

**Universidade Federal de São Carlos - UFSCar**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - PPGBiotec**

**Erick de Abreu Silveira**

**Produção, caracterização e imobilização de lipases e sua aplicação na síntese  
de ésteres alquílicos de ácidos graxos**

**São Carlos**  
**2018**

**Erick de Abreu Silveira**

**Produção, caracterização e imobilização de lipases e sua aplicação na síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.**

**Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP).**

**Coorientadores: Prof. Paulo Waldir Tardioli (DEQ/UFSCar) e Dr. José Manuel Guisán (ICP-CSIC, Madri, Espanha).**

**São Carlos**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Erick de Abreu Silveira, realizada em 20/02/2018:

---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

---

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior  
UFSCar

---

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli  
UFSCar

---

Prof. Dr. Willian Kopp  
Kopp Technologies

## Dedicatória

*Aos meus pais, Vaner e Jaqueline*

*Aos meus irmãos, Lucas e Leticia*

*E à minha noiva Anelise*

*Obrigado pela dedicação, pelo respeito, pelos ensinamentos e companheirismo.*

*Aprendi com vocês a ser dedicado e determinado.*

*Obrigado pela confiança de sempre.*

*Nunca conseguiria atingir mais este objetivo sem o apoio de vocês.*

*A todos vocês dedico!*

*“Quando o jogo e a estratégia mudam rapidamente, não basta se contentar com o possível. É preciso fazer o seu melhor”*

(Mario Sergio Cortella, filósofo e escritor)

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela força e perseverança para alcançar minhas metas.

À Dra. Cristiane Sanchez Farinas pela orientação e pela oportunidade de desenvolvimento profissional e também pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli pela co-orientação deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. Nº 2016/10636-8, 2015/10530-2 e 2013/20826-0, pelo apoio financeiro concedido.

Aos Programas de Pós-Graduação da UFSCar, Biotecnologia (PPG-Biotec) e Engenharia Química (PPG-EQ), e à Embrapa Instrumentação São Carlos pelo apoio institucional e formação profissional.

A todo o pessoal do Laboratório de Agroenergia (Embrapa), do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e analistas da Embrapa Instrumentação que fizeram parte também desta conquista.

Ao Dr. José Manuel Guisan Seijas pelos ensinamentos, pelo grande exemplo de pesquisador que é e pela incrível oportunidade de estudos proporcionada a mim no Instituto de Catálisis y Petrolequímica de Madrid, Espanha.

À minha noiva Anelise Moreti Cabral pela paciência, pela compreensão, por todo amor e pelo apoio que recebi. Sempre dizendo palavras de incentivo que foram essenciais para que eu chegasse à conclusão de mais esta etapa da minha vida acadêmica.

À toda minha família por sempre acreditar em mim e me dar todo o suporte do qual eu precisava.

A todos que contribuíram para esta conquista!

## RESUMO

O uso de resíduos do processamento industrial de óleo de palma como fonte de carbono e indutor para produção de lipase microbiana pode ser uma forma atrativa de agregar valor a esses resíduos e contribuir para reduzir os custos de sua produção. Além disso, a imobilização dessas enzimas em suportes sólidos é uma forma de melhorar sua estabilidade operacional e facilitar a sua recuperação e reutilização no processo. Adicionalmente, as características do suporte e a técnica de imobilização empregada podem modular as propriedades catalíticas das lipases, alterando em alguns casos suas régio- e/ou estereoespecificidades. Neste contexto, este trabalho teve dois objetivos centrais, a saber: (i) investigar a viabilidade do uso de resíduos industriais de óleo de palma como matéria-prima para a produção de lipase em diferentes sistemas de cultivo; (ii) avaliar o efeito do suporte de imobilização e de técnicas de modificação pós-imobilização sobre a atividade, estabilidade e especificidade da lipase imobilizada. Quanto à produção de lipases, após etapa preliminar de triagem de 18 fungos da coleção da Embrapa, selecionou-se a linhagem de *Aspergillus niger* C para se avaliar a produção de lipase por fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FSm). As atividades lipolíticas alcançadas por FES e FSm de *A. niger* C foram de 15,41 e 10,46 UI/mL, respectivamente. A lipase bruta produzida por *A. niger* C por FES apresentou atividade lipolítica máxima em pH entre 4,0 e 6,5 e em temperatura entre 37 e 55°C. Essa enzima apresentou boa estabilidade a 60°C (meia-vida em torno de 12 h) e maior especificidade na hidrólise substratos de cadeia carbônica longa, destacando-se óleo de palma e girassol. Quanto à etapa de imobilização, primeiramente avaliou-se a imobilização de uma lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em diferentes suportes comerciais hidrofóbicos e modificação pós-imobilização (glicosilação, hidroxilação e PEGuilação) a fim de se verificar o efeito do suporte e da técnica de modificação pós-imobilização sobre a atividade, estabilidade e especificada da lipase. A imobilização de LTL em Purolite C18 (suporte contendo grupos octadecil) em diferentes condições experimentais permitiu a preparação de derivados imobilizados com diferentes regioespecificidades e taxas de reação. A imobilização a pH 8,5 e 30°C na presença de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) produziu um derivado com regioespecificidade *sn*-1,3 perfeita. Por outro lado, a imobilização em pH 5,0 e 4°C na ausência de CTAB produziu um derivado não específico, catalisando a etanolise de grupos acil do óleo de girassol rico em ácido oleico das posições *sn*-1 e *sn*-3 de forma muito rápida e também continuamente da posição *sn*-2. Após a modificação química da LTL adsorvida em Purolite C18 (Purolite-LTL) com PEG, o derivado modificado apresentou alta estabilidade em sistema livre de solvente orgânico (meia-vida de 6 dias a 40°C) e em hexano (100% de atividade após 20 dias a 40°C). Posteriormente, avaliou-se a imobilização da lipase de *A. niger* C parcialmente purificada nos suportes Purolite C18 e octil-silica (silica modificada com octiltriétoxissilano). Os rendimentos de imobilização foram baixos (28 a 69%, em termos de atividade), comparados aos obtidos com a

imobilização de LTL nos mesmos suportes (aproximadamente 100%). Entretanto, o derivado produzido pela imobilização da lipase de *A. niger* C em Purolite C18 (Purolite-LAN) apresentou desempenho similar ao derivado Purolite-LTL na esterificação de ácido oleico com *n*-octanol, atingindo conversões de ácido oleico de aproximadamente 80% após 24 h de reação. Destaca-se, portanto, a contribuição deste trabalho em um contexto econômico-ambiental, pelo aproveitamento de um resíduo agroindustrial do processamento do óleo de dendê como substrato para a produção de uma enzima de grande interesse econômico em diferentes setores industriais e pela obtenção de um biocatalisador imobilizado competitivo com uma lipase comercial em aplicações importantes de base biotecnológica.

**Palavras-chave:** Lipase. Resíduos agroindustriais. Resíduos de óleo de palma. Biorrefinaria. Fermentação submersa. Fermentação de estado sólido. *Aspergillus niger*. Estabilização de derivados de lipase. Modulação da atividade lipolítica.

## ABSTRACT

The use of industrial palm oil processing residues as a source of carbon and inducer for microbial lipase production can be an attractive way to add value to these residues and help reduce the costs of their production. In addition, the immobilization of these enzymes on solid supports is a way of improving their operational stability and facilitating their recovery and reuse in the process. The characteristics of the carrier and the immobilization technique employed can modulate the catalytic properties of lipases, in some cases altering their regio- and/or stereospecificities. In this context, this work had two main objectives: (i) to investigate the viability of the use of industrial palm oil residues as raw material for the production of lipase in different culture systems; (ii) to evaluate the effect of immobilization support and post-immobilization modification techniques on the activity, stability and specificity of immobilized lipase. Regarding lipase production, after the preliminary screening of 18 fungi from the Embrapa collection, the *Aspergillus niger* C strain was selected to evaluate lipase production by solid state (SSF) and submerged (SF) fermentation. The lipolytic activities achieved by SSF and SF of *A. niger* C were 15.41 and 10.46 IU/mL, respectively. The lipase produced by *A. niger* C by SSF showed maximum lipolytic activity at pH between 4.0 and 6.5 and at temperature between 37 and 55°C. This enzyme presented good stability at 60°C (half-life around 12 h) and greater specificity towards long carbon chain substrates, especially palm and sunflower oils. As for the immobilization step, the immobilization of a commercial lipase of *Thermomyces lanuginosus* (LTL) on different hydrophobic commercial supports and post-immobilization modification (glycosylation, hydroxylation and PEGylation) was first evaluated in order to verify the effect of the support and the post-immobilization modification technique on lipase activity, stability and specificity. Immobilization of LTL in Purolite C18 (support containing octadecyl groups) under different experimental conditions allowed the preparation of immobilized derivatives with different regiospecificities and reaction rates. Immobilization at pH 8.5 and 30°C in the presence of CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) produced a derivative with perfect sn-1.3 regiospecificity. On the other hand, immobilization at pH 5.0 and 4°C in the absence of CTAB produced a nonspecific derivative which catalyzed the ethanolysis of acyl groups from the sunflower oil at sn-1 and sn-3 positions very quickly as well as at sn-2 position continuously. After the chemical modification of LTL adsorbed on Purolite C18 (Purolite-LTL) with PEG, the modified derivative showed high stability in an organic solvent free system (half-life of 6 days at 40°C) and in hexane (100% activity after 20 days at 40°C). Subsequently, the immobilization of partially purified *A. niger* C lipase was evaluated on the supports Purolite C18 and octyl-silica (octyltriethoxysilane-modified silica). Immobilization yields were low (28-69%, in terms of activity), compared to those obtained with LTL immobilized on the same supports (approximately 100%). However, the derivative produced by the immobilization of *A. niger* C lipase on Purolite C18 (Purolite-LAN) showed similar performance to the Purolite-LTL derivative in the esterification of oleic

acid with n-octanol, achieving oleic acid conversions of approximately 80% after 24 h of reaction. Therefore, this work stands out in an economic-environmental context, by the use of an agroindustrial residue of the processing of palm oil as a substrate for the production of an enzyme of great economic interest in different industrial sectors and by obtaining a competitive biocatalyst with a commercial lipase in important biotechnological applications.

