade de DVB), o tipo e a quantidade do diluente, o grau de diluição dos monômeros, entre outras variáveis (Costa *et al*., 2020). No entanto, o principal parâmetro que afeta a formação porosa da estrutura do copolímero é apresença de um diluente, também chamado de agente porogênico, e o grau de afinidade entre os monômeros e este diluente. O grau de afinidade entre a mistura monomérica e o diluente pode ser previsto pela teoria do parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ). Segundo essa teoria, quanto maior a diferença entre os parâmetros de solubilidade do polímero (δp) e do diluente (δd) (Δδ = δp-δd), menor será a afinidade termodinâmica do diluente pelo polímero em formação. Os diluentes podem ser classificados de acordo com sua afinidade termodinâmica pelas cadeias poliméricas, sendo

eles: diluentes solvatantes (bons solventes), diluentes não solvatantes (maus solventes) e solventes intermediários (Coutinho; Rezende, 2001; Cardoso *et al*., 2004).

Durante a polimerização de copolímeros de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) na fase orgânica, o uso diluente solvatante, como tolueno e dicloroetano, leva à formação de um gel inicialmente expandido devido à afinidade termodinâmica do solvente com os monômeros. No entanto, se aumentar a quantidade de reticulante (υ) enquanto a quantidade de solvente é mantida constante, em certo ponto a rede polimérica se torna altamente reticulada e não consegue mais absorver todas as moléculas de solvente, resultando na separação de fases após o ponto de gelificação (formação do gel), caracterizando o fenômeno da macrossinérese. Nesse processo, o gel em expansão colapsa à medida que o solvente é removido, transformando em um microgel (núcleo), enquanto o excesso de solvente permanece como uma fase contínua na reação. À medida que a polimerização e a reticulação avançam, novos núcleos de polímeros são gerados continuamente a partir da separação dos polímeros em crescimento, levando ao aumento gradual dos poros vazios na estrutura. A remoção do solvente do gel resulta em poros com diâmetros relativamente pequenos, classificados como microporos (menores que 2 nm) ou mesoporos (entre 2 e 50 nm), com uma área específica interna que varia entre 50 e 500 m^2/g. Esse processo de formação de porosidade é conhecido como υ-sinérese induzida, onde "υ" se refere à densidade de reticulação da rede, influenciando o comportamento da estrutura final do polímero (Okay, 2000; Coutinho *et al*., 2001; Gokmen; Du Prez, 2012).

Em contraste, na polimerização de copolímeros de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB), o uso de diluente não solvatante, como n-heptano e álcool n-butílico, resulta em um comportamento distinto. Quando esses diluentes não solvatantes ou mau solventes são adicionados à fase orgânica da polimerização, as cadeias poliméricas tendem a se retrair, pois esses diluentes possuem menor afinidade termodinâmica pelos monômeros. Essa incompatibilidade leva à separação de fases antes de se atingir o ponto de gelificação, onde ocorre o fenômeno conhecido como microssinérese. Como resultado, a diminuição da solubilidade do polímero em altas concentrações de um solvente não solvatante forma-se uma dispersão de fase polimérica na fase contínua do monômero. À medida que a reação avança, essas gotículas poliméricas se aglomeram em microesferas, contribuindo para o aumento da porosidade do sistema, que corresponde aos espaços vazios entre as microesferas. Com a progressão do processo, a fase polimérica se torna contínua. Após a remoção do diluente do gel resultante da polimerização, são gerados os mesoporos (entre 2 e 50 nm)e macroporos (entre 50 a 1000 nm), com umaárea específica interna variando normalmente entre 10 e 100

m^2/g. Esse processo de formação de porosidade é denominado como χ-sinérese induzida, onde o χ representa o parâmetro de interação polímero-solvente (Okay, 2000; Coutinho *et al*., 2001; Gokmen; Du Prez, 2012).

A combinação de diluentes solvatantes e não solvatantes no meio de polimerização gera copolímeros com morfologias intermediárias, diferentes das obtidas com diluentes puros (Coutinho *et al*., 2004). Variações no teor e concentração desses diluentes, com base nos parâmetros de solubilidade do polímero e dos diluentes, influenciam diretamente a distribuição do tamanho dos poros, que pode ser calculada pela média dos diluentes puros (Okay, 2000; Chaudhary; Sharma, 2019; Ribeiro *et al*., 2022). Quando a polimerização do Sty-DVB ocorre com maior proporção de diluente solvatante, a separação de fases tende a acontecer após o ponto de gel, resultando em polímeros com altas áreas de superfície específicas e pequenos diâmetros de poros, devido à sinérese induzida por υ. Em contraste, quando a proporção de diluente não solvatante é maior, a separação de fases acontece antes do ponto de gel, resultando em polímeros com grandes diâmetros de poros e baixas áreas de superfície específicas, devido à sinérese induzida por χ (Ribeiro *et al*., 2022).

Considerando o exposto, o estudo de novos biocatalisadores utilizando matrizes agroindustriais que valorizem a biodiversidade nacional e a imobilização eficiente em suportes engenheirados pode contribuir para o desenvolvimento de processos industriais economicamente viáveis. O desenvolvimento e aplicação de polímeros porosos, como os copolímeros Sty-DVB, têm sido amplamente investigados em diversos estudos que destacam sua eficiência na imobilização de lipases. Pesquisas, como as de Cunha *et al*. (2014), Pinto *et al*. (2014, 2018, 2020), Manoel *et al*. (2016), Cipolatti *et al*. (2018) e Ribeiro *et al*. (2022), exploraram a relação entre a morfologia desses suportes e a atividade catalítica das lipases imobilizadas, reforçando o potencial desses materiais em aplicações biotecnológicas promissoras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A etapa de produção de lipase de *A. niger* a partir do Cultivo em Estado Sólido foi realizada no Laboratório de Química Ambiental e Microbiologia Industrial - Departamento de Tecnologia de Processos de Bioquímica (DTPB) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A etapa de imobilização de lipases ao copolímero foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Microbiana Farmacêutica – LaBiMFar na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).A etapa de síntese do copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica (LASO) na Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Zona Oeste (UERJ-ZO). As caracterizações do suporte obtido foram realizadas no Laboratório de Caracterização Instrumental Departamento de Processos Químicos Instituto de Química–UERJ e Laboratório de Materiais, Sustentabilidade e Educação Departamento de Físico-Química Instituto de Química (LaMaSE) - UERJ.

3.1 **Materiais**

3.1.1 Reagentes

- Acetonitrila P.A: obtido da Dinâmica; usado como recebido [c].
- Ácido cítrico anidro P.A: obtido pela Vetec; usado como recebido [a].
- Agar-agar em pó (Agente gelificante) pela Isofar; usado como recebido [a].
- Álcool Polivinílico (PVA): obtido pela Vetec química fina Ltda; grau de hidrólise: 86,5-89,5%; usado como recebido [c].
- Azobisisobutironitrila (AIBN): obtido da Migquímica S.A; grau de pureza: comercial; usado após recristalização com Metanol [c].
- Citrato de sódio anidro P.A: obtido pela Isofar; usado como recebido [a].
- Cloreto de potássio P.A: obtido pela Isofar; usado como recebido [a].
- Dimetilsulfóxido (DMSO): obtido pela Tedia Company Inc; grau de pureza mínima: 99,9% UV/HPLC; usado como recebido [b].
- Divinilbenzeno (DVB): obtido pela Nitriflex Indústria e Comércio S.A.; grau de pureza: comercial; usado após extração ácido-base com solução aquosa de NaOH 5% m/v seguida de neutralização, visando a extração do inibidor de polimerização [c].

- Dodecanoato de 4-nitrofenila: obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química fina); grau de pureza superior a 98,0%; usado como recebido [b].
- Estireno (Sty): obtido pela Nitriflex Indústria e Comércio S.A.; grau de pureza: comercial; usado após extração ácido-base com solução aquosa de NaOH 5% m/v, visando a extração do inibidor de polimerização; usado como recebido [c].
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A.: obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química fina); grau de pureza mínima: 98%; usado como recebido [b].
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A.: obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química fina); grau de pureza mínima: 98%; usado como recebido [b].
- Lipase de *Aspergillus niger*: fornecido pela Sigma-Aldrich; usado como recebido [c].
- Lipozyme RM (*Rhizomucor miehei*): fornecido pela lipozyme; usado como recebido [b].
- Lipozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica*): fornecido pela lipozyme; usado como recebido [b].
- Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*): fornecido pela lipozyme; usado como recebido [b].
- N-heptano: obtido da Sigma Aldrich (Vetec- Química fina); grau de pureza: 99,5% P.A; usado como recebido [c].
- Nitrato de sódio P.A: obtido pela Isofar; usado como recebido[a].
- Peptona de carne bacteriológica: obtido pela Isofar; usado como recebido [a].
- Potássio fosfato dibásico hidratado: obtido pela Avantor; usado como recebido [a].
- Sulfato de ferro (II) hidratado: obtido pela Merck; usado como recebido [a].
- Sulfato de magnésio P.A: obtido pela Vetec; usado como recebido [a].
- Tolueno: obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química fina); grau de pureza: P.A.; usado como recebido [c].

[a] Laboratório de Química Ambiental e Microbiologia Industrial (LQaBIN) - Departamento de Tecnologia de Processos de Bioquímica – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - RJ

[b] Laboratório de Biotecnologia Microbiana Farmacêutica – LaBiMFar, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.

[C] Laboratório de Síntese Orgânica – LASO, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Zona Oeste.

3.1.1 Equipamentos

Foram utilizados no desenvolvimento da parte experimental desta dissertação, além das vidrarias e instrumentos laboratoriais, os equipamentos descritos abaixo:

- Agitador magnético: fornecido pela empresa IKA; modelo: RCT basic[b].
- Autoclave vertical: fornecido pela empresa Phoenix; modelo: AV-50[a].
- Balança analítica: fornecido pela empresa Mettler Toledo[a].
- Balança analítica: fornecido pela empresa Sartorius [b].
- Balança analítica: fornecido pela empresa Shimadzu Classe I; modelo: AUY220 [c].
- Espectrofotômetro: fornecido pela empresa Jasco; modelo: V-730BIO[b].
- Fluxo laminar: fornecido pela empresa Biogreen[a].
- Incubadora B.O.D.: fornecido pela empresa Nova Ética; modelo: 411D [a].
- Incubadora Shaker: fornecido pela empresa Tecnal; modelo: TE-420[a].
- Medidor de bancada pH21-01: fornecido pela empresa Hanna[a].
- Microscópio vertical: fornecido pela empresa Nikon eclipse; modelo E100 [a].
- Minicentrífuga de eppendorfs: fornecido pela empresa KASVI [b].
- Moinho de facasfornecido pela empresa Marconi; modelo: MA340/SNR [a].
- Rooler: fornecido pela empresa Biomixer[b].
- Titulador compactor: fornecido pela empresa Mettler Toledo; modelo: G20 [b].

[a] Laboratório de Química Ambiental e Microbiologia Industrial (LQaBIN) - Departamento de Tecnologia de Processos de Bioquímica – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - RJ

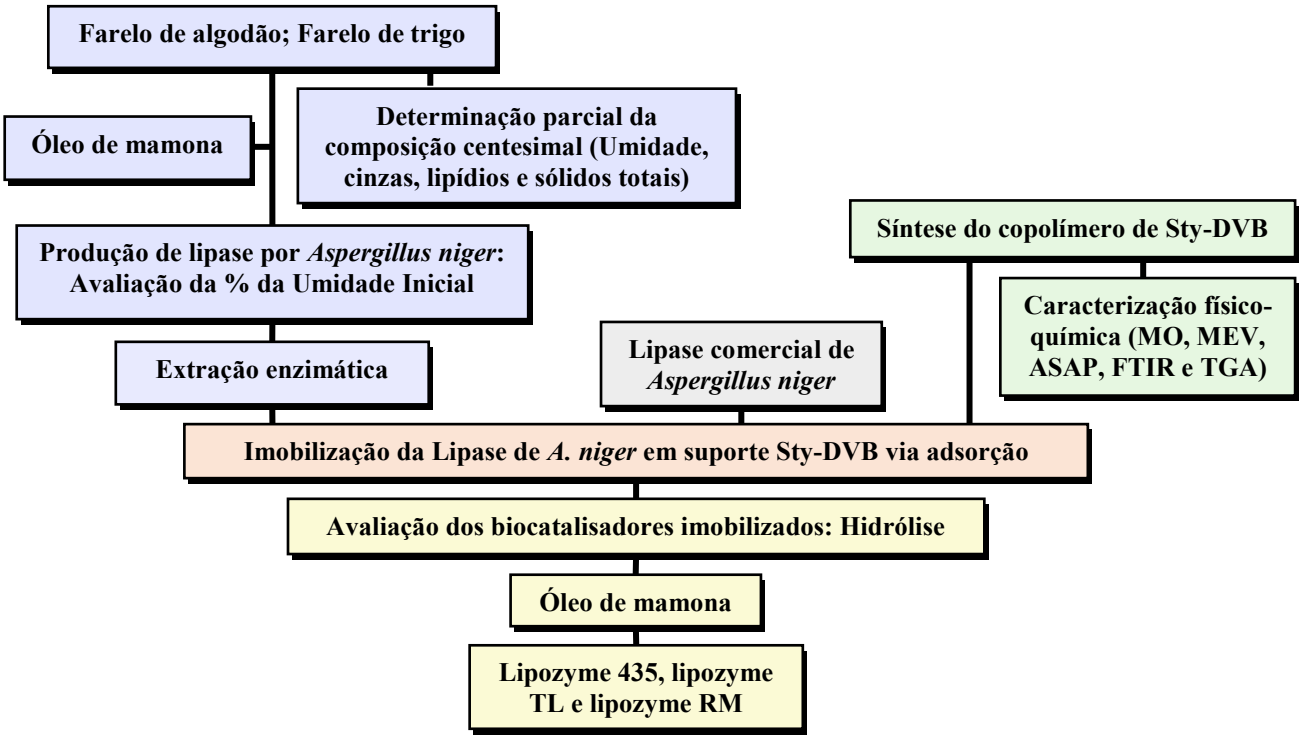
[b] Laboratório de Biotecnologia Microbiana Farmacêutica – LaBiMFar, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.

[C] Laboratório de Síntese Orgânica – LASO, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Zona Oeste.

3.2 **Métodos**

Este estudo consistiu em produzir lipase a partir de *Aspergillus niger*, utilizando farelo de algodão combinado com óleo de mamona e uma mistura de farelo de algodão com farelo de trigo na proporção 1:1, também suplementado com óleo de mamona, para Cultivo em Estado Sólido (CES). Inicialmente, foi realizada a caracterização centesimal parcial dos farelos. Para produção da lipase, foi avaliado o porcentual teórico de umidade inicial para 30, 45 e 60%. Após o cultivo, a lipase foi extraída e sua atividade de hidrólise foi medida utilizando *p*-nitrofenillaurato *(p*-NFL) como substrato. Em paralelo, a atividade de uma lipase comercial de *A. niger* foi utilizada como padrão de comparação. Em outra etapa, foi preparado o copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) e caracterizado por MO, MEV, ASAP, FTIR e TGA. Em seguida, as lipases produzidas e comercial foram imobilizadas no suporte Sty-DVB via adsorção. Após a imobilização, os biocatalisadores resultantes foram avaliados por meio de reações de hidrólise, utilizando *p*-NFL e óleo de mamona como substratos. Adicionalmente, foi analisado o desempenho dos biocatalisadores heterogêneos comerciais Lipozyme 435, TL e RM utilizando óleo de mamona. A Figura 8 apresenta o organograma das atividades experimentais desenvolvidas.

Figura 8 - Fluxograma da metodologia experimental da pesquisa



MO: Microscopia Óptica; MEV: Microscopia eletrônica de varredura; ASAP: análise de área específica, volume de poros e diâmetro de poros, foram determinados por Adsorção de Nitrogênio a Baixa Pressão; FTIR: Espectroscopia de Infravermelho

com Transformada de Fourier; TGA: Análise Termogravimétrica; *p*-NFL: *p*-nitrofenillaurato; Lipozyme 435: Lipase B de *Candida antarctica*; Lipozyme TL: Lipase *Thermomyces lanuginosus*; Lipozyme RM: Lipase *Rhizomucor miehei*.

Fonte: O autor, 2024.

3.2.1 Preparo das matérias-primas

A torta de algodão foi fornecida pela Embrapa Algodão (Campina Grande/PB) e cominuída em um moinho de facas (Marconi®) (Figura 9) utilizando uma peneira com abertura de 6 mm, resultando em farelo de algodão. Já o farelo de trigo (Arma Zen®) foi adquirido em um mercado local no Leblon, Rio de Janeiro - RJ. Ambos os farelos foram armazenados sob refrigeração e utilizados sem nenhum tratamento químico prévio. O óleo de mamona, também fornecido pela Embrapa Algodão (Campina Grande/PB), foi utilizado sem tratamento prévio.

Figura 9 - Moinho de facas utilizado para cominuir o farelo de algodão

Fonte: O autor (2024).

3.2.2 Caracterização da composição centesimal parcial

A caracterização da composição centesimal do farelo de algodão e do farelo de trigo, como teores de umidade, cinzas, lipídios e sólidos totais, foi realizada na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para o farelo de algodão, os ensaios seguiram os métodos

descritos pela AOAC (2003), enquanto para o farelo de trigo foram utilizados os métodos do Instituto Adolf Lutz (2008). Ambas as matérias-primas apresentaram os resultados como média ± desvio padrão (dp) em g/100g.

3.2.2.1 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizado pelo método gravimétrico padrão para ambas as amostras. As amostras foram inicialmente pesadas, seguidas de secagem em estufa a 100°C até atingirem massa constante. O cálculo do teor de umidade foi realizado conforme a Equação 1, seguindo os métodos descritos pela AOAC (2003) e pelo Instituto Adolf Lutz (2008).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{inicial}}\,(\text{g}) - \text{massa}_{\text{final}}\,(\text{g})}{\text{massa}_{\text{inicial}}\,(\text{g})} \times 100 \qquad (Eq.\ 1)$$

3.2.2.2 Determinação de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais dos coprodutos foi realizada pelo método gravimétrico, que se baseia na perda de massa da amostra após a incineração. Inicialmente, os cadinhos foram preparados e pesados. As amostras foram então incineradas em mufla a 550ºC a 4 horas, até a completa eliminação do material orgânico, resultando em cinzas claras. Posteriormente, a massa das cinzas foi aferida. A Equação 2 foi utilizada para determinar o teor de cinzas totais, conforme os métodos descritos pela AOAC (2003) e pelo Instituto Adolf Lutz (2008).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_{cinzas}}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (Eq.\ 2)$$

Onde:

m_{cinzas}= massa de cinzas na amostra (g);

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

3.2.2.3 Determinação de lipídios

A determinação do teor de lipídios começou com a pesagem de uma quantidade precisa da amostra. Em seguida, a amostra foi extraída utilizando um extrator soxhlet, empregando um solvente apropriado, como éter de petróleo ou hexano. O tempo de extração variou entre 6 e 16 horas, enquanto a temperatura de refluxo foi mantida dentro da faixa de 40-70 °C, para garantir uma extração eficiente dos lipídios. Após a extração, o solvente foi evaporado para deixar somente os lipídios. O peso dos lipídios foi então medido, e a partir dessa medida, o teor de lipídios na amostra foi calculado em relação ao peso inicial da amostra na Equação 3, conforme os métodos da AOAC (2003) e do Instituto Adolf Lutz (2008).

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = \frac{m_{lipídios}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \qquad (Eq.\ 3)$$

Onde:

$m_{lipídios}$ = massa de lipídios na amostra (g);

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

3.2.2.4 Determinação dos sólidos totais

Para determinar o teor de sólidos totais, pequenas quantidades do próprio farelo foram retiradas e pesadas em uma balança de precisão. Em seguida, essas porções foram submetidas a secagem em uma estufa a 105 °C por 2 horas para remover a umidade. Após a secagem, foram pesadas novamente para calcular o teor de sólidos totais. Esse cálculo foi realizado de acordo com a Equação4, conforme os métodos descritos pela AOAC (2003) e pelo Instituto Adolf Lutz (2008).

$$\text{Teor de sólidos totais (\%)} = \frac{m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{sólidos totais}}} \times 100 \qquad (Eq.\ 4)$$

Onde:

$m_{amostra\ \text{seca}}$ = massa da amostra seca (g);

$m_{sólidos\ totais}$ = massa total dos sólidos na amostra (g).

