

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUÍS FERNANDO DA SILVA SANTOS

PRODUÇÃO DE OLEATO DE DECILA UTILIZANDO A LIPASE DE
Geotrichum candidum

Alfenas/MG

2021

LUÍS FERNANDO DA SILVA SANTOS

PRODUÇÃO DE OLEATO DE DECILA UTILIZANDO A LIPASE DE
Geotrichum candidum

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Daniela Battaglia Hirata.

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Santos, Luís Fernando da Silva
S237p Produção de oleato de decila utilizando a lipase de *Geotrichum candidum* / Luís Fernando da Silva Santos – Alfenas, MG, 2021.
74 f.: il. –

Orientadora: Daniela Battaglia Hirata.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Lipase. 2. Fungo. 3. Imobilização. 4. Otimização. 5. Esterificação.
I. Hirata, Daniela Battaglia. II. Título.

CDD- 579

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

PRODUÇÃO DE OLEATO DE DECILA UTILIZANDO A LIPASE DE *Geotrichum candidum*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 24 de março de 2021

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa de Freitas
Instituição: Escola de Engenharia de Lorena, USP – (EEL-USP)

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata, Presidente**, em 24/03/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joelise de Alencar Figueira Angelotti, Professor do Magistério Superior**, em 24/03/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LARISSA DE FREITAS, Usuário Externo**, em 24/03/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0484900** e o código CRC **005D5D9C**.

Dedico aos meus pais e aqueles que sempre estiveram comigo na realização e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família por me apoiarem sempre mais do que o necessário para que atingisse meus objetivos.

Aos meus amigos, Amanda Bueno, Henrique Damásio e Lara Mendes por todo o companheirismo, paciência e incentivo ao longo deste trabalho.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Daniela Battaglia Hirata, pela dedicação, apoio, conhecimentos transmitidos, paciência e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes pelas palavras sábias nos momentos necessários e por me incentivar em diferentes aspectos.

Aos colaboradores do Laboratório de Bioprocessos, em especial os alunos Eric Ferreira, Milena Rocha e Rafaela Gama por toda a ajuda e parceria ao longo desta jornada.

A Profa. Dra. Larissa de Freitas, Prof^ª. Dr^ª. Joelise de Alencar Figueira Angelotti e Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira por aceitarem compor a minha banca examinadora.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

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

Muito obrigado a todos!

*“Minha bandeira é brasileira eu não desisto nunca
Mas se dependesse deles eu nunca seria
Minha cor é cor de gente que cês não queria ver no topo
E não adianta meritocracia”*

Lourena (2018)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a produção do éster oleato de decila pela reação de esterificação utilizando como biocatalisador a lipase de *Geotrichum candidum* (LGC) imobilizada via adsorção física em um suporte preparado a partir de um resíduo agroindustrial (casca de arroz). O oleato de decila é um éster utilizado em uma variedade de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, sendo que a sua síntese via catálise enzimática é de grande interesse para a indústria cosmética, pois os processos catalisados por enzimas são considerados naturais e menos agressivos ao meio ambiente e, além disso, eles propiciam a obtenção de um único produto final, reduzindo gastos adicionais com processos de purificação pós-reação. As lipases são enzimas que apresentam estereosseletividade, quimiosseletividade e regioseletividade para o substrato. Essas propriedades as tornam extremamente versáteis e muito atraentes para diferentes aplicações, incluindo a indústria cosmética, oleoquímica, de alimentos, de detergentes, farmacêutica, dentre outras. Neste trabalho a LGC foi produzida por fermentação submersa a 30,0 °C, pH 7,0, sob agitação de 250 rpm por 48h e purificada por precipitação. Na sequência ela foi imobilizada por adsorção física em diferentes suportes provenientes de resíduos agroindustriais como carvão ativado de palha de café e de palha de cana, sílica de palha de arroz funcionalizada com o grupo fenil e com o grupo vinil e ainda foi utilizando também um suporte de nanopartículas magnéticas. A caracterização das propriedades biocatalíticas dos derivados obtidos foi realizada e os suportes foram também avaliados quanto a sua hidrofobicidade, utilizando o corante Rosa de Bengala. Dentre os suportes avaliados, o que apresentou a melhor atividade do derivado foi o suporte de sílica, obtido da palha de arroz e funcionalizado com os grupos fenis (fenil-sílica). Para este suporte, o efeito do carregamento de proteína foi avaliado, sendo que o derivado apresentando um carregamento de 8,13 mg/g de proteína foi selecionado para a etapa de esterificação subsequente. O processo de produção do oleato de decila foi otimizado utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis: a concentração de biocatalisador oferecido e a temperatura de reação. As condições ótimas para a produção do emoliente foram estabelecidas para 15 % (m/v) de biocatalisador e a temperatura de reação de 50 °C. A validação do planejamento foi realizada sob as melhores condições experimentais, tendo sua máxima conversão observada em aproximadamente 2 h (78%). O biocatalisador preparado manteve 73,3 % de sua atividade inicial após 6 ciclos consecutivos de 2 h de reação cada.

Palavras-chave: Lipase. *Geotrichum candidum*. Imobilização. Otimização. Esterificação.

ABSTRACT

The present work aimed to produce the decyl oleate ester by esterification reaction using the lipase of *Geotrichum candidum* (LGC) immobilized via physical adsorption on a support prepared from agro-industrial waste as a biocatalyst. Decyl oleate is an ester used in a variety of cosmetics and personal care products, and its synthesis via enzymatic catalysis is of great interest to the cosmetic industry, as the processes catalyzed by enzymes are considered natural and less aggressive to the environment. environment and, in addition, they provide a single final product, reducing additional expenses with post-reaction purification processes. Lipases are enzymes that exhibit stereoselectivity, chemoselectivity and regioselectivity for the substrate. These properties make them extremely versatile and very attractive for different applications, including the cosmetic, oleochemical, food, detergent and pharmaceutical industry. In this work, the lipase of *Geotrichum candidum* (LGC) was produced by submerged fermentation at 30.0 °C, pH 7.0 and under agitation of 250 rpm for 48h and purified by precipitation with organic solvent. Then, it was immobilized by physical adsorption on different supports from agro-industrial residues, such as activated carbon of coffee straw and cane straw, rice straw silica functionalized with the phenyl group and with the vinyl group and also using a magnetic nanoparticle support, in the sequence the characterization of the biocatalytic properties of the derivatives obtained was carried out. Derivatives were also evaluated for their hydrophobicity using the Bengal Rose dye. Among the evaluated supports, the one that presented the best activity of the derivative was the silica support, obtained from rice straw and functionalized with the phenyl groups (phenyl-silica). The effect of the protein loading was evaluated to support phenylsilica, and the derivative with a loading of 8.13 mg / g was selected for the subsequent esterification step. The decyl oleate production process was optimized using a central rotational composite design (DCCR) for two variables: the concentration of biocatalyst offered and the reaction temperature. The optimum conditions for the production of the emollient were established for 15% (w / v) of biocatalyst and the reaction temperature of 50 ° C. The planning validation was performed under the best experimental conditions, with its maximum conversion observed in approximately 120 min (78%). The prepared biocatalyst maintained 73.3% of its initial activity after 6 consecutive cycles of 2 h of reaction each.

Keywords: Lipase. *Geotrichum candidum*. Immobilization. Optimization. Esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Hidrólise de triglicérides por lipase.....	19
Figura 2 -	Estrutura cristalina da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> . A folha- β é mostrada em azul, rodeada por algumas hélices em amarelo, e o resíduo do sítio de serina ativo em bastões vermelhos, e a tampa mostrada em vermelho. Tanto a conformação aberta quanto a fechada são mostradas sobrepostas.....	20
Figura 3 -	<i>Geotricum candidum</i> em meio SDA (Ágar Sabouraud dextrose).....	26
Figura 4 -	Métodos de imobilização de biomoléculas.....	29
Figura 5 -	Principais características dos materiais utilizados como suporte para imobilização enzimática.....	31
Figura 6 -	Reação de produção do éster de interesse (Oleato de decila).....	42
Figura 7 -	Gráfico de Pareto para o DCCR.....	51
Figura 8 -	Porcentagem de esterificação em função da temperatura e concentração de biocatalizador na etapa de esterificação do oleato de decila: (a) superfície de resposta e (b) curva de contorno.....	53
Figura 9 -	Efeito do tempo de reação na porcentagem de conversão para a síntese de oleato de decila.....	54
Figura 10 -	Estabilidade operacional do biocatalisador após sucessivos ciclos de síntese de oleato de decila.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das enzimas estabelecida pela IUBMB.	18
-		
Tabela 2	Várias cepas de fungos para produção de lipase por fermentação submersa e fermentação sólida.....	21
-		
Tabela 3	Lípases utilizadas para produção de ésteres de cosméticos.....	23
-		
Tabela 4	Diferentes condições para produção de lipase tendo como fonte microbiana <i>Geotrichum candidum</i>	26
-		
Tabela 5	Níveis de variáveis adotados no planejamento fatorial.....	42
-		
Tabela 6	Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional.....	43
-		
Tabela 7	Hidrofobicidade dos suportes empregados na imobilização da LGC. Os ensaios foram realizados a 25°C utilizando 100 µg/mL do corante Rosa de Bengala.....	45
-		
Tabela 8	Determinação dos parâmetros de imobilização para a lipase purificada de <i>Geotrichum candidum</i> . Os ensaios foram realizados a 25 °C e 200 rpm por 12 h, usando 1,0 mg de proteína/g de suporte.....	47
-		
Tabela 9	Influência do carregamento inicial de proteína nas propriedades catalíticas da LGC imobilizada em fenil-sílica, a 25 °C e 200 rpm por 12 h.....	49
-		
Tabela 10	Matriz do DCCR 22 para a esterificação do oleato de decila, utilizando a LGC imobilizada no suporte fenil-sílica. A resposta do planejamento foi a porcentagem de esterificação obtida após 60 min de reação.....	50
-		
Tabela 11	Coefficientes de regressão obtidos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %.....	51
-		
Tabela 12	Coefficientes de regressão estatisticamente significativos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %.....	52
-		
Tabela 13	ANOVA para o DCCR 22, utilizando somente os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5 % de significância.....	52
-		
Tabela 14	Síntese enzimática de oleato de decila por reação de esterificação.....	55
-		

LISTA DE SIGLAS

LGC	Lipase de <i>Geotrichum Candidum</i>
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
TAGs	Triacilgliceróis
AGLs	Ácidos Graxos Livres
SmF	Fermentação Submersa
SSF	Fermentação Sólida
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
MEA	Ágar Extrato de Malte
CLECs	Cristais de Enzima Reticulada
CLEAs	Agregados Enzimáticos Reticulados
DCCR	Desempenho Do Delineamento Composto Central Rotacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	18
2.1	LIPASE.....	18
2.2	LIPASE DE ORIGEM FUNGICA.....	20
2.2.1	Aplicação da lipase em ésteres de interesse industrial.....	23
2.2.2	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i> (LGC).....	25
2.3	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	27
2.3.1	Métodos de imobilização.....	28
2.3.2	Suportes de imobilização.....	30
2.3.3	Tipos de suporte.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO <i>G. CANDIDUM</i>	37
3.2	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO.....	38
3.3	AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DOS SUPORTES.....	38
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA HIDROLÍTICA.....	39
3.5	IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM DIFERENTES SUPORTES.....	39
3.5.1	Efeito do carregamento de proteína.....	40
3.6	PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO.....	40
3.6.1	Cálculo da Atividade Recuperada.....	40
3.6.2	Concentração de Proteína Imobilizada.....	41
3.6.3	Cálculo do Rendimento de Imobilização.....	41
3.7	PRODUÇÃO DO OLEO DE DECILA POR REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.....	41

3.8	ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
4.1	AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DOS SUPORTES.....	45
4.2	IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM DIFERENTES SUPORTES.....	46
4.3	EFEITO DO CARREGAMENTO DE PROTEÍNA.....	48
4.4	OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	49
4.5	ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	55
5	CONCLUSÕES.....	58
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os emolientes são ingredientes essenciais em todos os tipos de produtos de cuidados pessoais especialmente para a categoria de cuidados com a pele. A maioria dos emolientes são hidrocarbonetos de cadeia longa (ácidos graxos), geralmente combinados com álcoois para a formação de ésteres. Estes vêm sendo utilizados em uma ampla variedade de aplicações por suas propriedades sensoriais e emolientes, em formulações cosméticas como, por exemplo, em cremes, pomadas, protetores solares, sabonetes, *sprays*, loções entre outros. A maioria desses ésteres é derivada sinteticamente do petróleo ou dos triacilglicerídeos naturais (ALANDER, 2020; ČOROVIĆ *et al.*, 2020).

Devido à variabilidade dos preços do petróleo bruto, os ésteres derivados dessa matéria prima se tornam cada dia mais dispendiosos, aumentando os custos referentes a sua utilização. Além disso, as indústrias de cosméticos começaram a direcionar seus produtos para formulações não agressivas ao meio ambiente e derivadas de produtos naturais e sustentáveis. Essa situação levou à necessidade de novas pesquisas a fim de se encontrar alternativas para a produção desses ésteres de forma sustentável (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2020).

O oleato de decila, conhecido como éster de cera, é um éster feito de álcool de cadeia linear (1-decanol) e ácido oleico. É usado em uma variedade de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, incluindo maquiagem e produtos para a pele e cabelo. O seu desempenho sensorial é frequentemente comparado aos populares triacilglicerídeos de cadeia média, obtidos de fontes naturais (OLEOCHEMICAL, 2019). Entretanto, os ésteres de cera disponíveis naturalmente por meio de secreções naturais de plantas e animais são tipicamente caros, pois as fontes são finitas (JAISWAL; RATHOD, 2019).

Uma forma de síntese do oleato de decila é via reação de esterificação usando catalisadores químicos como ácido p-toluenossulfônico e derivados de organo-estanho. No entanto, vários subprodutos indesejáveis também são gerados como olefinas, aldeídos, éteres e sais, exigindo processos de purificação pós-reação (HILLS, 2003).

Os ésteres de cera sintetizados por via enzimática são considerados similares aos ésteres de cera naturais e, portanto, podem ser usados com segurança e sem riscos nas indústrias de cosméticos e alimentos. A classe de biocatalisador mais amplamente utilizada para reação biotecnológica para a síntese de produtos químicos orgânicos é a enzima lipase. Elas possuem

um interesse substancial para pesquisadores e indústrias, pois apresentam estereosseletividade, quimiosseletividade e regiosseletividade para o substrato.