**Keywords:** Lipase. Agro-industrial wastes. Palm oil residues. Biorefinery. Submerged fermentation. Solid-state fermentation. *Aspergillus niger*. Stabilization of lipase derivatives. Lipase derivatives. Lipase activity modulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura das formas aberta e fechada da LTL. A estrutura 3D foi obtida do Protein Data Bank (PDB) utilizando o Pymol vs. 0,99. ....	23
Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas.....	28
Figura 3 - Aldeído-dextrano como um arcaouço para criar uma camada densa de PEG em torno da superfície enzimática. ....	32
Figura 4 – Plaqueamento em tributirina de fungos filamentosos da coleção Embrapa para seleção de microrganismos potencialmente produtores de lipases. Fotos tiradas após 96 h de plaqueamento.....	52
Figura 5 – Plaqueamento com óleo de oliva como substrato e Rodamina B. Fotos tiradas após 96 h de plaqueamento da linhagem <i>Trichoderma harzianum</i> .....	54
Figura 6 – Gráfico das atividades lipolíticas quantificadas pelo método do pNPP durante 120 h de cultivo em FES a 30°C contendo farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor. ....	56
Figura 7 – (A) Extratos escuros da linhagem <i>A. niger C</i> ; (B) Extratos mais claros da linhagem P50B2.....	57
Figura 8 – Gráfico das atividades lipolíticas após 72 h de cultivo em FES a 30°C contendo farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor das 8 linhagens selecionadas na etapa de triagem.....	57
Figura 9 – Gráfico das atividades volumétricas de lipases da linhagem <i>A. niger C</i> em cultivos a 30°C (FSm e FES) contendo os resíduos agroindustriais fibra e borra alcalina do processamento do dendê.....	61
Figura 10 – Gráfico das atividades específicas de lipases da linhagem <i>A. niger C</i> em cultivos a 30°C (FSm e FES) contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.....	62
Figura 11 – Gráfico das atividades volumétricas de lipases das linhagens <i>T. harzianum</i> e P18E2 em cultivos por FES a 30°C contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.....	63
Figura 12 – Gráfico das atividades específicas de lipases das linhagens <i>T. harzianum</i> e P18E2 em cultivos por FES a 30°C contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.....	64
Figura 13 – Ensaio fermentativo evidenciando possíveis indutores/inibidores da atividade lipolítica em FSm na presença e/ou ausência de 10 g/L de glicose. ....	65

Figura 14 – Superfície de resposta mostrando o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato bruto produzido por <i>A. niger</i> C cultivado em FES. ....	68
Figura 15 - Termoestabilidade da lipase presente nos extratos produzidos por <i>A. niger</i> C utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma após 72h de FES. ....	70
Figura 16 - Especificidade da lipase de <i>A. niger</i> frente a diferentes substratos oleosos emulsificados. ....	71
Figura 17 – Diferentes indutores na produção de lipases por <i>A. niger</i> C através de FES e utilização de diferentes substratos oleosos emulsificados na determinação da atividade hidrolítica. ....	72
Figura 18 – Fotos dos derivados imobilizados de diferentes lipases no suporte Purolite ECR8806F. A e B: Derivado com a enzima comercial lipolase (lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , Novozyme). C e D: Derivado com a enzima do extrato bruto da FES ( <i>A. niger</i> C) após 72 h de cultivo. ....	74
Figura 19 - Derivado obtido com ensaio de imobilização da lipase de <i>A. niger</i> C feito antes da precipitação (preto) e depois da precipitação/resuspensão do extrato (mais claro), evidenciando a remoção parcial dos contaminantes presentes no extrato. ...	75
Figura 20 - Perfil da quantidade de proteínas totais nos sobrenadantes das suspensões de imobilização da lipase de <i>A. niger</i> em Purolite e as atividades específicas no sobrenadante no início (A) e após 24 h de imobilização (B) para o extrato resuspendido.....	78
Figura 21 - Perfil da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização da LTL em Purolite e em Octil-Sílica em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e a temperatura ambiente.....	79
Figura 22 – Conversão de ácido oleico , a 37°C e 200 rpm, na reação de esterificação de ácido oleico e n-octanol (razão molar 1:1) em heptano catalisada por derivados de lipases de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL) e <i>Aspergillus niger</i> C (LAN). Carga enzimática no reator de 20 Uazeite. ....	80
Figura 23 – Perfil de inativação térmica dos derivados de LTL a (A) 60°C e (B) 70°C em pH 7.0. ....	83
Figura 24 – Atividade de etanólise (síntese de oleato de etila) a 40°C utilizando 2%(p/v) de diferentes derivados imobilizados de LTL preparados por adsorção direta da enzima comercial aos suportes. Etanólise em sistema <i>solvent-free</i> (A) e na presença de hexano (B). ....	87
Figura 25 – Atividade de etanólise (síntese de oleato de etila) a 40°C utilizando 2%(p/v) de diferentes derivados imobilizados de LTL preparados por adsorção direta da enzima comercial ao suporte hidrofóbico, seguido de modificação adicional	

(PEGuilação). 1- Purolite C18-LTL (derivado padrão); 2- Purolite C18-LTL revestido; Etanólise em sistema *solvent-free* (A) e na presença de hexano (B). ..... 91

Figura 26 – Inativação dos derivados de LTL imobilizada por adsorção em suportes hidrofóbicos e incubados em hexano a 40°C. .... 93

Figura 27 – Inativação de Purolite C18-LTL (derivado padrão) comparada a inativação de Purolite C18-LTL revestido a 40°C em (A) óleo de girassol (alto oleico) e em (B) hexano). .... 94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos suportes utilizados neste estudo. ....	37
Tabela 2 – Variáveis e níveis do DCCR para analisar a atividade lipolítica em FES. ....	41
Tabela 3 – Cálculo dos índices enzimáticos de fungos filamentosos da coleção da Embrapa .....	53
Tabela 4 – Diferença de padrão detectável de atividade lipolítica de fungos filamentosos da coleção Embrapa na presença de substratos com tamanhos de cadeias carbônicas diferentes: Tributirina (C4) e óleo de oliva (majoritariamente C18) na presença do corante rodamina B. ....	55
Tabela 5 – Dados da literatura para produção de lipases por diferentes fungos e condições de cultivos para FES. ....	58
Tabela 6 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental estatístico para atividade de lipase dos extratos produzidos em FES por <i>A. niger</i> C utilizando os resíduos da indústria de óleo de dendê. ....	67
Tabela 7 - Valores de coeficientes e análise estatística da atividade da lipase nos extratos produzidos por <i>A. niger</i> cultivados sob FES utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma. ....	67
Tabela 8 – Purificação parcial da lipase presente no extrato bruto da FES de <i>Aspergillus niger</i> C após 72 h de cultivo através da precipitação com acetona à frio. ....	76
Tabela 9 - Resultado das imobilizações de LTL e LAN nos diferentes suportes após 24h. Carga oferecida igual a 10 mg de proteína / g de suporte. ....	77
Tabela 10 – Influencia de diferentes cátions na atividade da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL), usando p-NPB como substrato (25°C, pH 7,0).....	82
Tabela 11 - Atividade catalítica e regioseletividade da LTL imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos em condições experimentais idênticas. ....	88
Tabela 12 - Atividade catalítica e regioseletividade da LTL imobilizada em Purolite C18 sob diferentes condições experimentais. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i>
OS	Octil-Sílica
ECR8806F	Suporte hidrofóbico Purolite C18 (Octadecil)
ECR1030M	Suporte hidrofóbico Purolite DVB (Divinilbenzeno)
Sepabeads C18	Suporte hidrofóbico (grupo funcional: Octadecil)
Lewatit DVB	Suporte hidrofóbico Purolite DVB (Divinilbenzeno)
p-NPB	p-Nitrofenilbutirato
p-NPP	p-Nitrofenilpalmitato
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
PEI	Polietilenamina
PEG	Polietilenoglicol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
U	Unidade enzimática
v/v	Volume/Volume
m/v	Massa/Volume

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	20
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3.1. LIPASES .....	21
3.1.2. Lipases de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL) .....	22
3.1.3. Lipases de <i>Aspergillus niger</i> (LAN) .....	23
3.2. TIPOS DE CULTIVO E MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES .....	24
3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	27
3.3.2. Imobilização de lipases .....	29
3.4. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE ENZIMAS .....	30
3.5. APLICAÇÃO DE LIPASES NA OBTENÇÃO DE DIFERENTES BIOPRODUTOS .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1. Materiais .....	36
4.1.1. Enzimas .....	36
4.1.2. Suportes .....	36
4.1.3. Reagentes .....	38
4.2. Triagem de fungos produtores de lipases .....	38
4.3. Estratégias de cultivo dos microrganismos .....	39
4.3.1. Produção enzimática em fermentação em estado sólido (FES) .....	39
4.3.2. Pré-cultivo para fermentação combinada (FC) .....	39
4.3.3. Pré-cultivo para fermentação submersa (FSm) .....	39
4.3.4. Produção Enzimática em FC e FSm .....	40
4.4. Influência do pH e da temperatura na atividade da lipase livre .....	40

4.5 Especificidade frente a diferentes substratos .....	41
4.6 Imobilização das lipases comerciais e do extrato bruto da FES .....	41
4.7 Inativação térmica das lipases comerciais e do extrato bruto livres e dos diferentes derivados imobilizados.....	43
4.7.1 Estabilidade térmica em meio aquoso .....	43
4.7.2 Estabilidade térmica em meio oleoso.....	43
4.7.3 Inativação térmica em solvente orgânico (hexano).....	44
4.8 Preparo do polialdeído dextrano.....	44
4.9 Modificação da superfície de lipases imobilizadas com Polietilenamina (PEI) .....	44
4.10 Aminoação química da superfície enzimática .....	45
4.11 Adsorção de polímeros na superfície das lipases imobilizadas.....	45
4.11.1 Glicosilação.....	45
4.11.2 Hidroxilação.....	45
4.11.3 PEGuilação.....	46
4.12 Secagem dos derivados .....	46
4.13 Dosagem de proteínas.....	46
4.14 Determinação da atividade de hidrólise.....	47
4.14.1 Hidrólise do Azeite de Oliva Emulsificado .....	47
4.14.2 Hidrólise do p-Nitrofenil-palmitato (pNPP) e p-Nitrofenil-butirato (pNPB) .....	48
4.15 Síntese de oleato de octila .....	48
4.16 Etanolise de óleo de girassol (rico em ácido oleico) na presença de hexano .....	49
4.17 Etanolise de óleo de girassol (rico em ácido oleico) em sistema livre de solvente.....	49
4.18 HPLC-ELSD .....	50
4.19 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	50
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1 Triagem de fungos produtores de lipases .....	51
5.2 Cultivo dos microrganismos .....	55
5.3 Caracterização bioquímica da lipase de <i>A. niger</i> C livre do extrato bruto da FES .....	65

5.4 Inativação térmica em meio aquoso da lipase livre de <i>A. niger</i> C do extrato bruto da FES.....	68
5.5 Especificidade da lipase livre de <i>A. niger</i> C no extrato bruto da FES frente a diferentes substratos oleosos .....	70
5.6 Imobilização das lipases de <i>A. niger</i> C (extrato bruto da FES) e de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (preparação líquida comercial).....	72
5.7 Inativação térmica em meio aquoso para derivados de lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL) imobilizada em Octyl-Sepharose na presença de diferentes cátions.....	81
5.8 Diferentes estratégias para a modulação da atividade e da regioseletividade da lipase comercial LTL .....	84
5.8.1 Características dos diferentes suportes.....	84
5.8.2 Etanólise do óleo de girassol rico em ácido oleico em hexano e em sistema solvent-free..	85
5.8.3 Atividade dos derivados revestidos por polímeros hidrofílicos .....	90
5.8.4 Estabilidade de diferentes derivados de LTL em hexano .....	92
6. CONCLUSÕES .....	95
7. TRABALHOS FUTUROS .....	97
REFERÊNCIAS .....	98

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria tem um interesse crescente no uso de enzimas no sentido de que auxiliam no desenvolvimento de um processo mais ambientalmente amigável, sendo altamente eficientes atuando como biocatalisadores específicos (MINTEN et al., 2014). As enzimas são capazes de catalisar uma ampla gama de transformações químicas com alta estereoseletividade, regioseletividade e quimioseletividade, produzindo quase exclusivamente um único produto principal, sem subprodutos indesejados (MATEO et al., 2007; MINTEN et al., 2014; MORENO-PEREZ et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017). Ademais, a comunidade científica busca desenvolver novos processos de interesse industrial que utilizem matéria-prima renovável, que reduzam o consumo energético e que tenham menor impacto ambiental e, neste contexto, destacam-se os processos biotecnológicos (TRICHES et al., 2008; COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; VESCOVI, 2012).