3.3 **Análise do óleo de mamona por cromatografia gasosa**

A composição de ácidos graxos do óleo de mamona foi monitorada pelo método de cromatografia gasosa (CG) equipado com um detector de ionização de chama (FID), um amostrado líquido automático (Agilent) e uma coluna capilar DB-FFAP (30 m x 0,53 mm x 0,25 μm). As amostras foram analisadas segundo o método livre de derivatização. Para isso foram preparadas por diluição em isopropanol (4mg. mL-1). O gás nitrogênio foi usado como gás de arraste para dividir as amostras com proporção de 4:1 e vazão de 10,2 $mL.min^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 100 °C e 250 °C. A temperatura do forno foi iniciada em 100°C por 5 minutos, então gradualmente foi aumentada até que alcance 220 ºC com taxa de aquecimento de $30°C.min^{-1}$. Soluções padrão de ácido palmítico, linoléico e esteárico foram preparadas, e o teor de ácidos graxos livres em cada amostra foi determinado com base nas respectivas curvas padrão.

3.4 **Microrganismo**

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

3.5 **Estocagem, ativação e manutenção do microrganismo**

O fungo de *A. niger* 11T53A14 foi estocado em solo congelado, previamente esterilizado. A ativação do fungo foi feita em gelose inclinada com meio básico sólido constituída pelo azeite de oliva (2 % m/m) como fonte de carbono e pelos nutrientes descritos na Tabela 3, denominado SOCAREAN (Couri; Farias, 1995). O pH do meio de cultura foi ajustado para pH 5,5 e em seguida, esterilizado em autoclave à 0,50 atm por 20 min. Após, o tubo de ensaio contendo a gelose foi inclinado para garantir uma melhor superfície de contato. A primeira ativação foi realizada utilizando uma alça de platina para transferir os esporos do solo para a gelose inclinada. Os tubos foram incubados em estufa a 32°C por 7 dias. Na segunda ativação, os conídios da primeira gelose inclinada foram transferidos para uma nova gelose inclinada, também com o auxílio da alça de platina, e os tubos foram novamente incubados nas mesmas condições.

Tabela 3 - Composição do meio básico sólido de ativação do microrganismo

Nutrientes	Concentração (g/L)
$NaNO_3$	3,00
$MgSO_4.5H_2O$	1,02
KCl	0,50
$FeSO_4.7H_2O$	0,01
K_2HPO_4	1,00
Agar-agar	18,00

$NaNO_3$: nitrato de sódio, $MgSO_4.5H_2O$: sulfato de magnésio pentahidratado, KCl: cloreto de potássio, $FeSO_4.7H_2O$: sulfato ferroso heptaidratado, K_2HPO_4: fosfato de potássio dibásico. Fonte: O autor, 2024.

3.6 **Preparo do inóculo para o Cultivo em Estado Sólido**

Após duas ativações sucessivas (Subseção 3.5), cerca de 10 mL de uma solução Tween 80 (0,3% v/v) foram adicionados aos tubos de gelose inclinada para desprendimento dos conídios do *A. niger*. A suspensão foi obtida diretamente e sua concentração foi determinada por contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer. O volume de inóculo foi calculado visando uma concentração final de 10^7 de conídios por grama de meio de cultivo sólido.

3.7 **Produção e extração enzimática proveniente da *A. niger* por CES**

3.7.1 Produção de lipase: avaliação do reator de bancada do tipo de bandeja

A produção de lipase por *A. niger* foi avaliada utilizando dois reatores do tipo bandeja em diferentes configurações, sendo: 1) Frasco erlenmeyer com volume de 250 mL, diâmetro de 9 cm, altura de 15 cm e área de base de 254,47 cm²e 2) frasco plástico de titulação com volume de 100 mL, diâmetro de 4 cm, altura de 11 cm e área de base de 12,57 cm². Em cada frasco, os meios de cultivo tiveram um leito de altura 1,5 cm.

No erlenmeyer, foram utilizados 15g de farelo de algodão puro e uma mistura de farelo de algodão e trigo (7,5 g de cada). Foram umedecidos com água destilada para atingir um porcentual teórico de umidade inicial de 45%. No frasco plástico de titulação, foram empregados 3,4 g de farelo de algodão puro e uma mistura de farelo de algodão e trigo (1,7 g de cada) com umidade inicial teórico avaliado na Subseção 3.7.2. Em seguida, os meios utilizados foram esterilizados a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. Após a esterilização, os meios destinados ao CES foram suplementados com óleo de mamona (2% m/m), previamente

filtrado através de uma membrana de 0,20 μm (Whatman®), inoculados com suspensão de *A. niger* (10^7 esporos/g), e incubados a 32°C por 48 horas em uma incubadora B.O.D. O experimento foi realizado em duplicata. Após o cultivo, as amostras de umidade (Subseção 3.7.3) e pH finais foram reservadas para análise (Subseção 3.7.4). Além disso, foi realizada a extração enzimática (Subseção 3.7.5) para determinação da atividade lipásica (Subseção 3.8). A descrição do processo experimental e os detalhes das unidades experimentais do CES são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Unidades experimentais do Cultivo em Estado Sólido para produção de lipase

(A) Erlenmeyer contendo os meios inoculados após 48 horas de cultivo. (B) Frasco plástico de titulação contendo os meios inoculados após 48 horas de cultivo. Fonte: O autor, 2024.

3.7.2 Produção de lipase: avaliação da porcentagem de umidade inicial dos meios

Foram realizados experimentos em frascos de titulação plásticos, onde a umidade inicial teórica foi ajustada para 30, 45 e 60% (Figura 11), usando água destilada até alcançar os níveis desejados, seguida de homogeneização manual. Cada frasco continha 3,4 g de farelo de algodão puro e 3,4 g da mistura de farelo de algodão e trigo (1:7:1,7 g), ambos com 2% m/m de óleo de mamona. Esses valores de umidade foram calculados teoricamente para estabelecer condições experimentais variadas, com o objetivo de identificar a umidade ideal para maximizar a produção de lipase.

Figura 11 - Arranjo experimental para avaliação da umidade inicial na produção de lipase

Agente umidificante: Água destilada.*Todos ensaios foram suplementados com óleo de mamona. Fonte: O autor, 2024.

3.7.3 Determinação do teor de umidade: inicial e final dos meios de cultivo

Após a adequação da porcentagem da umidade inicial dos meios utilizados, foi determinado o teor de umidade inicial e final (antes e após o CES), utilizando um método gravimétrico conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (Subseção 3.2.2.1, *Eq*. 1). As amostras foram pesadas e secas em estufa a 100°C por 24 horas, até atingirem massa constante. A Figura 12 ilustra os meios de cultivo após 24 horas de secagem na estufa.

Figura 12 - Farelo de algodão puro e a mistura do farelo de algodão e trigo após secagem

(A) Farelo de algodão. **(B)** Mistura do farelo de algodão e farelo de trigo. Fonte: O autor (2024).

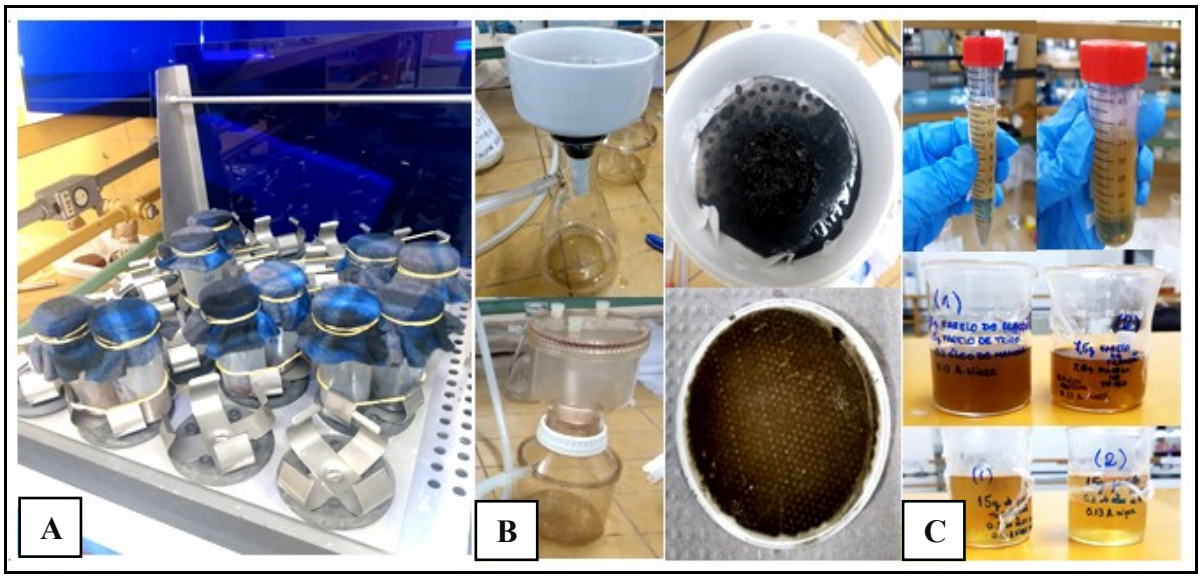
3.7.4 Determinação do teor de pH

A análise do pH das amostras foi realizada adicionando-se 7 mL de água destilada às amostras de 5 g das matérias-primas e agitando-se manualmente. Para as amostras de 3,4 g, adicionou-se 5 mL de água destilada, seguida também de agitação manual. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante dessas amostras foi medido em potenciômetro. Cada medição foi feita em triplicata. A medição de pH foi realizada tanto antes quanto após o Cultivo em Estado Sólido.

3.7.5 Obtenção do extrato enzimático

Após 48 horas de cultivo, adicionou-se 2,4 mL tampão de citrato de sódio 0,1 mol. L^{-1} (pH 5) por grama de meio de cultivo aos frascos erlenmeyer/ frascos de plástico. Em seguida, os frascos foram agitados em um incubador rotatório a 170 rpm, a 32°C por 1 hora (Veloso, 2018). O meio de cultivo foi filtrado com uma bomba a vácuo usando um funil de buchner acoplado ao kitassato, separando o extrato enzimático do sólido cultivado. Uma segunda filtração foi realizada com membranas de nanocelulose de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µL, também utilizando bomba a vácuo. O filtrado foi armazenado em congelador por 24 horas para determinação da atividade enzimática (Subseção 3.8). As etapas deste processo estão ilustradas na Figura 13.

Figura 13 - Etapas de agitação (A), filtração (B) e a obtenção do extrato enzimático (C)



Fonte: O autor, 2024.

3.8 **Determinação da atividade da lipase**

Para determinar a atividade enzimática do extrato enzimático bruto de *A. niger*, utilizou-se *p*-nitrofenilaurato (*p*-NFL) como substrato em uma solução aquosa de tampão fosfato pH 7,0. Esta determinação foi realizada em um espectrofotômetro com um banho termostato com temperatura controlada a 30 °C. Foi preparada inicialmente uma solução tampão de fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, e uma solução de substrato contendo *p*-nitrofenilaurato. Em uma cubeta de vidro, combinou-se 2,2 mL de tampão com 0,25 mL de substrato. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato enzimático concentrado à cubeta, seguida imediatamente pela medição da absorbância a 412 nm no espectrofotômetro. Cada análise foi realizada em duplicata. O cálculo da atividade hidrolítica foi baseado na taxa de formação de *p*-nitrofenol e expresso em unidades por mililitro (U/mL), conforme detalhado na Equação 5. A unidade de atividade enzimática (1 UI ou 1 U) é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1,0 µmol de produto. Além disso, também foram determinadas unidades por grama (U/g $_{\text{massa seca}}$), considerando-se a massa seca e a umidade do meio de cultivo, conforme as Equações 6 e 7.

$$AH = \frac{(Abs/min) \text{ x } Vf \text{ x } f}{V_e} \qquad (Eq.\ 5)$$

AH= Atividade hidrolítica (UI/mL);
(*Abs*/*min*) = Coeficiente angular da reta, obtida com o avanço da reação de hidrólise;
Vf =Volume final do meio reacional (mL);
f = Fator do espectro, obtido por curva padrão com *p*-nitrofenol;
Ve =Volume do extrato enzimático concentrado (mL).

A partir do cálculo da atividade lipásica em U/mL, foi feito cálculo da atividade lipásica em U/g a partir das Equações 6 e 7:

$$P_u = \frac{Q_{mt} \, x \, U}{100} \qquad (Eq.\ 6)$$

$$A_{Lms} = \frac{A_L \, x \, V_t}{Q_m - P_u} \qquad (Eq.\ 7)$$

Onde,
P_u = Massa da amostra de água presente no cultivo (g);
Q_m = Quantidade de massa da amostra de meio de cultivo utilizada para análise (g);
Q_{mt} = Quantidade de massa total usada no Cultivo em Estado Sólido;
U = Umidade do meio de Cultivo em Estado Sólido;
A_{Lms} = Atividade lipásica de massa seca (U/g $_{\text{massa seca}}$);
A_L = Atividade lipásica em U/mL;
V_t = Volume da solução tampão (mL).

3.9 **Imobilização de lipase em copolímero Sty-DVB e avaliação do desempenho dos biocatalisadores imobilizados**

3.9.1 Imobilização de lipase *A. niger* ao copolímero Sty-DVB

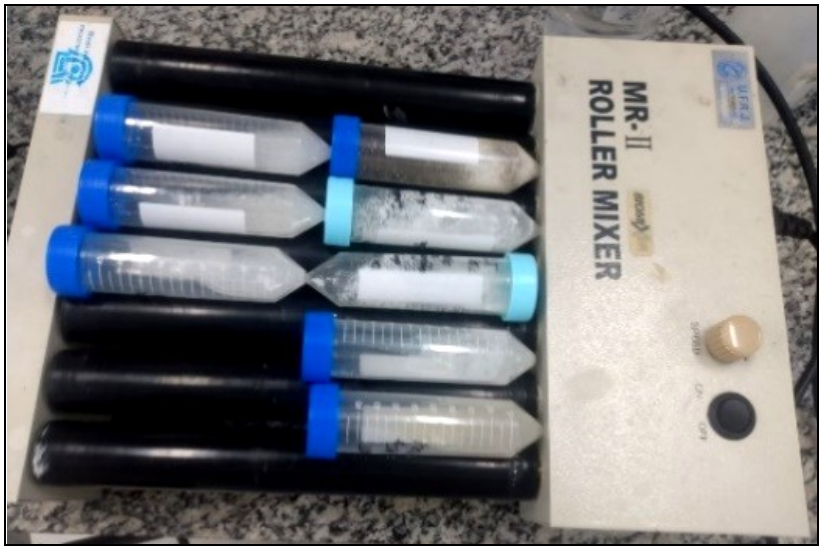
A imobilização da lipase de *A. niger* ao suporte seguiu adaptações de metodologia descrita por Pinto *et al*., 2018; Cipolatti *et al*., 2018; Ribeiro *et al*., 2022. Neste contexto, o primeiro passo do processo de imobilização foi o pré-tratamento dessas partículas de

polímero, a fim de facilitar o acesso da solução enzimática na estrutura porosa das partículas do polímero (Pinto *et al*., 2018). Foi pesado cerca de 1g do polímero e pré-tratado com os seguintes solventes, em sequência: etanol (95%) (30 mL), água destilada (30 mL) e solução tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7). Ao final deste processo as partículas foram filtradas e armazenadas na geladeira.

Em seguida, foi realizada a preparação da solução enzimática por meio da diluição de cada uma das lipases produzidas e comercial de *A. niger* (0,5 mL) em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7 (9,5 mL).A imobilização foi iniciada através da adição da solução enzimática (10 mL) em tubo falcon de 50 mL de capacidade contendo suporte (0,5 g) pré-tratado na etapa anterior. Posteriormente, esse tubo foi colocado em um agitador de tubo roller, empregando a velocidade de agitação de 40 rpm (Figura 14). Durante o processo de imobilização, a atividade enzimática inicial foi medida em 12,5 U/g de suporte.

Para a determinação da cinética de imobilização, foram coletadas alíquotas de solução enzimática (150 µL) presentes no sobrenadante (na forma solúvel) nos tempos de 0, 15, 60 e 120 minutos de contato. Estas alíquotas foram empregadas para determinar a atividade hidrolítica, empregando a solução de substrato *p*-NFL (preparada anteriormente com 0,0086g de *p*-NFL, 5 mL de acetonitrila e 5 mL de dimetilsulfóxido).

Figura 14 - Unidade experimental empregada para a imobilização enzimática



Fonte: O autor, 2024.

A cinética de imobilização foi avaliada através do decaimento da atividade hidrolítica da enzima presente no meio reacional. A reação de hidrólise de *p*-NFL formaum produto de

coloração amarela característica, o cromóforo *p*-nitrofenol. Esta reação foi usada para determinar a quantidade de produto formado em intervalos de tempo de amostragem e para quantificar a atividade da enzima ainda presente na fase solúvel durante a imobilização.

Para acompanhar o progresso da imobilização foi utilizado um espectrofotômetro (λ=412) acoplado a um banho termostático, operando a 30 °C. Para iniciar a dosagem foram adicionados à cubeta de vidro, 2,2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH 7,0) e 0,25 mL de solução de substrato. Em seguida, a cubeta foi acoplada ao espectrofotômetro e 50 µL da solução enzimática foram adicionados, iniciando a reação. As análises foram repetidas em duplicata ou triplicata para cada intervalo de tempo. Ao término da imobilização, os biocatalisadores obtidos foram filtrados, lavados com tampão de fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0), secos em dessecadores e armazenados na geladeira até a realização da reação de hidrólise.

A unidade de atividade enzimática (1UI, Unidade Internacional ou 1 U) corresponde à quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1,0 µmol de produto (no caso, *p*-nitrofenol) por minuto. O cálculo para determinação da atividade de hidrólise das enzimas na forma solúvel é apresentado na Equação 8 e o rendimento de imobilização foi determinado de acordo com a Equação 9.

$$AH = \frac{(Abs/min) \times Vf \times f}{V_e} \qquad (Eq.\ 8)$$

AH =Atividade hidrolítica (UI/mL);

(*Abs*/*min*) = Coeficiente angular da reta, obtida com o avanço da reação de hidrólise;

Vf =Volume final do meio reacional (mL);

f =Fator do espectro, obtido por curva padrão com *p*-nitrofenol;

Ve =Volume de enzima devidamente diluída (mL).

$$RI\ (\%) = \frac{U_{teo} \times 100}{U_e};\ U_{teo} = U_e - U_s \qquad (Eq.\ 9)$$

Onde,

RI = Rendimento de imobilização enzimática (%);

U_{teo} = Atividade da enzima teoricamente imobilizada ($U/g_{suporte}^{-1}$);

U_e = Atividade enzimática da solução no início do processo de imobilização ($U/g_{suporte}^{-1}$);

U_s = Atividade enzimática da solução no final do processo de imobilização ($U/g_{suporte}^{-1}$).

3.9.2 Avaliação do desempenho dos biocatalisadores imobilizados em reações de hidrólise

Após a síntese dos biocatalisadores imobilizados, avaliou-se seu desempenho em reações de hidrólise. Foram avaliados outros parâmetros de imobilização como: Atividade hidrolítica do biocatalisador (*p*-NFL), retenção de atividade (R_a) enzimática e atividade de hidrólise do biocatalisador empregando como substrato o óleo de mamona.

3.9.2.1 Determinação da atividade hidrolítica e retenção de atividade de enzimas imobilizadas

A determinação da atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas seguiu adaptações das metodologias descritas por Pinto *et al*., 2018; Cipolatti *et al*., 2018. A reação de hidrólise do biocatalisador foi novamente determinada com auxílio do espectrofotômetro (λ=412 nm) a uma temperatura de 30 °C (temperatura assegurada pelo acoplamento de um banho térmico ao equipamento), usando o *p*-NFL como substrato.

Para iniciar a reação, (2,2 mL) de tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH = 7,0) e 0,25 mL de solução de substrato (*p*-NFL) foram adicionados a cubeta de vidro. Em seguida, adicionou-se o biocatalisador na cubeta 0,075g, iniciando a reação de hidrólise propriamente dita. Os experimentos foram realizados em duplicata.

A determinação da atividade de hidrólise do biocatalisador foi realizada a partir da Equação 10 e a determinação da atividade retida (Ra), foi feita por meio da Equação 11.

$$A_{imohid} = \frac{(Abs/min) \times Vf \times f}{m_e} \qquad (Eq.\ 10)$$

Onde,

A_{imohid} = Atividade hidrolítica do biocatalisador (UI/g_{bio});

(*Abs*/*min*) = Coeficiente angular da reta, obtida com o avanço da reação de hidrólise;

Vf = Volume final do meio reacional (mL);

f = Fator do espectro, obtido por curva padrão com *p*-nitrofenol;

m_e = Massa de biocatalisador utilizada na reação (g).

$$R_a\,(\%) = \frac{A_{imohid}}{U_{teo}} \text{ x } 100 \qquad (Eq.\ 11)$$

Onde,

R_a = retenção de atividade enzimática (%);

A_{imohid} = atividade hidrolítica do biocatalisador (UI/g_{bio});

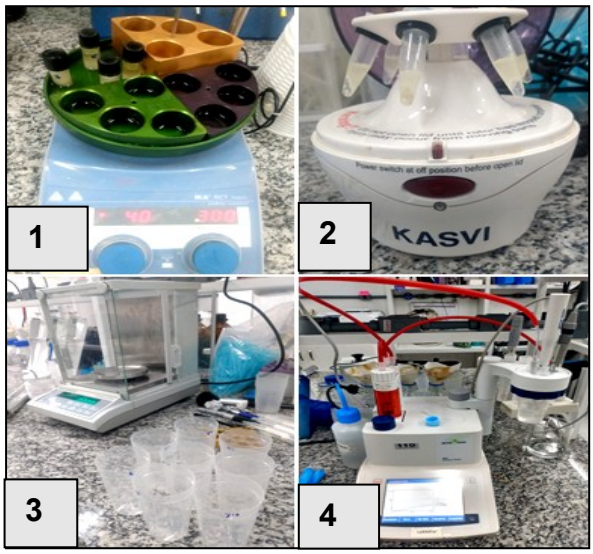
U_{teo} = atividade da enzima teoricamente imobilizada ($U/g_{suporte}^{-1}$).