A biocatálise enzimática é uma técnica atrativa para a produção de produtos biotecnológicos em decorrência da sua especificidade, reduzido tempo de processo, baixo consumo de energia e por não apresentar toxicidade, sendo ainda que os produtos gerados por essa técnica são considerados similares aos obtidos de forma natural (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

A engenharia de proteínas, juntamente com as técnicas de imobilização, buscam promover uma maior estabilidade para uma enzima que é empregada em reações com condições adversas como elevadas temperaturas e a presença de solventes e/ou reagentes que podem causar a sua desnaturação, caso ela seja utilizada na sua forma livre. As técnicas de imobilização enzimática em materiais insolúveis representam um custo adicional, mas garantem a recuperação da enzima ao final do processo, maior precisão para controle do processo catalítico e maior estabilidade da enzima contra agentes desnaturantes e proteolíticos. Por essa razão, a busca por materiais alternativos como os resíduos agroindustriais que possam ser utilizados como suporte, a um baixo custo, é atrativa. Desta forma, além dos benefícios econômicos obtidos para a enzima, há ainda uma redução dos problemas de disposição de resíduos agrícolas (APRICENO *et al.*, 2019; MASSIMI *et al.*, 2018; SAFARIK *et al.*, 2018).

No presente trabalho, a síntese enzimática de oleato de decila foi realizada por meio da reação de esterificação do ácido oleico com 1-decanol. A novidade está na produção de um derivado não comercial, utilizando um biocatalisador e suporte não comerciais. A LGC foi inicialmente imobilizada via adsorção física em diferentes suportes, que foram preparados a partir de resíduos agroindustriais e utilizados para imobilização enzimática, como carvão ativado de palha de café e de palha de cana, sílica da casca de arroz funcionalizados com o grupo fenil e com o grupo vinil e novos materiais como as nanopartículas magnéticas. Até o presente momento há poucos relatos na literatura sobre a produção do oleato de decila via síntese enzimática, justificando o presente trabalho.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal foi a produção do éster oleato de decila pela reação de esterificação utilizando como biocatalisador a LGC imobilizada via adsorção física no suporte preparado a partir de resíduo agroindustrial (casca de arroz funcionalizada com grupos fenis).

1.1.2 Objetivos específicos

Para se alcançar o objetivo principal proposto, alguns objetivos específicos precisaram ser observados. Estes podem ser descritos como:

- a) Produzir a LGC por fermentação submersa;
- b) Purificar a lipase produzida;
- c) Avaliar os diferentes suportes para a etapa de imobilização para a enzima purificada;
- d) Caracterizar as propriedades biocatalíticas dos derivados obtidos;
- e) Aplicar o biocatalisador produzido na síntese do oleato de decila;
- f) Otimizar a síntese do oleato de decila, utilizando a metodologia do planejamento fatorial;
- g) Verificar a estabilidade operacional do biocatalisador produzido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPASES

As enzimas são biocatalisadores, de natureza principalmente proteica, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas e de elevada importância nos processos biotecnológicos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Com a descoberta de um número expressivo de enzimas, houve a necessidade de sistematização de nomenclatura. A *União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular* (IUBMB) adotou uma divisão das enzimas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada, conforme mostra a Tabela 1:

Tabela 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela IUBMB.

Nº	Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
1	Oxiredutases	Reação de oxidação-redução
2	Transferase	Transferência de grupos funcionais
3	Hidrolase	Reações de Hidrolise
4	Liasas	Remoção de grupos para formar ligações duplas
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

Fonte: Adaptado de Motta (2005).

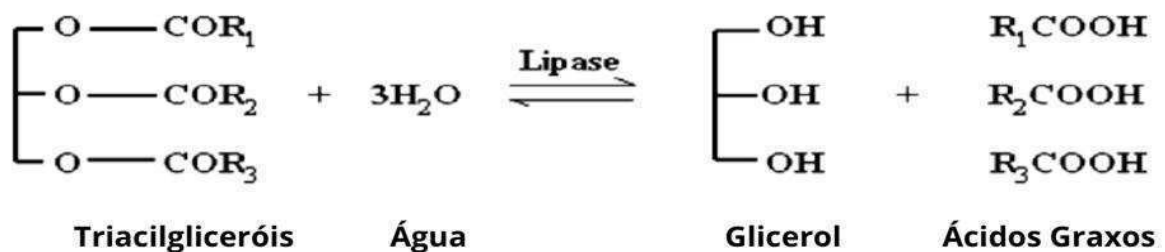
Nas últimas décadas, a aplicação prática de enzimas foi amplamente alcançada em várias indústrias de processamento bioquímico (KIM; GRATE; WANG, 2006), incluindo sínteses orgânicas, produtos químicos finos e a granel, saúde e produtos farmacêuticos, bem como alimentos, cosméticos, têxteis, celulose e papel. A aplicação atual de enzimas livres em escala industrial ainda é obstruída pela restrição da baixa estabilidade catalítica e recuperação da mesma (SHELDON, 2007a). Além disso, a natureza frágil das enzimas causa-lhes falta de desempenho catalítico em condições extremas como alta temperatura, estresse mecânico, acidez ou alcalinidade excessiva, solventes orgânicos incompatíveis, desnaturantes ou surfactantes, etc. (LIANG *et al.*, 2020).

Devido às propriedades específicas como enantiosseletividade, regioseletividade e especificidade pelo substrato as lipases se destacam dentre as demais enzimas. Elas podem ser

produzidas por fontes animais, vegetais e microbianas (CARRIERE *et al.*, 2000; FACCHINI *et al.*, 2015; GILBERT, 1993; JAEGER *et al.*, 1994; MUKHTAR *et al.*, 2016; PACKTER, 1994).

As lipases (triacilglicerol acilidrolase EC 3.1.1.3) são hidrolases capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (TAGs) em glicerol e ácidos graxos livres (AGLs) (Figura 1) em meio aquoso. Em meio orgânico, as lipases catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. Os substratos das lipases são diversificados e podem ser compostos por lipídios neutros, fosfolipídios e lisofosfolipídios ou éter lipídico (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; NOMURA; CASIDA, 2016; SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 1 - Hidrólise de triglicerídeos por lipase.

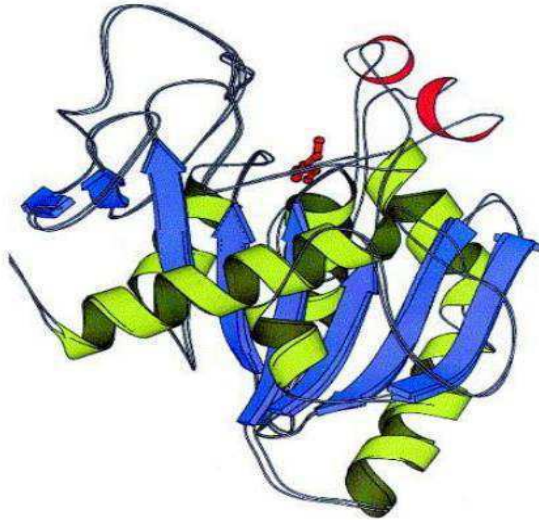


Fonte: Adaptado de Singh; Mukhopadhyay (2012).

As estruturas 3-D de lipases de *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas glumae*, *Penicillium camembertii*, *Humicola lanuginosa* e do pâncreas humano foram resolvidas cristalograficamente (BERTOLINI *et al.*, 1994; BRADY *et al.*, 1990; DEREWENDA; DEREWENDA; DODSON, 1992; NOBLE *et al.*, 1993; GROCHULSKI *et al.*, 1993). Esses estudos forneceram informações detalhadas sobre as relações estrutura-função nas lipases. As estruturas cristalinas indicaram que todas essas lipases têm uma dobra α / β -hidrolase comum.

O estudo também mostrou uma tríade catalítica (Ser-His Asp/Glu) semelhante à encontrada em serina proteases, e uma tampa cobrindo o sítio ativo. Durante a ativação, a tampa que cobre o sítio ativo é deslocada torna-o acessível ao substrato. As lipases apresentam uma grande variedade de sequências primárias com uma gama de massas moleculares entre 20 kDa a cerca de 110 kDa para lipases fúngicas maiores. No entanto, todas as lipases exibem a mesma estrutura dobrada α / β -hidrolase, comum também em muitas outras hidrolases com tríade catalítica idêntica composta por Ser, His, Asp e, às vezes, Glu no lugar de Asp (Figura 2) (BORRELLI; TRONO, 2015; CYGLER *et al.*, 1993; DAVID *et al.*, 1992; KRAUT, 1977; SCHMID; VERGER, 1998).

Figura 2 - Estrutura cristalina da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. A folha- β é mostrada em azul, rodeada por algumas hélices em amarelo, e o resíduo do sítio de serina ativo em bastões vermelhos, e a tampa mostrada em vermelho. Tanto a conformação aberta quanto a fechada são mostradas sobrepostas.



Fonte: (SVENDSEN, 2000).

2.2 LIPASE DE ORIGEM FÚNGICA

Os fungos filamentosos são considerados a melhor fonte para a produção de lipases extracelulares voltada para a aplicação industrial e esses podem crescer em vários habitats, incluindo sementes, óleos vegetais usados, solo contaminado com óleos, bem como alimentos e produtos lácteos deteriorados (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). As melhores linhagens descritas para a produção extracelular de lipases são: *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, sendo que *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp. e *Yarrowia* sp. são descritas como sendo notáveis leveduras produtoras de lipase (BASHEER *et al.*, 2011; BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020).

A produção de lipase pelos fungos varia de acordo com a cepa, a composição do meio de crescimento, as condições de cultivo, a temperatura, o pH e o tipo de fontes de carbono e nitrogênio usadas. Na Tabela 2 encontram-se algumas cepas produtoras de lipase utilizando fermentação submersa (SmF) ou fermentação sólida (SSF) (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Tabela 2 - Cepas de fungos e leveduras para produção de lipase por fermentação submersa e fermentação sólida.

(continua)

Micro-organismo	Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Substrato	Fermentação	Refêrencia
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	48	25	Óleo de soja	SmF	(LIMA <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	24	43	Torta-bagaço de azeite de oliva	SSF	(CORDOVA <i>et al.</i> , 1998)
<i>Rhizopus pusillus</i>	25	108	Torta-bagaço de azeite de oliva	SSF	(CORDOVA <i>et al.</i> , 1998)
<i>Penicillium restrictum</i>	24	30	Torta de óleo de babaçu	SSF	(PALMA <i>et al.</i> , 2000)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	36	30	Torta de óleo de babaçu	SSF	(GUTARRA <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rhizopus oligosporus TUV-31</i>	48	76,6	Gema de ovo	SSF	(IFTIKHAR; ., 2001)
<i>Rhizopus oligosporus ISUUV-16</i>	48	81,2	Farinha de amêndoa	SSF	(AWAN <i>et al.</i> , 2003)
<i>Aspergillus carneu</i>	96	12,7	Óleo de girassol	SSF	(KAUSHIK <i>et al.</i> , 2006)
<i>Candida cylindracea</i>	179,5	23,7	Ácido Oleico	SmF	(KIM; HOU, 2006)
<i>Candida rugosa</i>	50	3,8	Azeite de oliva	SmF	(RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2008)
<i>Penicillium verrucosum</i>	48	40	Farelo de soja	SSF	(KEMPKA <i>et al.</i> , 2008)
<i>Geotrichum sp.</i>	24	20	Azeite de oliva	SmF	(BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004)

Tabela 2. Cepas de fungos e leveduras para produção de lipase por fermentação submersa e fermentação sólida.

(conclusão)

Micro-organismo	Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Substrato	Fermentação	Refêrencia
<i>Rhizopus homothallicus</i>	12	826	Azeite de oliva	SSF	(RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2006)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	168	46	Farelo de trigo	SSF	(NARWAL; GUPTA, 2013)
<i>Fusarium solani FSI</i>	120	0,45	Óleo de gergelim	SmF	(MAIA <i>et al.</i> , 2001)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	48	21	Torta de soja	SSF	(DI LUCCIO <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aspergillus awamori</i>	96	495	Óleo de farelo de arroz	SmF	(BASHEER <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida cylindracea NRRLY17506</i>	175	20,4	Águas residuais de moinho de azeite	SmF	(BROZZOLI <i>et al.</i> , 2009)

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

As lipases fungicas têm recebido mais atenção quando comparadas às mesmas enzimas provindas de plantas e animais, devido a sua diversidade na atividade catalítica, alto rendimento e baixo custo de produção, assim como a relativa facilidade de manipulação genética e por não necessitarem de cofatores. A sua alta versatilidade permite a aplicação em diferentes indústrias tais como alimentícia, laticínios, detergente, farmacêutica, produção de biodiesel, couro, têxtil, cosmética, papel e oleoquímica (AKBAS *et al.*, 2015; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; LOLI *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2014; MUKHTAR *et al.*, 2016; NARWAL; GUPTA, 2013; NIYONZIMA; MORE, 2014; SUBHASH *et al.*, 2013; VELLARD, 2003). Na produção de cosméticos, elas podem funcionar como ingredientes ativos em uma formulação cosmética e como biocatalisador na síntese de produtos químicos cosméticos específicos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013; ARANA-PEÑA *et al.*, 2020; JAEGER; REETZ, 1998; ZHONG *et al.*, 2020).

Por serem amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e possuírem especificidade para diversos tipos de substrato, as lipases se tornaram muito atraentes para

aplicações industriais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; KAPOOR; GUPTA, 2012; RAY, 2015). Os maiores fabricantes de enzimas comerciais, Novozymes, DuPont, DSM, Amano Enzyme Inc. e Lonza Group que operam em nível global de mercado, preveem um aumento na demanda de lipases para os próximos anos.

O tamanho do mercado global de enzimas foi avaliado em 2019 em US \$ 9,9 bilhões de dólares e deve crescer a uma taxa composta de crescimento anual de 7,1% de 2020 a 2027 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Entre 2015 e 2020, a fatia do mercado global de enzimas destinado às lipases alcançou US \$ 590,5 milhões de dólares com uma taxa de crescimento anual de 6,5%. A região Ásia-Pacífico foi o maior mercado consumidor de lipases em 2014 e durante o período desta previsão, estimou-se que esse mercado cresceu uma taxa de crescimento anual maior do que 6,5 % proposto para o restante do mundo. Além disso, espera-se também que os países em desenvolvimento, como Índia, China e Brasil, possam aumentar o seu mercado consumidor de lipases para os próximos anos (CHANDRA *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2020).

2.2.1 Aplicação da lipase em ésteres de interesse industrial

Dentre todas as classes de compostos orgânicos usados em cosméticos, os ésteres têm uma ampla gama de aplicações na indústria cosmética, como emolientes em cremes, surfactantes em xampus, antioxidantes em cremes anti-idade, e sabores em cosméticos labiais, dependendo de suas propriedades específicas (THUM; OXENBØLL, 2008).

A Tabela 3 apresenta uma breve revisão geral da síntese de ésteres de interesse para indústrias de cosméticos catalisada por lipase.

Tabela 3 – lipases utilizadas para produção de ésteres de cosmeticos.