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C 3.1.1.3), enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, destacam-se dentre as enzimas mais investigadas e com vasto potencial de aplicação industrial. Diante da versatilidade das reações catalisadas pelas lipases, a aplicação industrial destas enzimas estende-se a vários setores (MORENO-PEREZ et al., 2013; MORENO-PEREZ et al., 2014; VESCOVI et al., 2017; ARUMUGAM et al., 2018). Reações catalisadas por lipases podem ser utilizadas industrialmente para vários propósitos, incluindo a hidrólise de óleos e gorduras, síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes de cosméticos ou surfactantes, produção de intermediários para síntese orgânica, entre outros (BASTIDA et al., 1998; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2001; PALOMO et al., 2002; COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; VESCOVI et al., 2017).

No entanto, a utilização de enzimas como catalisadores apresenta algumas limitações, tais como instabilidade das suas estruturas quando isoladas de seu ambiente natural e dificuldade de sua recuperação no final do processo, devido sua baixa concentração no meio reacional. Várias metodologias têm sido propostas para superar essas limitações, sendo que uma das mais bem sucedidas é a imobilização enzimática (KRAJEWSKA, 2004; ADLERCREUTZ, 2013; KOPP et al., 2015; LIMA et al., 2015; VESCOVI et al., 2016). Tal tecnologia de imobilização de enzimas envolve

basicamente a escolha de um suporte e do método de imobilização a esse suporte que resulte num preparado imobilizado ativo e estável. A utilização de enzimas imobilizadas permite o uso de diferentes configurações de reatores, fácil recuperação e reuso, redução do volume reacional, etc. (KRAJEWSKA, 2004; MATEO et al., 2007; ADLERCREUTZ, 2013; CUBIDES-ROMAN et al., 2017). Dispõe-se, atualmente, de várias técnicas de imobilização de enzimas, assim como de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (BALCAO et al., 1996; MATEO et al., 2007; ADLERCREUTZ, 2013; BEZBRADICA et al., 2014; TACIAS-PASCACIO et al., 2016), o que permite a preparação de um biocatalisador com propriedades físico-químicas adequadas para uma aplicação de interesse.

Ademais, como em qualquer aplicação que exige grandes quantidades de enzima, a produção de lipases depende da redução do custo para se tornar economicamente viável e a fermentação em estado sólido (FES) representa uma interessante alternativa para a produção de enzimas industriais com menores custos (HOELKER et al., 2004; GUTARRA et al., 2007; FARINAS, 2015; SILVEIRA et al., 2016), com a vantagem de utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultura. Porém, a maioria da produção industrial em larga escala de enzimas usam a tecnologia de fermentação submersa (FSm) devido a maior facilidade do monitoramento e controle do processo (SINGHANIA et al., 2010).

Devido à sua grande importância, lipases permanecem sendo intenso objeto de estudo (BORNSCHEUER, 2000) e o desenvolvimento de tecnologias que utilizam as lipases para a síntese de novos compostos está se expandindo rapidamente (ANDUALEMA e GESSESSE, 2012; MALDONADO et al., 2016). A aplicação dessas enzimas na indústria de óleos e gorduras é recente, fornecendo diversas soluções tanto para os problemas industriais quanto se tornando a chave para modificação dos referidos óleos e gorduras a fim de produzir novos compostos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; ANDUALEMA e GESSESSE, 2012; SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012). Lipases podem catalisar reações sob condições brandas, além de poderem ser usadas para obter produtos de alto valor agregado para alimentos e outros usos industriais com custos de produção competitivos (ANDUALEMA e GESSESSE, 2012). As aplicações dessas enzimas incluem ainda a produção de biopolímeros, biocombustíveis (biodiesel), intermediários enantiomericamente puros para uso na indústria farmacêutica, agroquímicos, óleos modificados, flavorizantes, dentre outros

(HAKI e RAKSHIT, 2003; MORENO-PEREZ et al., 2014; MALDONADO et al., 2016; MORENO-PEREZ et al., 2017).

O dendê (ou palma) é uma oleaginosa com grande potencial de aplicação na indústria de biocombustíveis, devido à alta produtividade de óleo por hectare: um hectare com palma rende entre 4 a 6 toneladas de óleo por ano, enquanto a soja rende cerca de quinhentos quilos, e a mamona, apenas setecentos quilos, o que representa mais do que as outras oleaginosas utilizadas para o mesmo fim (CARVALHO, 2015). As propriedades de vários ésteres de ácido graxo que compõem o biodiesel determinam as propriedades deste biocombustível. Por sua vez, as propriedades destes ésteres são determinadas pelas características estruturais dos ácidos graxos e das porções de álcool que os compõem (KNOTHE, 2005). O óleo de dendê apresenta proporções similares de ácidos graxos saturados (43,7% de ácido palmítico, C16:0) e monoinsaturados (40,2% de ácido oleico, C18:1) (TAN et al., 2009). Assim, o biodiesel produzido a partir do óleo de dendê apresenta elevada estabilidade quanto a oxidação, que é considerada um problema frequente para os biocombustíveis produzidos a partir de ácidos graxos com alto conteúdo de ácido linoleico (C18:2) (SALIS et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo principal a produção de lipases a partir de fungos filamentosos, selecionados após triagem de microrganismos potencialmente produtores isolados da região amazônica (DELABONA et al., 2012) e armazenados na Embrapa Instrumentação, além de linhagens de *Aspergillus niger* cedidas pela Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ. Após seleção dos fungos potencialmente produtores, avaliou-se a produção de lipases por diferentes bioprocessos (fermentação em estado sólido, fermentação submersa e fermentação combinada) em meios contendo resíduos agroindustriais do processamento do óleo de palma (dendê). Após a caracterização bioquímica da lipase produzida, avaliou-se a sua imobilização em matrizes sólidas e sua aplicação na síntese de ésteres de ácidos graxos.

O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Instrumentação, Laboratório de Agroenergia, sob orientação da Dra. Cristiane Sanchez Farinas, responsável pelas pesquisas acerca da produção de tais biocatalisadores, em colaboração com Departamento de Engenharia Química da UFSCar sob co-orientação do Dr. Paulo Waldir Tardioli, responsável pelos estudos sobre imobilização de biocatalisadores e suas aplicações na obtenção de bioprodutos. Ademais, foi realizado período

sanduíche no laboratório de engenharia enzimática do “Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid”, sob orientação do Dr. José Manuel Guisan Seijas, com objetivo de aprendizagem em técnicas de modificações pós-imobilização, utilizando lipases microbianas comerciais, para posterior aplicação na lipase produzida neste trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Produção de lipases a partir de fungos filamentosos utilizando resíduos agroindustriais do processamento de óleo de palma (dendê) e sua imobilização em suportes sólidos hidrofóbicos para aplicação em biotransformações.

### 2.2 Objetivos específicos

- **Triagem:** selecionar os melhores fungos produtores de lipases através de triagem com diferentes meios de cultivo diferenciais e confirmação da triagem em placas através de fermentação em estado sólido com substrato e indutores padrões (farelo de trigo e óleo de oliva).
- **Produção de lipases por diferentes bioprocessos:** realizar o cultivo do fungo selecionado na etapa de triagem a fim de produzir lipases em Fermentação em Estado Sólido (FES), Fermentação Submersa (FSm) e Fermentação Combinada (FC) e comparar a produção de lipases desses bioprocessos, além de buscar um melhor destino e aproveitamento de resíduos agroindustriais do processamento do dendê (torta e borra).
- **Imobilização de lipases:** imobilizar lipases comerciais e do extrato bruto da FES em suportes hidrofóbicos e avaliar o efeito de modificações químicas pós-imobilização na modulação de atividade/seletividade e estabilidade operacional do biocatalisador.
- **Caracterização bioquímica:** Caracterizar as lipases livres e imobilizadas quanto à temperatura e pH de máxima atividade catalítica e quanto à estabilidade térmica e operacional.
- **Aplicação biotecnológica:** utilizar as lipases imobilizadas em biotransformações em meio orgânico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIPASES

Entre as enzimas de interesse industrial, as lipases (triacilglicerol-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas altamente seletivas (enantio e regioseletivas) que catalisam a hidrólise de uma gama de ésteres, mas preferencialmente aqueles insolúveis em água, tais como, triglicerídeos, produzindo glicerol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos e são um dos principais biocatalisadores com aplicações industriais (PALOMO et al., 2005; BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006; HASAN et al., 2006; BORA et al., 2013; MIRANDA et al., 2014).