3.9.2.2 Determinação da atividade de hidrólise dos biocatalisadores usando óleo de mamona

As reações de hidrólise do óleo de mamona foram conduzidas em uma placa de aquecimento equipada com um agitador magnético de 16 poços. A temperatura do meio reacional foi mantida a 40 °C usando um banho de aquecimento, enquanto a agitação foi constante a 300 rpm. Antes do início das reações, preparou-se um controle branco, utilizando um frasco de vidro com 2,5 g de óleo de mamona e 0,93 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7. Os biocatalisadores incluíram lipase de *A. niger* imobilizada em suporte de Sty-DVB, produzida a partir do farelo de algodão, e a partir da mistura dos farelos de algodão e trigo, além da lipase comercial de *A. niger*. Também foram utilizadas lipases imobilizadas comerciais: Lipozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica*), Lipozyme TL (lipase *Thermomyces lanuginosus*) e Lipozyme RM (lipase *Rhizomucor miehei*). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Cada reação foi iniciada pela adição de 0,075 g do biocatalisador ao meio reacional em frascos de vidro, seguida de agitação. Alíquota do sobrenadante (100 µL) foram coletadas no tempo inicial (0) e após 24 horas de reação, agitadas em uma minicentrífuga e, em seguida, pesadas em frasco de titulação na balança analítica (Figura 15), com as massas devidamente anotadas. As amostras nos frascos foram então adicionadas a uma mistura de etanol e acetona (1:1, v/v) para determinar o teor de ácido ricinoleico não consumido presente no meio reacional. Esta determinação foi realizada por titulação ácido-base utilizando uma solução de NaOH (0,9641 mol/L).

Figura 15 - Processo experimental para hidrólise com óleo de mamona



(1) Reação conduzida a 40°C e 300 rpm em placa de aquecimento e agitação; (2) Amostras de 100 µL do sobrenadante agitadas em minicentrífuga; (3) Pesagem das alíquotas nos frascos de titulação em balança analítica; (4) Determinação do teor não consumido por titulação ácido-base com NaOH. Fonte: O autor, 2024.

Durante a reação de hidrólise catalisada pelos biocatalisadores, observou-se um aumento na acidez do meio reacional devido à liberação de ácido ricinoleico (ácido majoritário) a partir do óleo de mamona. Consequentemente, o consumo de NaOH na titulação aumentou, indicando a formação de ácidos graxos livres. O valor da acidez das amostras foi calculado de acordo com a Equação 12. O cálculo da porcentagem de conversão do ácido graxo majoritário durante a reação de hidrólise foi feito de acordo com a Equação 13.

$$\text{Acidez (\% m/m)} = \frac{V x\, C_{NaOH}\, x10^{-3} x\, MM_{NaOH}\, x\, 10^{2}}{m_{amostra}} \qquad (Eq.\ 12)$$

Onde:

V = volume de NaOH gasto na titulação (mL);

C_{NaOH} = concentração de NaOH (mol/mL) (0,9641);

MM_{NaOH} = massa molar de NaOH (g/mol);

m = massa da amostra (g).

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(\text{acidez}_{final} - \text{acidez}_{inicial}) \times 100}{\text{Acidez}_{inicial}} \qquad (Eq.\ 13)$$

3.10 **Síntese e caracterização do suporte polimérico estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB)**

3.10.1 Síntese do suporte polimérico Sty-DVB

A síntese do copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) foi conduzida por meio de polimerização em suspensão aquosa, em um sistema com balão de fundo redondo de 3 bocas com capacidade 1000 mL. Neste balão foram acoplados um condensador de refluxo e uma haste reta com hélice basculante, a outra extremidade da haste foi conectada a um agitador mecânico digital.

A fase aquosa foi preparada pela dissolução dos estabilizadores poli (álcool vinílico) (PVA) (0,5% p/v em relação à água) e do cloreto de sódio (NaCl) (0,5% p/v em relação à água) em cerca de 200 mL de água destilada. Essas soluções foram transferidas para uma proveta graduada e o volume da solução resultante foi completado com água destilada de modo a obter-se uma razão fase aquosa/fase orgânica de 4:1 (v/v). A fase orgânica foi preparada dissolvendo-se azobisisobutironitrila (AIBN) (em concentração igual a 1% em relação à soma do número de moles dos monômeros) em uma solução constituída por monômeros de estireno (Sty), divinilbenzeno (DVB). À mistura dos monômeros e iniciador foi adicionada em uma mistura dos diluentes tolueno e n-heptano na proporção 20/80 (% v/v). Após esta adição a solução orgânica foi homogeneizada. A fase aquosa foi transferida para o balão reacional, a agitação mecânica foi ajustada a 230 rpm. Após 30 minutos a fase orgânica foi gotejada de forma lenta e contínua sobre a fase aquosa, com auxílio de uma pipeta graduada e pêra. A mistura reacional foi, então, aquecida a 80 °C em banho termostatizado, sob agitação e mantida por 10 horas. As quantidades dos reagentes estão especificadas na Tabela 4.

Ao término da reação, o copolímero foi separado por filtração sob pressão reduzida para eliminar os agentes de suspensão. Após a filtração, as partículas foram lavadas abundantemente com água destilada, etanol e acetona com o auxílio do funil, até que o filtrado se apresentasse límpido e solúvel em água. Posteriormente, o copolímero foiseco em estufa a 60 ºC por 24 horas. Finalmente, as partículas foram armazenadas em recipiente identificado, e a massa foi medida para determinar o rendimento.

Tabela 4 - Principais parâmetros usados na preparação do copolímero de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB)

Fase orgânica			**Fase aquosa**		
Sty (% mol)	**DVB (% mol)**	**Tol/n-Hep (% v/v)**	**Água destilada (mL)**	**PVA (%)**	**NaCl (%)**
40	60	20/80	393,2	0,5	0,5

Sty: estireno; DVB: divinilbenzeno; Tol: Tolueno; n-Hep: n-Heptano; PVA: poli (acetato de vinila); NaCl: cloreto de sódio. Fonte: O autor, 2024.

3.10.2 Caracterização físico-química do suporte polimérico

O copolímero Sty-DVB foi caracterizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) através de determinação do rendimento da reação de polimerização; microscopia óptica (MO); microscopia eletrônica de varredura (MEV); análise de área específica, volume de poros e diâmetro médio de poros por adsorção de nitrogênio (ASAP); espectroscopia de infravermelho (FTIR); análise termogravimétrica (TGA).

3.10.2.1 Rendimento da reação de polimerização

O rendimento da reação de polimerização foi determinado por gravimetria através da correlação entre a massa teórica do polímero e a massa experimental. A massa teórica do polímero foi determinada considerando o número de mols e a densidade dos monômeros usados na reação de polimerização. A massa experimental, determinada através da pesagem das partículas após etapa de purificação e secagem.

3.10.2.2 Microscopia óptica (MO)

Na análise, empregou-se um Microscópio óptico da marca Nikon, especificamente o modelo Eclipse E200, acompanhado de uma câmera da marca BEL photonics, modelo IS 500. A calibração do equipamento foi conduzida utilizando a lente de aumento de 4 vezes, utilizando a lâmina padrão fornecida com o microscópio. As imagens foram capturadas na mesma escala da calibração, mantendo o aumento de 4 vezes para garantir a consistência das medições.

3.10.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada em um microscópio eletrônico JEOL (Modelo: JSM-6510LV), equipado com EDS Quantax 70 de Bruker. O processo de metalização foi realizado através de recobrimento das partículas com uma fina camada de ouro em um metalizador BAL-TEC (Modelo: SCD 005 Sputter Coater). Para a observação da superfície, as partículas foram fixadas em suporte metálico com fita adesiva dupla face, metalizadas e colocadas na câmara de vácuo do microscópio. Para a obtenção das imagens, foram utilizadas voltagens de aceleração de 15 e 20 keV e aumentos de 500 e 2000 vezes.

3.10.2.4 Determinação da área específica, volume e diâmetro médio de poros através de dados de adsorção de nitrogênio (ASAP)

A área específica, volume e diâmetro médio de poros do Sty-DVB foram determinados por adsorção física de nitrogênio aos suportes sólidos. A amostra foi pré-tratada sob aquecimento a 110 ºC por 12 horas em um sistema de vácuo. Após, a amostra foi submetida a aumento da pressão com nitrogênio gasoso. Foram construídas curvas de isotermas correlacionando a quantidade de gás adsorvida pelas pérolas de copolímero (cm^3/g^{-1}) em função da pressão relativa (P/P0). A Equação de BET foi empregada na faixa linear da curva para o cálculo da área específica e a determinação do volume e diâmetro de poros foi feita empregando o método de BJH (Teixeira, *et al*., 2001).

3.10.2.5 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As análises foram realizadas com um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Modelo: Perkin Elmer Frontier, número de série: C105496). O método adotado foi o ATR (Reflexão Total Atenuada), utilizando um cristal de diamante. Foram obtidas oito acumulações e o ruído de fundo foi removido antes da análise da amostra. A faixa de leitura compreendeu o IR médio, de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}.

3.10.2.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando um equipamento TGA Q50 da marca TA Instruments, identificado pelo número de série 0050-0390. A calibração do equipamento foi conduzida utilizando padrões de Alumel e Níquel. Durante a análise, uma porção da amostra foi colocada em um cadinho de platina. O equipamento foi programado para aquecer a amostra a uma taxa de aquecimento de 10 ºC/min, variando de 50°C até 800°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da composição centesimal parcial dos farelos de algodão e trigo

A determinação da composição centesimal dos farelos de algodão e trigo foi um passo fundamental na avaliação da utilização como matérias-primas para a produção de lipase. A análise incluiu os teores de umidade, cinzas, lipídios e sólidos totais, fornecendo uma base quantitativa sobre a qualidade e a composição dos farelos. Esses parâmetros foram essenciaispara o Cultivo em Estado Sólido (CES) com a linhagem mutante de *Aspergillus niger* 11T53A14 e óleo de mamona como indutor.

O uso de farelo de algodão, farelo de trigo e óleo de mamona como fontes de carbono é amplamente justificado devido às suas características nutritivas, ampla disponibilidade no Brasil e viabilidade econômica, especialmente na produção de lipases através de *A. niger* em CES. Essas matérias-primas não apenas otimizam a eficiência do processo fermentativo, mas também agregam valor ao oferecer uma solução sustentável e acessível para a biotecnologia industrial. O farelo de algodão apresenta como uma matriz de suporte e fonte de nutrientes promissora, devido ao seu elevado teor de lipídios, criando um ambiente propício para a produção de enzimas (Ohara *et al*., 2018; Aguieiras *et al*., 2019). O farelo de trigo, com seu perfil nutricional favorável, é utilizado como suplemento para aumentar a porosidade da matéria-prima, otimizando o crescimento microbiano e produção da lipase (Arora *et al*., 2018; El-Ghonemy *et al*., 2020). Adicionalmente, o óleo de mamona (2% m/m), entre outros óleos, demonstrou ser uma fonte eficaz de carbono quando combinado com farelo de trigo, maximizando a atividade lipásica em CES (Dutra *et al*., 2008).

Com base nessas informações, foram realizados experimentos iniciais utilizando 15 g de farelo de algodão puro e 7,5 g de farelo de algodão combinado com 7,5 g de farelo de trigo, mantendo uma umidade teórica inicial de 45% em erlenmeyer. Em uma fase posterior, foram testadas quantidades reduzidas: 3,4 g de farelo de algodão puro e 1,7 g de farelo de algodão combinado com 1,7 g de farelo de trigo, variando a umidade inicial teórica entre 30; 45 e 60% em frasco plástico de titulação. Todos os experimentos foram conduzidos com a adição de óleo de mamona na concentração de 2% m/m.

A avaliação da composição físico-química das matérias-primas é fundamental para entender como diferentes substâncias influenciam a síntese de enzimas e o crescimento de microrganismos. A Tabela 5 apresenta a composição centesimal parcial dos farelos utilizados, destacando as diferenças entre eles. É importante observar que essa composição é parcial e

não inclui todos os componentes nutricionais, como carboidratos e outras proteínas. No entanto, as análises feitas permitem compreender as principais características dos farelos e sua possível influência na produção de lipase.

Tabela 5 - Composição centesimal das matérias-primas: farelo de trigo e farelo de algodão

Coprodutos	**Cinzas (g/100g)**	**Umidade (g/100g)**	**Lipídios (g/100g)**	**Sólidos totais (g/100g)**
Farelo de trigo	5,6 ± 0,03	9,3 ± 0,04	4,3 ± 0,02	90,7 ± 0,04
Farelo de algodão	3,8 ± 0,00	6,7 ± 0,10	11,2 ± 0,40	93,3 ± 0,10

Fonte: O autor, 2024.

Comparando as matérias-primas, a Tabela 5 revela que o farelo de trigo apresenta um teor de cinzas ligeiramente mais alto (5,6 ± 0,03 g/100 g) em relaçãoao farelo de algodão (3,8 ± 0,0 g/100 g). A presença de cinzas no farelo de trigo indica uma maior concentração de minerais e nutrientes essenciais. El-Ghonemy *et al*. (2020) destacam que o farelo de trigo é uma escolha vantajosa devido ao seu baixo teor de lignina com elevado valor nutricional, o que favorece o crescimento de microrganismos e produção enzimática. Além disso, o farelo de trigo apresenta uma umidade um poucomaior (9,3 ± 0,04 g/100 g) em comparação ao farelo de algodão (6,7 ± 0,1 g/100 g).

Costa *et al*. (2017) observaram que,quandomatérias-primas possuem níveis mais altos de umidade, pode ocorrer uma reduçãona porosidade, restringindo a penetração de oxigênio e facilitando a contaminação bacteriana. Contudo, a relevância desses efeitos pode variar com as características específicas da matéria-prima e as condições do processo. El-Ghonemy *et al*. (2020) destacam que, mesmo em condições de alta umidade, o farelo de trigo fornece uma grande área específica. Isso sugere que a ampla área específicapode compensar os efeitos negativos da umidade, facilitando a distribuição de nutrientes e criando condições mais favoráveis para o metabolismo de microrganismo *A. niger* no CES.

Em contrapartida, o farelo de algodão exibe um teor superior de lipídios (11,2 ± 0,4g100/g) em comparação com o farelo de trigo (4,3 ± 0,02 g/ 100 g) (Tabela 5). Estudos indicam que meios enriquecidos com óleos são eficazes para estimular a produção destalipase (Ohara *et al*., 2018), destacando o impacto positivo dos lipídios nesse processo.O farelo de algodão, extraído das sementes durante a produção de óleo, destaca-se por sua composição versátil, frequentemente apresentando altos teores de lipídios (Olukomaiya *et al*., 2019). O

óleo derivado desse coproduto é formado por triacilgliceróis derivados deácido linoleico (56,9%), ácido oleico (16,9%) e ácido palmítico (23,3%), componentes reconhecidospor seu potencial em induzir a produção de lipase (Medeiros *et al*., 2023). Segundo Carvalho *et al*. (2023), as lipases produzidas pelos microrganismos, como *Aspergillus niger*, são excretadas com função de atuarem na hidrólise dos triacilgliceróis presentes no meio, liberando ácidos graxos essenciais para o metabolismo celular. À medida que a concentração desses ácidos graxos diminui, os microrganismos secretam lipases extracelulares para degradar os lipídios restantes no meio de cultura, fornecendo assim os ácidos graxos necessários para a manutenção metabólica e o crescimento das células.

Na Tabela 5 são mostrados também que o farelo de algodão apresentou 93,3 ± 0,1 g/100g de sólidos totais, comparável aos 90,7 ± 0,04 g/100 g do farelo de trigo, evidenciando uma quantidade de matéria seca disponível para os microrganismos. Medeiros *et al*. (2023), relataram que o farelo de trigo possui um teor de proteína bruta de 21,97 ± 0,28 g/100 g, inferior ao encontrado no farelo de algodão. Em geral, o farelo de algodão apresenta uma faixa de proteína bruta entre 22,2 e 56,2 g/100 g, com energia metabolizável variando de 7,4 a 11,99 MJ/kg (Olukomaiya *et al*., 2019). A elevada concentração de proteína bruta destaca a importância do farelo de algodão como uma fonte nutritiva essencial, potencialmente favorecendo a produção de lipase por *A. niger*.

Na literatura, a produção de lipase por *A. niger* em CES é fortemente influenciada pelo teor lipídico dos coprodutos agroindustriais utilizados. Ohara *et al*. (2018) demonstraram que o cultivo em farelo de algodão, com um teor lipídico de 8,36% após 48 horas de CES com 50% de umidade, apresentou uma atividade enzimática considerável de 323 U/g, utilizando *A. niger*. Em contraste, Aliyah *et al*. (2016) observaram que o farelo de milho, apesar de ter um teor proteico elevado (9,73%), apresentou uma atividade de lipase de *A. niger* relativamente baixa (3,92 U/mL) devido ao seu baixo teor de lipídios (2,12%). Por outro lado, coprodutos de tofu, com um teor de lipídios de 10,7%, resultaram em uma produção de lipase mais elevada, alcançando 8,48 U/mL. Medeiros *et al*. (2023) investigaram uma combinação da torta de algodão (teor lipídico de 7,80 ± 0,80 g/100 g) e farelo de trigo (teor lipídico de 3,06 ± 0,09 g/100g), suplementada com azeite de oliva, óleo de tilápia, tween 80 e triton-x, onde o cultivo com farelo de algodão em menor proporção (1,5:3,5) exibiu uma atividade enzimática menor de 0,091 U/g, usando *A. niger*. No entanto, Aliyah *et al*. (2016) apontaram que uma concentração excessiva de lipídios pode criar um sistema bifásico que prejudica a transferência de oxigênio e nutrientes para o microrganismo, afetando o crescimento do fungo. É importante ressaltar que a relação entre teor lipídico e atividade enzimática pode ser

complexa e influenciada por múltiplos fatores, incluindo a composição da mistura de matérias-primas, adições de suplementos de carbono e condições ambientais do meio de cultivo (Costa *et al*., 2017).

4.2 **Produção de lipase de *A. niger* em Cultivo em Estado Sólido**

4.2.1 Avaliação do reator de bancada do tipo de bandeja

O estudo de produção da lipase de *A. niger* em CES foi conduzido em biorreator do tipo bandeja, variando os tipos de frascos. Inicialmente, frascos erlenmeyer foram utilizados com 15 g totais de meios de cultivo. Posteriormente, visando uma abordagem econômica, a escala experimental foi reduzida com a utilização de frascos plástico de titulação contendo 3,4 g totais de meios de cultivo sólido, conforme descrito na Subseção 3.7.1. Adicionalmente, essa abordagem possibilitou a realização de múltiplos testes simultâneos em escala laboratorial, otimizando a eficiência do processo.

A produção enzimática foi comparada utilizando farelo de algodão puro e a combinação de farelo de algodão com farelo de trigo 1:1 m/m, ambos suplementados com 2% m/m de óleo de mamona. A Tabela 6 apresenta os parâmetros experimentais para ensaios em erlenmeyer e frascos plásticos. Esses dados fornecem uma visão abrangente das condições de cultivo com uma umidade teórica inicial de 45% e sua influência na produção de lipase por *A. niger*.

Tabela 6 - Parâmetros experimentais e atividade lipásica de *A. niger* do CES em erlenmeyer e frasco plástico

Exp.	**Frasco**	**Farelo de algodão (g)**	**Farelo de trigo (g)**	**Óleo de mamona (%)**	**[1]Umid Inicial (%)**	**[2]Umid Final (%)**	**[3]pH Inicial**	**[4]pH Final**	**Inóculo de *A. niger* (esporos/ g)**	**[5]Atividade lipásica ($U/g_{massa\ seca}$)**
1	**Erlenmeyer** (250 mL, 9 cm de diâmetro, 15 cm de altura, 254,47 cm² de área)	15	0,0	2	43	31	6,6	5,9	10^7	51,4
2		7,5	7,5		45	43	6,2	5,9		35,5

4	**Frasco plástico** (100 mL, 4 cm de diâmetro, 11 cm de altura e 12,57 cm² de área)	3,4	0,0		40	23	6,4	4,9		40,2
7		1,7	1,7		47	34	6,3	5,5		25,2

[1]Umid inicial: Umidade inicial antes do CES; [2]Umid final: Umidade final do meio após 48 horas de CES; [3]pH inicial: pH do meio antes do CES; [4]pH final: pH do meio após 48 horas de CES; [5]Atividade Lipásica (U/g $_{massa\ seca}$): Unidade de atividade enzimática (calculado por grama, considerando-se a massa seca da matéria-prima). Temperatura: 32 ºC; Tempo de cultivo: 48 horas. Fonte: O autor, 2024.