(continua)

Fonte da lipase	Éster produzido	Propriedade	Tempo de Reação	Referência
<i>Candida antartica</i>	Oleil acetato	Emoliente	5 min	(RADZI <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Oleato de Galactose	Surfactante	2 h	(ABDULMALEK <i>et al.</i> , 2012)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Propil galato	Antioxidante	48 h	(BOUAZIZ <i>et al.</i> , 2010)
<i>Candida artica</i>	Éster de ácido cinâmico	Antioxidante	12 dias	(STAMATIS; SERETI; KOLISIS, 2001)

Tabela 3 – lipases utilizadas para produção de ésteres de cosmeticos.

(continuação)

Fonte da lipase	Éster produzido	Propriedade	Tempo de Reação	Referência
<i>Candida rugosa</i>	Valerato de etila	Sabor	9 dias	(RAGHAVENDRA; SAYANIA; MADAMWAR, 2010)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	n-butil acetato	Sabor	24 h	(MAHAPATRA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	n-propil acetato	Sabor	24 h	(MAHAPATRA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Candida antarctica</i>	Octil, Decil e Dodecil ester	Emoliente	24 h	(VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2003)
<i>Candida antártica B</i>	Laurato de frutose	Surfactante	72 h	(ŠABEDER; HABULIN; KNEZ, 2006)
<i>Candida antártica B</i>	Palmitato de Frutose	Surfactante	72 h	(ŠABEDER; HABULIN; KNEZ, 2006)
<i>Candida sp.</i>	Oleato de cetila	Emoliente	8 h	(LI; HU; HAN, 2015)
<i>Candida antarctica</i>	Acetato de geranilo	Sabor	120 h	(TRUSEK-HOLOWNIA; NOWORYTA, 2007)
<i>Rhizomocur miehei</i>	Oleato de frutose	Surfactante	26 hrs	(KHALED <i>et al.</i> , 1991)
<i>Rhizopus sp.</i>	Butirato de isoamila	Sabor	48 hrs	(MACEDO; PASTORE; RODRIGUES, 2004)
<i>Rhizomocur miehei</i>	Acetato de isoamila	Sabor	72 h	(HARI KRISHNA <i>et al.</i> , 2001)
<i>Candida rugosa</i>	n-amil isobutirato	Sabor	48 h	(MILAŠINOVIĆ <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rhizomucur miehei</i>	Oleato de etila	Emoliente	24 h	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	n-butil hidrocínâmico	Antioxidante	48 h	(PRIYA; CHADHA, 2003)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Éster de ácido ascorbio	Antioxidante	30 min	(BRADDOO; SAXENA; GUPTA, 1999)
<i>Candida sp.</i>	Palmitato de isopropila	Emoliente	2 h	(GARCIA <i>et al.</i> , 1999)
<i>Rhisopus oryzae</i>	Butanoato de etila	Sabor	48 h	(GROSSO; FERREIRA-DIAS; PIRES-CABRAL, 2013)
<i>Candida sp.</i>	Palmitato de 1-etilexila	Emoliente	30 h	(TAN; CHEN; YE, 2006)
<i>Candida antarctica</i>	Oleato de decila	Emoliente	1 h	(RANI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Oleato de decila	Emoliente	3 h	(MIGUEZ <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 3 – lipases utilizadas para produção de ésteres de cosmeticos.

(conclusão)

Fonte da lipase	Éster produzido	Propriedade	Tempo de Reação	Referência
<i>Aspergillus</i> sp.	Oleato de decila	Emoliente	72 h	(AULAKH <i>et al.</i> , 2017)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oleato de decila	Emoliente	10h	(CHANG; CHOU; SHAW, 2001)

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Como pôde ser observado na Tabela 3, há ainda poucos trabalhos na literatura que utilizaram a rota enzimática para a produção do oleato de decila, justificando o presente trabalho.

2.2.2 Lipase de *Geotrichum candidum* (LGC)

O *Geotrichum candidum* é um fungo filamentosos (Figura 3) que produz lipases somente na presença de triglicerídeos no meio de fermentação. As LGC foram objeto de intensa investigação por detalhes em sua estrutura que pudessem explicar as diferentes seletividades de ácidos graxos observadas em reações hidrolíticas, quando catalisadas por essas enzimas. A LGC possui uma especificidade única para ácidos graxos insaturados com ligações duplas na posição cis-9 ou cis, cis-9, 12; sendo que as ligações ésteres desses ácidos graxos são hidrolisadas muito mais rapidamente do que a maioria dos outros. (BAILLARGEON; BISTLINE; SONNET, 1989; MALDONADO *et al.*, 2016; SONNET; MCNEILL; JUN, 1994). A reação preferencial de ácidos graxos insaturados cis-9, notadamente os ácidos oleico, linoléico, linolênico e palmitoléico, é considerada industrialmente útil, pois permite a produção de ácidos graxos interessantes a partir dos óleos correspondentes concentrados como o enriquecimento com ácido linoléico conjugado, e também, podem oferecer novas propriedades enantiosseletivas com relevância na química fina e farmacêutica (CHARTON; MACRAE, 1993; MALDONADO *et al.*, 2016).

As lipases produzidas por *G. candidum* são capazes de catalisar ambas reações de hidrólise (em meio aquoso) e síntese de ésteres, e suas especificidades variam de acordo com a linhagem tanto quanto a capacidade hidrolítica para formação de di- e monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres. Além disso, o meio em que elas são produzidas influencia no perfil dos ácidos graxos hidrolisados. Como elas foram uma das primeiras lipases investigadas há muitos relatos sobre sua produção, isolamento, atividade e seletividade ao longo dos anos (BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2007; BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004;

MALDONADO *et al.*, 2012), sendo que as preparações de enzimas brutas de diferentes cepas de *Geotrichum candidum* exibiram vários graus de especificidade para o tipo e posição dos ácidos graxos hidrolisados de triacilgliceróis e ésteres graxos (BERTOLINI *et al.*, 1994; MALDONADO *et al.*, 2016). Na tabela 4 estão listadas algumas cepas e os diferentes meios de produção utilizados para a produção de lipases.

Figura 3 - *Geotrichum candidum* em meio SDA (Ágar Sabouraud dextrose).



Fonte: Autor (2020).

Tabela 4 - Diferentes condições para produção de lipase tendo como fonte microbiana diferentes cepas de *Geotrichum candidum*.

(continua)

Fonte Microbiana	Condições de Produção	Referência
<i>G. candidum</i> (DBM 4012, 4013 e 4166) e <i>G. ludwigii</i> (DBM 48)	Inóculo líquido / Uréia e azeite / tubos agitados / 24 h / 30 °C / Inóculo líquido / Peptona, glicose e azeite / tubos agitados / 24 h, 30 °C	(ZAREVÚCKA <i>et al.</i> , 2005)
<i>G. candidum</i> 4013	Inóculo líquido / peptona e glicose / frascos agitados / 30 °C / 24 h	(BRABCOVÁ; ZAREVÚCKA; MACKOVÁ, 2010)
<i>G. candidum</i> (41 cepas)	Peptona, glicose e azeite / frascos agitados, 120 rpm / 30 °C / 48 h	(SACRISTÁN <i>et al.</i> , 2012)
<i>G. candidum</i> NRRLY 552	Inóculo sólido / licor de maceração de milho e óleo de soja / frascos agitados e tanque agitado e reatores de transporte aéreo, 250 rpm / pH = 7,0 / 30 °C	(MALDONADO <i>et al.</i> , 2014)

Tabela 4 - Diferentes condições para produção de lipase tendo como fonte microbiana diferentes cepas de *Geotrichum candidum*.

(conclusão)

Fonte Microbiana	Condições de Produção	Referência
<i>Geotrichum sp.</i> e <i>G. candidum</i> NRRLY 552	Inóculo sólido / licor de maceração de milho e óleo de soja / frascos agitados, 150 rpm / pH = 6,0 / 30 °C	(MALDONADO; MACEDO; RODRIGUES, 2014)
<i>G. candidum</i> NRRL Y-552	Inóculo sólido / hidrolisado de levedura e óleo de soja / frascos agitados, 250 rpm / transporte aéreo, 1 vvm / pH = 7,0 / 30 °C	(MALDONADO <i>et al.</i> , 2015)
<i>G. candidum</i> NRRLY 552	Inoculo sólido / peptona e óleo de soja / reator tanque agitado, 250 rpm / pH = 7,0 / 30 °C	(MALDONADO <i>et al.</i> , 2012)
<i>G. candidum penicillatum</i> M2	Inóculo líquido / extrato de levedura (10 g L ⁻¹), resíduo de refino de óleo de girassol (10 mL L ⁻¹) e minerais / frascos agitados, 170 rpm	(MLADENOSKA, 2014)

Fonte: Adaptado de Maldonado *et al* (2016).

2.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática tem sido considerada uma técnica bastante atrativa para a aplicação comercial de enzimas. Refere-se a uma enzima que está física ou quimicamente confinada ou localizada em uma determinada região ou espaço que propicia uma retenção de sua atividade catalítica em muitos ciclos de operações. O principal interesse na utilização de enzimas imobilizadas está associado às vantagens oferecidas por esta técnica em comparação com a utilização de enzimas livres (ADLERCREUTZ, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Dentre as vantagens apresentadas pela técnica de imobilização enzimática pode-se destacar a facilidade de separação das enzimas do meio reacional, o que possibilita a sua reutilização e diminui a possibilidade de contaminação por proteínas do produto final. Além disso, a imobilização fornece a possibilidade de um aumento de estabilidade enzimática mesmo utilizando-se elevadas temperaturas e variações de pH. Ainda, ela pode proporcionar a modulação da seletividade e especificidade enzimática, bem como a redução de problemas de

inibição, além de facilitar a remoção da enzima em qualquer ponto da reação e prevenção da perda de enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; GEOR MALAR *et al.*, 2020).

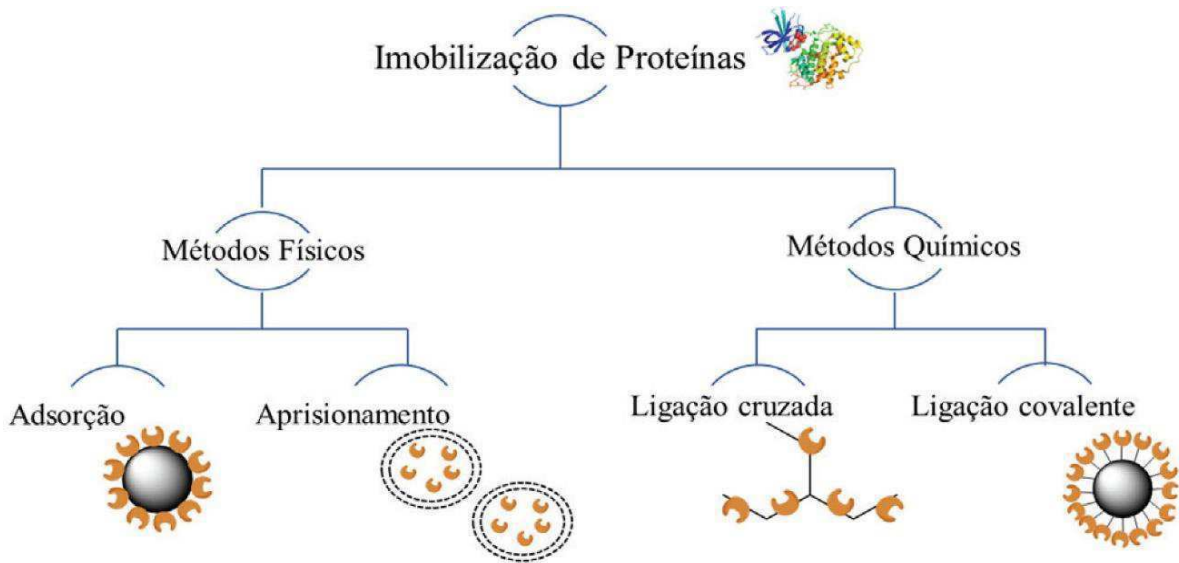
2.3.1 Métodos de imobilização

A seleção do método de imobilização apropriado é uma etapa muito importante, pois desempenha o papel principal na determinação da atividade e das características da enzima em uma determinada reação. As especificações do processo para o catalisador, incluindo a atividade enzimática geral, a eficácia da utilização da enzima, as características de desativação e regeneração da enzima, o custo do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas das enzimas imobilizadas são fatores que devem ser considerados (CHIOU; WU, 2004).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização, não há um método aplicável para todas as enzimas ou propósitos, considerando a natureza da estrutura de cada proteína. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2012).

De modo geral, a imobilização de proteínas pode ser subdividida em métodos químicos e físicos. Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes obtidas pela ligação de éter, tio-éter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte ou ainda por meio de ligações cruzadas, na qual as proteínas são imobilizadas a partir da reação direta com um agente reticulante. Os métodos físicos são caracterizados por ligações mais fracas, como ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica entre a enzima e o suporte. As proteínas podem também ser aprisionadas no suporte. A Figura 4 exemplifica os tipos de imobilização utilizados (FURLANI *et al.*, 2020; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Figura 4 - Métodos de imobilização de biomoléculas.



Fonte: (FURLANI *et al.*, 2020).

O aprisionamento é definido como um método irreversível de imobilização enzimática, onde as enzimas são aprisionadas em um suporte ou dentro das fibras, seja na estrutura de rede de um material ou em membranas poliméricas que permite que o substrato e os produtos passem, mas que a enzima fique retida. Normalmente, o aprisionamento pode melhorar a estabilidade mecânica e minimizar a lixiviação da enzima e a mesma não interage quimicamente com o polímero, portanto, a desnaturação geralmente é evitada. O método permite a capacidade de modificar o material de aprisionamento e criar um microambiente ideal para a enzima (COSTA; AZEVEDO; REIS, 2005; KLOTZBACH *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2011; WON *et al.*, 2005).

A ligação cruzada é outro método irreversível de imobilização que não requer um suporte para evitar a perda de enzima no substrato, pois as enzimas são ligadas umas às outras, ou às proteínas inativas, formando uma estrutura tridimensional complexa (FURLANI *et al.*, 2020; MOHAMAD *et al.*, 2015). Há um interesse crescente em imobilizar enzimas sem o uso de suportes, como cristais de enzima reticulada (CLECs) e agregados enzimáticos reticulados (CLEAs). Esta abordagem oferece vantagens claras: atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção devido à exclusão de um suporte adicional (SHELDON, 2007b).

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é

comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos e a carga de enzima permanecer constante após a etapa de imobilização (MENDES; CASTRO; GIORDANO, 2014).