As lipases têm uma propriedade comum: em meio homogêneo, estas enzimas têm seu centro ativo isolado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada de tampa. Na presença de qualquer interface hidrofóbica, a tampa se move para permitir a interação entre sua face hidrofóbica e os resíduos hidrofóbicos que normalmente envolvem o centro ativo da lipase com esta interface hidrofóbica. Desta forma, a lipase torna-se adsorvida nesta superfície hidrofóbica (forma aberta) e o centro ativo é exposto ao meio de reação. Este mecanismo de ação geralmente é chamado de "ativação interfacial" das lipases, e essas mudanças conformacionais drásticas devem ser consideradas no uso dessas enzimas como biocatalisadores (CYGLER e SCHRAG, 1999; PALOMO et al., 2002; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

As lipases são proteínas altamente solúveis e são capazes de mostrar alguma atividade esterásica mesmo em meio totalmente aquoso, isto é, são enzimas capazes de ser solúveis em água mesmo quando expõem parcialmente uma grande região hidrofóbica em seus centros catalíticos. À primeira vista, poderíamos assumir que as lipases não possuem uma alta densidade adicional de regiões hidrofóbicas no restante de suas superfícies. Se tivessem, deveriam ser pouco solúveis em água. Portanto, lipases são enzimas bastante hidrofóbicas e sua principal região hidrofóbica é uma área extremamente hidrofóbica localizada em torno do sítio catalítico (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

As lipases são um dos principais biocatalisadores com potencial comprovado para contribuir com a bioindústria da tecnologia lipídica (TREICHEL et al., 2010; MALDONADO et al., 2016; ARUMUGAM et al., 2018). O mercado global de enzimas

creceu muito nos últimos anos. Em 2011, seu valor foi de cerca de US\$ 4 bilhões. Já o mercado específico de lipases deverá atingir US\$ 590,5 milhões em 2020 (OLIVEIRA et al., 2017). O número de lipases disponíveis aumentou desde a década de 1980. Isto é devido, principalmente, ao resultado das enormes conquistas feitas na clonagem e expressão de enzimas a partir de microrganismos, bem como de uma demanda crescente desses biocatalisadores com propriedades novas e específicas, como a especificidade, a estabilidade frente a diferentes pHs e temperaturas (BORNSCHEUER, 2000; BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006; TREICHEL et al., 2010).

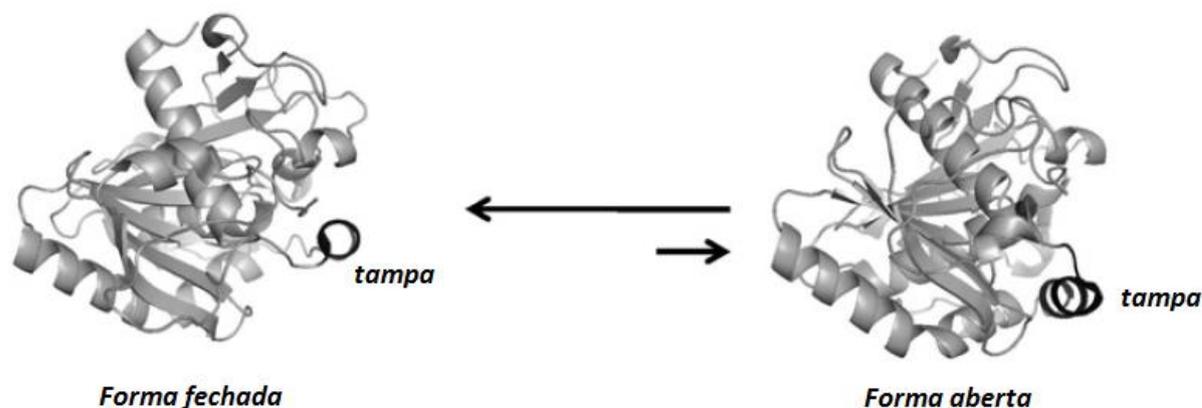
Adicionalmente, as lipases são capazes de catalisar as reações de esterificação e transesterificação, tornando-as atraentes catalisadores na síntese orgânica. Uma importante aplicação industrial de lipases é a modificação de óleos e gorduras a fim de produzir biodiesel e outros lipídios estruturados (HOUDE et al., 2004; HASAN et al., 2006; VESCOVI et al., 2017).

### 3.1.2 Lipases de *Thermomyces lanuginosus* (LTL)

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola lanuginosus*) (LTL) é uma enzima termoestável, comercialmente disponível tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada (Sigma-Aldrich e Novozymes). Embora inicialmente orientada para a indústria alimentícia, a LTL encontrou aplicações em muitas áreas industriais diferentes, desde a produção de biodiesel até produtos químicos mais refinados (principalmente em processos enantio e regioseletivos ou específicos) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A LTL (Figura 1) é uma proteína de cadeia única que consiste em 269 aminoácidos. Seu peso molecular é de 31,7 kDa e seu ponto isoelétrico é 4,4 (JHA et al., 1999). O seu centro ativo inclui a típica tríade catalítica Ser-His-Asp e um dos quatro resíduos Trp da LTL, o resíduo Trp89, localizado na tampa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Holmquist e colaboradores (1995) demonstraram a importância deste resíduo para uma catálise eficiente, mostrando que a mutagênese sítio-dirigida no resíduo Trp89 diminui a atividade catalítica de LTL em reações de transesterificação na presença de ciclo-hexano.

Figura 1 Estrutura das formas aberta e fechada da LTL. A estrutura 3D foi obtida do Protein Data Bank (PDB) utilizando o Pymol vs. 0,99.



Fonte: FERNANDEZ-LAFUENTE (2010)

As lipases, em geral, tendem a formar agregados bimoleculares, confrontando seus centros ativos abertos. A LTL é uma das lipases com maior tendência a formar esses agregados bimoleculares, com tanta força que mesmo outras lipases imobilizadas podem ser usadas para purificar ou mesmo imobilizar a LTL. Este fato precisa ser considerado ao avaliar propriedades de LTL, porque o monômero e o dímero apresentam diferentes características de atividade, estabilidade e seletividade (PALOMO et al., 2003; PALOMO et al., 2004).

### 3.1.3 Lipases de *Aspergillus niger* (LAN)

O fungo *Aspergillus niger* é considerado um microrganismo promissor para a síntese de lipases com aplicações industriais (MAHADIK et al., 2002), devido à sua capacidade de crescer rapidamente em um suporte sólido e sintetizar grandes quantidades de lipases extracelulares (KAMINI et al., 1998). Embora estudos envolvendo otimização da produção de enzimas com diferentes linhagens de *A. niger* mostrem algumas variações em seus resultados, a presença de uma fonte de carbono lipídica mostrou-se essencial para a produção de lipase (MAHADIK et al., 2002).

A lipase extracelular do fungo *A. niger* NCIM 1207 foi purificada por (MHETRAS et al., 2009) através da precipitação com sulfato de amônio seguida por

cromatografia em gel de fenil-sepharose e Sephacryl-100. Este protocolo resultou em uma purificação de 149 vezes com uma recuperação final de 54%. A enzima purificada mostrou uma proeminente banda única em SDS-PAGE. A enzima purificada é uma proteína monomérica com peso molecular de 32,2 kDa e exibe atividade ótima a 50°C, pH ótimo altamente ácido e ponto isoelétrico de 8,5. Além disso, estudos de modificação química revelaram que os aminoácidos His, Ser e Trp estão envolvidos na catálise (MHETRAS et al., 2009).

Costa e colaboradores (2017) avaliaram o efeito da composição do meio de cultivo sólido na produção de enzimas lipolíticas pelo fungo *Aspergillus niger*. Arroz, trigo e farelo de soja foram misturados para preparar o meio de cultivo, que foi suplementado com glicose, glicerol ou óleo de soja. Desta maneira, estes pesquisadores obtiveram os maiores valores de atividade lipolítica com uma mistura de farelo de arroz e glicerol (19,84 U/gms) ou apenas com farelo de arroz (13,27 U/gms).

### **3.2 TIPOS DE CULTIVO E MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES**

Devido ao papel central das enzimas nos bioprocessos e mesmo em muitos processos industriais atuais, várias pesquisas têm sido realizadas para alcançar biocatalisadores de alto rendimento e baixo custo (FERREIRA-LEITAO et al., 2017). Por exemplo, os resíduos líquidos, tais como glicerina bruta, manipuera (resíduo do processamento da mandioca) e melaço, podem ser utilizados em fermentação submersa. Os resíduos sólidos, como casca, resíduos oleosos, bagaço, farelo e sementes de frutas, tem sido empregados como meios de cultura mais baratos para a fermentação em estado sólido a fim de produzir vários biocatalisadores (VELMURUGAN et al., 2011).

A fermentação submersa (FSm) tem sido definida como o cultivo na presença de excesso de água. Quase todas as instalações de produção de enzimas em larga escala utilizam a tecnologia da FSm devido ao melhor monitoramento e facilidade de manuseio (SINGHANIA et al., 2010). Assim, as lipases são produzidas tradicionalmente por fermentação submersa, pois a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa são facilitadas por meio de filtração ou centrifugação simples (CORADI et al., 2013). De fato, o processo de *downstream*

trata principalmente da purificação do produto obtido, sendo que os processos envolvidos diferem com base no produto produzido e se é um processo de fermentação submersa ou sólida que está sendo utilizado, uma vez que há muita diferença entre o tratamento de um produto líquido e um produto sólido (ASHOK e KUMAR, 2017).

Entretanto, a fermentação em estado sólido (FES) também é utilizada para a produção de lipases e tem algumas vantagens sobre a FSm, como permitir o uso de resíduos agrícolas sólidos, exigindo menos água, menos energia e fácil aeração do meio (SILVA et al., 2011; SALGADO et al., 2014; VENKATESAGOWDA et al., 2015). Porém, existem poucos exemplos de produção de lipases por fungos filamentosos em FES (CORADI et al., 2013).

A produção de enzimas microbianas por meio de um processo de FES tem sido descrita como uma melhor opção em termos de estabilidade do produto quando comparada à fermentação submersa (HOLKER e LENZ, 2005). Os processos em FES simulam as condições de crescimento de muitos fungos filamentosos superiores. Por esta razão, a FES é o método de cultivo de escolha, por exemplo, nos casos em que o processo biotecnológico é necessário para incluir a diferenciação morfológica e metabólica em hifas aéreas e em hifas que penetram no substrato, assim como na produção de conidiósporos (HOLKER e LENZ, 2005). Os fungos superiores e suas enzimas, esporos ou metabólitos são bem adaptados ao crescimento em substratos sólidos. Por exemplo, os esporos fúngicos produzidos por FES mostram maior estabilidade, são mais resistentes à secagem e exibem maiores taxas de germinação por longos períodos de tempo após a liofilização do que os esporos produzidos por FSm (HOLKER e LENZ, 2005).

O principal fator para a expressão da atividade da lipase sempre foi relatado como a fonte de carbono, uma vez que se pode induzir a produção das lipases. Estas enzimas são distribuídas amplamente na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos (CONTESINI et al., 2010), porém, as enzimas fúngicas são as preferencialmente escolhidas para aplicações industriais devido ao seu reconhecido estado de segurança e à facilidade de cultivo desses microrganismos (CORADI et al., 2013). Além disso, lipases são geralmente produzidas na presença de um lipídeo, como óleo ou qualquer outro indutor, por exemplo, triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais biliares e glicerol (GUPTA et al., 2003; NIAZ et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016).