Ao comparar os experimentos realizados no erlenmeyer, pode-se observar na Tabela 6 que, com a combinação de farelo de algodão com óleo de mamona foi alcançada uma atividade lipásica de 51,4 U/g $_{massa\ seca}$ (exp.1), superior à atividade alcançada empregando-se a combinação de farelo de algodão e farelo de trigo (7,5 g cada) suplementada com óleo de mamona, que foi de 35,5 U/g $_{massa\ seca}$. Da mesma forma, quando os experimentos foram realizados em frascos plásticos, observou-se que a combinação de farelo de algodão com óleo de mamona resultou uma atividade superior de 40,2 U/g $_{massa\ seca}$ (exp.4), em comparação com a mistura de farelo de algodão e farelo de trigo (1,7 g cada) suplementada com óleo de mamona, que apresentou uma atividade lipásica de 25,2U/g $_{massa\ seca}$. Esses resultados, indicam que a combinação de farelo de algodão com óleo de mamona foi cerca de 1,5 e 1,6 mais eficiente na produção de lipase por *A. niger* em comparação com a mistura de farelo de algodão e farelo de trigo, nos experimentos com erlenmeyer e frascos plásticos, respectivamente.

Essa diferença pode ser atribuída ao maior teor lipídico do farelo de algodão, conforme observado na Tabela 5, Seção 4.1, que fornece uma base rica em carbono e potencialmente induz a produção de lipase. O óleo de mamona, atuando como um indutor pode ter promovido um efeito sinérgico ao fornecer uma fonte adicional de carbono lipídico essencial para a produção da enzima. Dessa forma, a combinação de farelo de algodão com óleo de mamona pode ter criado um ambiente mais favorável para a atividade enzimática. De acordo com Carvalho *et al*. (2023) o teor lipídico da matéria-prima é um fator determinante para a eficiência da lipase, influenciando diretamente a atividade enzimática.

As variações na umidade inicial e final, conforme a Tabela 6 reflete a absorção e evaporação de água durante o CES, influenciadas pelas características das matérias-primas e por variáveis experimentais. Apesar das limitações na comparação direta entre diferentes tipos de frascos, a mistura de farelo de algodão e farelo de trigo mostrou maior retenção de

umidade do que o farelo de algodão puro. Além disso, o pH do meio de cultivo apresentou uma leve acidificação ao longo do processo.

4.2.2 Avaliação da porcentagem inicial de umidade na produção de lipase

A produção de lipase foi avaliada em duas formulações: uma composta por farelo de algodão (3,4 g), e outra, por uma mistura em proporções iguais de farelo de algodão e farelo de trigo (1,7 g cada). Ambas as formulações foram suplementadas com e sem o óleo de mamona (2 % m/m). Cada formulação foi testada em diferentes porcentagens de umidade teórica inicial (30, 45 e 60%), com o objetivo de determinar a umidade ideal para maximizar a produção enzimática. Os resultados experimentais no Cultivo em Estado Sólido (CES) são apresentados na Tabela 7. Observou-se que as umidades teóricas iniciais não foram completamente atingidas em ambas às formulações, possivelmente devido a variações na capacidade de retenção de água dos meios de cultivo.

O estudo revelou que o aumento no teor de umidade inicial dos meios de cultivo, de 31 a 59% (exp. 3 a 14), resultou em um aumento da atividade lipásica. Nos experimentos 3 a 5, compostos por farelo de algodão e óleo de mamona, as atividades lipásicas registradas foram de 24,9; 40,2 e 93,0 U/g $_{\text{massa seca}}$ para as umidades iniciais de 35; 40 e 54%, respectivamente. Observou-se que a atividade lipásica aumentou 3,7 vezes ao se elevar a umidade inicial de 35% para 54%. Na combinação de farelo de algodão e trigo com óleo de mamona (exp. 6 a 8), as atividades lipásicas obtidas foram de 14,0; 25,2 e 39,9 U/g $_{\text{massa seca}}$ para as umidades iniciais de 31, 47 e 58%, respectivamente. Nos experimentos sem óleo de mamona (exp. 9 a 14), verificaram-se aumentos similares na atividade lipásica. Nos experimentos 9 a 11, compostos por farelo de algodão puro, as atividades lipásicas foram de 20,4; 33,1 e 53,0 U/g $_{\text{massa seca}}$ para as condições de umidade inicial de 33; 43 e 54%, respectivamente, representando um aumento de 2,6 vezes ao se aumentar a umidade inicial de 33% para 54%. Na mistura de farelo de algodão e trigo sem óleo de mamona (exp. 12 a 14), as atividades lipásicas foram de 12,1; 20,0 e 36,9 U/g $_{\text{massa seca}}$ para as umidades iniciais de 31; 46 e 59%, respectivamente, indicando um aumento de 3,0 vezes.

Segundo Mandari *et al*. (2020) o teor de umidade adequado facilita a dissolução e a transferência de nutrientes, favorecendo a atividade da lipase. Nema *et al*. (2019) observaram que a atividade aumentou conforme a umidade inicial aumentava de 55% para 75%, atingindo a atividade máxima de 28,1 U/g $_{\text{massa seca}}$ em 75% de umidade, após 24 horas de CES com *A. niger* para a produção de lipase, utilizando uma mistura de casca de arroz, torta de semente de

algodão e casca de grama vermelha (2:1:1). Mahadik *et al*. (2002) relataram a produção máxima de lipase de *A. niger* com 71% de umidade inicial, utilizando farelo de trigo.

Tabela 7 - Parâmetros de cultivo e atividade lipásica em diferentes formulações e umidades

Exp.	**Farelo de algodão/Trigo (% m/m)**	**Óleo de mamona (%)**	**[1]Umid Inicial (%)**	**[2]Umid Final (%)**	**[3]pH Inicial**	**[4]pH Final**	**Inóculo (esporos/g de meio)**	**[5]Atividade lipásica ($U/g_{massa\ seca}$)**
3	100/00	2	35	20	5,5	5,7	10^7	24,9
4	100/00		40	23	6,4	4,9		40,2
5	100/00		54	29	6,4	5,5		93,0
6	50/50		31	16	6,2	6,1		14,0
7	50/50		47	34	6,3	5,5		25,2
8	50/50		58	47	6,3	5,1		39,9
9	100/00	-	33	22	6,6	5,0		20,4
10	100/00		43	38	6,3	5,5		33,1
11	100/00		54	50	6,3	5,5		53,0
12	50/50		31	29	6,3	4,6		12,1
13	50/50		46	34	6,2	5,5		20,0
14	50/50		59	56	6,2	5,2		36,9

[1]Umid inicial: Umidade inicial do meio antes do CES; [2]Umid final: Umidade final do meio após 48 horas de CES; [3]pH inicial: pH do meio antes do CES; [4]pH final: pH do meio após 48 horas de CES; [5]Atividade lipásica ($U/g_{massa\ seca}$): Unidade de atividade enzimática (calculado por grama, considerando-se a massa seca da matéria-prima). Temperatura: 32 ºC; Tempo de cultivo: 48 horas; -: Não contém. Fonte: O autor (2024).

Teores excessivamente altos de umidade, como 80%, têm o potencial de reduzir a porosidade da matéria-prima e aumentar a viscosidade do meio, impactando negativamente no crescimento dos fungos. Por outro lado, teores insuficientes de umidade resultam em um desenvolvimento limitado de fungos devido à reduzida difusão de nutrientes e menor inchaço da matéria-prima (Medeiros *et al*., 2023). Em condições extremas, abaixo de 12% de umidade, a ausência de desenvolvimento microbiano foi observada (Schmidell *et al*., 2002), pois a umidade necessária para o crescimento celular estava ausente. Essas considerações destacam a importância do controle preciso do teor de umidade durante o Cultivo em Estado Sólido para garantir condições ideais de crescimento e produção enzimática.

Ao analisar dos dados da Tabela 7 foi possível observar que o emprego de mistura do farelo de algodão, trigo e óleo (exp. 6, 7 e 8), resultou em uma retenção média de umidade de 68% durante o processo de CES, superando a retenção média de 56% observada nos experimentos com farelo de algodão puro e óleo de mamona (exp. 3, 4 e 5). Essa melhor retenção de umidade pode ser atribuída ao teor de fibra e a porosidade, principalmente do

farelo de trigo. Segundo Medeiros *et al*. (2023) o farelo de trigo possui um teor de fibra de 41,6 ± 2,5 g/100 g, superior ao teor de fibra da torta de algodão (27,6 ± 0,7 g/100 g). Possivelmente, a estrutura fibrosa da mistura das matérias-primas proporcionou maiores espaços porosos ou intersticiais, contribuindo para uma melhor retenção de água, favorecendo o crescimento microbiano e produção de lipases. Nos experimentos 7 e 8, que apresentaram a maior umidade inicial (47; 58%) e menor perda de umidade (27,7; 19%) ao longo do cultivo, foi alcançada maior atividade lipásica, dentro do conjunto de formulações estudada, alcançando 25,2 e 39,9 U/g $_{\text{massa seca}}$, respectivamente.

Nos experimentos de CES 3, 4 e 5 empregando farelo de algodão e óleo de mamona, foi possível observar uma maior perda de umidade (44%) ao longo do processo, possivelmente devido à evaporação facilitada, devido à menor capacidade de retenção de água deste substrato e às atividades metabólicas microbianas (Schmidell *et al*., 2002). É importante notar que, durante o cultivo uma bandeja com água foi mantida na incubadora, mas essa medida não foi completamente eficaz para assegurar a umidade dos meios.

Pode-se observar ainda na Tabela 7 que a atividade lipásica alcançada usando farelo de algodão e óleo de mamona (exp. 3, 4 e 5) foi 1,8; 1,6 e 2,3 vezes maior do que as atividades alcançadas usando a mistura de farelo de algodão, trigo e óleo de mamona, respectivamente os cultivos (exp. 6, 7 e 8). Esses resultados sugerem que o farelo de algodão, possui grande potencial para a produção de enzimas em processos de CES. O alto teor de lipídios (11,2 ± 0,4%) do farelo de algodão (Tabela 5, Seção 4.1) associado ao óleo de mamona e aliado a disponibilidade da umidade inicial, parece ter criado um ambiente propício para a máxima expressão da atividade da lipase (93,0 U/g $_{\text{massa seca}}$).

Ao comparar os experimentos 3 a 8 (com óleo de mamona) e 9 a 14 (sem óleo de mamona), observou-se que a suplementação com óleo de mamona teve um impacto mais notável na condição de 54% de umidade inicial utilizando o farelo de algodão puro. No experimento 5, com óleo de mamona, a atividade foi de 93,0 U/g $_{\text{massa seca}}$, enquanto no experimento 11, sem óleo de mamona, a atividade foi de 53,0 U/g $_{\text{massa seca}}$, resultando em uma diferença de 1,8 vezes, apesar de ambas as condições apresentarem 54% de umidade inicial. Para as demais condições de umidade, as diferenças de atividade foram mais discretas.

O pH inicial do farelo de algodão puro variou entre 5,5 e 6,4, diminuindo para valores finais entre 4,9 e 5,7, indicando leve acidez. Já na combinação com trigo, o pH inicial variou entre 6,2 e 6,3, resultando em um pH final entre 5,1 e 6,1, também mostrando leve acidez (Tabela 7). Essas variações de pH são provavelmente atribuídas não apenas ao aumento da atividade da lipase, que hidrolisa os triglicerídeos presentes nos substratos e libera ácidos

graxos, mas também ao metabolismo microbiano, que produz outros ácidos e contribui para a redução do pH do meio (Krishna, 2005; El-Ghonemy *et al*., 2020). O pH pode afetar a estabilidade das enzimas, modificando as interações eletrostáticas em suas estruturas proteicas, influenciando as estruturas secundárias e terciárias da proteína, e consequentemente, sua atividade e estabilidade. Estudos relatam que o microrganismo *A. niger* possui boa estabilidade de pH (4,0–10,0) durante a produção de lipase, e que pH mais altos (7,5–8,0) não apresentam efeito significativo na produção da enzima (Nema *et al*., 2019).

Na Tabela 8 estão compilados dados da literatura, de 2017 a 2023, incluindo o presente estudo, correlacionando o teor de umidade e pH inicial no Cultivo em Estado Sólido, utilizando farelo de algodão e farelo de trigo, com a atividade lipásica derivada de *Aspergillus niger*. Os estudos abordaram diferentes matérias-primas e indutores, com umidade inicial variando de 50 a 75%.

Tabela 8 - Dados da literatura e do presente trabalho referente a produção de lipase por *A. niger* em diferentes condições de CES

Matéria-prima	**Indutor**	**[1]Umid Inicial (%)**	**[2]pH Inicial**	**T (Cº)**	**Tempo (h)**	**[3]Atividade lipásica máxima (U/g massa seca)**	**Ref.**
Farelo de algodão	Óleo de mamona	54	6,4	32	48	93,0	Presente estudo
Farelos: algodão e Trigo		58	6,3			39,9	
Cascas: arroz e grama vermelha e torta de algodão (2:1:1)	-	75	6	40	24	28,1	Nema *et al*., 2019
Caroço de algodão	-	60	7	30	144	4,8	El-Ghonemy *et al*., 2020
Farelo de trigo						8,6	
Torta de algodão e farelo de trigo (1,5:3,5)	Azeite de oliva, óleo de tilápia, tween 80 e triton X	70	7	30	240	0,1	Medeiros *et al*., 2023

Farelo de algodão	-	50	ND	30	48	323	Ohara *et al*., 2018
Farelo de trigo e farelo de soja (1/3:1/3)						319	
Prosopis juliflora, casca de grama vermelha e torta de caroço de algodão (6,66:1,66:1,66)	-	70	7	30	72	269,8	Mandari *et al*., 2020
Farelo de trigo e casca de arroz (1/2:1/2)	Glicerol	50	4,9	28	168	11,2	Costa *et al*., 2017
Farelo de trigo, sabugo de milho (80:20)	Melaço de cana-de-açúcar e óleo de soja	60	ND	30	96	7,7	Kreling *et al*., 2021

[1]Umid inicial: Umidade inicial do cultivo antes do CES; [2]pH inicial: pH do meio de cultivo antes do CES; Atividade lipásica máxima (U/g massa seca): Unidade de atividade enzimática (considerando a massa seca da matéria-prima); ND: Não determinado, -: Não contém. Fonte: O autor, 2024.

O presente estudo, além de Ohara *et al*. (2018) utilizaram farelo de algodão com umidades iniciais próximas (54 e 50%, respectivamente), enquanto El-ghonemy *et al*. (2020) optou por uma umidade ligeiramente superior (60%) (Tabela 8). No presente estudo, alcançou-se uma atividade lipásica de 93,0 U/g $_{\text{massa seca}}$ (usando *p*-NFL como substrato para medir a atividade lipásica) em apenas 48 horas de CES, destacando a eficiência do processo. Em contraste, El-Ghonemy *et al*. (2020) registrou atividade de apenas 4,8 U/g (utilizando *p*-NPP como substrato para medir a atividade) após 144 horas de cultivo, empregando como substrato caroço de algodão, sugerindo que tempos prolongados de CES podem reduzir a produção enzimática devido ao esgotamento dos nutrientes no meio (Santos *et al*., 2018). Por outro lado, Ohara *et al*. (2018) alcançaram atividades lipásicas mais elevadas, de 323 U/g e 319 U/g, empregando farelos de algodão, mistura de farelo de trigo e farelo de soja, porém utilizando o método de titulação de ácidos graxos na determinação destas atividades, empregando 48 horas de cultivo, com umidade inicial de 50%. Isso indica que a otimização das condições de cultivo, incluindo temperatura, pH, aeração e a seleção cuidadosa da cepa de *A. niger*, bem como o método de medição da atividade lipásica, pode ter contribuído para essa superioridade na eficiência enzimática.

Foi observada uma vantagem na utilização de misturas compostas de farelo de trigo, comparado ao uso exclusivo desse farelo. El-Ghonemy *et al*. (2020) relataram que com farelo de trigo puro, com 60% de umidade inicial, foi observada uma atividade lipásica de 8,68 U/g. Em contraste, a combinação de farelo de algodão e farelo de trigo (1:1) no presente estudo, umidade inicial 58%, combinado com óleo de mamona, resultou em uma atividade lipásica de 39,9 U/g $_{\text{massa seca}}$. Costa *et al*. (2017) observaram uma atividade lipásica de 11,2 U/g utilizando uma mistura de farelo de trigo e casca de arroz (1:1), com glicerol como indutor. Ohara *et al*. (2018) alcançaram uma atividade lipásica de 319 U/g empregando-se uma mistura de farelo de trigo e farelo de soja (1:1). Por outro lado, Medeiros *et al*. (2023) observaram que uma maior proporção de farelo de trigo na mistura com torta de algodão (1,5:3,5) resultou em uma atividade lipásica baixa (0,1 U/g), mesmo com indutores como azeite de oliva, óleo de tilápia, Tween 80 e Triton x. Além disso, Kreling *et al*., 2021 também observaram que uma maior proporção de farelo de trigo na mistura com sabugo de milho (proporção, 80:20), mesmo com indutores como melaço de cana de açúcar e óleo de soja, também resultou em menor atividade lipásica (7,77 U/g). Embora alguns estudos indiquem uma melhoria na produção de lipase com misturas de farelo de trigo, a literatura não apresenta consenso sobre a eficácia da mistura de farelo de trigo com outros farelos na mesma proporção para otimizar a produção de lipase. Assim, são necessários mais estudos para determinar as condições ideais que maximizem a atividade lipásica.

Nema *et al*. (2019) mostraram que com uma mistura balanceada de cascas de arroz, grama vermelha e torta de algodão (2:1:1) foi obtida uma atividade lipásica de 28,19 U/g. Mandari *et al*. (2020) observaram que a combinação de *Prosopis juliflora*, casca de grama vermelha e torta de algodão, na proporção 6,66:1,66:1,66 resultou em uma alta atividade lipásica de 269,87 U/g. Essas observações indicam que a combinação adequada de farelo de algodão com outros componentes pode otimizar a atividade enzimática, considerando a contribuição específica de cada matéria-prima.

4.3 **Síntese e caracterização do suporte polimérico Sty-DVB**

O suporte de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) foi sintetizado por polimerização em suspensão aquosa, utilizando como diluente uma razão tolueno/n-heptano de 20/80 (% v/v), conforme as condições reacionais estabelecidas por Ribeiro *et al*. (2022). Esses autores demonstraram que o aumento da proporção de heptano na polimerização resultou em partículas de Sty-DVB com maiores diâmetros de poros, volumes e áreas específicas, o que

por sua vez, melhorou a difusão do substrato e a eficiência da imobilização da lipase CAL-B. Devido ao caráter hidrofóbico, esses copolímeros são candidatos promissores como suporte para lipases via ativação interfacial.

A matriz polimérica de Sty-DVB tem se destacado na adsorção de lipases de diversas fontes devido à sua ampla área de superfície específica e ao tamanho de poro adequado. A elevada hidrofobicidade do copolímero Sty-DVB facilita a imobilização enzimática, possibilitando uma carga enzimática mais alta (Pinto *et al*., 2014; Silva *et al*., 2018; Pinto *et al*., 2020; Miguel Júnior *et al*., 2022). A síntese do copolímero Sty-DVB é descrita como econômica e relativamente simples, o que a torna acessível e adaptável para várias aplicações laboratoriais. Como um material reticulado, o copolímero Sty-DVB apresenta resistência física considerável e estabilidade química, resistindo a condições adversas como oxidação, hidrólise e altas temperaturas. Além disso, o ajuste do tamanho das partículas e a manutenção das propriedades sob diversas condições experimentais reforçam a sua adequação para a imobilização de enzimas (Coutinho *et al*., 2006; Cipolatti *et al*., 2017). Essas características fazem deste material uma alternativa prática e eficiente para processos de imobilização enzimática.

No presente estudo, asíntese do copolímero Sty-DVB foi realizada empregando as mesmas condições experimentais descritas no trabalho de Ribeiro *et al*. (2022). Entretanto o copolímero preparado aqui apresentou área específica pouco menor, volume de poros ligeiramente reduzido e um leve aumento no diâmetro médio dos poros. Essas variações podem ser atribuídas a diferenças experimentais ou a fatores não controlados, como impurezas nos reagentes ou variações nas condições ambientais (Tabela 9).