O método de adsorção física pode ser definido como um método simples de imobilização reversível, que envolve as enzimas sendo fisicamente adsorvidas ou fixadas no material de suporte. As enzimas imobilizadas reversivelmente podem ser removidas do suporte em condições suaves, tornando esse método altamente atraente, pois quando a atividade enzimática decai, o suporte pode ser regenerado e reutilizado para imobilizar novas enzimas. Isso auxilia na economia do processo, já que o custo do suporte é frequentemente um fator primário no custo geral dos catalisadores imobilizados. A adsorção pode ocorrer por meio de forças inespecíficas fracas, como van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Das vantagens da imobilização por adsorção física se destacam a facilidade e simplicidade da técnica que permite a imobilização sob condições brandas, a possibilidade de alta retenção da atividade enzimática, visto que não há grandes modificações estruturais na biomolécula e a reversibilidade que permite a reutilização dos suportes empregados (FURLANI *et al.*, 2020; GUIBAN, 2006; KUMAR, 2009; MOHAMAD *et al.*, 2015).

A adsorção física geralmente requer a imersão do suporte em uma solução enzimática e sua incubação para permitir que ocorra a adsorção física. No entanto, como desvantagem tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção por meio de variações de temperatura, pH e força iônica. (FURLANI *et al.*, 2020; JOSHI *et al.*, 2005; SHELDON, 2007a).

2.3.2 Suportes de imobilização

As características do suporte são fundamentais para se determinar a eficácia do sistema de imobilização. Assim, a interação entre suporte e enzima confere a esse, propriedades mecânicas, químicas, bioquímicas e cinéticas específicas. As propriedades de suporte ideais

incluem: hidrofobicidade, inércia em relação às enzimas, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano, resistência à compressão, facilidade de acesso do substrato e baixo custo (LI; HU; LIU, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2015; SHELDON, 2007b).

Diferentes suportes oferecem variabilidade em seus aspectos físicos e propriedades químicas como por exemplo, tamanho de poro, equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico e diferentes grupos funcionais químicos na superfície, para fixação de enzimas. Essas diferenças nas características morfológicas podem afetar a imobilização enzimática e suas propriedades catalíticas, uma vez que o suporte entra em contato direto com a enzima (BERRIO *et al.*, 2007; CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; MOHAMAD *et al.*, 2015). As principais características necessárias aos materiais utilizados como suportes para uma imobilização enzimática eficaz estão resumidas na Figura 5.

Figura 5 – Principais características dos materiais utilizados como suporte para imobilização enzimática.



Fonte: adaptado de Zdarta *et al* (2018).

Os suportes porosos são geralmente preferidos porque a área de superfície elevada permite uma carga enzimática mais elevada e a enzima imobilizada recebe uma proteção melhor no seu micro-ambiente. Os parâmetros de poros e tamanho de partícula do suporte estabelecem a área de superfície total e, assim, afetam criticamente a capacidade de ligação das enzimas. Esses suportes também devem ter uma distribuição de poros controlada, a fim de se otimizar a capacidade e as propriedades de fluxo (GUISAN, 2006).

Alguns materiais naturais que estão disponíveis em abundância podem ser usados com poucas modificações como suportes ecológicos, diminuindo o custo do processo em relação aos suportes sintéticos e evitando o uso de produtos químicos caros e/ou tóxicos. Dentre as fontes de suporte econômico e ecologicamente corretas para imobilização de enzimas, Park *et al.*

(2015) usaram hidrogéis compostos miméticos de madeira para aprisionamento de lipase, onde os componentes de madeira foram tratados com um líquido iônico para formar um hidrogel esférico e aprisionar a lipase.

A nanofibra de celulose extraída de resíduos de papel também foi usada para imobilização de lacase para degradação de poluentes (GHODAKE *et al.*, 2018). Mesmo que uma enzima imobilizada em um suporte tenha propriedades melhores do que uma enzima livre, garantir a recuperação e purificação fácil e eficiente da enzima imobilizada é um desafio que afeta a economia do processo de imobilização (BILAL *et al.*, 2018). Portanto, a construção de um suporte ecologicamente correto e econômico pode reduzir os custos do biocatalisador e, conseqüentemente, facilitar sua aplicação industrial. Nesse cenário, os resíduos industriais e subprodutos tais como grãos usados, subprodutos de arroz e de milho (palha), fibra de coco, pó de café usado, entre outros, podem ser utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, e ainda proporcionam uma redução do impacto negativo ao meio ambiente causado pelo descarte inadequado (DE SOUZA *et al.*, 2020; OTARI *et al.*, 2020; SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.3.3 Tipos de suporte

Uma grande variedade de materiais de várias origens pode ser usada como suportes para a imobilização de enzimas. Esses materiais podem, em geral, ser divididos em orgânicos, inorgânicos e híbridos ou compostos. O suporte deve proteger a estrutura da enzima contra condições adversas de reação e, assim, ajudar a enzima imobilizada a reter sua atividade catalítica (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Suportes inorgânicos

Dentro dos clássicos materiais utilizados como suporte para imobilização enzimática a sílica é um dos materiais de suporte inorgânicos mais usados para imobilização de enzimas. Sua alta resistência térmica e química e boas propriedades mecânicas o tornam um material adequado para muitas aplicações práticas. A sílica oferece boas propriedades de adsorção devido à sua alta área superficial e estrutura porosa. Essas propriedades permitem a adesão efetiva da enzima e reduzem as limitações de difusão (JESIONOWSKI, 2001; JESIONOWSKI; KRYSZTAFKIEWICZ, 2002).

Outros óxidos inorgânicos, os óxidos de titânio, alumínio e zircônio também foram usados para a imobilização de muitas enzimas, por exemplo, lipase, cisteína, urease e α -amilase. Esses suportes são conhecidos por sua alta estabilidade, resistência mecânica e boa capacidade de adsorção. Além disso, esses materiais são inertes sob várias condições de reação, o que facilita sua aplicação como suporte para várias classes de enzimas (FORESTI *et al.*, 2010; YANG; SI; ZHANG, 2008; ZDARTA *et al.*, 2018).

Os minerais como bentonita, aloisita, caulinita, montmorilonita e sepiolita também são usados como materiais de suporte para produzir sistemas biocatalíticos recuperáveis com boa estabilidade enzimática para as condições da reação empregada. Eles são abundantes na natureza, estão facilmente disponíveis, oferecem alta biocompatibilidade e podem ser usados como obtidos sem tratamento e purificação avançados adicionais, o que os torna relativamente baratos (GHIACI *et al.*, 2009). Além disso, a presença de muitos grupos funcionais (como $-\text{OH}$, COOH , $\text{C} = \text{O}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$) na superfície dos minerais permite a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte e facilita a modificação dos minerais. Quando grupos funcionais adicionais são introduzidos, a área de adesão e hidrofobicidade do suporte aumenta, enquanto os obstáculos estéricos podem ser reduzidos (KEMMEGNE MBOUGUEN; NGAMENI; WALCARIUS, 2006).

Em teoria, as enzimas pertencentes a muitas classes catalíticas podem ser fixadas sem limitação à superfície de materiais minerais, mas na prática as mais frequentemente imobilizadas são as lipases, α -amilases, tirosinases e glicose oxidases. Enzimas imobilizadas em minerais são usadas principalmente em engenharia ambiental para tratamento de efluentes e águas residuais, bem como em biossensores para melhorar a faixa linear e o limite de detecção. Por exemplo, de acordo com Chrisnasari *et al.* 2015, a glicose oxidase imobilizada em bentonita modificada por hidróxido de tetrametilamônio reteve mais de 50% de sua atividade inicial após cinco ciclos catalíticos repetidos (CHRISNASARI *et al.*, 2015; ZHOU; KEELING, 2013).

Materiais à base de carbono, como carvão ativado modificado e não modificado, têm sido usados como materiais de apoio eficazes e valiosos na imobilização de enzimas, especialmente durante as últimas duas décadas. A estrutura porosa bem desenvolvida desses materiais, com poros de vários tamanhos e volumes e a grande área superficial, significa que esses materiais contêm inúmeros locais de contato em sua superfície para imobilização enzimática. A alta capacidade de adsorção, a abundância de muitos grupos funcionais e a liberação mínima de partículas finas tornam os materiais à base de carbono suportes adequados

para a imobilização por adsorção de várias enzimas (DAOUD; KADDOUR; SADOON, 2010; DUTTA *et al.*, 2009).

Suportes Orgânicos

De modo geral, os suportes de materiais orgânicos podem ser divididos em dois grandes grupos, materiais sintéticos (principalmente polímeros) e materiais renováveis obtidos de fontes naturais (biopolímeros).

Vários materiais poliméricos podem ser usados como suportes eficazes e melhorar as propriedades da enzima imobilizada como estabilidade térmica e capacidade de reutilização. As camadas de polímero desempenham um papel muito importante na proteção dos sítios ativos das enzimas dos efeitos negativos dos substratos da mistura de reação e das condições do processo. No entanto, deve-se notar que a síntese de um polímero com as propriedades e grupos funcionais desejados é geralmente um processo demorado e dispendioso (ASHLY; JOSEPH; MOHANAN, 2011). Diferentes polímeros contendo vários grupos funcionais têm sido usados para imobilização de enzimas, tais como celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, alginato, colágeno, albumina, poliestireno, polimetacrilatos de poliácido, poliácido, poliacrilamida, poliamidas, vinilo, alil-polímeros, entre outros (MESQUITA *et al.*, 2018).

- ***Materiais Sintéticos:*** A maior vantagem dos polímeros sintéticos como materiais para suporte é que os monômeros que constroem a cadeia polimérica podem ser selecionados de acordo com os requisitos da enzima e do processo no qual o produto da imobilização será utilizado. O tipo e a quantidade dos monômeros determinam a estrutura química e as propriedades do polímero (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MAKSYM *et al.*, 2017).

- ***Materiais renováveis obtidos de fontes naturais (biopolímeros):*** são uma alternativa ao uso de polímeros sintéticos como suporte de enzimas. Este grupo inclui carboidratos, mas também proteínas, como albumina e gelatina. Materiais como colágeno, celulose, queratinas e carragenina, bem como quitina, quitosana e alginato são exemplos de biopolímeros usados para imobilização (ELNASHAR, 2012; HORCHANI *et al.*, 2012). Sua origem natural e biocompatibilidade minimizam seu impacto negativo na estrutura e propriedades das enzimas e, assim, as proteínas imobilizadas retêm sua atividade catalítica. Além disso, a disponibilidade de grupos funcionais reativos em sua estrutura - principalmente hidroxila, mas também porções de amina e carbonila - permite a reação direta entre a enzima e o suporte facilitando a modificação

de sua superfície. Acima de tudo, porém, esses materiais são renováveis e fáceis de serem obtidos, e em muitos casos, são subprodutos de várias indústrias, o que os tornam baratos, reduzindo os custos associados ao processo de imobilização (KURITA, 2001; PETER, 1995).

Novos suportes para imobilização

As possibilidades de aplicações práticas de enzimas imobilizadas continuam a crescer e por esta razão, a pesquisa a respeito de novos materiais que apresentem características adequadas para determinadas enzimas, tornou-se importante. Estes materiais, tanto de origem orgânica como inorgânica, são caracterizados por possuírem uma boa estabilidade térmica, química e boas propriedades mecânicas, e ainda apresentam várias formas morfológicas com tamanhos de partículas distintos, geralmente em nano escala, o que os torna adequados para uso na imobilização de enzimas. Além disso, possuem quantidades notáveis de vários grupos funcionais, correspondentes aos grupos químicos das proteínas, que aumentam a ligação enzimática e a modificação de superfície (SINGH *et al.*, 2016).

Como exemplo de novos materiais que vêm sendo utilizado, podemos citar as nanopartículas. A imobilização de enzimas em nanopartículas é uma estratégia que apresenta diversos pontos positivos, entre eles a reduzida resistência à transferência de massa, o que confere elevada sensibilidade ao método, elevada carga enzimática efetiva, potencializando a utilização deste tipo de suporte na reprodução de cascatas enzimáticas, elevada área superficial, tornando o contato com o meio reacional mais eficaz, elevada resistência mecânica, que se revela muito importante em sistemas sujeitos a stress mecânico e a minimização dos problemas de difusão (CIPOLATTI *et al.*, 2014).

Outro exemplo que pode ser citado são suportes provenientes de resíduos agrícolas, facilmente disponíveis e não tóxicos, que podem ser adequados para a imobilização enzimática. Eles são definidos como os resíduos do cultivo e processamento de produtos agrícolas crus, como frutas, vegetais, aves, laticínios e plantações. Esses resíduos podem conter compostos que podem ser benéficos para o homem, mas cujos valores econômicos são inferiores ao custo de coleta, transporte e processamento. Sua composição dependerá do sistema e do tipo de atividades agrícolas e podem ser encontrados na forma de líquidos, lamas ou sólidos (OBI; UGWUISHIWU; NWAKAIRE, 2016).

Eles podem ainda ser classificados em dois grupos levando-se em consideração o percentual de celulose. Exemplos de resíduos lignocelulósicos são: grãos usados, subprodutos

de arroz e milho, fibra de coco, pó de café usado, enquanto para os resíduos não lignocelulósicos são exemplos, a casca de ovo e a membrana da casca de ovo. Uma das principais propriedades de todos esses suportes é a grande área superficial, que garante uma alta carga enzimática e uma alta porosidade que permite a proteção catalítica do micro-ambiente reacional (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A lipase foi produzida pelo micro-organismo *G. candidum* da linhagem NRRL Y-552, obtida da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). A linhagem foi mantida a 4°C em placas de Petri contendo ágar extrato de malte.

Os suportes de carvão ativado de palha de café e de palha de cana foram gentilmente doados pela Profa. Cristiane Veloso (PEREIRA *et al.*, 2017). O suporte de nanopartículas magnéticas foi gentilmente doado pelo Prof. Eduardo Figueiredo (MENDES *et al.*, 2020). Os suportes de sílica de casca de arroz funcionalizados com o grupo fenil e com o grupo vinil foram gentilmente cedidos pelo Prof. Adriano Aguiar Mendes (GAMA *et al.*, 2019). Todos os demais reagentes utilizados para este trabalho foram de grau analítico.

O óleo de algodão foi adquirido da Indústria Campestre (São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e o óleo de oliva (Carbonel, Espanha) foi adquirido em mercado local.

3.1 PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO *G. CANDIDUM*

A cepa de *G. candidum* foi mantida na temperatura de 5 °C em meio de manutenção (ágar extrato de malte – MEA). Para reativação, o fungo foi repicado pra um meio de crescimento (Sabouraud dextrose ágar - SDA).

A produção de lipase ocorreu por meio de fermentação submersa. As condições de cultivo para o meio de inóculo foram: 2% (m/v) de peptona de caseína, 1% (v/v) de óleo de algodão, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO₄. Para o meio de cultivo as composições dos reagentes foram: 3% (m/v) de peptona de caseína, 1,5% (v/v) de óleo dealgodão, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO₄. (CASTRO *et al.*, 2016).