Desta forma, os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores de lipase e são atualmente as fontes preferenciais, pois produzem lipases extracelulares (CONTESINI et al., 2010). Os fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Thermomyces*, as leveduras do gênero *Candida* e as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Burkholderia* são os microrganismos mais utilizados para produção industrial de lipases (JAEGER e REETZ, 1998; PAQUES e MACEDO, 2006).

Oliveira e colaboradores (2017) buscaram maximizar a produção de lipase do fungo *Aspergillus ibericus* através de FES utilizando bagaço de azeitona e farelo de trigo, e avaliaram o efeito sobre a produção de lipase segundo a relação C/N, lipídios, fenóis, conteúdo de açúcares dos substratos e adição de fonte de nitrogênio. Taxas baixas de C/N e alto teor de lipídios levaram à produção máxima de lipase. As condições ótimas da FES foram alcançadas com uma relação de massa C/N de 25,2 e 10,2% (p/p) de lipídeos no substrato, pela mistura de bagaço de azeitona : farelo de trigo (1:1) e suplementada com 1,33% (p/p)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Estes pesquisadores conseguiram uma atividade final de lipase de  $223 \pm 5$  U/gms após 7 dias de fermentação e ainda demonstraram neste mesmo estudo a importância do Triton X-100 na extração das lipases.

Já nosso grupo de pesquisa foi capaz de demonstrar a potencial utilização dos resíduos do processamento do óleo de dendê para a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus niger* C (SILVEIRA et al., 2016). Foi conseguida uma atividade de  $77,04 \pm 10,23$  U/gms para FES utilizando torta de dendê moída como substrato e borra alcalina como indutor, enquanto que níveis mais baixos de atividade lipolítica foram alcançados quando foi realizada uma FSm apenas com a utilização da borra como indutor.

De outra forma, Santos e colaboradores (2017) e colaboradores estudaram a produção de lipases de *Aspergillus niger* IOC 3677, comprado do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), mas através de FES utilizando como substrato o resíduo de mangaba (sementes). Foi conseguida uma atividade de 62,5 U/gms neste estudo.

Avila-Cisneros e colaboradores (2014) conseguiram um biocatalisador imobilizado com atividade lipolítica produzido por *Thermomyces lanuginosus* em fermentação em estado sólido utilizando perlite (vidro vulcânico) como suporte inerte. As atividades lipolíticas máximas (22,0 e 120,0 U/gms, utilizando octanoato

de p-nitrofenilo e trioctanoína, respectivamente, como substratos para hidrólise) foram obtidas após 72 horas de cultivo sólido. Estes pesquisadores encontraram ainda uma atividade lipolítica ótima entre temperaturas de 60 a 85°C e a pH 10.

Souza e colaboradores (2017) tiveram como objetivo de seus estudos o uso de torta de canola e farelo de soja como matéria-prima para produção de lipase através de fermentação em estado sólido pelo fungo *Yarrowia lipolytica*. A lipase obtida a partir da FES com torta de canola, após 28h de fermentação, apresentou atividade máxima de  $72,6 \pm 2,4$  U/gms (atividade hidrolítica com óleo de oliva como substrato). Por outro lado, a atividade da lipase obtida a partir da FES com farelo de soja, após 14h de cultivo, atingiu maior atividade lipolítica ( $93,9 \pm 2,9$  U/gms, usando óleo de oliva como substrato).

Maldonado e colaboradores (2012) realizaram estudos utilizando *Geotrichum candidum* a fim de selecionar o melhor indutor para a produção de lipases (azeite de oliva e os óleos de soja, de canola, de milho e de girassol) e de otimizar a composição do meio de cultura e as condições físico-químicas para a produção das referidas enzimas em biorreator de tanque agitado utilizando diferentes rotores. Estes pesquisadores reportam que aproximadamente 25-50% do custo de produção de lipases é devido à composição do meio de cultivo e concluem que o *G. candidum* não apresenta preferência quanto aos indutores testados, sendo então o óleo de soja o mais indicado devido ao seu baixo custo.

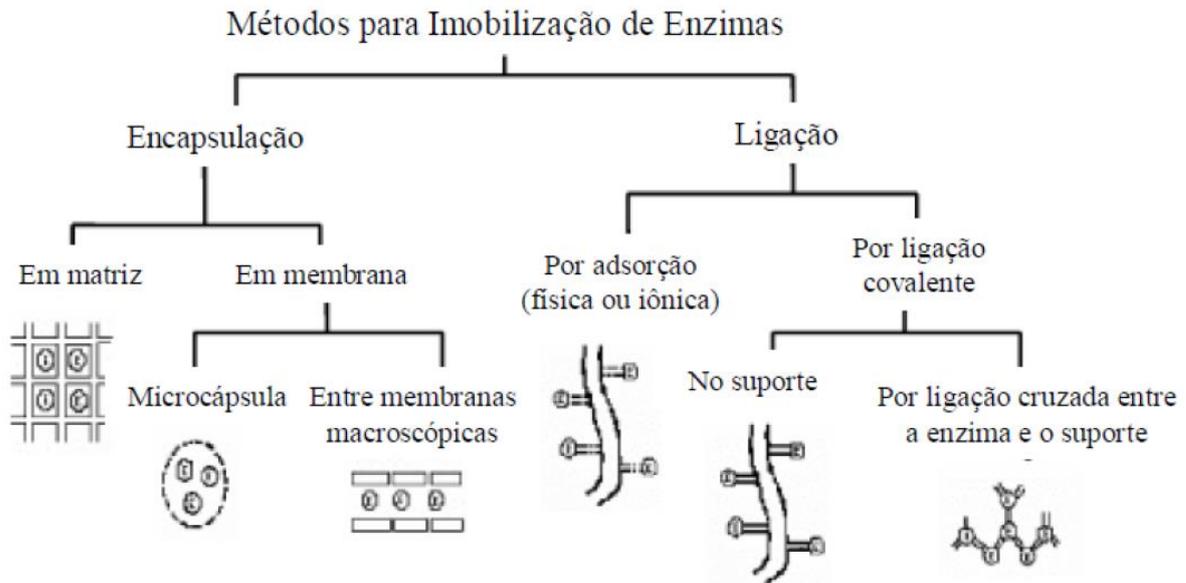
### 3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

É senso comum entre os pesquisadores o fato de que não existe uma técnica 100% perfeita para imobilização de enzimas. Todas as técnicas sempre apresentarão algumas vantagens e desvantagens (BASTIDA et al., 1998; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; GODOY et al., 2014; KOPP et al., 2015; ZHAO, X. B. et al., 2015; MALDONADO et al., 2016; TACIAS-PASCACIO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017).

A primeira enzima imobilizada foi relatada por Nelson e Griffin há mais de um século (NELSON e GRIFFIN, 1916). Uma enzima imobilizada é definida como a enzima fisicamente confinada a uma determinada região, mantendo sua atividade catalítica (BASTIDA et al., 1998; JEGANNATHAN et al., 2008; MENDES et al., 2013;

LIMA et al., 2013). Para melhor ilustrar, várias técnicas que foram desenvolvidas para a imobilização de enzimas em geral são representadas na Figura 2 abaixo.

Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Dalla-Vecchia et al. (2004).

Geralmente, essas técnicas podem ser classificadas em três tipos: ligação a suportes sólidos, reticulação e encapsulação. Dependendo do tipo de interações entre enzimas e suportes, essas técnicas podem ser ainda classificadas em técnicas de imobilização irreversível e reversível (GUISAN, 2006). Na imobilização irreversível, uma vez que as enzimas estão ligadas covalentemente aos suportes, elas não podem ser separadas sem destruir a atividade biológica da enzima ou do suporte. Na imobilização reversível, as enzimas podem ser separadas do suporte sob condições suaves. A ligação covalente, o aprisionamento e a reticulação são os procedimentos mais utilizados para a imobilização irreversível de lipases. A adsorção física e várias ligações não covalentes, como a ligação por afinidade e a ligação de quelação, são procedimentos de imobilização reversíveis bem conhecidos. Cada técnica de imobilização tem seus próprios méritos e, inevitavelmente, algumas desvantagens para a imobilização da lipase (ZHAO, X. B. et al., 2015).

### 3.3.2 Imobilização de lipases

Semelhante a outras enzimas imobilizadas, as lipases imobilizadas apresentam muitas vantagens em relação às lipases livres para a aplicação na síntese de bioprodutos (ÖZTÜRK, 2001; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; TAN et al., 2010; ZHANG et al., 2012; MANOEL et al., 2015; MORENO-PÉREZ et al., 2016; MORENO-PEREZ et al., 2017), como fácil recuperação e reutilização, maior adaptabilidade para operação contínua, menos problemas de efluentes, maior estabilidade frente a pH e estabilidade térmica e maior tolerância aos reagentes e produtos (RODRIGUES et al., 2008; BRANCO et al., 2015; KOPP et al., 2015; VESCOVI et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

As lipases em meio anidro sofrem ativação interfacial por substratos hidrofóbicos. Essa ativação interfacial de uma dada lipase pode ser muito diferente para diferentes derivados imobilizados com diferentes orientações da lipase sobre o suporte: i.- o centro ativo aberto e estabilizado sobre um suporte hidrofóbico, ii.- o centro ativo exposto ao solvente distante do suporte, iii.- o centro ativo exposto ao solvente próximo do suporte, etc. (MORENO-PEREZ et al., 2014). A transição entre a estrutura fechada e a estrutura aberta dos centros ativos de uma dada lipase em meio anidro está associada a drásticas mudanças conformacionais na região onde se localiza o centro ativo. Além disso, também podem ocorrer alterações conformacionais relevantes em outras regiões da superfície da enzima, mesmo longe do centro ativo. A presença da superfície do suporte muito próxima a algumas dessas regiões pode impedir ou modular algumas dessas mudanças conformacionais (MORENO-PEREZ et al., 2014).

Deste modo, a abertura do centro ativo da lipase pode ser ligeiramente modificada produzindo diferentes formas do centro ativo aberto e, desta forma, as propriedades catalíticas da lipase podem ser moduladas. A diferente orientação de uma determinada lipase, imobilizada em diferentes suportes (por exemplo, adsorção iônica *versus* adsorção física em sílica), pode promover diferentes formas abertas da lipase e diferentes propriedades catalíticas. Por outro lado, quando a lipase é adsorvida em suportes hidrofóbicos, o seu centro ativo aberto é fixado no suporte. No entanto, a interação adicional com solventes ou óleos pode também promover ligeiras alterações na conformação da forma aberta já fixada no suporte. Existem vários suportes hidrofóbicos comerciais com diferentes grupos hidrofóbicos (C8,

C18, divinil benzeno) e morfologia diferente (PALOMO et al., 2002; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011; LIMA et al., 2015; BASSO et al., 2016; VESCOVI et al., 2016; VESCOVI et al., 2017). Todos eles são úteis para fixar a forma aberta de uma lipase, mas a combinação de diferentes solventes ou óleos e suportes diferentes pode promover a formação de diferentes estruturas abertas de uma determinada lipase. Já foi observado um papel crítico de diferentes derivados de uma dada lipase (com diferentes orientações sobre o suporte) com várias lipases trabalhando em meio aquoso ou anidro (MENDES et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

Deste ponto de vista, as propriedades catalíticas para uma síntese orgânica catalisada por uma dada lipase adsorvida em diferentes suportes hidrofóbicos, por exemplo, com diferentes morfologias internas, com diferentes tipos de grupos hidrofóbicos, com diferentes densidades superficiais de grupos hidrofóbicos, etc., podem ser muito diferentes.