Tabela 9 - Características morfológicas do suporte Sty-DVB

Tol/n-Hep (% v/v)	**S (m^2/g)**	**Vp (cm^3/g)**	**D (Å)**	**Referência**
20/80	285,8	0,99	204,3	Presente estudo
	319,2	1,06	186,8	Ribeiro *et al*., 2022
80/20	285,0	0,27	41,4	

Diluentes: Tol: Tolueno e n-Hep: n-heptano; S: Área específica; Vp: Volume específico de poros; D: Diâmetro médio de poros. Fonte: O autor, 2024.

Os copolímeros Sty-DVB preparados por RIBEIRO et al. (2022), sintetizados empregando como diluentes misturas de diferentes proporções de tolueno (Tol) e n-heptano (n-Hep), apresentaram variações nas propriedades texturais. A mistura na proporção 20/80 v/v de tolueno para n-heptano resultou em copolímeros com área específica, volume de poros e diâmetro médio de poros superiores em comparação com o copolímero preparado empregandoa mistura inversa, 80/20 v/v, de tolueno e n-heptano. Essa diferença pode ser explicada pela influência do n-heptano, que atua como um diluente não solvatante. Esse tipo de diluente reduz a interação entre o polímero e o solvente durante a polimerização, promovendo a formação de uma estrutura mais porosa no Sty-DVB. O solvente n-heptano, ao não interagir efetivamente com as cadeias poliméricas em formação, facilita a separação de fases antes do ponto de gelificação, resultando em uma estrutura de copolímero mais porosa. Esse efeito é explicado pelo mecanismo de χ-sinérese induzida, que se refere ao parâmetro de interação entre o polímero e o solvente, pelo parâmetro de solubilidade (δ) de Hildebrand e pela semelhança estrutural.

A afinidade entre o polímero e o solvente é medida pela diferença entre os parâmetros de solubilidade (δ) entre estes dois componentes. Diferenças menores que 0,5 $(cal/cm^3)^{1/2}$ entre δ do polímero e do solvente indicam alta afinidade e boa solvatação entre estes dois constituintes, resultando em uma estrutura polimérica menos porosa. Diferenças entre 0,5 e 1,5 $(cal/cm^3)^{1/2}$ indicam afinidade intermediária entre estes dois componentes, enquanto diferenças maiores que 1,5 $(cal/cm^3)^{1/2}$ entre os parâmetros de solubilidade do polímero e solvente indicam baixa afinidade entre estes dois componentes, classificando este solvente como mau solvente e promovendo a formação de uma estrutura mais porosa devido à separação de fases precoce. Para o copolímero Sty-DVB, a Tabela 10 mostra os seguintes valores: o parâmetro de solubilidade do polímero Sty-DVB (δ_p) é 9,3 $(cal/cm^3)^{1/2}$ e o parâmetro de solubilidade do tolueno (δ_d) é 9,0 $(cal/cm^3)^{1/2}$, resultando em uma diferença (Δδ) de 0,15 $(cal/cm^3)^{1/2}$. Essa pequena diferença sugere uma alta afinidade entre o tolueno e o polímero, tornando o tolueno um bom solvente para este polímero. O tolueno dissolve eficientemente as cadeias poliméricas em formação, evitando a precipitação precoce e resultando em uma estrutura polimérica mais coesa e menos porosa.

O tolueno age como um solvente termodinamicamente favorável para o polímero, facilitando a expansão das esferas reticuladas durante a polimerização. Inicialmente, o monômero se transforma em uma rede polimérica que incha a medida que o tolueno é absorvido. Contudo, à medida que a reticulação avança a capacidade da rede para absorver tolueno é limitada, resultando em macrossinerese. Este fenômeno ocorre quando o gel, após

atingir o ponto de gelificação, experimenta precipitação ou desinchamento, levando à formação de núcleos de microgel rodeados por uma fase líquida contínua. A continuidade da polimerização resulta na formação de novos núcleos devido à separação sucessiva dos polímeros em crescimento, criando uma estrutura de copolímero predominantemente micro e mesoporosa. Após a remoção do tolueno, surgem vazios ou poros, conferindo às esferas uma alta área de superfície e volumes de poros relativamente baixos. Esse processo é conhecido como υ-sinérese induzida, onde "υ" refere-se à densidade de reticulação da rede (Okay, 2000; Gokmen; Du Prez, 2012).

Por outro lado, o δ_d do n-heptano é 7,4 $(cal/cm^3)^{1/2}$, com uma diferença ($\Delta\delta$) de 1,9 $(cal/cm^3)^{1/2}$ entre os parâmetros de solubilidade entre polímero e este solvente. Essa diferença maior indica baixa afinidade entre o n-heptano e o Sty-DVB, classificando-o como um mau solvente para este polímero. O n-heptano não consegue manter o polímero em solução durante a polimerização, levando à precipitação precoce do polímero e, consequentemente, à formação de uma rede polimérica mais porosa. A separação de fases ocorre antes da completa reticulação, resultando em uma estrutura final com maior porosidade (Coutinho *et al*., 2004; Coutinho; Rezende, 2001).

A presença de n-heptano, sendo um diluente não solvatante, reduz a interação entre o polímero e o solvente, levando à separação de fases antes do ponto de gelificação. No modelo de microssinerese, essa separação provoca a formação de pequenas gotículas de líquido dentro do gel, aumentando a turbidez devido à dispersão de luz. Com baixos teores de reticulador, as cadeias de rede relaxam lentamente, permitindo que as moléculas de solvente permaneçam como gotículas, resultando em um gel com alta turbidez e porosidade predominantemente mesoporosa. Com o aumento da concentração de reticulante, as gotículas de líquido se combinam formando uma fase líquida volumosa, e as cadeias de rede se organizam rapidamente em núcleos esféricos. Em concentrações ainda mais altas de diluente, o sistema pode se tornar descontínuo, formando partículas de macrogel que eventualmente se dissolvem em solução coloidal, gerando microgéis. A diminuição da solubilidade do polímero em altas concentrações de n-heptano leva à formação de uma dispersão descontínua de polímero na fase contínua do monômero. A continuação da polimerização resulta em aglomerados maiores, criando uma estrutura com poros de diâmetro médio que variam de mesoporos a macroporos, e uma área interna normalmente menor. Esse fenômeno é conhecido como mecanismo χ-sinérese induzida, onde χ representa o parâmetro de interação polímero-solvente. A incompatibilidade entre os segmentos de rede e as moléculas do diluente resulta na formação de porosidade na rede polimérica (Okay, 2000; Gokmen; Du Prez, 2012).

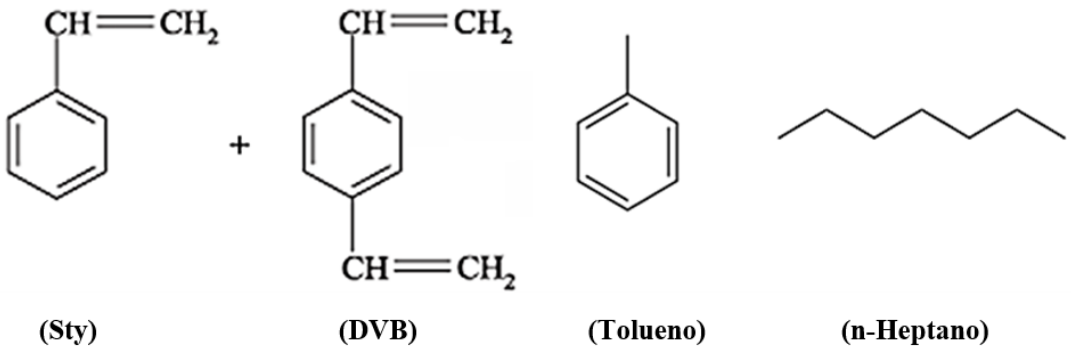
Tabela 10 - Parâmetros de solubilidade de Hildebrand

Polímero/ Solvente	δ_p $(cal/cm^3)^{1/2}$	δ_d $(cal/cm^3)^{1/2}$	$\delta_p - \delta_d$ $(cal/cm^3)^{1/2}$	Classificação
Sty-DVB / Tolueno	9,3	9	0,15	Bom solvente
Sty-DVB / n-Heptano	9,3	7,4	1,75	Mau solvente

Sty: Estireno; DVB: Divinilbenzeno; δp: Parâmetro de solubilidade do polímero; δd: Parâmetro de solubilidade dos diluentes; δp-δd: Δδ, diferença do parâmetro de solubilidade entre o polímero e diluente. Fonte: COUTINHO; REZENDE, 2001.

Além disso, solventes com estruturas químicas semelhantes ao polímero, como o tolueno, que possui um anel aromático compatível com as unidades monoméricas de estireno (Sty) e divinilbenzeno (DVB), favorecem a solvatação do polímero, reduzindo a formação de poros na rede polimérica. Essa semelhança estrutural melhora a miscibilidade e a interação entre o solvente e o polímero, promovendo uma estrutura mais compacta e menos porosa. Em contraste, o n-heptano, com sua estrutura alifática não aromática, interage de forma mais fraca com o polímero Sty-DVB em formação, comprometendo a solvatação e favorecendo a precipitação precoce. Essa precipitação prematura resulta em uma rede polimérica mais porosa, devido à separação de fases antes da completa reticulação do polímero (Coutinho; Rezende, 2001). Portanto, com base na semelhança estrutural, o tolueno também é considerado um melhor solvente para os copolímeros Sty-DVB do que o n-heptano (Figura 16).

Figura 16 - Composição química utilizada na reação de polimerização

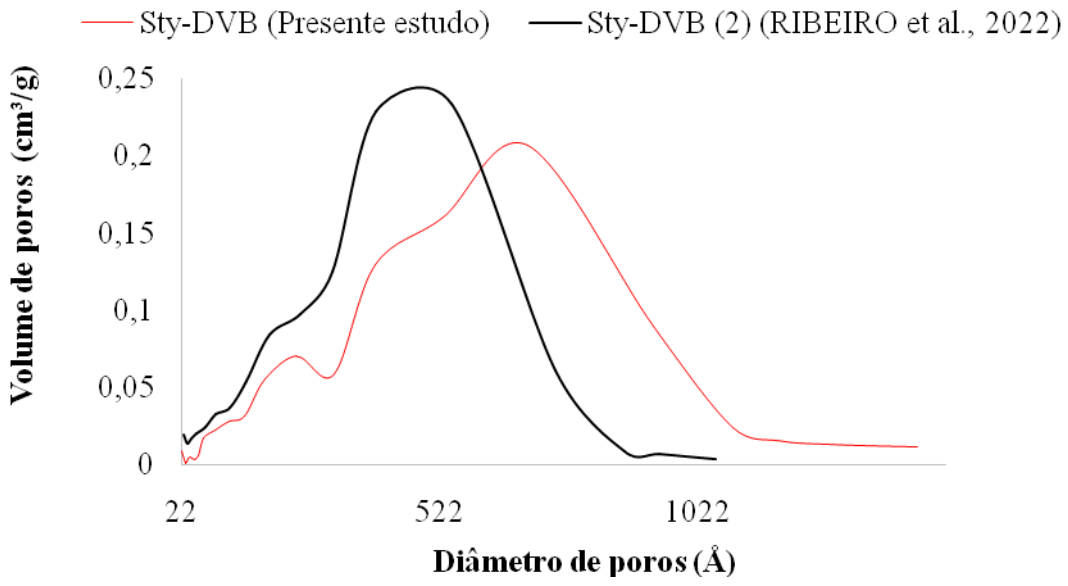


Composição química dos monômeros: Sty: Estireno e DVB: Divinilbenzeno; e dos diluentes: Tol: Tolueno e n-Hep: n-Heptano. Fonte: O autor, 2024.

A Figura 17 confirma que, neste estudo, o aumento da proporção de n-heptano na composição diluente influenciou diretamente o diâmetro médio dos poros dos copolímeros de

Sty-DVB (Coutinho *et al*., 2004). Comparando as curvas de distribuição de tamanhos de poros, é possível observar que o copolímero Sty-DVB (2) de Ribeiro *et al*. (2022), representado pela linha preta, mostra uma maior concentração de poros na faixa de 32-822 Å, enquanto o copolímero do presente estudo, representado pela linha vermelha, apresentou poros na faixa de 32-1088 Å. Esses resultados indicam que, com o aumento da proporção de n-heptano na composição diluente, a distribuição de tamanho dos poros do copolímero Sty-DVB do presente estudo foi deslocada para regiões de tamanhos maiores em comparação com o Sty-DVB (2) do estudo de Ribeiro *et al*. (2022). Isso sugere que o n-heptano, como mau solvente, favoreceu a formação de poros maiores na estrutura polimérica. Vale destacar que ambos os estudos utilizaram a mesma composição monomérica e condições reacionais, o que permite uma comparação direta entre os resultados apresentados. Segundo a classificação da IUPAC com base na largura do poro, os poros são categorizados como microporos (largura de até 20 Å, equivalente a 2 nm), mesoporos (largura na faixa de 20–500 Å, ou 2–50 nm) e macroporos (largura maior que 500 Å, ou 50 nm) (Okay *et al*., 2000). Com base nesses critérios, o material sintetizado neste estudo, com o diâmetro médio de poros de 204,3 Å (20,43 nm), classifica-se como mesoporoso.

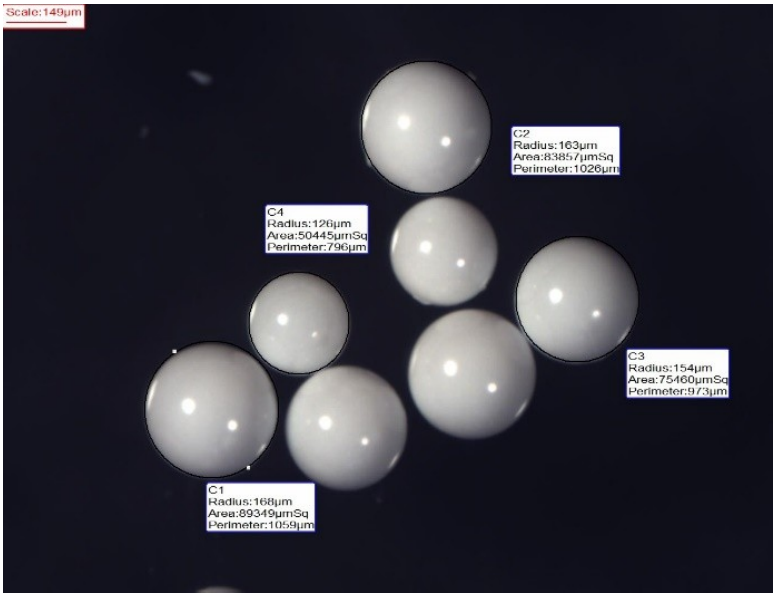
Figura 17 - Distribuição de tamanhos de poros dos copolímeros Sty-DVB com razão Tol/n-Hep de 20/80



Fonte: O autor, 2024.

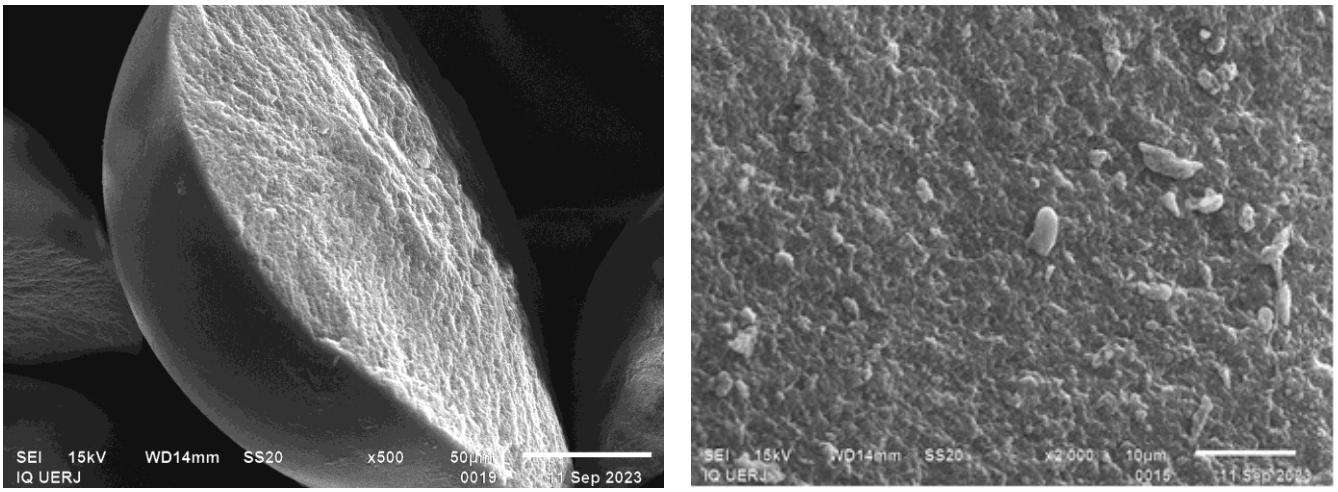
Na Figura 18, foi possível observar através da microscopia óptica a formação de um copolímero com estruturas individualizadas e formato esférico, apresentando um aspecto opaco que sugere a presença de porosidade. Complementando esta análise, a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu a realização de um corte no polímero, possibilitando a observação de sua estrutura interna, a qual se mostrou porosa (Figura 19).

Figura 18 - Microscopia óptica das partículas de Sty-DVB com aumento de 4 vezes



A barra de escala representa 149 µm. As partículas têm as seguintes medidas: C1: Raio: 161 µm, Área: 50949 µm², Perímetro: 1019 µm; C2: Raio: 163 µm, Área: 53149 µm², Perímetro: 1026 µm; C3: Raio: 154 µm, Área: 75600 µm², Perímetro: 1035 µm; C4: Raio: 194 µm, Área: 50446 µm², Perímetro: 793 µm. Fonte: O autor, 2024.

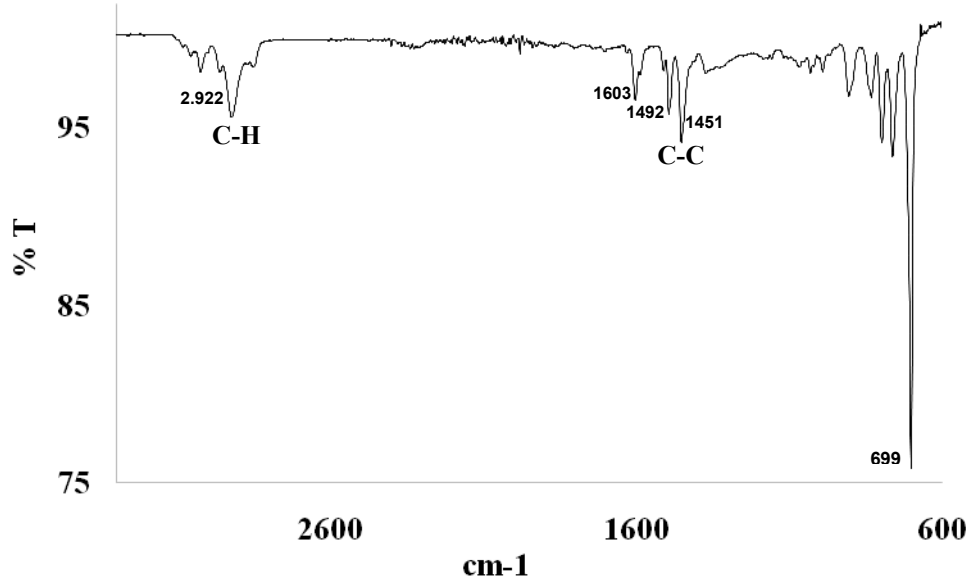
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de Sty-DVB com diferentes ampliações



À esquerda, ampliação de 500x com barra de escala de 50 µm. À direita, ampliação de 2000x com barra de escala de 10 µm. Fonte: O autor, 2024.

O copolímero de Sty-DVB, conforme observado no espectro FTIR, apresenta várias bandas de absorção significantes sobre sua estrutura molecular e composição química. Na Figura 20 foram identificados os seguintes picos de absorção: uma banda em 2922 cm^{-1}, associada ao estiramento de ligações C-H alifáticas, estiramentos C-C aromáticos em 1603, 1492 e 1451 cm^{-1} e uma absorção em 699 cm^{-1} relacionada à flexão aromática fora do plano para benzeno *p*-substituído (Aybastier; Demir, 2010).