O micro-organismo foi reativado em placa de SDA a 28 °C por 48 h. Uma colônia de diâmetro de 5 mm do micro-organismo foi retirada da placa de SDA e transferido para um “*erlenmeyer*” contendo 100 mL do meio de inóculo e incubado em shaker por 24 h, a 30 °C e 250 rpm. Para a etapa de fermentação foram utilizados 10 mL de inóculo e 90 mL de meio de cultivo, previamente autoclavado (atingindo 10% da capacidade total do “*erlenmeyer*”). A fermentação ocorreu a 30°C e agitação constante de 250 rpm, por um período de 48 h.

Após as 48 h de fermentação, o caldo de fermentação foi filtrado a vácuo, com um papel de filtro. O filtrado contendo a LGC (220,9 U/mL) foi denominado extrato enzimático bruto e utilizado para os estudos posteriores.

3.2 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO

Inicialmente o extrato enzimático bruto, foi liofilizado (Liofilizador L101 – Liotop) até que o volume final alcançasse um terço do volume inicial. Em seguida, utilizou-se o método de precipitação da lipase por solvente orgânico. A escolha do solvente orgânico acetona e da proporção utilizada foi baseada em trabalhos desenvolvidos anteriormente no laboratório de Bioprocessos (FERREIRA *et al*, 2018). A purificação foi feita usando o solvente (acetona) a 8 °C em uma relação (v/v) de caldo enzimático:solvente, 1:2. Após a adição da acetona, os sistemas foram centrifugados em tubos Falcon de 50 mL por 15 minutos a 2000 rpm, para a separação das fases. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e novamente colocado em contato com uma nova fase solvente (2ª etapa de precipitação), desta vez na proporção sobrenadante:solvente de 1:1 e repetiu-se o processo. O precipitado, resultante das duas etapas de precipitação, foi reunido e submetido à análise de atividade hidrolítica para verificação da atividade da enzima purificada, conforme o item 4.4.

3.3 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DOS SUPORTES

Para a determinação da hidrofobicidade dos suportes estudados, 0,15 g de cada suporte foi adicionado a 10 mL de uma solução de Rosa de Bengala (100 µg/mL em tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 5 mM) por 15 h à temperatura ambiente, sob agitação de 200 rpm. Após esse tempo foram retiradas amostras do sobrenadante para a quantificação da concentração de corante adsorvida, analisada por absorbância a 549 nm (MENDES *et al.*, 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata. A eficiência de adsorção do corante (E) foi determinada pela equação (1):

$$E (\mu\text{g}/\text{m}^2) = \left(\frac{C_{Csol}V_{sol} - C_{Csob}V_{sol}}{m_s} \right) \div SA \quad (1)$$

Em que: C_{sol} é a concentração inicial do corante, V_{sol} é o volume da solução corante, C_{sob} é a concentração do corante no sobrenadante após o tempo de incubação, m_s é a massa de suporte utilizada e SA é a área superficial do suporte utilizado.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA HIDROLÍTICA

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva (CASTRO *et al.*, 2016). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e solução de goma arábica a 7% (m/m). Em frascos “*erlenmeyer*” de 125 mL foram adicionados 5 mL de substrato, 5 mL de solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) e adicionados 0,1 g de derivado ou 0,1 mL da enzima na forma solúvel, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostaticado com agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma solução de acetona:etanol 1:1. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 20 mM, utilizando fenolftaleína como indicador. O branco da reação foi realizado adicionando-se 0,1 mL do meio de cultivo autoclavado utilizado para a fermentação, ou 0,1 g do suporte empregado para a imobilização.

O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a equação 2. Uma unidade internacional (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio (37°C, pH 7,0 e 250 rpm). As atividades foram expressas em μmoles/mg.min

$$A (U/mg) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (2)$$

Em que: M é a concentração molar da solução de NaOH; m é o volume de enzima solúvel (mL) ou massa do derivado (g); t é o tempo de reação (min); V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL) e V_b é o volume do NaOH gasto na titulação do controle (mL).

3.5 IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM DIFERENTES SUPORTES

Para os suportes utilizados neste trabalho uma etapa anterior à imobilização foi

requerida, visando à retirada do ar dos poros do suporte propiciando seu preenchimento com água. Assim, pesou-se os suportes secos (1 g) que foram umidificados com 20 mL de etanol 90 % e agitados por 5 minutos. Após a agitação, lavou-se os suportes com água destilada e filtrou-se à vacuo para a retirada da água residual (FERREIRA *et al.*, 2018).

Foi oferecida uma carga inicial de 1 mg de proteína que correspondeu a uma atividade inicial de 229,1 U. O volume final foi completado para 20 mL utilizando tampão fosfato 5 mM pH 7. Essa suspensão foi mantida em agitação de 250 rpm em shaker orbital, a temperatura de 25 °C por 12 h, tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio por adsorção, em todos os ensaios (FERREIRA *et al.*, 2018). Após as 12 h de imobilização, o derivado foi filtrado e armazenado a 4°C para posterior utilização. Após a imobilização, a atividade resultante no sobrenadante e nos derivados foi determinada pelo método de hidrólise, utilizando óleo de oliva a pH 7 (100 mM).

3.5.1 Efeito do carregamento de proteína

O efeito da quantidade de proteína imobilizada no suporte de fenil-silica foi avaliado. Diferentes carregamentos, de 1 a 30 mg de proteína/g de suporte, foram utilizados para a imobilização da LGC. Os ensaios foram realizados utilizando-se a lipase purificada solubilizada em tampão fosfato pH 7 a 5 mM, e 1 g de suporte foi adicionado a um volume final de 20 mL. Os ensaios foram realizados a 25 °C, por 12 horas sob agitação de 200 rpm.

3.6 PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

3.6.1 Cálculo da Atividade Recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica aparente do derivado e o produto da atividade inicial oferecida com a concentração de enzima imobilizada, conforme mostra a equação 3.

$$AR (\%) = \frac{A(\frac{U}{mg})}{U_0} \cdot 100 \quad (3)$$

Em que: *AR* é a atividade recuperada em porcentagem; *A* (U/mg) é a atividade hidrolítica do derivado ($U \cdot g^{-1}$ de suporte); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização ($U \cdot g^{-1}$ de suporte).

3.6.2 Concentração de Proteína Imobilizada

A concentração de proteína imobilizada foi estimada com base na concentração de proteína oferecida e a concentração de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostra a equação 4.

$$PI (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Em que: PI é a porcentagem de proteína imobilizada; P_0 é a concentração de proteína no tempo inicial; P_f são as concentrações de proteína no tempo final no sobrenadante ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

3.6.3 Cálculo do Rendimento de Imobilização

O cálculo do rendimento de imobilização foi determinado através da relação entre a atividade da proteína livre e a atividade da proteína no sobrenadante, como mostra a equação 5.

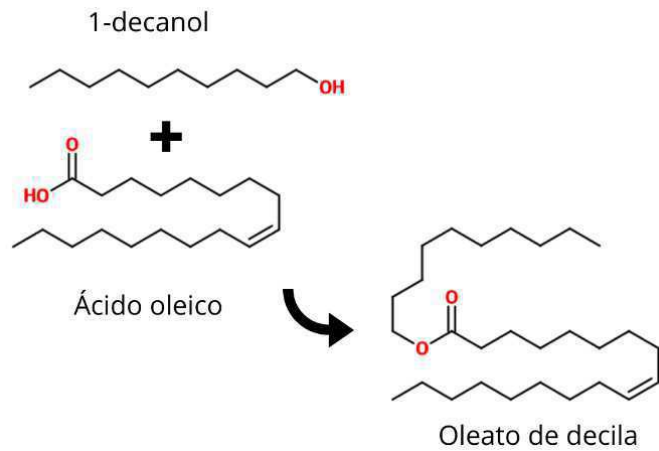
$$RI (\%) = \frac{U_r - U_s}{U_r} \cdot 100 \quad (5)$$

Em que: RI é a porcentagem do Rendimento de Imobilização; U_r é a atividade da proteína (U/mL) livre; U_s é a atividade da proteína (U/mL) do sobrenadante.

3.7 PRODUÇÃO DO OLEAO DE DECILA POR REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Os ensaios de esterificação para a produção do oleato de decila (Figura 6) foram realizados em frascos Duran, de 50 mL, fechados utilizando-se 4 mL de substrato, preparados na proporção de 1:1,15 de ácido oleico:álcool etílico (100 mM) em meio contendo n-heptano (MIGUEZ *et al.*, 2018).

Figura 6 - Reação para produção do éster de interesse (oleato de decila).



Fonte: Autor (2020).

A concentração de derivado e a temperatura destes ensaios foram determinadas de acordo com um DCCR 2² e três pontos centrais. Como variável resposta ao planejamento foi calculada a porcentagem de éster obtido utilizando um tempo de reação de 1 h e agitação de 250 rpm. As Tabelas 5 e 6 mostram o delineamento adotado. Foram realizados 11 ensaios utilizando-se um derivado preparado com um carregamento de proteína de 8,13 mg/g de suporte.

Tabela 5 - Níveis de variáveis adotados no planejamento fatorial.

Variáveis	- 1,41	-1	0	1	1,41
Conc. de Derivado (% m/v)	5	7	12	17	19
Temperatura (°C)	26	30	40	50	54

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Tabela 6 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional.

Ensaio	Variáveis Independentes	
	Conc. de Derivado (% m/v)	Temperatura (°C)
1	-1 (7)	-1 (30)
2	+1 (17)	-1 (30)
3	-1 (7)	+1 (50)
4	+1 (17)	+1 (50)
5	-1,41 (5)	0 (40)
6	+1,41 (19)	0 (40)
7	0 (12)	-1,41 (26)
8	0 (12)	+1,41 (54)
9	0 (12)	0 (40)
10	0 (12)	0 (40)
11	0 (12)	0 (40)

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 1 h de reação. Essas alíquotas foram transferidas para frascos “*erlenmeyer*” contendo 10 mL de solução álcool-acetona (1:1 v/v), 3 gotas de fenolftaleína e tituladas com solução de NaOH 20 mM, previamente padronizada. O mesmo procedimento foi utilizado para preparo do branco, porém a adição do substrato foi utilizada no lugar da amostra.

Os resultados foram analisados por meio do software Protimiza Experimental Design (2014) sendo utilizada uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos se avaliar a construção da superfície de resposta e curva de contorno.

O planejamento foi validado na melhor condição obtida, com a execução de um ensaio em triplicata. Ainda para esta condição ainda foi realizado o acompanhamento da reação de esterificação com o tempo (4 h).

3.8 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A síntese do oleato de decila foi realizada sob as melhores condições experimentais; concentração de enzima de 17 (% m/v) e temperatura de 50 °C na proporção de 1:1,15 de ácido oleico:álcool etílico (100 mM) em meio contendo n-heptano a 250 rpm de agitação, durante 2 h. A reação foi catalisada pela LGC imobilizada em fenil-sílica (8,13 mg/ g de suporte). Foram utilizados seis ciclos sucessivos de 2 h cada um.

Ao final de cada ciclo, o derivado foi retirado da mistura reacional por filtração e lavado com n-hexano para remover os reagentes ou as moléculas de produto retidas no micro-ambiente do biocatalisador. Após esse procedimento o biocatalisador era reintroduzido em uma nova reação e assim sucessivamente até completar os seis ciclos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DOS SUPORTES

A hidrofobicidade do suporte é um fator importante a ser estudado para a imobilização de lipase por adsorção física com ativação interfacial (LIMA *et al.*, 2015). Neste tipo de imobilização as lipases tendem a se adsorverem na superfície do suporte na conformação aberta, e o seu sítio ativo fica direcionado para a superfície do suporte. Esta forma de imobilização pode favorecer o aparecimento da hiper ativação da lipase imobilizada (BASTIDA *et al.*, 1998), mas este efeito é extremamente reduzido quando são utilizados substratos não solúveis como os óleos vegetais.

Assim, dependendo da hidrofobicidade do suporte e do tamanho da tampa que recobre o sítio ativo da enzima, esse fator poderá interferir também de forma negativa na atividade catalítica da enzima imobilizada. Quanto maior a hidrofobicidade, maior a aproximação entre o sítio ativo da enzima e a superfície do suporte, diminuindo o espaço entre eles e dificultando assim o acesso do substrato (FERREIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, uma menor atividade catalítica do derivado é observada, devido a uma maior dificuldade de acessibilidade de substratos grandes como os triacilglicerídeos ao sítio ativo da enzima.

Neste trabalho a hidrofobicidade foi definida como a quantidade do corante Rosa de Bengala adsorvido por unidade de área do suporte. Na Tabela 7, estão mostrados os resultados obtidos para os suportes analisados.

Tabela 7 - Hidrofobicidade dos suportes empregados na imobilização da LGC. Os ensaios foram realizados a 25°C utilizando 100 µg/mL do corante Rosa de Bengala.

Suportes	Área de superfície (m ² /g)	Diâmetro de poro (Å)	Hidrofobicidade (µg de corante/m ²)
Fenil- sílica de casca de arroz	183,7 ^a	35,2	52,70
Vinil-sílica de casca de arroz	242,5 ^b	33,9	38,94
Resíduo de Café	1209 ^c	não informado	8,09
Resíduo de Cana	982 ^c	não informado	10,04
Magnético	12,8 ^d	19,4	4,87

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: a (GAMA *et al.*, 2019); b determinado no presente estudo por método de BET; c (PEREIRA *et al.*, 2017); d (MENDES *et al.*, 2020)

O suporte que apresentou uma maior hidrofobicidade foi o de sílica de casca de arroz modificada com o grupo fenil (52,70 μg de corante/ m^2). O grupo fenil é um radical derivado de um anel aromático, o benzeno. O objetivo de se modificar a sílica com a adição de grupos fenis é justamente o de se favorecer a imobilização da lipase por adsorção via ativação interfacial (GAMA, *et al.*, 2019). Segundo Blanco *et al.* (2004), a introdução de frações orgânicas hidrofóbicas em superfícies à base de sílica promove a geração de um micro-ambiente mais hidrofóbico, melhorando a afinidade da enzima com a superfície de suporte e ainda proporcionando a obtenção de biocatalisadores com alta atividade catalítica em meios não aquosos.

Os suportes obtidos a partir de resíduos de cana e de café, apesar de apresentarem um elevado valor de adsorção do corante Rosa de Bengala, possuem também uma elevada área de superfície, fazendo com que a sua hidrofobicidade por área seja menor do que a obtida para o suporte de sílica modificado com fenil. Já o suporte magnético apresentou o menor valor de hidrofobicidade observado (4,87 μg de corante/ m^2).

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM DIFERENTES SUPORTES

Na sequência foram realizados os ensaios para a imobilização da LGC nestes suportes, sendo que a LGC foi previamente produzida via fermentação submersa e purificada por precipitação com acetona, seguindo os procedimentos já estabelecidos no Laboratório de Bioprocessos em estudos anteriores (CASTRO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018).