### **3.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE ENZIMAS**

Além da imobilização, há outras estratégias envolvendo o uso de engenharia enzimática para melhorar a eficiência e a estabilidade das enzimas. Por exemplo, a chamada modificação pós-produção, que compreende técnicas de glicosilação, pegilação e hidroxilação de enzimas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; MATOS et al., 2012; MINTEN et al., 2014; PFISTER e MORBIDELLI, 2014).

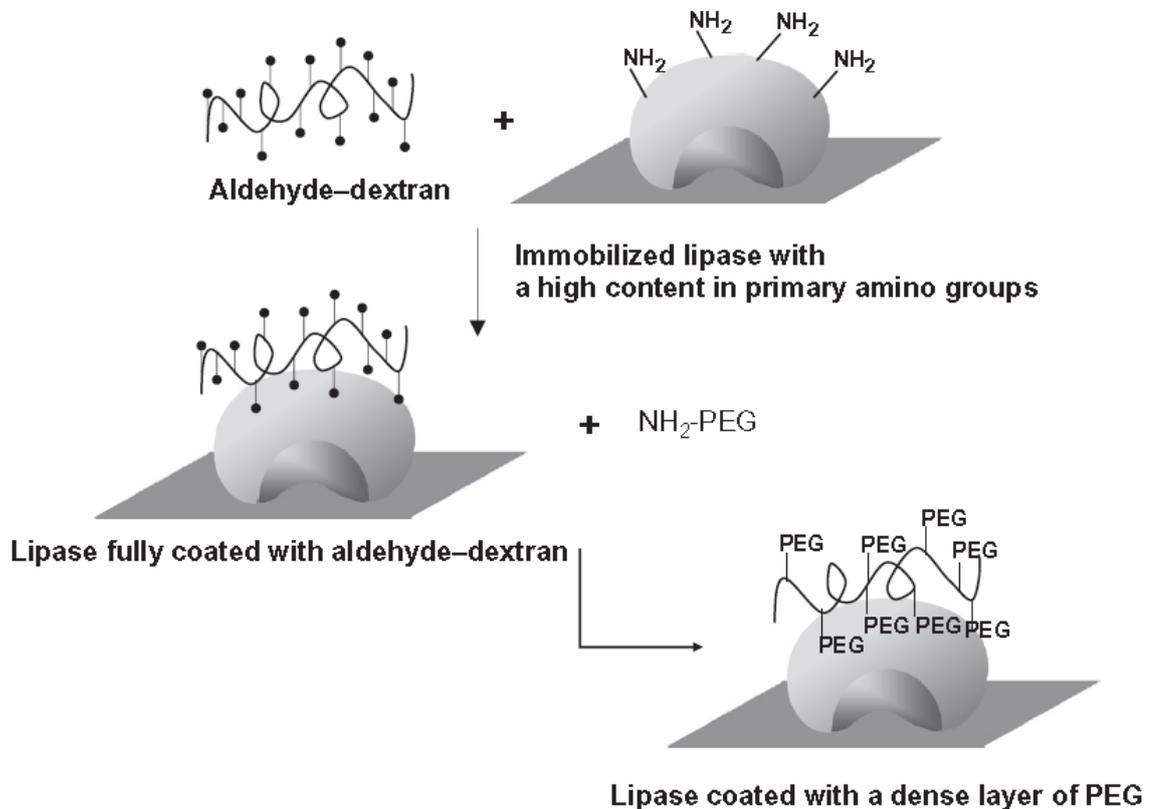
A glicosilação é o processo pelo qual a ligação de cadeias de polissacarídeos pode ocorrer em proteínas (Figura 3). Este processo fornece uma maneira eficaz de modular as propriedades da enzima melhorando sua estabilidade (SHENTAL-BECHOR e LEVY, 2008). A superfície das enzimas pode ser modificada com dextrano (polímero de glicose) de modo a atingir a glicosilação total. O dextrano pode ser parcialmente oxidado, gerando grupos aldeídos que reagem de forma covalente com os grupos amino da superfície da enzima. A superfície da enzima também pode ser enriquecida com grupos amino por modificação dos seus resíduos carboxílicos (Asp + Glu) com etilenodiamina na presença de carbodiimida (PENZOL et al., 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2001).

Outra modificação química é o processo de hidroxilação das enzimas. O dextrano pode ser totalmente oxidado por periodato gerando uma estrutura de polialdeído adequada para reagir com grupos amino de proteínas. A reação entre os polialdeídos e proteínas ocorre através da formação de bases de Schiff. A reação é terminada por redução com borohidreto de sódio, em que as bases de Schiff são reduzidas a grupos amino secundários e os polialdeídos remanescentes são convertidos em poliálcoois (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; MATEO et al., 2000).

Entre as estratégias utilizadas para ampliar as aplicações biotecnológicas das proteínas, a adição de PEG (polietilenoglicol) em proteínas alvo, uma técnica conhecida como PEGuilação, também se tornou bastante difundida para modular as propriedades físicas e químicas, biocompatibilidade e termoestabilidade (Wang et al., 2015). O PEG é sintetizado por polimerização de abertura de anel a partir de monômeros de óxido de etileno (PFISTER e MORBIDELLI, 2014). No caso da PEGuilação de lipases, (MORENO-PÉREZ et al., 2016) relataram uma metodologia interessante quanto à fixação de PEG após a imobilização das enzimas, a qual é brevemente descrita abaixo.

Primeiro, a superfície da enzima, rica em grupos aminos, é recoberta por uma camada de polialdeído-dextrano, seguida por um novo recobrimento com uma camada de amino-PEG (Figura 3). A camada de dextrano é capaz de estabilizar a densa camada de amino-PEG e evitar a exposição de grupos hidrofóbicos da enzima. O dextrano é ainda capaz de se ligar à estrutura proteica devido aos grupos aldeídos presentes na molécula, os quais reagem facilmente com a superfície enzimática altamente aminada. A PEGuilação maciça da superfície da enzima deve gerar uma camada altamente viscosa composta pelos segmentos de PEG que circundam a superfície da enzima. Esta camada viscosa deve prevenir ou reduzir as distorções da superfície enzimática na presença de agentes desnaturantes (MORENO-PÉREZ et al., 2016).

Figura 3 - Aldeído-dextrano como um arcabouço para criar uma camada densa de PEG em torno da superfície enzimática.



Fonte: Adaptado de Moreno-Pérez et al. (2016).

### 3.5 APLICAÇÃO DE LIPASES NA OBTENÇÃO DE DIFERENTES BIOPRODUTOS

A modificação de óleos ou gorduras de alimentos pode alterar suas propriedades nutricionais, além disso, alguns ácidos graxos poliinsaturados são considerados nutracêuticos e alguns permitem a preparação de produtos com baixa caloria. Essa modificação intermediada por lipases apresenta diversas vantagens, dentre elas, produção de óleos de composição desejada e redução da quantidade de subprodutos, facilitando as operações de downstream (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Devido à regioesletividade (seletividade quanto à posição dos ácidos graxos na molécula de glicerol), lipases (não específicas ou 1,3 específicas) possuem a

habilidade de produzir novos tipos de misturas de triglicerídeos, o que as tornam de grande interesse no setor de óleos e gorduras (CASTRO et al., 2004; RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A modificação de óleos e gorduras inclui:

- (i) Hidrólise – produção de glicerídeos ricos em ácidos poliinsaturados ou ácidos graxos livres especiais;
- (ii) Transesterificação ou alcoólise de glicerídeos – produção de monoglicerídeos, ésteres com álcoois de cadeia longa (waxesters), ésteres de poliglicerol (emulsificantes, substitutos de gorduras, etc.), ésteres de ácidos graxos e açúcares (emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos), alcoólise de fosfolídeos, etc.;
- (iii) Esterificação de ácidos graxos – produção de glicerídeos específicos (alimentos saudáveis ou intermediários na preparação de lipídeos estruturados, trioleína, monolaurina, dilaurina), redução de acidez de um óleo ácido, tornando-o de grau comestível, produção de n-octiloleato (aplicado em indústrias de cosméticos, lubrificantes e fármacos), n-butiloleato, etiloleato, hexillaurato (aroma de frutos e emoliente de aplicações cosméticas), etc.;
- (iv) Interesterificação de um óleo ou mistura de óleos – produção de lipídeos estruturados de baixa caloria, óleos com quantidades balanceadas de ácidos graxos saturados e insaturados com propriedades físicas ou hipocolesterolêmicas melhoradas;
- (v) Acidólise – produção de lipídeos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3 e ômega-6, modificação de fosfolídeos, etc. (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

O número de biotransformações industriais para converter em grande quantidade recursos renováveis em produtos químicos de interesse comercial é limitado. Importantes produtos como biodiesel, tensoativos, polímeros e lubrificantes, não são produzidos por biotransformação industrial, pois a biocatálise ainda é mais cara do que a produção química a partir de recursos do petróleo (HAPPE et al., 2012). Entretanto, o potencial de aplicação das lipases nos diferentes setores industriais pode mudar drasticamente esse cenário em um futuro próximo.

Outros produtos com ampla aplicação em indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar podem ser sintetizados por via enzimática utilizando lipases específicas.

Estes produtos podem ser fontes específicas de ácidos graxos para fins terapêuticos ou nutricionais após sofrerem algumas modificações, tais como alterações lipídicas no conteúdo de ácidos graxos, alterações na posição do ácido graxo ligado na molécula de glicerol (posições 1-sn, 2-sn ou 3-sn) e mudanças no comprimento do ácido graxo, bem como seu grau de saturação (CASTRO et al., 2004; HOUDE et al., 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A produção de biodiesel por catálise enzimática atrai grande interesse no campo industrial e acadêmico (MOREIRA et al., 2007; CHEIRSILP et al., 2008; NASSREDDINE et al., 2008; MENDES et al., 2011; LIMA et al., 2015), uma vez que a tecnologia de produção do biodiesel via alcoólise catalisada por lipases é muito promissora, pois, além da reação ocorrer em condições suaves de temperatura, é conduzida com melhor performance com etanol hidratado (CASTRO et al., 2004; MOREIRA et al., 2007) e biomassa com alto teor de ácidos graxos livres. Na reação química conhecida como transesterificação, um éster (triacilglicerídeo, por exemplo) reage com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol, de preferência) na presença de uma lipase para formar uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) (BISEN et al., 2010).