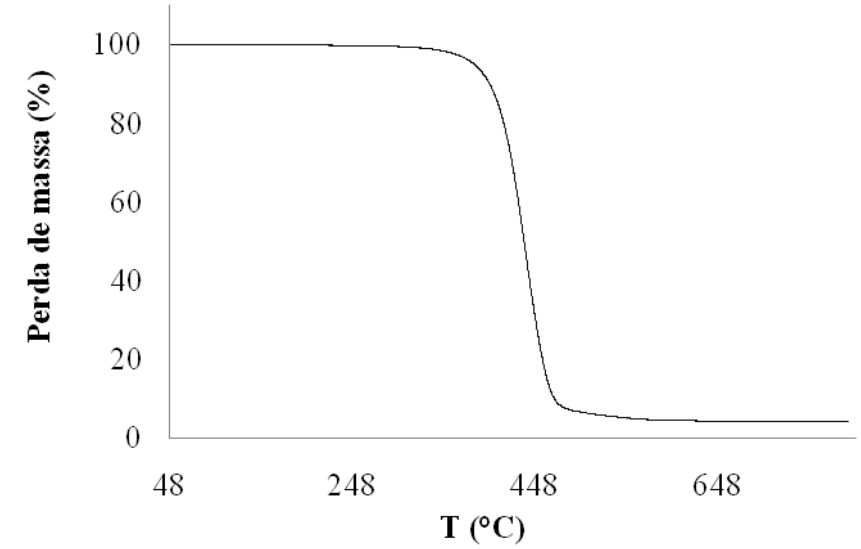
Figura 20 - Espectro de FTIR do copolímero Sty-DVB



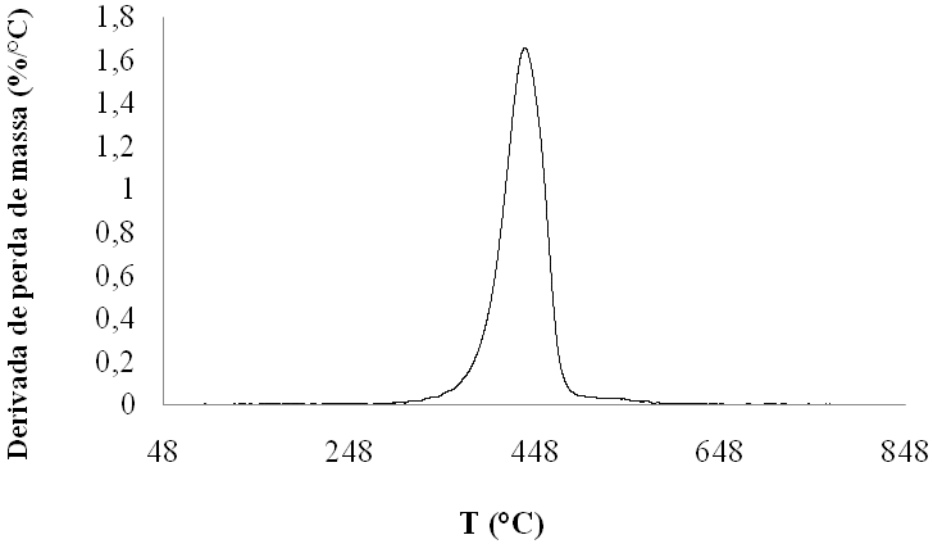
Fonte: O autor, 2024.

A análise das curvas de degradação térmica, TG e DTG Figura 21 revela informações importantes sobre o comportamento térmico do material em estudo. Na curva de TG, observou-se que a perda de massa mais acentuada ocorreu em torno de 440 ºC, sugerindo uma degradação mais significativa do material nessa faixa de temperatura. Por outro lado, a curva DTG mostra um único estágio de perda de massa significativa, com a velocidade máxima de degradação atingida em 437 ºC. Isso indica que a degradação térmica do material ocorre de forma mais pronunciada nessa faixa de temperatura, o que pode estar relacionado à decomposição da cadeia polimérica como um todo. Essas características térmicas sugerem que o copolímero Sty-DVB possui uma resistência térmica adequada, o que é relevante para sua aplicação como suporte de enzima em processos industriais que requerem condições de alta temperatura.

Figura 21 - Curvas de TG (a) e de DTG (b) do copolímero Sty-DVB



(a)



(b)

Fonte: O autor, 2024.

4.4 **Imobilização da lipase de *Aspergillus niger* ao suporte Sty-DVB por adsorção**

4.4.1 Avaliação das lipases por *A. niger* produzidas em CES na imobilização enzimática

As lipases de *A. niger* da linhagem mutante 11T53A14 produzidas por CES foram submetidas a contato com copolímero Sty-DVB, preparado a partir de mistura diluente contendo 80% de n-heptano, visando à preparação de biocatalisadores heterogêneos. As lipases foram obtidas via CES empregandofarelo de algodão puro e de uma mistura de farelo

de algodão com farelo de trigo (50:50 m/m), respectivamente. O cultivo foi realizado em frascode erlenmeyer (exp. 1 e 2) e frasco plástico de titulação (exp. 3, 4, 5, 6, 7 e 8) suplementados com 2% de óleo de mamona e inoculados com uma concentraçãode 10^7 esporos/g inicial. A lipase extraída foi utilizada na imobilização. Uma lipase comercial de *A. niger* foi utilizada como controle, sendo imobilizada no copolímero nas mesmas condições empregadas na imobilização das lipases produzidas por CES.

A Tabela 11 detalha as características morfológicas do suporte polimérico Sty-DVB, utilizado para a imobilização, bem como os principais parâmetros de imobilização. Este suporte foi produzido por meio de polimerização em suspensão aquosa. As informações incluem a área específica, o volume de poros e o diâmetro médio dos poros, além de seu desempenho em termos de atividade enzimática e eficiência de imobilização. A Tabela 11 também apresenta dados do grupo de pesquisa acerca da imobilização de lipases em suportes de Sty-DVB, preparados por diferentes metodologias de polimerização, como emulsão e a combinação de suspensão e emulsão.

A imobilização de lipases em suportes poliméricos pode ser aprimorada quando superfícies hidrofóbicas bem definidas são utilizadas. De acordo com Fernández-Lafuente *et al*. (1998), essas superfícies podem mimetizar gotas hidrofóbicas de substratos naturais insolúveis, facilitando a adsorção das lipases.A lipase de *A. niger* possui uma estrutura tridimensional complexa, composta por hélices α e folhas β que sustentam a tríade catalítica (Ser146, Asp201 e His258), formando uma "tampa" que cobre o sítio ativo da enzima (Shu *et al*., 2009). Esta tampa possui geralmente duas interfaces: uma interna, que interage diretamente com o sítio ativo e contribui para a sua proteção, e uma externa, que pode estar em contato com a superfície hidrofóbica do suporte (Ortiz *et al*., 2019; Rodrigues *et al*., 2019).

A imobilização da lipase de *A. niger* no suporte polimérico Sty-DVB foi realizada por adsorção, uma técnica simples que utiliza forças de baixa energia. A combinação de forças hidrofóbicas, Van der Waals e eletrostáticas promovem a interação entre a face interna hidrofóbica da tampa e a superfície hidrofóbica do suporte. As interfaces do solvente podem penetrar na estrutura porosa do suporte (Fernández-Lafuente *et al*., 1998) provocando mudanças conformacionais na lipase e facilitando a exposição do sítio catalítico. Esse processo, conhecido como ativação interfacial, resulta no deslocamento parcial ou total da tampa, expondo o sítio ativo ao meio de reação. A interação entre a tampa e o suporte hidrofóbico é essencial, pois permite a abertura do sítio ativo de forma fixa, potencializando a eficiência catalítica (Ortiz *et al*., 2019; Rodrigues *et al*., 2019).

Os pontos isoelétricos da lipase por *A. niger* variam, com valores relatados entre 3,5 e 8,5 (Höfelmann *et al*., 1985; Mhetras *et al*., 2009). As condições ótimas de pH e temperatura para atividade diferem entre as isoenzimas, com algumas mostrando preferência por condições ácidas (Mhetras *et al*., 2009). Para evitar desvios no equilíbrio reacional e garantir a máxima solubilidade das enzimas, foi utilizada uma solução tampão neutra (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7), já que a solubilidade diminui conforme se aproxima do ponto isoelétrico (Alves *et al*., 2022). Além disso, foi observado que enzimas com múltiplos grupos amino terminais podem ser imobilizadas eficientemente mesmo em pH neutro (Bolivar *et al*., 2022). As imobilizações foram realizadas nesse meio de baixa força iônica, pois estudos indicam que a velocidade de imobilização das lipases é máxima em tais condições, em comparação com outras proteínas presentes no extrato enzimático (Pinto, 2017; Fernández-Lafuente *et al*., 1998).

As lipases de *A. niger* catalisam a hidrólise de triglicerídeos derivados de ácidos graxos de cadeia curta e longa (Höfelmann *et al*., 1985). As enzimas produzidas por esse fungo apresentam uma especificidade variável pelos ácidos graxos, com uma ordem decrescente de afinidade para o ácido oleico (C18:1) > ácido butírico (C4:0) > ácido láurico (C12:0) (Reinehr *et al*., 2014). A lipase comercial de *A. niger* demonstra maior atividade de hidrólise com substratos de cadeia média (Namboodiri; Chattopadhyaya, 2000).

Tabela 11 - Características morfológicas do copolímero de estireno-divinilbenzeno e atividades enzimáticas dos biocatalisadores imobilizados

Legenda			**S (m^2/g)**	**Vp (cm^3/g)**	**D (Å)**	**U_e ($U/g_{suporte}$)**	**U_{teo} ($U/g_{suporte}$)**	**RI (%)**	**R_a (%)**	**A_{imohid} (U/g_{bio})**	**Ref.**
Lipase produzida por *A. niger*	(1)	[a]Sty-DVB	285,8	0,9	204,3	12,5 ± 0,0	10,6	84,4	18,6 ± 0,0	1,9 ± 0,1	Presente estudo
	(2)					12,5 ± 0,2	11,4	91,0	8,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1	
	(3)					12,5 ± 0,0	8,4	67,3	9,4 ± 0,0	0,8 ± 0,0	
	(4)					12,5 ± 0,1	10,3	82,3	15,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0	
	(5)					12,5 ± 0,1	10,7	85,6	30,0 ± 0,0	3,2 ± 0,1	
	(6)					12,5 ± 0,0	10,5	84,0	5,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	
	(7)					12,5 ± 0,0	11,5	92,2	7,5 ± 0,0	0,8 ± 0,2	

	(8)						12,5 ± 0,0	12,3	98,2	17,1 ± 0,0	2,1± 0,1	
	Comercial						12,5 ± 0,1	12,1	94,9	18,0 ± 0,0	2,1± 0,1	
Lipase B de*Candida antarctica* (comercial)		[a]Poliestireno	1	27,3	0,2	287,6	127,0	nd	99,2	1,8	2,3	Pinto *et al*., 2014
			3	7,8	0,06	300,9	116,8	nd	98,4	3,6	4,2	
			8	2,9	0,03	400,8	82,1	nd	94,2	2,4	1,9	
			11	11,2	0,08	299,7	83,0	nd	97,4	1,2	1,0	
			14	13,1	0,09	263,7	73,3	nd	90,9	2,2	1,6	
		[c]PS/P(S-co-DVB)		18,3	0,1	217,8	100,0	nd	80,0	nd	2,5	Pinto *et al*., 2020
		[b]PS/PS		1,6	0,01	357,5	100,0	nd	82,0	nd	3,2	
		[a]Sty/DVB (1)		285,0	0,2	41,4	180,0	nd	89,5	5,4	8,7	Ribeiro *et al*., 2022
		[a]Sty/DVB (2)		319,2	1,0	186,8	180,0	nd	99,2	14,3	25,6	

(1,3,4,5): lipase extraída de *A.niger*derivada farelo de algodão; (2,6,7,8): lipase extraída de *A. niger*derivada da combinação de farelo de algodão/trigo; Lipase comercial: Lipase de *Aspergillus niger*, fornecido pela Sigma-Aldrich; Ue: Atividade enzimática da solução no início do processo de imobilização; Uteo: Atividade da enzima teoricamente imobilizada; RI: Rendimento da imobilização; Ra: Retenção da atividade hidrolítica; A_{imohid}: Atividade de hidrólise do biocatalisador; [a] Estireno-Divinilbenzeno; [b] Poliestireno/Poliestireno; [c] Poliestireno/Poli (Estireno copolimerizado com Divinilbenzeno); S: Áreaespecífica; Vp:Volume específico de poros; D: Diâmetro médio de poros. nd: Não determinado (dados não apresentados pelo autor). Fonte: O autor, 2024. As condições utilizadas para a produção das lipases por *A. niger* estão descritas no Subitem 3.7.

Pode-se observar na Tabela 11, que em geral, foi possível alcançar rendimentos de imobilização elevados, variando de 82,3 a 98,2%, empregando as lipases de *A. niger* obtidas por CES e imobilizada no suporte de Sty-DVB. Entretanto, o biocatalisador derivado da lipase de *A. niger* (3), produzida com farelo de algodão puro e óleo de mamona, apresentou uma atividade enzimática teórica adsorvida (U_{teo}) inferior, de 8,4 $U/g_{suporte}$, o rendimento de imobilização (RI) de 67,3%, inferior ao RI alcançado para as demais lipases produzidas. Durante os testes, verificou-se que a atividade enzimática deste biocatalisador foi menor em comparação com as atividades alcançadas para os outros biocatalisadores. Embora as condições de cultivo para a produção da lipase tenham sido favoráveis, o que normalmente resultaria em uma atividade enzimática satisfatória, a etapa de imobilização possui parâmetros controláveis, como pH, temperatura e tampão, que podem não ter relação direta com as condições de cultivo da lipase. A variação do teor de proteína no meio durante a imobilização não foi determinada, entretanto pode-se supor que para alcançar o mesmo U de entrada na imobilização, seria necessária uma maior quantidade de proteína, o que pode ter reduzido o RI, provavelmente pela presença de outras proteínas ou enzimas que não contribuem diretamente para a atividade lipolítica, mas que estavam presentes na preparação enzimática.

A atividade dos biocatalisadores vai depender do balanço entre a carga de proteína oferecida, o rendimento de imobilização (RI) e a atividade inicial da enzima (Fé *et al*., 2024).

Os resultados da Tabela 11 indicam que as lipases produzidas em cultivo sólido apresentaram desempenho comparável e, em alguns casos, superior a lipase comercial de *A. niger*, todas imobilizadas no suporte Sty-DVB. O biocatalisador derivado da lipase (5), produzido com farelo de algodão, apresentou a maior retenção de atividade (Ra) de 30% e atividade de hidrólise de 3,2 U/g, superando consideravelmente as demais lipases imobilizadas (exp. 1, 2, 3, 4, 6 e 7), cujas retenções de atividade variaram de 5,0 a 18,6% e atividades de 0,5 a 1,9 U/g, além da lipase comercial, que teve Ra de 18,0% e atividade hidrolíticade 2,1 U/g. Observou-se também que o biocatalisador derivado da lipase (1), obtido com farelo de algodão e óleo de mamona, apresentou uma retenção de 18,6%, próximo à da lipase comercial (18,0%). Em relação ao rendimento de imobilização (RI), os biocatalisadores derivados das lipases (2) e (7), produzidas com misturas de farelos e óleo de mamona, alcançaram rendimentos de imobilização (RI) de 91,0% e 92,2%, próximos ao da lipase comercial (94,9%). Em destaque, o biocatalisador derivado da lipase (8) alcançou um RI superior de 98,2% em relação à lipase comercial imobilizada.

Foi possível observar que a produção de lipases de *Aspergillus niger* em CES resultou em biocatalisadores distintos, com variações nos rendimentos de imobilização (RI) e nas retenções de atividade (Ra). Como já comentado, essas diferenças podem estar relacionadas as variações da carga proteica ofertada ao suporte para padronização das atividades. Para confirmar este resultado seria necessária a avaliação do teor de proteína durante o processo de imobilização, o que está previsto para estudos futuros. Além disso, o *A. niger*, quando cultivado em fase exponencial, pode produzir metabólitos primários na forma de proteínas ou enzimas extracelulares, como enzimas amilase, pectinases (Rilda *et al*., 2023), proteases, celulases (Ohara *et al*., 2018), oxidases, desidrogenases e hidrolases (Zhu *et al*., 2020), além de xilanases (Moran-Aguilar *et al*., 2021). Outras proteínas estruturalmente complexas ou pequenos peptídeos, como nucleosídeo hidrolase, esterol 24-c-metiltransferase, dentre outros (Zhu et al., 2020). Não se sabe exatamente quais proteínas foram produzidas junto com a lipase no presente estudo, o que pode também ter influenciado os resultados observados. As proteases produzidas em maior ou menor concentração podem atuar afetando a estabilidade e a atividade da lipase. Para esclarecer essa questão, seria necessário um ensaio de purificação das proteínas sintetizadas, de modo a determinar se a produção foi exclusivamente de lipase ou se houve a presença de outras enzimas que possam interferir no desempenho do biocatalisador.

Silva *et al*. (2009) relataram que lipases de *A. niger*, imobilizadas por adsorção em suportes como Accurel EP-100, Amberlite MB-1, Celite e Montmorillonite K10, apresentaram rendimentos de imobilização mais baixos, com valores de 36,8; 61,7; 32,4; e 53,5%, respectivamente. Já os estudos de Pinto *et al*. (2014), Pinto *et al*. (2018), Pinto *et al.* (2020) e Ribeiro *et al*. (2022), indicam que suportes obtidos a partir de monômeros hidrofóbicos, como o copolímero Sty-DVB, resultaram em maiores rendimentos de imobilização, contudo estes estudos foram realizados empregando lipase B de *Candida antarctica*. A eficácia do copolímero Sty-DVB como suporte para a imobilização de lipases não é determinada não é determinada apenas pela sua hidrofobicidade; a morfologia destes copolímeros também desempenha um papel importante. Fatores como área de superfície, volume de poros e distribuição de tamanhos de poros podem ser ajustados durante a síntese deste material, afetando diretamente a difusão do substrato e o acesso aos sítios ativos da lipase.

Analisando os dados da Tabela 11, observou-se que entre os biocatalisadores derivados da lipase de *Aspergillus niger*, o biocatalisador (8) alcançou o maior rendimento de imobilização (98,2%). Este biocatalisador foi preparado a partir do copolímero Sty-DVB, com uma área específica de 285,8 m^2/g e volume de poros de 0,9 cm^3/g e diâmetro médio de poros de 204,3 Å. Ribeiro *et al*. (2022) relataram resultados semelhantes para a lipase *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em copolímero Sty-DVB denominado Sty-DVB (2), com elevada área específica de 319,2 m^2/g e volume de poros de 1,0 cm^3/g, e diâmetro médio de poros de 186,8 Å, alcançou um rendimento de imobilização (*RI*) de 99,5%. O suporte denominado Sty-DVB (1), também preparado por Ribeiro *et al*. (2022), com uma área específica de 285,0 m^2/g, volume de poros de 0,2 cm^3/g e diâmetro médio de 41,4 Å, também apresentou um *RI* elevado de 89,5%. Comparando estudos que utilizaram a lipase CALB, pode-se citar também o trabalho de Pinto *et al*. (2014), que observaram queo suporte de poliestireno com a maior área específica (27,3 m^2/g), dentre os materiais preparados por eles, alcançou um RI de 99,2%. No entanto, suportes com áreas específicas menores, como 7,8; 2,9; 11,2 e 13,1 m^2/g, também mostraram RI expressivos (98,4; 94,2; 97,4; 90,9%, respectivamente), apesar de seus volumes de poros variados (0,06 a 0,2 cm^3/g). Pinto *et al*. (2020) encontraram RI de 80% e 82%, empregando suportes com áreas específicas de 1,6 e 18,3 m^2/g, e volumes de poros de 0,01 e 0,1 cm^3/g, respectivamente. Esses dados sugerem que embora a área específica e volumes de poros possam influenciar a imobilização de enzimas, é possível alcançar um elevado rendimento de imobilização (RI) independentemente dos valores altos ou baixos desses parâmetros, desde que haja um equilíbrio adequado entre o

diâmetro dos poros, área específica e os parâmetros de imobilização. De acordo com Souza *et al*. (2017), uma elevada área específica do suporte facilita um contato mais eficiente entre a enzima e o suporte, enquanto um diâmetro de poros adequado permite que tanto a enzima quanto o substrato acessem as regiões internas do suporte.

Analisando novamente os dados da Tabela 11, observou-se que, entre os biocatalisadores derivados da lipase de *Aspergillus niger*, o biocatalisador (5) apresentou a maior retenção de atividade, com 30%, e uma atividade de hidrólise de 3,2 U/g. Esse desempenho pode ser atribuído à maior possibilidade de acesso do substrato no meio reacional, evidenciando como as interações específicas entre a lipase e o suporte Sty-DVB influenciam a atividade enzimática. Em comparação, as lipases comerciais, como a lipase B de *Candida Antarctica* (CALB), também imobilizadas no suporte Sty-DVB, mostraram retenções de atividade (Ra) variando de 1,8 a 3,6%, com atividades de hidrólise entre 1,0 e 4,2 U/g, conforme documentado por Pinto *et al*. (2014). Embora os dados de atividades da CALB sejam informativos, é importante ressaltar que as comparações diretas de atividade entre as lipases de *Aspergillus niger* e CALB devem ser feitas com cautela. Cada enzima possui características únicas que podem resultar em interações diferentes com o suporte e o meio reacional. Estudos subsequentes relataram atividades do biocatalisador imobilizado de 2,5 e 3,2 U/g (Pinto *et al*., 2020), enquanto Ribeiro *et al.* (2022) observaram retenções de atividade de 5,4 e 14,3%, com atividades correspondentes de 8,7 e 25,6 U/g.