Na Tabela 8, estão os derivados obtidos para a imobilização por adsorção física utilizando a LGC previamente purificada.

Tabela 8 - Determinação dos parâmetros de imobilização para a lipase purificada de *Geotrichum candidum*. Os ensaios foram realizados a 25 °C e 200 rpm por 12 h, usando 1,0 mg de proteína/g de suporte.

Derivados	AI^a (U/mL)	RI^b (%)	PI^c (mg/g de suporte)	AD^d (IU/g)	AR^e (%)
Resíduo de Cana	229,10 ± 1,04	100,00	1,00	0,00 ± 0,00	0,00
Resíduo de Café	229,10 ± 1,04	100,00	1,00	0,00 ± 0,00	0,00
Vinil – sílica de casca de arroz	229,10 ± 1,04	100,00	1,00	12,52 ± 0,14	5,46
Fenil – sílica de casca de arroz	229,10 ± 1,04	100,00	1,00	13,69 ± 0,02	5,97
Magnético	229,10 ± 1,04	68,17	0,68	11,13 ± 0,09	7,26

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Legenda: a atividade inicial; b rendimento de imobilização; c proteína imobilizada; d atividade hidrolítica; e atividade recuperada.

A adsorção física com ativação interfacial em suportes hidrofóbicos, e em baixa força iônica, é um método simples e eficiente de se imobilizar lipases (ADLERCREUTZ, 2013). Além disso, a adsorção é um processo reversível, o que facilita a recuperação e reutilização do suporte para ser utilizado em novas imobilizações, já que quando as lipases imobilizadas se tornarem inativas, após vários ciclos de reuso, elas poderão ser desorvidas do suporte, que poderá ser então reutilizado (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017).

Um rendimento de imobilização de 100% foi obtido para a maioria dos suportes utilizados. Como foi utilizado uma baixa carga de proteína (1 mg) a imobilização de toda a lipase oferecida era esperada. A exceção foi para o suporte magnético, que apresentou o menor rendimento de imobilização observado na Tabela 5 (68,17 %). Uma possível explicação para este resultado estaria relacionada com o menor valor de hidrofobicidade encontrado para este suporte (4,87 µg de corante/m²), uma vez que o processo de imobilização utilizado se deu por adsorção física da lipase na superfície do suporte.

A melhor atividade do derivado encontrada foi para a imobilização da LGC com o suporte de fenil-sílica (13,69 ± 0,02 U/g de suporte), sendo que os resultados encontrados para os derivados de vinil-sílica e magnético foram próximos a este. Atribui-se a essa baixa atividade do derivado as possíveis distorções que possam ocorrer no sitio ativo da lipase quando

imobilizada em baixo carregamento em suportes hidrofóbicos (RAMOS *et al.*, 2015, FERREIRA *et al.*, 2018) e não por problemas difusionais do substrato em relação aos poros do suporte, pois o diâmetro molecular da LGC é de 69,5 Å (FERREIRA *et al.*, 2018), e o diâmetro dos poros dos suportes usados foram todos abaixo deste valor (Tabela 6), indicando que a imobilização da LGC ocorreu na superfície dos suportes, descartando assim a possibilidade de baixa atividade devido aos problemas difusionais do substrato pelos poros.

Para os suportes de resíduo de cana e de café não houve a detecção de atividade do derivado. Uma possível explicação para este resultado seria a elevada área de superfície observada para estes suportes, que conseqüentemente, favorece que haja uma maior distorção do sítio ativo da lipase, inviabilizando desta forma que substratos de maior peso molecular como o óleo de oliva entrem em contato com o sítio ativo e sejam convertidos.

Assim, dentre os suportes avaliados para a imobilização da LGC, o de sílica obtida da casca de arroz e modificada com o grupo fenil foi escolhido para os ensaios subsequentes, por ter apresentado uma imobilização total de toda proteína oferecida e por ter sido o derivado que apresentou a maior atividade hidrolítica.

4.3 EFEITO DO CARREGAMENTO DE PROTEÍNA

A LGC foi imobilizada no suporte fenil-sílica de casca de arroz via adsorção física a 25 °C, pH 7,0 e baixa força iônica (5 mM) por 12 h, que correspondeu ao tempo necessário para se atingir o estado de equilíbrio para todos os ensaios (FERREIRA *et al.*, 2018). A concentração inicial de proteínas oferecidas para a imobilização variou de 1 a 30 mg de proteína por grama de suporte no intuito de se avaliar a influência da carga enzimática sobre as propriedades catalíticas dos derivados preparados. Na Tabela 9 encontram-se os resultados da influência do carregamento de proteína nos parâmetros de imobilização

Para os derivados preparados foram observadas as imobilizações de 1,00 a 17,87 mg de proteína por g de suporte e atividades hidrolíticas de $12,92 \pm 0,42$ a $121,74 \pm 2,57$ U/g. Embora a saturação do suporte não tenha sido atingida mesmo oferecendo um carregamento de proteína de 30 mg, a atividade encontrada para o derivado se manteve praticamente constante para os carregamentos a partir de 15 mg (≈ 120 U/g). Ainda para este ensaio foi observado o melhor

valor de atividade recuperada (6,51%). Portanto, o derivado no qual foi imobilizado 8,13 mg de proteína, foi selecionado para a etapa de esterificação subsequente.

Tabela 9 - Influência do carregamento inicial de proteína nas propriedades catalíticas da LGC imobilizada em fenil-sílica, a 25 °C e 200 rpm por 12 h.

Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	AI^a (U/mL)	RI^b (%)	PI^c (mg/g de suporte)	AD^d (U/g)	AR^e (%)
1	229,12 ± 1,00	100,00	1,00	12,92 ± 0,42	5,64
2	458,20 ± 0,95	100,00	2,00	13,69 ± 0,03	2,99
4	916,01 ± 2,54	98,97	3,96	27,49 ± 1,09	3,03
8	1832,21 ± 0,01	68,65	5,49	57,48 ± 5,33	3,44
10	2290,02 ± 3,07	72,95	7,29	73,11 ± 2,89	5,81
15	3435,05 ± 4,01	54,23	8,13	121,31 ± 1,45	6,51
20	4580,02 ± 0,02	60,92	12,18	121,74 ± 2,51	4,36
30	6870,04 ± 4,51	59,57	17,87	119,17 ± 2,13	2,91

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: a atividade inicial; b rendimento de imobilização; c proteína imobilizada; d atividade hidrolítica; e atividade recuperada.

Uma alta carga enzimática imobilizada no suporte é muito desejável e atraente do ponto de vista industrial, pois permite uma elevada atividade catalítica por volume e ainda que a reação ocorra de forma mais rápida, entretanto em alguns processos a existência de limitações de acesso do substrato ao sítio catalítico pode fazer com que o uso de derivados não totalmente carregados seja uma melhor solução, justificando desta forma a escolha do derivado que imobilizou 8,13 mg/g de suporte.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Um planejamento experimental do tipo DCCR 2², com três pontos centrais para avaliação do erro puro, foi utilizado a fim de se investigar os efeitos da concentração de derivado e da temperatura durante a reação de esterificação do oleato de decila. Os níveis utilizados, com os valores codificados e reais e suas respectivas respostas para as concentrações

de esterificação estão apresentadas na Tabela 10. Todas as respostas foram analisadas estatisticamente mediante aplicação do modelo quadrático com interação das variáveis. Nas condições estudadas, os valores de esterificação variaram entre 24,75 % e 57,0 % e os pontos centrais apresentaram baixa variação, o que indicou uma boa reprodutibilidade do processo.

A maior porcentagem de esterificação, de 57 %, foi obtida para o ensaio 4, no qual foi usada uma concentração de derivado de 17 % (m/v) e a temperatura de reação de 50 °C (Tabela 10). Já a menor porcentagem de esterificação (24,75 %) foi observada para o ensaio 5 no qual foi utilizada a menor concentração de derivado (5 % m/v) de todo planejamento e uma temperatura de reação de 40 °C. Esse resultado está coerente com o esperado, pois uma menor quantidade de enzimas resulta em uma menor disponibilidade de sítios ativos para catálise da reação e, conseqüentemente, uma menor conversão é esperada para um mesmo intervalo de tempo, quando comparado a um ensaio no qual houve a disponibilização de uma maior concentração de derivado (ensaio 4).

Tabela 10 - Matriz do DCCR 2² para a esterificação do oleato de decila, utilizando a LGC imobilizada no suporte fenil-sílica. A resposta do planejamento foi a porcentagem de esterificação obtida após 1 h de reação.

Ensaio	Variáveis Independentes		Resposta		
	Conc. de Derivado (% m/v)	Temperatura (°C)	Esterificação (%)	Predito (%)	Desvio (%)
1	-1 (7)	-1 (30)	30,87	32,29	-4,60
2	+1 (17)	-1 (30)	53,02	55,49	-4,66
3	-1 (7)	+1 (50)	28,85	32,29	-11,92
4	+1 (17)	+1 (50)	57,00	55,49	2,65
5	-1,41 (5)	0 (40)	24,75	23,99	3,05
6	+1,41 (19)	0 (40)	54,81	56,71	-3,46
7	0 (12)	-1,41 (26)	49,00	47,39	3,29
8	0 (12)	+1,41 (54)	49,88	47,39	5,00
9	0 (12)	0 (40)	43,17	40,35	6,53
10	0 (12)	0 (40)	44,96	40,35	10,25
11	0 (12)	0 (40)	38,92	40,35	-3,67

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A análise estática mostrou que apenas o termo linear da concentração do derivado (x_1) e o termo quadrático da temperatura (x_2^2) foram estatisticamente significativos a 5 % de significância, ou seja, para $p < 0,05$ (Tabela 11).

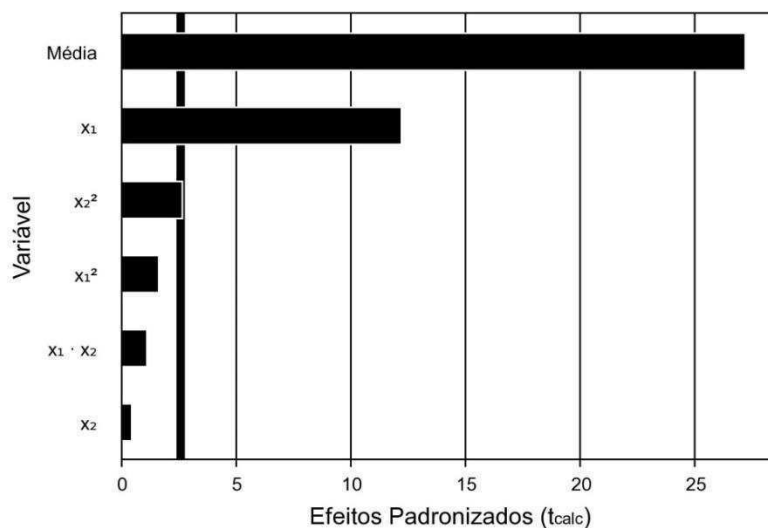
O gráfico de Pareto (Figura 7) também pode ser usado para confirmar visualmente os dados exibidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %

	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor
Média	42,35	1,56	0,0000
x_1	11,60	0,95	0,0001
x_1^2	-1,83	1,13	0,1680
x_2	0,40	0,95	0,6918
x_2^2	3,00	1,13	0,0457
x_1x_2	1,50	1,35	0,3165

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Figura 7. Gráfico de Pareto para o DCCR.



Fonte: do autor (2021).

Dessa forma, os termos não significativos foram retirados do modelo e enviados para os resíduos. Os coeficientes foram então recalculados (Tabela 12) e utilizados para gerar a equação (6).

Tabela 12. Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %

	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor
Média	40,35	1,20	0,0000
x ₁	11,60	1,01	0,0000
x ₂ ²	3,54	3,07	0,0152

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

$$\text{Esterificação (\%)} = 40,35 + 11,60 x_1 + 3,54 x_2^2 \quad (6)$$

Em que x₁ e x₂ refere-se a porcentagem de derivado e temperatura (°C), respectivamente.

Na Tabela 13 encontra-se a ANOVA calculada para os coeficientes estatisticamente significativos. Verificou-se que o F_{calc.} (70,5) foi maior que o F_{tab.} (4,46) e que o coeficiente de determinação foi muito bom (0,95). Além disso, os valores previstos possuem, em sua grande maioria, desvios abaixo de 10 % mostrando um bom ajuste do modelo gerado aos dados experimentais (ver Tabela 10). Assim, pode-se afirmar que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, permitindo a construção da superfície de resposta (Figura 8) para análise das variáveis estudadas pelo planejamento (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 13 - ANOVA para o DCCR 2², utilizando somente os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5 % de significância.

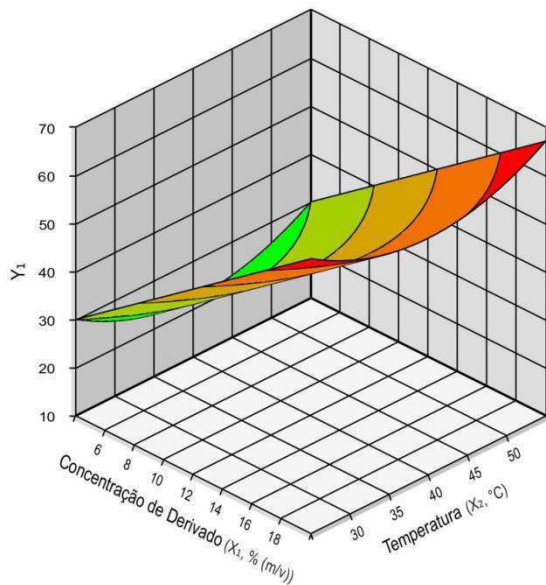
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	1154,2	2	577,1	70,5	0,00001
Resíduos	65,5	8	8,2		
Falta de ajuste	46,3				
Erro puro	19,2				
Total	1219,7	10			

$$R^2 = 0,95; F_{\text{Tab}2;8;0,05} = 4,46$$

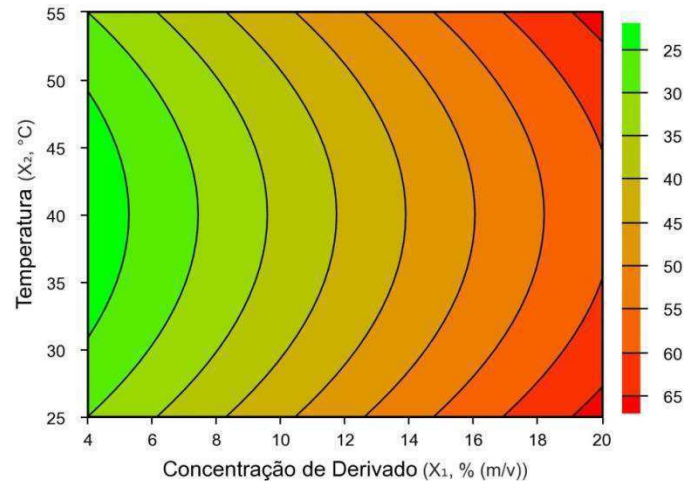
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Observou-se na Figura 8, a formação de uma região ótima em que foram obtidos os maiores valores para a porcentagem de esterificação (65%), quando uma maior concentração de derivado foi empregada 17 e 20 (%m/v), para toda a faixa de temperatura estudada em 1 h de reação.