Firdaus e colaboradores (2016) mostraram que a bioconversão de óleo em biodiesel com um rendimento de 92-97% é viável com 1% de carga enzimática utilizando lipase livre produzida por *Thermomyces lanuginosus* (24h, 35°C) e matérias-primas contendo 2-20% de água, 0-10% de glicerol, 0-20% de ácidos graxos livres. A lipase pode ainda ser coletada em uma camada branca e estreita formada entre as fases de biodiesel e água-glicerol, podendo, então, ser reutilizada após compensação devido à perda de 5-10% de enzima.

Existem várias aplicações industriais importantes para a etanólise catalisada pela lipase em sistemas isentos de solventes (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; FJERBAEK et al., 2009; CIPOLATTI et al., 2015; MORENO-PEREZ et al., 2017). A utilização destes sistemas é vantajosa porque evita problemas de separação, toxicidade e inflamabilidade dos solventes orgânicos. Além disso, eles reduzem os custos do produto final, permitindo sua recuperação sem a etapa de evaporação do solvente (SELMI e THOMAS, 1998). Uma das aplicações mais promissoras da etanólise enzimática em um sistema isento de solventes é a produção de biodiesel. A principal vantagem do biodiesel é que se trata de um combustível biodegradável, pode ser usado em motores atuais sem qualquer

modificação e ainda libera emissões reduzidas de gases poluentes. Além disso, o principal ponto no processo enzimático da produção de biodiesel é que as biotransformações podem ocorrer em condições brandas de processo e o subproduto, glicerol, pode ser facilmente recuperado (TRENTIN et al., 2015).

Os diglicerídeos e os triglicerídeos são os principais compostos responsáveis pelo aumento da viscosidade dos óleos vegetais e isso representa um dos principais problemas quando se trata do uso direto desses óleos em motores a diesel (CABALLERO et al., 2009). Assim, pode-se esperar que os biocombustíveis que contenham uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos/monoglicerídeos ou ésteres etílicos de ácidos graxos/monoglicerídeos tenham propriedades físicas semelhantes às do biodiesel convencional, eliminando a produção de glicerol como subproduto (BEHR et al., 2008; CABALLERO et al., 2009).

Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa são moléculas funcionais úteis que respondem aos requisitos de vários campos de aplicação na indústria de cosméticos, farmacêuticos e lubrificantes (LAUDANI et al., 2007). A grande maioria dos lubrificantes industriais é derivada de frações de petróleo (óleos minerais). No entanto, o uso extensivo de lubrificantes à base de petróleo tem causado sérios problemas ambientais devido à sua toxicidade e baixa biodegradabilidade (AVISHA et al., 2013; MOBARAK et al., 2014). Nos últimos anos, os ésteres sintéticos têm sido considerados como substitutos promissores para os óleos minerais devido às suas propriedades tecnológicas superiores, incluindo a possibilidade de alcançar propriedades feitas sob medida, falta de toxicidade e excelente biodegradabilidade (NAGENDRAMMA e KAUL, 2012; MOBARAK et al., 2014).

O oleato de n-octila foi sintetizado por reação de esterificação enzimática do ácido oleico com n-octanol por (BASSI et al., 2016). Esses pesquisadores testaram as atividades catalíticas de diferentes lipases: lipases de pâncreas porcino (PPL), *Mucor javanicus* (MJL), *Candida sp.* (CALA), *Rhizomucor miehei* (RML) e *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizadas através da ativação interfacial em partículas de poli-metacrilato (PMA). Dentre estes derivados, PMA-LTL foi o mais ativo na síntese de oleato de n-octila. A porcentagem máxima de conversão de  $95,1 \pm 1,3\%$  foi observada após 60 minutos de reação a 45°C, 10% m/v de PMA-LTL e razão molar ácido oleico : n-octanol de 1: 1,5 em um sistema isento de solventes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Enzimas

As lipases de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100 L) (LTL) e a LTL imobilizada comercial (Lipozyme TL IM) foram generosamente doadas pela Novozymes (Dinamarca). A lipase de *Aspergillus niger* foi produzida no nosso laboratório de Agroenergia, da Embrapa Instrumentação, a partir de diferentes bioprocessos (fermentação em estado sólido, fermentação submersa e fermentação combinada) utilizando resíduos do processamento do óleo de dendê.

#### 4.1.2 Suportes

Foram utilizados os suportes Sílica funcionalizada com grupos octil (OS), Lewatit VP OC 1600 (resina porosa de metacrilato contendo grupos divinil benzeno), adquirido da Bayer (Leverkusen, Alemanha) (Lewatit DVB), Sepabeads EC-OD (resina de metacrilato contendo grupos octadecil C18), obtido a partir de Resindion S.R.L.-Mitsubishi (Milão, Itália) (Sepabeads C18), Purolite Lifetech™ ECR8806F (resina macroporosa de metacrilato contendo grupos octadecil C18) (Purolite C18) e Purolite Lifetech™ ECR1030M (resina macroporosa de metacrilato contendo grupos divinil benzeno (Purolite DVB), gentilmente doados pela Purolite Ltd. (País de Gales, Reino Unido). A Tabela 1 abaixo resume as principais características de cada suporte.

Tabela 1 – Características dos suportes utilizados neste estudo.

Suporte	Matriz	Grupos	Volume	Diametro	Área <sup>c</sup>	Conteúdo
		Funcionais <sup>a</sup>	poro <sup>b</sup>	poro <sup>c</sup>		água <sup>d</sup>
		mmol OD/g	ml/g	Å	m <sup>2</sup> /g	%
(base seca)						
Lifetech™ ECR8806F (Purolite C18)	Octadecil metacrilato	1,03	0,65	616	116	64
Lifetech™ ECR1030M <sup>d,e</sup> (Purolite DVB)	Copolímero de divinilbenzeno e metacrilato	1,03	0,65	616	116	64
Lewatit VP OC 1600 (Lewatit DVB)	Metacrilato reticulado com divinilbenzeno	n.a.	0,51	324	74	60
Sepabeads EC-OD <sup>e</sup> (Sepabeads C18)	Octadecil metacrilato	n.a.	0,2-0,4	100-200	60-80	55-65
Octil-Sílica <sup>F</sup>	Sílica	1,3*	0,64	337	77,51	

<sup>a</sup> Valor teórico.

<sup>b</sup> Medido por intrusão de mercúrio.

<sup>c</sup> Medido por BET.

<sup>d</sup> Medido por equilíbrio infra-vermelho.

<sup>e</sup> Valores do fornecedor.

<sup>F</sup> Valores descritos por Vescovi et al. (2016)

\*Moléculas por nm<sup>2</sup>

### 4.1.3 Reagentes

Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), butirato de p-nitrofenila (p-NPB), palitato de p-nitrofenila (p-NPB), etanol e hexano foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). O óleo de girassol alto-oleico e o óleo de oliva (Carbonell®) foram comprados em um mercado local. A fibra e a borra de dendê foram gentilmente doadas pela empresa Agropalma. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou HPLC.

### 4.2 Triagem de fungos produtores de lipases

Foram preparados diferentes meios diferenciais para a prospecção de microrganismos originários do solo e da madeira em decomposição da região amazônica (DELABONA et al., 2012), além de linhagens de *Aspergillus niger*, isoladas originalmente de resíduos de manteiga, cedidas pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Inicialmente, 18 fungos filamentosos da coleção da Embrapa foram submetidos a triagem em placas utilizando tributirina como substrato (CAPPUCCINO e SHERMAN, 2002) em que se verificou a formação de halo transparente ao redor da colônia e foi calculado o índice enzimático (relação entre o tamanho do halo e o tamanho da colônia). Posteriormente, foram selecionados 8 destes fungos (3 com maiores índices enzimáticos, 2 intermediários e 3 negativos) para novo plaqueamento, mas desta vez utilizando o óleo de oliva como substrato e Rodamina B (BARROS et al., 2013) a fim de obter nova confirmação da produção de lipases verdadeiras. Por fim, após os testes de plaqueamentos, foi realizada a produção enzimática por FES utilizando farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor para as 8 linhagens selecionadas.

### 4.3 Estratégias de cultivo dos microrganismos

#### 4.3.1 *Produção enzimática em fermentação em estado sólido (FES)*

Em frascos cônicos de 250 mL, foram utilizados 10 g de palha de dendê e borra alcalina de dendê (0,3 mL aliqotado rapidamente após fundir a borra a 50°C) como indutor. Nesta etapa, a umidade do meio sólido foi ajustada através da adição de 8,0 mL de solução de sulfato de amônio 1,2% (p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0. Cada frasco foi inoculado com  $10^7$  esporos/g de meio sólido seco e mantido incubado em estufa, na ausência de luz, em condições estáticas, a 30°C por 96 h.

Para as extrações, amostras de todos os cultivos foram retiradas a cada 24 h (sendo retirado todo o frasco de fermentação). Foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM, pH7 na proporção de 5 mL para cada grama de substrato e, após 30 min sob agitação de 150 rpm em shaker a 30°C, as amostras foram filtradas à vácuo em papel filtro, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min e mantidas sob congelamento a -20°C para análises posteriores. Todos os experimentos foram conduzidos no mínimo em triplicatas e os resultados expressos como médias  $\pm$  desvios.

#### 4.3.2 *Pré-cultivo para fermentação combinada (FC)*

O pré-cultivo para a fermentação combinada consistiu de uma etapa inicial de cultivo em estado sólido como descrita anteriormente, porém realizada com 10 g de torta de dendê em frascos cônicos de 500 mL. Decorrido um período de 24 h, foi realizada a transição do cultivo em FES para FSm através da adição de 200 mL do mesmo meio nutriente líquido utilizado para o pré-cultivo da FSm, adaptado de Toscano et al. (2011), descrito na seção 4.2.3. O pré-cultivo continuou em mesa incubadora rotativa, com agitação contínua de 220 rpm, a 30°C por 48 h.

#### 4.3.3 *Pré-cultivo para fermentação submersa (FSm)*

Na etapa de pré-cultivo para a fermentação submersa, em cada frasco cônico de 500 mL foram adicionados 100 mL do meio nutriente adaptado de Toscano et al.

(2011), descrito a seguir (em m/v): Extrato de levedo (0,5%), Peptona (2%), Glicose (3%),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,05%),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,04%),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1%),  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,02%). Após a inoculação com  $10^7$  esporos/mL no meio nutriente, o pré-cultivo permaneceu em mesa incubadora rotativa com agitação contínua de 220 rpm, a 30°C por 48 h.