Esses resultados refletem a influência de diversos fatores relacionados a imobilização e as características do suporte Sty-DVB. A conformação da enzima, que é influenciada pelo microambiente da enzima e pelo processo de imobilização por adsorção, pode ter causado distorções no sítio ativo, comprometendo a eficiência catalítica da lipase imobilizada. Além disso, a limitação difusional na transferência de massa para o interior dos poros pode ter resultado em partículas com poros inacessíveis aos reagentes, gerando biocatalisadores imobilizados com baixa atividade (Fernandez-Lafuente *et al*., 1998). Segundo Illanes (2008), as restrições de transferência de massa, especialmente as de difusão interna, podem limitar a atividade dos biocatalisadores heterogêneos. Essas restrições estão diretamente relacionadas às características morfológicas dos suportes, incluindo área de superfície, volume dos poros, tamanho dos poros e distribuição do tamanho dos poros. Fatores como o comportamento de intumescimento do suporte no meio reacional e a polidispersidade das partículas também influenciam a eficiência da difusão e a atividade enzimática.

Apesar de a atividade do biocatalisador imobilizado e a retenção de atividade da lipase de *A. niger*no suporte Sty-DVB serem relativamente baixas, a escolha por este suporte oferece

a possibilidade de otimização através da variação de suas características morfológicas, como aumento da porosidade, o que pode facilitar a difusão de substratos e produtos, melhorando, assim, a eficiência catalítica. Além disso, o suporte Sty-DVB também apresenta versatilidade na imobilização de diferentes lipases, permitindo a adaptação às necessidades específicas de aplicações industriais. Portanto, mesmo diante de desafios iniciais relacionados à atividade enzimática, a potencialidade do suporte Sty-DVB, aliada a modificações apropriadas, sugere que ele pode ser uma opção viável para maximizar o desempenho de lipases em processos catalíticos.

4.5 **Avaliação dos biocatalisadores imobilizados na reação de hidrólise do óleo de mamona**

Neste subitem, foram avaliados os biocatalisadores imobilizados para comparar sua capacidade de conversão na reação de hidrólise utilizando óleo de mamona (óleo de rícino). A composição dos principais ácidos graxos no óleo de mamona foi determinada por cromatografia gasosa no presente estudo, revelando que 3,3% correspondem a ácido palmítico (16:0), 2,8% a ácido oleico (18:1), 2,8% a ácido esteárico (18:0) e 2,8% a ácido linoleico (18:2). Contudo, dentre os ácidos graxos livres presentes no óleo de mamona, o ácido ricinoleico se destaca como o mais abundante (cerca de 90%) (Rathod; Pandit, 2009). Os constituintes em maiores proporções no óleo de mamona são os triglicerídeos derivados destes ácidos graxos, sendo o principal triglicerídeo o derivado do ácido graxo em maior proporção.

Industrialmente, a hidrólise do óleo de rícino é realizada em alta temperatura (250–360 °C) e alta pressão (5000 kPa) para a fabricação de ácidos graxos. Estas condições resultam na formação de estolídeos, oligômeros do ácido ricinoleico (Khaskheli *et al*., 2015).Uma alternativa para contornar essas desvantagensé a hidrólise enzimática do óleo de mamona quepode ocorrer em condições suaves (35 a 40 ◦C), devido à menor energia de ativação com alta eficiência catalítica, eliminando a necessidade de alta pressão, proporcionando alta pureza do produto sem alterar a composição de ácidos graxos do óleo de rícino, oferecendo uma alternativa sustentável e econômica. Além disso, a conversão do ácido ricinoleicopode ser otimizada por meio de ajustes em parâmetros como agitação e a adição de solventes que reduzam a viscosidade, especialmente ao utilizar enzimas imobilizadas (Khaskheli *et al*., 2015; Rathod; Pandit, 2009; Gamayurova *et al*., 2013).

De acordo com Edwinoliver *et al*. (2009), a lipase fúngica de *A. niger* produzida em fermentação submersa, parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio e utilizada diretamente na reação de hidrólise do óleo de mamona alcançou um desempenho máximo de aproximadamente 60% de eficiência de conversão em 72 horas de reação. Contudo, é possível que o uso da enzima na forma imobilizada pudesse resultar em uma maior eficiência.

A Tabela 12 apresenta uma comparação da eficiência hidrolítica dos biocatalisadores imobilizados derivados das lipases produzidas por *A. niger* (5) e (8), além da lipase comercial de *A. niger* imobilizada no suporte desenvolvido. Também estão incluídas lipases imobilizadas comerciais (Lipozyme TL, 435 e RM) amplamente utilizadas na biocatálise. A eficiência da hidrólise foi quantificada em termos de conversão (%) após 24 horas de reação, utilizando óleo de mamona como substrato.

Tabela 12 - Avaliação de biocatalisadores imobilizados na conversão de óleo de mamona

Biocatalisador imobilizado	**Conversão** Após 24h **(%)**	**S (m^2/g)**	**D (Å)**
Lipase de *A. niger* (5)	45,0	285,8	204,3
Lipasede *A. niger* (8)	36,0		
A. niger comercial	17,7		
Lipozyme TL	91,2	500[a]	300-700[a]
Lipozyme 435	39,6	130[b]	315-1000[b]
Lipozyme RM	47,0	226[c]	100-300

(5): lipase extraída de *A. niger* derivada farelo de algodão; (8): lipase extraída de *A. niger* derivada da combinação de farelo de algodão/trigo; Lipase comercial: Lipase de *Aspergillus niger*, fornecido pela Sigma-Aldrich; TL: lipase *Thermomyces lanuginosus*; Lipozyme 435: lipase B de *Candida antarctica*; Lipozyme RM: lipase *Rhizomucor miehei*. [a]: MOKHTAR et al., 2020; [b]: REMONATTO et al., 2022; [C] CALERO et al., 2019; Fonte: O autor, 2024. As condições utilizadas para a produção das lipases por *A. niger* estão nos descritas Subitem 3.7.

A comparação entre as lipases produzidas de *Aspergillus niger* e as lipases comerciais, apresentada na Tabela 12, demonstra o desempenho competitivo dos biocatalisadores imobilizados em suportes poliméricos de Sty-DVB na hidrólise do óleo de mamona. A lipase produzida de *A. niger* (5) alcançou uma conversão de 45,0%, enquanto a lipase produzida (8) obteve 36,0% de conversão nesta reação de hidrólise. Ambas superaram a lipase comercial de *A. niger*, que apresentou uma conversão de 17,7%, evidenciando o potencial dos suportes Sty-

DVB em melhorar a eficiência das lipases produzidas. Entre as lipases comerciais, a Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*) foi a mais eficiente, com uma conversão de 91,2%, seguida pela Lipozyme RM (*Rhizomucor miehei*), com 47,0%, e pela Lipozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica*), que alcançou 39,6%. Apesar de não superarem a Lipozyme TL, as lipases produzidas de *A. niger* demonstraram um desempenho competitivo, especialmente a amostra 5, derivadade farelo de algodão e óleo de mamona, que apresentou conversões próximas ou superiores às demais lipases comerciais avaliadas.

Os resultados demonstram a competitividade das lipases de *A. niger* imobilizadas em suportes de Sty-DVB, que exibiram características morfológicas favoráveis, como elevada área específica (285,8 m^2/g), volume de poros (0,99 cm^3/g) e diâmetro médio de poros (204,3 Å). Essas propriedades possivelmente facilitaram o acesso da enzima às regiões internas do suporte, minimizando restrições difusionais. As lipases comerciais diferem em suas características estruturais, o que pode explicar as variações no desempenho. Por exemplo, a Lipozyme TL possui área específica de 500 m^2/g e diâmetro de poros entre 300-700 Å, sendo imobilizada em suportes como sílica ou resinas (Mokhtar *et al*., 2020). A Lipozyme 435 apresenta área específica de 130 m^2/g e diâmetro de poros de 315-1000 Å, frequentemente imobilizada imobilizados em polimetacrilato reticulado com divinilbenzeno (Remonatto *et al*., 2022). Já a Lipozyme RM apresenta área específica de 226 m^2/g e diâmetro de poros de 100-300 Å, sendo imobilizada em suportes como sílica ou ésteres de celulose (Calero *et al*., 2019). Essas diferenças podem impactar diretamente a difusão do substrato e a acessibilidade da enzima, afetando a conversão final.

Esses resultados indicam que, apesar de desafios específicos, as lipases de *A. niger* imobilizadas em Sty-DVB representam uma alternativa promissora, especialmente considerando os avanços na modificação do suporte e na otimização das condições reacionais. A otimização de parâmetros, incluindo temperatura, pH, concentração de substrato e enzima, além do uso de solventes para reduzir a viscosidade do óleo, pode aumentar a eficiência da conversão. O óleo de mamona apresenta vantagens para reações de transesterificação, devido à alta solubilidade do ácido ricinoleico em álcoois como metanol ou etanol, permitindo reações a temperaturas ambiente. Contudo, a remoção da água formada durante a reação pode ser dificultada pelas pontes de hidrogênio com o grupo hidroxila presente no ricinoleato (Dabdoub *et al*., 2009). Estudos de Aguieiras *et al*. (2019) demonstraram alta eficiência (>95% de conversão) na transesterificação de óleo de mamona e soja utilizando as lipases comerciais Lipozyme 435 e Lipozyme RM. Entretanto, o óleo de mamona demandou um tempo de reação maior (48 h) em comparação ao biodiesel de soja (24 h).

A complexidade da interação entre enzima e suporte merece destaque, pois não foi possível chegar a uma conclusão definitiva sobre a relação direta entre a morfologia do suporte e as propriedades do biocatalisador. A busca incessante por desenvolver biocatalisadores mais estáveis e ativos é uma constante tanto neste trabalho quanto na literatura. A adsorção entre a lipase por *A. niger* e um determinado suporte depende de diversos parâmetros extremamente importantes para a eficiência da imobilização, incluindo a porosidade e a natureza hidrofóbica do suporte. No entanto, o suporte polimérico Sty-DVB mostrou potencial para imobilização de lipases por *A. niger*, com suas características morfológicas, como alta área específica, volume e diâmetro de poros adequados, além de sua hidrofobicidade, favoreceramo rendimento de imobilização eficiente.

Este trabalho contribui para a literatura ao aprofundar a compreensão das relações entre a produção da lipase pelo fungo filamentoso da linhagem mutante de *A. niger* 11T53A14 em condições de CES e as subsequentesatividades de hidrólise enzimática. Além de explorar a interação entre enzima e o suporte polimérico de Sty-DVB utilizado na imobilização por adsorção. Ele avança na complexa busca pelo aprimoramento contínuo dos biocatalisadores. Futuras pesquisas poderão otimizar as condições de cultivo, desenvolver novos suportes para a imobilização da lipase de *A. niger*, expandir as aplicações industriais das lipases imobilizadas e avaliar a viabilidade econômica do processo. A continuidade das investigações nesse campo pode levar ao desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes e sustentáveis, contribuindo para a inovação na produção de enzimas e suas aplicações em diversos setores industriais.

CONCLUSÕES

- A composição, umidade e teor de lipídios dos farelos foram determinantes na produção de lipase.
- O farelo de algodão e óleo de mamona foi 1,5 a 1,6 vezes mais eficientes que a mistura com trigo, nos experimentos realizados em erlenmeyers e frascos plásticos, respectivamente.
- O aumento do teor de umidade inicial dos meios de cultivo, de 30 a 58%, resultou em uma tendência de aumento da atividade lipásica ($U/g_{massa\ seca}$).
- O aumento da umidade inicial no farelo de algodão puro resultou em até 93 $U/g_{massa\ seca}$.
- A mistura de farelos alcançou 39,9 $U/g_{massa\ seca}$ com umidade inicial de 58%.
- Devido à maior proporção de n-heptano na mistura de diluentes no suporte Sty-DVB, ocorreu à separação de fases em um estágio mais precoce da reação, resultando na formação de um material mesoporoso.
- Os biocatalisadores derivados da lipase de *Aspergillus niger* demonstraram elevados rendimentos de imobilização, variando de 82,3 a 98,2%. A mistura de farelo de algodão, trigo e óleo de mamona, alcançou um rendimento de imobilização (RI) de 98,2%, superior ao RI de 94,9% da lipase comercial.
- Na hidrólise do óleo de mamona, a lipase de *A. niger* (5), derivada de farelo de algodão e óleo de mamona, obteve conversão de 45,0%, enquanto a lipase de *A. niger* (8), derivada de uma mistura de farelo de algodão, trigo e óleo de mamona, alcançou 36,0%. Ambas apresentaram desempenho superior a lipase comercial de *A. niger* (17,7%) e conversões próximas às lipases comerciais Lipozyme RM (47,0%) e Lipozyme 435 (39,6%). Apesar de ficarem abaixo da Lipozyme TL (91,2%), os resultados destacam o potencial competitivo dos biocatalisadores de *A. niger* imobilizados em suportes de Sty-DVB.

PERSPECTIVAS

- Purificar a lipase de *Aspergillus niger* antes da imobilização para aprimorar sua atividade e estabilidade.
- Otimizar o processo de Cultivo em Estado Sólido e, posteriormente, escalonar para aplicação em escala industrial.
- Repetir a cromatografia gasosa (CG) para incluir esse ácido ricinoleico, permitindo uma compreensão mais completa das propriedades do óleo de mamona e incluir essas informações no artigo.
- Verificar os teores de carboidratos, proteínas e nitrogênio total no farelo de algodão e farelo de trigopara obter uma análise completa da composição centesimal.
- Realizar a medição da proteína por ensaio de Bradford.
- Adequar as condições da reação de hidrólise do óleo de mamona para otimização do processo.

REFERÊNCIAS

ABRAPA. **Brasil ultrapassa Estados Unidos em exportações de algodão no ciclo 2023/24**. 2024. Disponível em: https://abrapa.com.br/2024/07/02/brasil-ultrapassa-estados-unidos-em-exportacoes-de-algodao-no-ciclo-2023-24/. Acesso em: 24 set. 2024.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013. Doi:10.1039/C3CS35446F

AGUIEIRAS, E. C. G.; BARROS, D. S. N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574-581, 2019. Doi: 10.1016/B978-0-444-63990-5.00008-6.

ALI, U.; ANWAR, Z.; HASAN, S.; ZAFAR, M.; AIN, N.U.; AFZAL, F.; KHALID, W.; RAHIM, M.A.; MRABTI, H.N.; AL-FARGA, A.; ELJEAM, H. A. R. A. Bioprocessing and screening of indigenous wastes for hyperproduction of fungal lipase. **Catalysts**, v. 13, p. 853, 2023. Doi: 10.3390/catal13050853

ALIYAH, A. N.; EDELWEISS, E. D.; SAHLAN, M.; WIJANARKO, A.; HERMANSYAH, H. Solid-state fermentation using agroindustrial wastes to produce *Aspergillus niger* lipase as a biocatalyst immobilized by na adsorption-crosslinking method for biodiesel synthesis. **International Journalof Technology**, v. 8, p. 1393–1404, 2016. Doi: 10.14716/ijtech.v7i8.6988

ALVES, T.; TRIQUES, C.; SILVA, E.; FAGUNDES-KLEN, M.; DIN, S. Multi-enzymatic recovery of fungal cellulases (*Aspergillus niger*) through solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **The Canadian Journalof Chemical Engineering**, v. 100, p. 1930-1938, 2022. Doi: 10.1002/cjce.24292

ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N.S.; CARBALLARES, D.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases via interfacial activationon hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, v. 362, p. 130-140, 2021.Doi: 10.1016/j.cattod.2020.03.059

Association of Official Analytical Chemistry - **Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society**. Champaign: AOCS Press, 2003.

ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C. H.; FERNANDES, C. J. D. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z. D.; SILVA, R. A; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M.; FLEURI L. F. Improvement of lipase obtaining system by Orange waste-based solid-statefermentation: production, characterization and application. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 48, p. 565-573, 2018. Doi: 10.1080/10826068.2018.1476879

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, 2018. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.010

AYBASTIER, O.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces laguginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surfasse methodology. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.63, p. 170-178, 2010. Doi: 10.1016/j.molcatb.2010.01.013

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications andproperties – a review. **Brazilian Journalof Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010. Doi: 0.1590/S0104-66322010000100002

BELLAOUCHI, R.; ABOULOIFA, H.; ROKNI, Y.; HASNAOUI, A.; GHABBOUR, N.; HAKKOU, A.; BECHCHARI,A.; ASEHRAOU, A. Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 50, 2021. Doi: 10.1186/s43141-021-00145-y

BOLIVAR, Juan M.; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, p. 6251-6290, 2022. Doi: 10.1039/D2CS00083K

CALERO, J.; LUNA, D.; LUNA, C.; BAUTISTA, F. M.; HURTADO, B.; ROMERO, A. A.; POSADILLO, A.; ESTEVEZ, R. *Rhizomucor miehei* Lipase supported on Inorganic Solids as Biocatalyst for the Synthesis of Biofuels: Improving the Experimental Conditions by Response Surface Methodology. **Energies**, v. 12, p. 83, 2019. Doi: 10.3390/en12050831

CARDOSO, A. M.; LUCAS, E. F.; BARBOSA, C. C. R. Influência das condições reacionais nas características de copolímeros de metacrilato de metila e divinilbenzeno obtidos por polimerização em suspensão. **Polímeros**, v. 14(3), p. 201–5, 2004. Doi: 10.1590/S0104-14282004000300017

CARVALHO, A. S. S.; ROCHA, R. D. C. P. E.; SALES, J. C. S.; SOUZA, C. E. C. D.; LEMES, A. C.; COELHO, M. A. Z. Biotechnological Valorization of Cupuaçu By-Products: Solid-State Fermentation for Lipase Production by *Yarrowia* lipolytica. **Fermentation**, v. 9, p. 989*,* 2023. Doi: 10.3390/fermentation9110989

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015. Doi: 10.5935/0100-4042.20140304

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004. Doi: 10.1590/S0100-40422004000100025

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199-207, 2015. Doi:10.1016/j.bcab.2014.12.001

CHAUDHARY, V.; SHARMA, S. Suspension polymerization technique: parameter saffecting polymer properties and application in oxidation reactions. **Journal of Polymer Research**, v. 26, n. 102, p. 2-12, 2019. Doi: 10.1007/s10965-019-1767-8

CIPOLATTI, E. P.; MANOEL, E. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 26-34, 2017. Doi: 10.1016/j.biori.2017.01.004

CIPOLATTI, E. P.; PINTO, M. C. C.; HENRIQUES, R. O; PINTO, J. C. C. S.; CASTRO, A. M.; FREIRE, D. M. G.; MANOEL, E. A. Enzymes in green chemistry: the state of theart in chemical transformations. **Advances in Enzyme Technology**, v. 5, p. 138-139, 2019. Doi: /10.1016/B978-0-444-64114-4.00005-4

CIPOLATTI, E. P.; PINTO, M. C. C.; ROBERT, J. M.; DA SILVA, T. P.; BERALTO, T. C.; SANTOS, J. G. F.; DE CASTRO, R. P. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MANOEL, E. A.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida Antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, p. 46727, 2018. Doi: 10.1002/app.46727

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R. O.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L.; FREIRE, D. M. G.; MANOEL, E. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; OLIVEIRA, D. Nano-materials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 104675–104692, 2016. Doi: 10.1039/c6ra22047a

CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Resumo do composto PubChem para CID 643684, ácido ricinoleico**. Recuperado em 15 de maio de 2024 em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ricinoleic-acid

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Estimativa da produção de trigo na safra 2023/2024**. Brasília, 2024. Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso em: 24 set. 2024.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Conab aponta crescimento de 100% na produção da mamona. Canal Rural**, 2023. Disponível em: https://www.canalrural.com.br/diversos/conab-aponta-crescimento-de-100-na-producao-da-mamona/. Acesso em: 25 set. 2024.

CORTEZ, D.V.; CASTRO, H. F; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Nova Química**, v.40, p. 85-96, 2017.Doi:10.21577/0100-4042.20160163

COSTA, M. G.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 220-225, 2008. Doi: 10.1590/S0101-20612008000100031

COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; BACHMANN, L.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Enhancement of lipase activity via

immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: Application in butyl butyrate production. **Applied Catalysis A: General**, v. 622, p. 118217, 2021. Doi:10.1016/j.apcata.2021.118217

COSTA, T. M.; HERMANN, K. L.; GARCIA-ROMAN, M.; VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agroindustrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 34(2), p. 419–427, 2017. Doi: 10.1590/0104-6632.20170342s20150477

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. Rev. **Microbiol**, v. 26, n. 4, p. 314-7, 1995.