Figura 8 - Porcentagem de esterificação em função da temperatura e concentração de biocatalizador na etapa de esterificação do oleato de decila.



(a)



(b)

Fonte: Autor (2021).

Legenda: (a) superfície de resposta.
(b) curva de contorno.

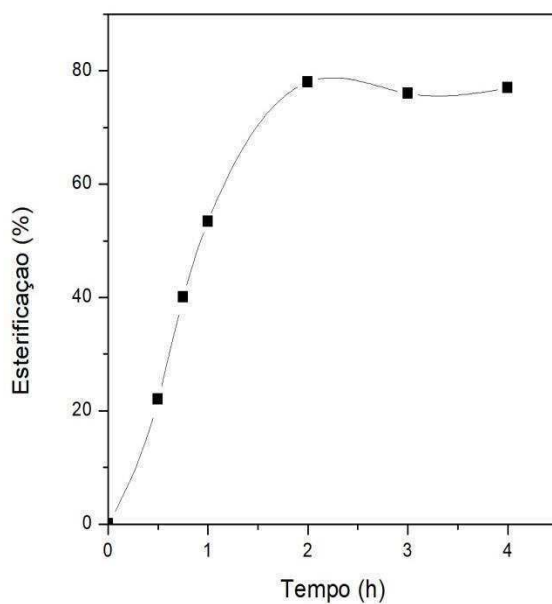
A validação do planejamento foi realizada, em triplicata, para a condição empregada no ensaio 4, no qual foi utilizado 17 (% v/m) para a concentração do derivado e a temperatura de 50 °C e 1 h de reação, sendo obtida uma porcentagem de esterificação de $56,30 \pm 2,41$ (%), demonstrando que o processo possui reprodutibilidade. Para essas mesmas condições foi realizado um ensaio com acompanhamento de tempo de reação por 4 h (Figura 9), sendo observado uma conversão de 78 % em 2 h de reação.

Esses resultados foram comparados com os resultados para a esterificação enzimática do oleato de decila descritos na literatura (Tabela 14). Chang *et al.* (2001) utilizaram extratos de lipase purificados de *Staphylococcus epidermidis* - lipase de tipo selvagem e duas lipases recombinantes expressas em *Escherichia coli* (mutantes M419A e V649I) e obtiveram após 10 h de reação uma conversão de 58,36 a 65,32 % para 50 mM de ácido oleico e 50 mM de 1-decanol. Aulakh *et al.* (2017) utilizaram suspensões de células secas de *Aspergillus* sp. RBD01 e obtiveram uma máxima conversão de 77 % em 36 h de reação. Miguez *et al.* (2018) obtiveram

87 % de conversão em oleato de decila após 3 h de reação utilizando 21 (% m/v) de biocatalisador preparado com um suporte obtido de resíduo agroindustrial e a lipase comercial *Thermomyces lanuginosus*. Rani *et al.* (2015) utilizaram a lipase Novozym 435 que obteve 96,5 % de conversão em 1 h de reação.

Embora o derivado preparado no presente estudo não tenha atingido a mesma porcentagem de conversão observada para as enzimas comerciais, ele exibiu uma maior porcentagem de conversão do oleato de decila em um tempo muito menor de reação, quando comparado com os estudos em que também foram utilizadas lipases não comerciais. A partir de 2 h de reação verificou-se que não houve um aumento da conversão para um maior tempo, indicando que provavelmente a reação tenha atingido o equilíbrio. Assim, para se aumentar a conversão seria preciso deslocar o equilíbrio, o que poderia ser conseguido mudando-se as concentrações iniciais dos reagentes ou alterando-se o solvente do meio reacional, pois é bastante conhecido que a presença de solventes orgânicos nos sistemas de reação pode mudar o equilíbrio para a síntese de éster (KUMAR *et al.*, 2016), ou ainda removendo-se a água do meio como por exemplo com a utilização de peneiras moleculares (SONG; WEI 2002).

Figura 9 - Efeito do tempo de reação na porcentagem de conversão para a síntese de oleato de decila.



Fonte: Autor (2021).

Tabela 14 - Síntese enzimática de oleato de decila por reação de esterificação.

Fonte de Lipase	de Suporte	Método de Imobilização	de Conversão - Tempo de reação	de Reutilização	Referência
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Extrato bruto de linhagem selvagem	- -	65.32% (10 h)	Não determinado	(CHANG; CHOU; SHAW, 2001)
	Extrato bruto mutante M419A ^a	- -	62.01% (10 h)	Não determinado	
	Extrato bruto mutante V649I ^a	- -	58.36% (10 h)	Não determinado	
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Lewatit VP OC 1600	Adsorção física	96.5% (1 h)	Não determinado	(RANI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aspergillus</i> sp. RBD01 ^b	Suspensão de células	-	<10% (36 h)	Não determinado	(AULAKH <i>et al.</i> , 2017)
	Biomassa seca	-	77% (36 h)	Não determinado	
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Amino-SiO ₂	Adsorção física	87% (3 h)	8 (100%)	(MIGUEZ <i>et al.</i> , 2018)
<i>Geotrichum candidum</i>	Fenil-SiO ₂	Adsorção física	78% (2 h)	6 (73,3%)	Este estudo

Fonte: Adaptado de Miguez *et al.* (2018).

Legenda: a - lipases recombinantes expressas em *Escherichia coli*; b - células inteiras.

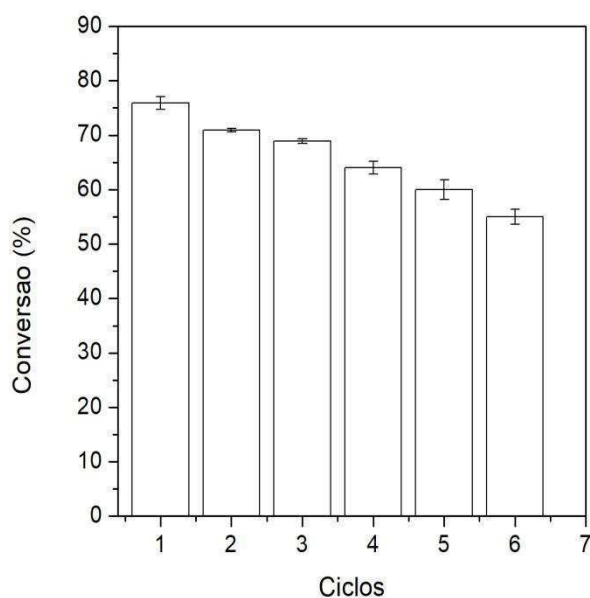
4.5 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A utilização de biocatalizadores heterogêneos permite uma melhor separação do produto final, proporcionando a reutilização do biocatalisador, resultando em uma diminuição dos gastos com a produção e com a purificação do produto tornando-o sustentável (COMAN;

PARVULESCU, 2013). Neste estudo, os ensaios de reutilização foram realizados nas condições experimentais ótimas após 6 sucessivos ciclos de reação de 2 h cada. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, o derivado manteve 73,3 % de sua atividade original após seis ciclos sucessivos. Isto pode ser explicado devido a uma boa interação das moléculas de LGC com a superfície do suporte, diminuindo a sua dessorção e auxiliando em sua estabilização. Entretanto, sabe-se que na reação de esterificação há a produção de moléculas de água que podem levar a uma dessorção da enzima imobilizada por adsorção física do suporte (VIRGEN-ORTÍZ, 2016), o que pode explicar a perda da atividade encontrada.

Miguez *et al.* (2018) relataram que a atividade inicial do derivado se manteve após 8 ciclos de reação em suas condições experimentais ótimas, porém deve-se ressaltar que neste trabalho foi utilizando uma lipase comercial (*Thermomyces lanuginosus* (LTL)/Sigma-Aldrich). Os demais estudos presentes na literatura não relataram ensaios de reutilização para a síntese do éster oleato de decila como mostrado na Tabela 14.

Figura 10 - Estabilidade operacional do biocatalisador após sucessivos ciclos de 2 h cada para a síntese de oleato de decila.



Fonte: Autor (2021).

Os testes de reutilização mostraram que o derivado reteve boa parte de sua atividade original após 6 ciclos de reação sucessivos. Estes resultados sugerem que este derivado pode

ser utilizado com sucesso na síntese enzimática do éster cosmético, contribuindo para a implementação de um processo mais sustentável e economicamente atrativo, no qual foi utilizado um suporte não comercial, preparado a partir de uma lipase produzida e um resíduo agroindustrial, de baixo custo e renovável.

5 CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação da hidrofobicidade dentre os suportes testados mostraram que o suporte de sílica de casca de arroz modificada com o grupo fenil foi o que apresentou uma maior hidrofobicidade ($52,70 \mu\text{g}$ de corante/ m^2) e também foi o suporte que apresentou uma melhor atividade do derivado ($13,69 \pm 0,02$ U/g de suporte) para os ensaios de imobilização. Assim, dentre os suportes avaliados o de fenil-sílica de casca de arroz foi escolhido para os ensaios subsequentes. O estudo do efeito do carregamento de proteína possibilitou a determinação do carregamento mais adequado para o suporte escolhido, e embora a saturação do suporte não tenha sido atingida mesmo oferecendo um carregamento de proteína de 30 mg, a atividade encontrada para o derivado se manteve praticamente constante para os carregamentos iniciais acima de 15 mg (120 U/ g) e, portanto, o derivado preparado apresentando 8,13 mg de proteína foi selecionado para a etapa de esterificação subsequente. Uma vez determinado o suporte e carregamento mais adequado, foi utilizado um planejamento experimental do tipo DCCR 2², a fim de se otimizar a reação de esterificação para produção do oleato de decila. As melhores condições encontradas para a produção do éster foram: 17 % (m/v) de derivado a 50 °C. A validação do planejamento foi realizada sob as melhores condições experimentais, durante 4 h, tendo sua máxima conversão observada em aproximadamente 2 h (78%). O derivado preparado manteve 73,3 % da sua atividade inicial após 6 consecutivos ciclos de 2 h de reação de esterificação.

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que o derivado produzido com uma lipase não comercial e um suporte proveniente de resíduo agroindustrial mostrou-se promissor para ser utilizado no âmbito industrial, contribuindo para produção de cosméticos de forma mais sustentável e com uma elevada qualidade a um custo menor do que quando utilizado derivados comerciais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade deste trabalho:

- a) Avaliar a influência dos parâmetros (i) concentração dos reagentes, (ii) solvente do meio reacional, (iii) água presente no meio.
- b) Aplicar o derivado desenvolvido em diferentes reações de esterificação.
- c) Avaliar a vida de prateleira do derivado desenvolvido.
- d) Estudo comparativo entre uma enzima comercial e a produzida, ambas imobilizadas no suporte de fenil-sílica.

REFERÊNCIAS

- ABDULMALEK, E. *et al.* Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 37–43, abr. 2012.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406, 7 ago. 2013.
- ALANDER, J. T. Chemical and Physical Properties of Emollients. **Treatment of Dry Skin Syndrome**, v. 10, n. 4, p. 399–417, out. 2020.
- AKBAS, F. *et al.* Molecular cloning and characterization of novel thermostable lipase from *Shewanella putrefaciens* and using enzymatic biodiesel production. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 04, n. 04, p. 297–300, fev. 2015.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475–6490, 8 jul. 2013.
- APRICENO, A. *et al.* A new laccase-mediator system facing the biodegradation challenge: Insight into the NSAIDs removal. **Chemosphere**, v. 215, p. 535–542, 1 jan. 2019.
- ARANA-PEÑA, S. *et al.* Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 28 fev. 2020.
- ASHLY, P. C.; JOSEPH, M. J.; MOHANAN, P. V. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1808–1813, 15 ago. 2011.
- AULAKH, S. S. *et al.* Biocatalyzed esterification of oleic acid using cell suspension and dried biomass of *Aspergillus* sp. RBD01. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 2, p. 127–130, 2017.
- AWAN, U. F. *et al.* Mineral Constituents of Culture Medium for Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* Fermentation. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 12, p. 913–915, 1 jun. 2003.
- BAILLARGEON, M. W.; BISTLINE, R. G.; SONNET, P. E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 92–96, jan. 1989.

BASHEER, S. M. *et al.* Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627–638, out. 2011.

BASTIDA, A. *et al.* A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 5 jun. 1998.

BERRIO, J. *et al.* Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.25, n. 2-4, p.130-134, 11 jul. 2007.

BERTOLINI, M. C. *et al.* Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 1–2, p. 119–125, jan. 1994.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, jan. 2019.

BHATTACHARYYA, M. S.; BANERJEE, U. C. Improvement of carbonyl reductase production of *Geotrichum candidum* for the transformation of 1-acetonaphthone to S(-)-1-(1'-naphthyl) ethanol. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1958–1963, jul. 2007.

BILAL, M. *et al.* Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530-2544, 7 set. 2018.

BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, 1 set. 2015.

BOUAZIZ, A. *et al.* Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 242–250, 2010.

BRABCOVÁ, J.; ZAREVÚCKA, M.; MACKOVÁ, M. Differences in hydrolytic abilities of two crude lipases from *Geotrichum candidum* 4013. **Yeast**, v. 27, n. 12, p. 1029–1038, dez. 2010.

BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 11, p. 1291, 1 nov. 1999.

BRADY, L. *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767–770, 1990.

BROZZOLI, V. *et al.* Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3395–3402, 1 jul. 2009.

BURKERT, J. F. DE M. *et al.* Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61–67, jan. 2005.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77–84, 2004.

CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CARRIERE, F. *et al.* The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. **Gastroenterology**, v. 119, n. 4, p. 949–960, 2000.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 169, 26 ago. 2020.

CHANG, R. C.; CHOU, S. J.; SHAW, J. F. Synthesis of fatty acid esters by recombinant *Staphylococcus epidermidis* lipases in aqueous environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2619–2622, maio 2001.

CHARTON, E.; MACRAE, A. R. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC 335426 lipases A and B in hydrolysis and ester synthesis reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 6, p. 489–493, 1 jun. 1993.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CHRISNASARI, R. *et al.* Glucose oxidase immobilization on tmah-modified bentonite. **Indones. J. Chem**, v. 15, n. 1, p. 22-28, 24 set. 2014.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 193–197, mar. 2004.

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 1 jan. 2014.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881–885, 7 ago. 2006.