COUTINHO, F. M. B.; REZENDE, S. M.; BARBOSA, C. C. R. Influence of the morphological structure of macroreticular amidoxime resins on their complexation capacity. **Reactive and Functional Polymers**, v.49, p.235-248, 2001. Doi: 10.1016/S1381-5148(01)00079-7

COUTINHO, F. M. B.; REZENDE, S. M. Catalisadores sulfônicos imobilizados em polímeros: síntese, caracterização e avaliação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 222-223, 2001. Doi: 10.1590/S0104-14282001000400012

COUTINHO, F. M. B.; SOUZA, R. R.; GOMES, A. S. Synthesis, characterization and evaluation of sulfonic resins as catalysts. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 1525-1532, 2004. Doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.02.003

COUTINHO, F. M. B.; REZENDE, S. M.; SOARES, B. G. Characterization of sulfonated poly (Styrene Divinylbenzene) and poly (Divinylbenzene) and its application as catalysts in esteri-fication reaction. **Journalof Applied Polymer Science**, v. 102, p. 3616-3627, 2006. Doi: 10.1002/app.24046

CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J.C., FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica* effect of the support nature on catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59-67, 2014. Doi: 10.1016/j.molcatb.2013.11.020

DHARMAKAR, P.; AANAND, S.; KUMAR, J. S. S.; ANDE, M. P.; PADMAVATHY, P.; PEREIRA, J. J. Fermented cottonseed meal as analternative for groundnut oil cake in aquafeed. **Int J Fish Aquat Stud**, v. 10, p. 151-154, 2022. Doi: 10.22271/fish.2022.v10.i1b.2642

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Quim. Nova**, 32(3), 776-792, 2009. Doi: 10.1590/S0100-40422009000300033

DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P. Produção de lipase em fermentação em estado sólido, monitoramento do crescimento de biomassa de *Aspergillus niger* usando processamento digital de imagens. **Appl Biochem Biotechnol**, 147, p. 63-75, 2008. Doi: 10.1007/s12010-007-8068-07

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S.; ROSE, C.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMINI, N. R. Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oil sthereof. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10658–10663, 2009. Doi: 10.1021/jf902726p

EL-GHONEMY, D. H.; ALI, T. H;HASSANEIN, N. M.; ABDELLAH, E. M.; FADEL, M.;AWAD, G. E. A.; ABDOU, D. A. M. Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production.**Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 225-240, 2020. Doi: 10.1080/10826068.2020.1805759

EMBRAPA. (2020). **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Uma abordagem sustentável**. *Documentos 31*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Agroenergia.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; Mendoza, J. C. D.; Hernandez, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation, **Food Technology andBiotechnology**, 44 (2), p. 235-240, 2006.

FÉ, L. X. S. G. M.; SANTOS, M. M.; COSTA, C. S.; PINTO, M. C. C.; OLIVEIRA, R. A.; CIPOLATTI, E. P.; PINTO, J. C.; LANGONE, M. A. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MANOEL, E. A. Lipase from *Rhizomucor miehei* onto home-made hydrophobic polymers: Stable and efficient biocatalysts. **Process Biochemistry**, v. 142, p. 136-148, jul. 2024. Doi: 10.1016/j.procbio.2024.04.008

FENG, K.; HUANG, Z.; PENG, B.;DAI, W.;LI, Y.;ZHU, X.;CHEN, Y.;TONG, X.; LAN, Y.;CAO, Y. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylicresin: Stableandrecyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122553, 2020. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.122553

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185 - 197, 1998. Doi: 10.1016/s0009-3084(98)00042-5

FERREIRA, M. M; SANTIAGO, F. L. B.; SIVA, N. A. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A.; HIRATA, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum Candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, 2018, v. 67, p. 55-63. Doi: 10.1016/j.procbio.2018.01.028

GAMAYUROVA, V. S.; ZINOV'EVA; M. E.; TRAN, H. T. T. Features of the enzymatic hydrolysis of castor oil. **Catal. Ind**, 5, 269–273, 2013. Doi: 10.1134/S2070050413030045

GOKMEN, M.T.; DU PREZ, F.E. Porous polymer particles - A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 365-405, 2012. Doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.07.006

GONÇALVES, H. P. C.; SILVA, H. S. T.; CARVALHO, J. T.; PEREIRA, C. S. S. Estudo da conversão do óleo de mamoma (*ricinus communis l*.) em polímeros: uma revisão. **Revista Teccen**, v. 15, p. 30-37, 2022. Doi: 10.21727/rt.v15i1.3093

GRECO-DUARTE, J.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selectionand product characterization. **Fuel**, v. 202, p. 196-205, 2017. Doi: 10.1016/j.fuel.2017.04.036

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins: Na Already Solved Problemor Still na Exciting Challenge?. In: **Methods in Biotechnology**: Immobilization of Enzymesand Cells, 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. Doi: 10.1007/978-1-59745-053-9_1

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 1797–1809, 2016. Doi: 10.1016/j.jece.2016.03.007

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009. DOI: 10.1039/b711564b

HÖFELMANN, M.; HARTMANN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Isolation, purification, and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1546-1549, 1985. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10574.x

ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis**: Principles and applications. Chile: Editora Springer, 2008. Doi: 10.1007/978-1-4020-8361-7

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Política de Revisão de Dados Divulgados**. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101637. Acesso em: 7 mar 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1624–1639, 2020. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021

JAEGER K. E.; REETZ M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16(9), p. 396-403, 1998. Doi: 10.1016/s0167-7799(98)01195-0

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuityand its biochemicalapplications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.011

KHASKHELI, A. A.; TALPUR, F. N.; ASHRAF, M. A.; CEBECI, A.; JAWAID, S.; AFRIDI, H. I. Monitoringthe *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed hydrolysisof castor oil by ATR-FTIR Spectroscopy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 1-23, 2015. Doi: 10.1016/j.molcatb.2015.01.002

KRELING, N. E.; SIMON, V., FAGUNDES, V.D.; TOMÉ, A.; COLLA, L. M. Improving the Bioremediation and in situ Production of Biocompounds of a Biodiesel-Contaminated Soil. **Environmental Management**, v. 68, p. 210–225, 2021. Doi: 10.1007/s00267-021-01486-7

KRISHNA C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Crit Ver Biotechnol**. v. 25(1-2), p. 1-30, 2005. Doi: 10.1080/07388550590925383

LIMA, L. G. R.; GONÇALVES, M. M. M.; COURI, S., MELO, V. F.; SANT'ANA, G. C. F.; COSTA, A. C. A. Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biologyand Technology**, v. 62, e19180113, 2019. Doi: 10.1590/1678-4324-2019180113

LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; MANAN, M. A.; WEBB, C. Chapter 7 - Solid-state fermentation of food industrywastes. Food Industry Wastes. 2.nd. ed. **Academic Press**, p. 135-161, 2020. Doi: 10.1016/B978-0-12-817121-9.00007-3

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007. Doi: 10.1590/S0104-14282007000200016

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHAIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochem**, p. 38, 715–721, 2002. Doi: 10.1016/S0032-9592(02)00194-2

MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247-253, 2007. Doi: 10.2323/jgam.53.247

MANDARI, V.; NEMA, A.; DEVARAI, S. K.Sequential optimization and large-scale production of lipase using tri-substrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 46-54, 2020. Doi: 10.1016/j.procbio.2019.10.026

MANOEL, E. A.; ROBERT, J. M.; PINTO, M. C. C.; MACHADO, A. C. O.; BESTETI, M. D.; COELHO, M. A. Z.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 4043 – 4052, 2016. Doi: 10.1039/c5ra22508f

MEDEIROS, W. R. D. B.; DE PAIVA, W. K. V.; DINIZ, D. S. Abordagens de baixo custo para produção e concentração de lipases estáveis e avaliação de indutores. **Brazilian Journalof Chemical Engineering**, 40, 81–92, 2023. Doi: 10.1007/s43153-022-00223-9

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, p. 143–158, 2020. Doi: 10.1080/15422119.2018.1564328

MENDES, D. B.; SILVA, F. F. D.; GUARDA, P. M.; ALMEIDA, A. F.; DE OLIVEIRA, D. P.; MORAIS, P. B.; GUARDA, E. A. Lipolytic enzymes with hydrolytic and esterification activities produced by filamentous fungi isolated from decomposition leaves in an aquatic environment. **Enzyme Research**, 8182425, 2019. Doi: 10.1155/2019/8182425

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009. Doi: 10.1590/S0101-20612009000200033

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresour Technol**,v. 100(3):1486-90, 2009. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.08.016

MIGUEL JÚNIOR, J.; MATTOS, F. R.; COSTA, G. R.; ZURLO, A. B. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Improved catalytic performance of lipase eversa transform 2.0 via Immobilization for the sustainable production of flavoresters—Adsorption process and environmental assessment studies. **Catalysts**, v. 12, p. 1412, 2022. Doi: 10.3390/catal12111412

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnol Annu Ver**, 8, p. 183-225, 2002.Doi: 10.1016/s1387-2656(02)08009-2

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (eds). **Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design andoperation.** Berlin: Springer, 2006. 447 p. Doi: 10.1007/3-540-31286-2

MOKHTAR, N. F.; RAJA NOOR ZALIHA, R. A.; MUHD NOOR, N. D.; MOHD SHARI, F.; MOHAMAD ALI, M. S. The Immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrophobic interaction method. **Catalysts**, 10, p. 744, 2020. Doi: 10.3390/catal10070744

MONTEIRO, R. R. C.; ARANA-PEÑA, S.; ROCHA, T. N.; MIRANDA, L. P.; BERENGUER-MURCIA, A.; TARDIOLI, P. W.; SANTOS, J. C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really na optimal solution?. **Renewable Energy**, p. 1-86, 2020. Doi: 10.1016/j.renene.2020.10.071

MORAN-AGUILAR, M.G.; COSTA-TRIGO, I.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, p. 108060, 2021. Doi: 10.1016/j.bej.2021.108060

NAMBOODIRI, V. M.; CHATTOPADHYAYA R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v.35(5), p. 495-502, 2000. Doi: 10.1007/s11745-000-549-3

NEMA, A., PATNALA, S.H., MANDARI, V.; KOTA, S.; DEVARAI, K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bull Natl Res Cent 43**, v. 82, p. 1-8, 2019. Doi: 10.1186/s42269-019-0125-7

OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, A. K.S.; CASTRO, R.J.S. Bioconversionof Chicken Feather Meal by *Aspergillus niger*: Simultaneous enzymes production using a cost-effective feedstock under solid state fermentation. **Indian J Microbiol**, v. 59, 209–216, 2019. Doi: 10.1007/s12088-019-00792-3

OKAY, O. Macroporous copolymer networks. **Progress in Polymer Science**.v. 25, p. 711-779, 2000. Doi: 10.1016/S0079-6700(00)00015-0

OLUKOMAIYA, O.; FERNANDO, C.; MEREDDY, R.; LI, X.; SULTANBAWA, Y. Solid-state fermented plant protein sources in the diets of broiler chickens: A review. **Animal Nutrition**, v. 5, p. 319-330, 2019. Doi: 10.1016/j.aninu.2019.05.005

OHARA, A.; SANTOS, J. K.; ANGELOTTI, J. A. F.; BARBOSA, P. P. M.; DIAS, F. F. G.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H.; CASTRO, R. J. S. A multicomponent system basedon a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 131-137, 2018. Doi: 10.1590/1678-457X.17017

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; BE-RENGUER-MURCIA, A.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: the 61 “perfect” lipase immobilized biocatalyst?.**Catalysis Science & Technology**, v. 9, p. 3-126, 2019. Doi: 10.1039/c9cy00415g

PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Different strategies for hyper activation of lipase biocatalysts. **Lipases and Phospholipases**, v. 861, p. 329-341, 2012. Doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_20

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003. Doi: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000. Doi: 10.1016/S0032-9592(00)00152-7

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. DA C.; SOUZA, E. F. DE.; FREITAS, S. C. DE.; SANTOS, J. DE O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. **Ciência Rural**, v. 46(4), p. 755–761, 2016. Doi: 10.1590/0103-8478cr20131673

PESQUISA E CONSULTORIA DE INTELIGÊNCIA DE MORDOR. (2023, junho). **Tamanho do mercado de lipase e análise de ações – Tendências e previsões de crescimento** (2024 – 2029).Inteligência Mordor. Recuperado26 de fevereiro de 2024, de https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lipase-market

PINTO, Martina Costa Cerqueira. **Desenvolvimento de suportes enzimáticos por polimerização simultânea em suspensão e emulsão**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia

Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

PINTO, M. C. C.; CASTRO, N. L. S.; CIPOLATTI, E. P; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MANOEL, E. A.; FREIRE, D. M. G; PINTO, J. C. Effects of reaction operation policies on properties of core–shell polymer supports used for preparation of highly active biocatalysts. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 1800055, p.1-14, 2018.

PINTO, M. C. C.; EVERTON, S. S.; CIRILO, L. C. M.; MELO, T. N.; CIPOLATTI, E. P.; MANOEL, E. A.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Effect of hydrophobicity degree of polymer particles on lipase immobilization and on biocatalyst performance. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, p. 304-314, 2020. Doi: 10.1080/10242422.2020.1739026

PINTO, M.C.C., FREIRE, D.M.G.; PINTO, J.C. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, p. 12509-12530, 2014. Doi: 10.3390/molecules190812509

PRABANINGTYAS, R. K.; PUTRI, D. N.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. 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, 2018. Doi: 10.1016/j.egypro.2018.10.010

PUTRI, D. N.; KHOOTAMA, A.; PERDANI, M. S.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v. 6, p. 331-335, 2020. Doi: 10.1016/j.egyr.2019.08.064

RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1-3, p. 93-99, 2009. Doi: 10.1016/j.bej.2009.07.008

RAFIEE, F.; REZAEE, M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p.170-195, 2021. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198

REIS, C. L. B.; SOUSA, E. Y. A.; SERPA, J. F.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. C. S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p.768-783, 2019. Doi: 10.21577/0100-4042.20170381

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. 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. Doi: 10.5935/0100-4042.20140077

REMONATTO, D.; MIOTTI JR., R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; PAULA, A. V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**,114, 1–2022. Doi: 10.1016/j.procbio.2021.12.012

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 1, p. 16, 2011. Doi: 10.4061/2011/615803

RIBEIRO, T.; TORQUATO, E.; CIPOLATTI, E.; PINTO, M.; MANOEL, E.; MARQUES, M.; FREIRE, D.; PINTO, J.; COSTA, L. Influence of Textural Properties of Divinylbenzene Copolymer son the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. **Materials Research**, 25, p. 1-14, 2022. Doi: 10.1590/1980-5373-mr-2021-0440

RILDA, Y.; VALERI, A.; SYUKRI, S.; AGUSTIEN, A.; PARDI, H.; SOFYAN, N. Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of Ti-dopedZnO (Ti/ZnO) using mediated *Aspergillus niger*. **South African Journalof Chemical Engineering**, v. 45, p. 10–19, 2023. Doi: 10.1016/j.sajce.2023.03.002

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, andsolutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 746-770, 2019. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.003

SAMPAIO, C. S.; ANGELOTTI, J. A. F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, p.434-449, 2022. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139

SANTOS, P. S; SOLIDADE, L. S; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA, A. C. R. J.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.4, p.0181-0188, 2018. Doi: 10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial - Vol. 2: Engenharia bioquímica**. Editora Blucher, v. 2, p.560, 2002.

SHAJI, H.; CHANDRAN, V.; MATHEW, L. Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients. **Controlled Release Fertilizers for SustainableAgriculture**, p. 231-245, 2021. Doi: 10.1016/B978-0-12-819555-0.00013-3

SHU, Z.; DUAN, M.; YANG, J.; XU, L.; YAN, Y. *Aspergillus niger* lipase: heterologous expression in *Pichia pastoris*, molecular modeling prediction and the importance of the hinge domains at both sides of the lid domain to interfacial activation. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 25 p. 409-415, 2009. Doi: 10.1021/bp.147

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applicationsof lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.Doi: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6

SILVA, M. V. C.; AGUIAR, L. G; CASTRO, H. F; FREITAS, L. Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinilbezene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases. **World J Microbiol Biotechnol**, 7;34(11):169, 2018. Doi: 10.1007/s11274-018-2553-1

SINGH, S.; SHARMA, S.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K. Roles of process parameter son the ricinoleic acid production from castor oil by *Aspergillus flavus* BU22S. **Fermentation**, v. 9, p. 318, 2023. Doi: 10.3390/fermentation9040318

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, Benevides C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada a Agro & Indústria**, 01 edição, Editora Blucher, 2017, vol. 4, p. 529-568. Doi: 10.5151/9788521211150-15

SUYANTO, E.; SOETARTO, E. S.; CAHYANTO, M. N. Production and optimization of lipase by *Aspergillus niger* using coconut pulp waste in Solid State Fermentation. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1374, p. 012005, 2019. Doi: 10.1088/1742-6596/1374/1/012005

TEIXEIRA, M. C. V.; ALVES, E. H.; OLIVEIRA, F. P.; VAZ, L. S.; WIENDL, V. B. Automação de reator de fermentação em estado sólido para síntese de enzimas. **Revista Univap**, v. 25, p. 1–12, 2019. Doi: 10.18066/revistaunivap.v25i49.2015

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of lipases– A review part I: Enzyme immobilization. **Chem Bio Eng Ver**., 6, p. 157–166, 2019.Doi: 10.1002/cben.201900016

TRAVÁLIA, B. M.;GALVÃO, M. S;LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; NARAIN, N.; SANTANA, L. C. L. A. Effect of parameters on butyl butyrate synthesis using novel *Aspergillus niger* lipase as biocatalyst. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 40, p. e35999, 2018. Doi: 10.4025/actascitechnol.v40i1.35999

TRENZ, T. S.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARASCHIN, F. S. Functional analysis of alternative castor bean DGAT enzymes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 46, e20220097, 2023. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2022-0097

URRUTIA, P.; ARRIETA, R.; ALVAREZ, L.; CARDENAS, C.; MESA, M.; WILSON, L. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalizationon lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.108, p. 674-686, 2018. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.062

VEANA F.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ J. L.; AGUILAR C. N.; RODRÍGUEZ-HERRERA R.; MICHELENA G. Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. **Braz J Microbiol**, v. 29, p. 373-7, 2014. Doi: 10.1590/s1517-83822014000200002

VELOSO, Elizabeth Cristina Tavares. **Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para produção de lipase por fermentação em estado sólido pela linhagem mutante *Aspergillus niger* 11T53A14**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) — Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VELOSO, E. C. T.; DA SILVA, T. M. L. O.; MENEZES, J. P. S. Q.; GASPAR, A. B.; GONÇALVES, M. M. M.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; LANGONE, M. A. P. 2024. Activatedcarbon from sugarcane bagasse as support for lipase immobilization by physical

adsorption technique. **Cuadernos De Educación Y Desarrollo**, v. *16*(1), p. 588–612, 2024. Doi: 10.55905/cuadv16n1-032

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J.Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of **Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000. Doi: 10.1016/S1381-1177(99)00107-1

WANG, A. P.; ZHANG, J. M.; MENG, Y. L.; DENG, L. Q.; LV, Y. F.; LI, C.; WANG, J. Q. Effects of different sources and levels of dietary gossypol on gossypol residues in plasma and milk of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5127-5132, 2012. Doi: 10.3168/jds.2011-4870

XING, X.; JIA, J. Q.; ZHANG, J. F.; ZHOU, Z. W.; LI, J.; WANG, N.; YU, X.Q. CALB immobilized on to magnetic nanoparticles for efficient kineticre solution of racemic secondary al-cohols: long-termstability and reusability. **Molecules**, v. 24, p. 490, 2019. Doi: 10.3390/molecules24030490

XU, L.; KE, C.; HUANG, Y.; YAN, Y. Immobilized *Aspergillus niger* Lipase with SiO2 nanoparticles in sol-gel materials. **Catalysts**, v. 6, 1492016. Doi: 10.3390/catal6100149

YUAN, Z. S.; YAN, X.; WEI, Y. X. Improved Homologous Expression of the Acidic Lipase from *Aspergillus niger*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 30, p. 196-205, 2020. Doi: 10.4014/jmb.1906.06028

ZAMBRANO, K. H; VILLAFUERTE, C. D.; DELGADO, E. R. Effect of Solid-State Fermentation parameters on growth of interest and environmental enzyme production with *Aspergillus Niger*. **Orbital: Electron. J. Chem**, v. 15, p. 176-183, 2023. Doi: 10.17807/orbital.v15i3.18211

ZHU, S.Y.; XU, Y. Y.; YU, X. W. Improved Homologous Expression of the acidic lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(2), 196–205, 2020. Doi: 10.4014/jmb.1906.06028

ZUBIOLO, C.; SANTOS, R. C. A.; CARVALHO, N. B.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SANTANA, L. C. L. A. Encapsulation in a sol–gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1781–1788, 2014. Doi: 10.1007/s00449-014-1151-3