COMAN, S. M.; PARVULESCU, V. I. Heterogeneous catalysis for biodiesel production. In: TRIANTAFYLIDIS, K.; LAPPAS, A.; STÖCKER, M. **The Role of Catalysis for the Sustainable Production of Bio-fuels and Bio-chemicals**. Elsevier 2013. cap. 4, p. 93-136.

CORDOVA, J. *et al.* Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 15, n. 1-4, p. 75-78, 15 set. 1998.

ĆOROVIĆ, M. *et al.* Enzymatically derived oil-based L-ascorbyl esters: Synthesis, antioxidant properties and controlled release from cosmetic formulations. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, p. 100231, 1 mar. 2020.

COSTA, S. A.; AZEVEDO, Helena S.; REIS, Rui L. Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. **Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine**. London: CRC Press; p. 109-112, 2005.

CYGLER, M. *et al.* Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Science**, v. 2, n. 3, p. 366–382, 1993.

DAOUD, F. B. O.; KADDOUR, S.; SADOON, T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 93–99, 1 jan. 2010.

DAVID, L. *et al.* The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

CASTRO, P. F. *et al.* High lipase production from *Geotrichum candidum* in reduced time using cottonseed oil: optimization, easy purification and specificity characterization. **J Chem Eng Res Updates**, v. 2016, p. 60-69, 2016.

DE SOUZA, T. C. *et al.* Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 12, p. 2253-2268, 28 jul. 2020.

DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, n. 3, p. 818-839, 5 out. 1992.

DI LUCCIO, M. *et al.* Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p. 173-180, 2004.

DUTTA, S. *et al.* Removal of mercury from its aqueous solution using charcoal-immobilized papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 888-896, 30 dez. 2009.

ELNASHAR, M. (Ed.). **Biotechnology of Biopolymers**. BoD-Books on Demand, 2012.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 996-1002, 2015.

FERREIRA, M. M. *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018.

FORESTI, M. L. *et al.* FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 6, p. 1624-1635, 1 jan. 2010.

FURLANI, I. *et al.* Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 463-473, 2020.

GAMA, R. S. *et al.* A novel functionalized SiO₂-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. **Materials Chemistry and Physics**, v. 234, p. 146-150, 2019.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 1 nov. 2011.

GARCIA, T. *et al.* Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 584-590, 1 out. 1999.

GEOR MALAR, C. *et al.* Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 158, 15 jun. 2020.

GHIACI, M. *et al.* Enzyme immobilization. Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Applied Clay Science**, v. 43, n. 3–4, p. 289–295, 1 mar. 2009.

GHODAKE, G. S. *et al.* Paper waste extracted A-cellulose fibers super-magnetized and chitosan-functionalized for covalent laccase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 420–427, 1 ago. 2018.

GILBERT, E. J. Pseudomonas lipases: Biochemical properties and molecular cloning. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 8, p. 634-645, 1 ago. 1993.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 1 abr 2020.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market Size & Share Industry Report, 2020-2027**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 16 fev. 2021.

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 475–480, 1 abr. 2013.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. **Immobilization of enzymes and cells**, v. 1, p.1-13, 2006.

GUTARRA, M. L. E. *et al.* Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 313–318, 1 mar. 2007.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 26 jan. 2009.

HARI KRISHNA, S. *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193–201, 18 maio 2001.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 26 jun. 2006.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, 2003.

HORCHANI, H. *et al.* *Staphylococcal* lipases: Biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 125– 132, 2012.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: An overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, jul. 2004.

IFTIKHAR, T.; . A. H. Effects of Nutrients on the Extracellular Lipase Production by Mutant Strain of *Rhizopus oligosporus* TUV-31. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 1, n. 1, p. 15–20, 15 dez. 2001.

JAEGER, K.-E. *et al.* Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1 set. 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAISWAL, K. S.; RATHOD, V. K. Enzymatic synthesis of cosmetic grade wax ester in solvent free system: optimization, kinetic and thermodynamic studies. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 8, p. 949, 31 ago. 2019.

JESIONOWSKI, T. Preparation of colloidal silica from sodium metasilicate solution and sulphuric acid in emulsion medium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 190, n. 1-2, p. 153-165, 2001.

JESIONOWSKI, T.; KRYSZTAFKIEWICZ, A. Preparation of the hydrophilic/hydrophobic silica particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, n. 1–3, p. 49–58, 30 jul. 2002.

JOSHI, K. A. *et al.* A disposable biosensor for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 54–58, 1 jan. 2005.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, abr. 2012.

KAUSHIK, R. *et al.* Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3–4, p. 121–126, 1 jun. 2006.

KEMMEGNE MBOUGUEN, J.; NGAMENI, E.; WALCARIUS, A. Organoclay-enzyme film electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 2, p. 145–155, 25 set. 2006.

KEMPKA, A. P. *et al.* Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119–125, 2008.

KHALED, N. *et al.* Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 3, p. 167–172, mar. 1991.

KIM, B. S.; HOU, C. T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, n. 1, p. 59–64, ago. 2006.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 3, p. 1017–1026, 1 fev. 2006.

KLOTZBACH, T. L. *et al.* Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. **Journal of Membrane Science**, v. 311, n. 1–2, p. 81–88, 20 mar. 2008.

KRAUT, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. **Annual review of biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 331–358, 1977.

KUMAR, N. *et al.* **Studies of glucose oxidase immobilized carbon nanotube-polyaniline composites**. 2009. Tese de Doutorado.

KUMAR, A., DHAR, K., KANWAR, S. S., & ARORA, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in polymer science**, v. 26, n. 9, p. 1921–1971, 2001.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **Biosystems**, v. 77, n. 1–3, p. 25–32, 1 nov. 2004.

LI, Y.; HU, J.; HAN, P. Synthesis of magnetically modified palygorskite composite for immobilization of *Candida sp.* 99-125 lipase via adsorption. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 5, p. 822–826, 1 maio 2015.

LIANG, S. *et al.* Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: an update review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 406, p. 213149, 2020.

LIMA, L. N. *et al.* Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 28 abr. 2015.

LIMA, V. M. G. *et al.* Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 105–110, 2003.

LOLI, H. *et al.* Lipases in Medicine: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1209–1216, 6 out. 2015.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus sp.* lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 687–693, 25 fev. 2004.

MAHAPATRA, P. *et al.* Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 57–63, set. 2009.

MAIA, M. M. D. *et al.* Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23–27, 1 jan. 2001.

MAKSYM, P. *et al.* Enhanced Polymerization Rate and Conductivity of Ionic Liquid-Based Epoxy Resin. **Macromolecules**, v. 50, n. 8, p. 3262–3272, 25 abr. 2017.

MALDONADO, R. R. *et al.* Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–151, abr. 2012.

MALDONADO, R. R. *et al.* Application of yeast hydrolysate in extracellular lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks, stirred tank, and airlift reactors. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 9, p. 1524–1530, 1 set. 2015.

MALDONADO, R. R. *et al.* A review on *Geotrichum* lipases: Production, purification, immobilization and applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 439–454, 2016.

MALDONADO, R. R. *et al.* Production of lipase from *Geotrichum candidum* using corn steep liquor in different bioreactors. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 12, p. 1999–2009, 16 out. 2014.

MALDONADO, R. R., MACEDO, G. A., & RODRIGUES, M. I. Lipase production using microorganisms from different agro-industrial by products. **Int J App Scien Tech**, v. 4, n. 1, jan. 2014.

MARQUES, T. A. *et al.* Production And Partial Characterization Of a Thermostable, Alkaline And Organic Solvent Tolerant Lipase From *Trichoderma atroviride* 676. **International Journal Of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 5, 2014.

MASSIMI, L. *et al.* Efficiency Evaluation of Food Waste Materials for the Removal of Metals and Metalloids from Complex Multi-Element Solutions. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 334, 26 fev. 2018.

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

MENDES, A. A. *et al.* Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 1 abr. 2012.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: Application in fruit flavor and biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 78–85, set. 2014.

MENDES, T. V. *et al.* Synthesis and characterization of a new magnetic restricted access molecularly imprinted polymer for biological sample preparation. **Materials Today Communications**, v. 24, n. 101002, feb. 2020.

MESQUITA, M. V. N. *et al.* Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. **Boletim Informativo Geum**, v.9, n.2, p. 38–50, jun. 2018.

MIGUEZ, J. P. *et al.* Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 296-308, 2018.

MILAŠINOVIĆ, N. *et al.* Synthesis of n-amyl isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly (N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels. **Chemical Engineering Journal**, v. 181–182, p. 614–623, 1 fev. 2012.

MLADENOSKA I. Isolation and purification of lipases from *Geotrichum Candidum* grown on a sunflower oil waste as a carbon source. **Chemical Engineering**, v. 42, p. 49- 54, 2014.

MOHAMAD, N. R. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Básica**. Laboratório Autolab LTDA, 2005.

MUKHTAR, H. *et al.* Optimization of Lipase Biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for Biodiesel Production Using Multiple Oils. **Chemical Engineering & Technology**, v. 39, n. 9, p. 1707–1715, 1 set. 2016.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. Biochemical properties of the alkaline lipase of *Bacillus flexus* XJU-1 and its detergent compatibility. **Biologia (Poland)**, v. 69, n. 9, p. 1108–1117, 1 ago. 2014.

NOBLE, M. E. M. *et al.* The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Letters**, v. 331, n. 1–2, p. 123–128, 27 set. 1993.

NOMURA, D. K.; CASIDA, J. E. Lipases and their inhibitors in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, n. Pt B, p. 211–222, 25 nov. 2016.

OBI, F.; UGWUISHIWU, B.; NWAKAIRE, J. Agricultural waste concept, generation, utilization and management. **Nigerian Journal of Technology**, v. 35, n. 4, p. 957, 25 set. 2016.

OLEOCHEMICAL., I. IOI Oleochemical. Technical Data Sheet MIGLYOL® DO. 2019.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5–6, p. 446–450, mar. 2000.

OTARI, S. V. *et al.* One-step hydrothermal synthesis of magnetic rice straw for effective lipase immobilization and its application in esterification reaction. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122887, 1 abr. 2020.

GROCHULSKI, P. *et al.* Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12843-12847, 1993.

PACKTER, N. Lipases — their structure, biochemistry and application. **Biochemical Education**, v. 22, n. 4, p. 216, 1 out. 1994.

PALMA, M. B. *et al.* Lipase Production by *Penicillium testricum* Using Solid Waste of Industrial Babassu Oil Production as Substrate. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p. 1137-1145.

PARK, S. *et al.* Wood mimetic hydrogel beads for enzyme immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 223–229, 22 jan. 2015.

PATEL, H. *et al.* Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101731, 1 set. 2020.

PEREIRA, M. *et al.* Utilização de carvão ativado sintetizado a partir de resíduos agroindustriais e seu estudo na adsorção da β -lactoglobulina / Utilization of activated charcoal synthesized from agroindustrial waste and its study on the adsorption of β -lactoglobulin. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, p. 60–66, 2017.

PETER, M. G. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 32, n. 4, p. 629–640, abr. 1995.

PRIYA, K.; CHADHA, A. Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3–4, p. 485–490, 3 mar. 2003.

RADZI, S. M. *et al.* High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilised lipase from *Candida antarctica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 291–298, 15 dez. 2005.

RAGHAVENDRA, T.; SAYANIA, D.; MADAMWAR, D. Synthesis of the “green apple ester” ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 1–2, p. 31–38, abr. 2010.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of Medium Components by Plackett-Burman Statistical Design for Lipase Production by *Candida rugosa* and Kinetic Modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 436–444, 1 mar. 2008.

RAMOS, E. Z. *et al.* Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, n. 118, p. 43–51, 30 maio 2015.

RANI, K. P. *et al.* Kinetics of enzymatic esterification of oleic acid and decanol for wax ester and evaluation of its physico-chemical properties. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 55, p. 12-16, 2015.

RAY, S. Applications of extracellular microbial lipases—a review. **Int J Res Biotechnol Biochem**, v. 5, n. 1, p. 6–12, 2015.

REIS, C. L. B. *et al.* Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 768-783, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3. ed. Campinas: Cárita Editora, 2014.

RODRIGUEZ, J. A. *et al.* Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264–2269, 1 nov. 2006.

ŠABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Ž. Sinteza estra fruktoze i masnih kiselina katalizovane lipazama u prisustvu natkričnog ugljen dioksida. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 12, n. 3, p. 147–151, 2006.

SACRISTÁN, N. *et al.* Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 260–266, maio 2012.

SAFARIK, I. *et al.* Magnetically modified agricultural and food waste: preparation and application. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2538-2552, 2018.

SANTOS, K. C. *et al.* Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, 2013.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007a.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1583-1587, 2007b.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 8 jul. 2013.

SHEN, Q. *et al.* Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1565-1571, 1 ago. 2011.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SINGH, V. *et al.* Polysaccharide-silica hybrids: Design and applications. **Polymer Reviews**, v. 56, n. 1, p. 113-136, 2016.

SONG, Q. X.; WEI, D. Z. Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 4-6, p. 261-266, 23 out. 2002.

SONNET, P. E.; MCNEILL, G. P.; JUN, W. Lipase of *Geotrichum candidum* immobilized on silica gel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 12, p. 1421-1423, dez. 1994.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F. N. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 323-328, 2001.

SUBHASH, Y. *et al.* *Vogesella alkaliphila* sp. nov., isolated from an alkaline soil, and emended description of the genus *Vogesella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART6, p. 2338-2343, 1 jun. 2013.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 223-238, 2000.

TAN, T.; CHEN, B. Q.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, n. 1-2, p. 41-45, 2006.

THUM, O.; OXENBØLL, K. M. Biocatalysis-A sustainable method for the production of emollient esters. **SOFW JOURNAL**, v. 134, n. 1/2, p. 44, 2008.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Esters Market – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast. 2020.

TRUSEK-HOLOWNIA, A.; NOWORYTA, A. An integrated process: Ester synthesis in an enzymatic membrane reactor and water sorption. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 1, p. 47–56, 31 maio 2007.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444-450, 2003.

VILLENEUVE, P. *et al.* Synthesis of pyroglutamic acid fatty esters through lipase-catalyzed esterification with medium chains alcohols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 79–84, 16 jul. 2003.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. *et al.* Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 30–35, 1 jan. 2017.

WON, K. *et al.* Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149–2154, maio 2005.

YANG, Z.; SI, S.; ZHANG, C. Study on the activity and stability of urease immobilized onto nanoporous alumina membranes. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 111, n. 1–3, p. 359–366, 15 abr. 2008.

ZAREVÚCKA, M. *et al.* Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 481–486, 3 out. 2005.

ZDARTA, J. *et al.* A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018.

ZHONG, L. *et al.* Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

ZHOU, C. H.; KEELING, J. Fundamental and applied research on clay minerals: From climate and environment to nanotechnology. **Applied Clay Science**, v. 74, p. 3–9, 1 abr. 2013.