#### 4.3.4 Produção Enzimática em FC e FSm

Os cultivos foram inoculados com 10% (v/v) dos seus respectivos pré-cultivos (descritos anteriormente) e foram mantidos incubados a 30°C em mesa incubadora rotativa com agitação contínua de 220 rpm durante 96 h.

Para as extrações, amostras de todos os cultivos foram retiradas a cada 24 h (sendo retirado todo o frasco de fermentação). Foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM, pH7 na proporção de 5 mL para cada grama de substrato e, após 30 min sob agitação de 150 rpm em shaker a 30°C, as amostras foram filtradas à vácuo em papel filtro, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min e mantidas sob congelamento a -20°C para análises posteriores. Todos os experimentos foram conduzidos no mínimo em triplicatas e os resultados expressos como médias  $\pm$  desvios.

#### 4.4 Influência do pH e da temperatura na atividade da lipase livre

Um delineamento fatorial completo seguido de análise de superfície de resposta foi utilizado para avaliar os efeitos da temperatura e pH, e sua possível interação sobre a atividade enzimática da lipase (Tabela 2). O planejamento experimental selecionado foi o composto central compreendendo 11 ensaios, correspondendo a quatro pontos cúbicos, quatro pontos axiais e três pontos centrais. A variável dependente (resposta) foi a atividade de lipase. O software Statistica v. 10 (Statsoft) foi utilizado para analisar os dados experimentais, realizar análise de variância (ANOVA) e traçar as superfícies de resposta. Estes ensaios foram realizados com o extrato enzimático bruto obtido após 72 h de cultivo em FES utilizando como substrato os resíduos da indústria do óleo de palma.

Tabela 2 – Variáveis e níveis do DCCR para analisar a atividade lipolítica em FES.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
<b>pH</b>	3,0	3,6	5,0	6,4	7,0
<b>Temperatura</b>	30,9	35,0	45,0	55,0	59,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 Especificidade frente a diferentes substratos

O extrato enzimático bruto obtido após 72 h de cultivo em FES utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma como matéria-prima foi caracterizado em termos da sua especificidade para a hidrólise de vários substratos oleosos emulsificados com diferentes proporções de ácidos graxos (base mássica): óleo de palma (43% ácido palmítico (C16:0) e 40% de ácido oleico (C18:1)), óleo de soja (22% de ácido oleico (C18: 1) e 53% de ácido linoleico (C18: 2)), óleo de girassol (20% de ácido oleico (C18:1) e 68% de ácido linoleico (C18:2)), óleo de milho (30% de ácido oleico (C18:1) e 52% de ácido linoleico (C18:2)), óleo de canola (61% de ácido oleico (C18:1) e 22% de ácido linoleico (C18:2)) e tributirina (C4). As atividades foram expressas em relação ao controle utilizando óleo de oliva (80% de ácido oleico (C18:1)). A atividade de lipase foi realizada sob as condições padrões descritas anteriormente, utilizando pH 5,0 e temperatura de 45°C.

#### 4.6 Imobilização das lipases comerciais e do extrato bruto da FES

Foram realizadas imobilizações por adsorção em suportes hidrofóbicos para as diferentes lipases utilizadas neste trabalho. Para a lipase de *Aspergillus niger* (LAN), foram utilizados os suportes Octil-sílica (OS) e Purolite C18. Já para a lipase comercial LTL, foram utilizados todos os suportes descritos no item 4.1.2.

A imobilização foi conduzida em temperatura ambiente e consistiu no preparo de 5 mL de uma suspensão contendo solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e foi oferecido o suporte Purolite C18 na condição de 2,5 mg da enzima comercial Lipolase (Novozyme) para cada 1 g de suporte.

No caso das lipases produzidas por *A. niger* C, foi realizado um teste inicial para verificar as particularidades deste procedimento quando da utilização do extrato bruto. Assim, para cada 30 mL de extrato bruto obtido após 72 h de cultivo em FES (extraído com tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0) foi diretamente oferecido 0,5 g de Purolite C18. As suspensões foram mantidas em agitação suave a 25°C durante 24 h. Posteriormente, após os primeiros ensaios, fez-se necessário a precipitação das proteínas do extrato bruto com acetona à frio a fim de eliminar interferentes, concentrar as lipases e resuspender em tampão de força iônica mais adequada para esta imobilização. Após resuspensão em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,0, a imobilização foi realizada pela adição de 0,5 g do suporte Purolite C18 à 15,0 mL da nova suspensão. Após ensaios preliminares, a quantidade de proteínas totais oferecida por cada grama de suporte foi de aproximadamente 10 mg tanto para a LTL quanto para a lipase de *A. niger* C (extrato resuspendido).

Para cada ensaio, uma suspensão de referência (solução enzimática sem suporte) foi preparada e submetida às condições de imobilização. Em todas as preparações a atividade desta suspensão de referência mostrou 100% da atividade ao longo do tempo.

O monitoramento da imobilização foi realizado através de medida da atividade hidrolítica pelos diferentes métodos citados anteriormente (hidrólise do pNPB e hidrólise do óleo de oliva), além da quantificação das proteínas totais presentes no sobrenadante.

Para as imobilizações visando a modulação da atividade/seletividade da lipase comercial LTL e estabilização adicional dos derivados, a LTL foi imobilizada em suportes hidrofóbicos (Lifetech™ ECR8806F, Lifetech™ ECR1030M, Sepabeads EC OD, Lewatit VP OC 1600 e Octil Sepharose CL-4B) por adsorção hidrofóbica. Todos os ensaios de imobilização foram conduzidos na presença de tampão fosfato de sódio a uma força iônica baixa (5 mM). As imobilizações (100 mL de solução contendo 200 mg de LTL e 10 g suporte) foram conduzidas em diferentes pHs (5, 7 ou 8,5), diferentes temperaturas (4, 25 ou 30°C) e na presença ou ausência de CTAB. Periodicamente, a atividade da suspensão e do sobrenadante foi medida pelo ensaio de pNPB.

## 4.7 Inativação térmica das lipases comerciais e do extrato bruto livres e dos diferentes derivados imobilizados

### 4.7.1 Estabilidade térmica em meio aquoso

A estabilidade térmica da lipase livre do extrato bruto obtido após 72 h de FES utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma como matéria-prima foi avaliada por medição da atividade enzimática residual. As temperaturas de 40, 45, 50, 60, 65 e 80°C foram avaliadas por um período total de 24 h, no mesmo pH do tampão de extração (fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0), com amostragem às 3, 6, 12 e 24 h. No final do período de incubação, as amostras foram imediatamente submetidas a ensaios de atividade de lipase. A atividade enzimática foi realizada em condição padrão (pH 5,0 e temperatura de 45°C) estabelecida após caracterização bioquímica da lipase livre do extrato bruto da FES.

A estabilidade térmica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi avaliada medindo a atividade enzimática residual desta lipase imobilizada em Octyl-Sepharose™ na presença de diferentes íons ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , K, Na,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Mo}^{+2}$ ) em diferentes concentrações (de 0,005 a 20 mM). Foram avaliadas as temperaturas de 60 e 70°C a pH 7,0 em tampão fosfato de sódio 5 mM. As amostras foram retiradas periodicamente e submetidas imediatamente aos ensaios de atividade lipolítica.

### 4.7.2 Estabilidade térmica em meio oleoso

Os derivados Purolite C18-LTL e Purolite C18-LTL-revestido com polímeros (0,1 g) foram incubados com 1,9 mmoles de óleo de girassol com alto teor de ácido oléico a 40°C. Após um determinado período de tempo, adicionaram-se 15,5 mmoles de etanol para iniciar a reação de etanolise na ausência de solvente orgânico (ver item 4.15) e as amostras desta transesterificação foram retiradas em diferentes tempos (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 24 h). A síntese dos ésteres etílicos

foi seguida por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e os melhores resultados foram analisados por análise de HPLC-ELSD.

#### 4.7.3 Inativação térmica em solvente orgânico (hexano)

Os derivados Purolite C18-LTL e Purolite C18-LTL revestido com polímeros (0,1 g) foram incubados em 4,1 mL de hexano a 40°C por, no mínimo, 24h. Em seguida, 0,6 mL de óleo de girassol com alto teor de ácido oléico e 0,3 mL de etanol anidro foram adicionados aos frascos a fim de iniciar a reação de etanolise na presença de solvente orgânico. Amostras foram retiradas em diferentes tempos (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 24h) para quantificação de ésteres etílicos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e os melhores resultados por análise de HPLC-ELSD.

#### 4.8 Preparo do polialdeído dextrano

Foram diluídas 10,02 g de dextrano (25.000 Da) em 300 mL de água destilada. Após, 26,16 g de periodato de sódio foram adicionadas para se obter uma preparação de dextrano 100% oxidado ou 5,232 g de periodato de sódio para se obter uma preparação de dextrano 20% oxidado. Depois de 2 h de agitação suave a temperatura ambiente, a solução foi dialisada contra excesso de água destilada. A solução de polialdeído dextrano foi, por fim, armazenada a 4°C (MORENO-PÉREZ et al., 2016).

#### 4.9 Modificação da superfície de lipases imobilizadas com Polietilenamina (PEI)

A superfície dos derivados de lipases LTL (Purolite-LTL) e *A. niger* C (Purolite-LAN) foram modificadas com uma camada fina de polietilenamina. Para cada 1 g de derivado foram oferecidos 1,0 g de PEI já diluído em 20 ml de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 8,0. A suspensão foi mantida sob agitação suave durante 90 min. Posteriormente, o derivado foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado a 4°C (GUISAN et al., 2001).

#### **4.10 Aaminação química da superfície enzimática**

A aaminação foi realizada como descrito por (Fernandez-Lorente, G. et al., 2008). 1 g de derivado foi adicionado a 10 mL de etilenodiamina (EDA) 1 M, pH 4,75, sob agitação continua. Carbodiimina (EDC) sólida foi adicionada à suspensão a fim de alcançar a concentração final de 10 mM. Após 90 min de agitação suave a 25°C, o derivado aminado foi filtrado a vácuo em filtros de vidro sinterizados e lavado com água destilada (MORENO-PÉREZ et al., 2016).

#### **4.11 Adsorção de polímeros na superfície das lipases imobilizadas**

##### *4.11.1 Glicosilação*

A glicosilação significa modificar a superfície da enzima com dextrano parcialmente oxidado (dextrano 20% oxidado) (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; MORENO-PÉREZ et al., 2016) (Mateo et al., 2000). Para isso, adicionou-se 1 g de lipase imobilizada a 10 ml de polialdeído dextrano (dextrano 20% oxidado) de modo a obter elevado grau de intercruzamento. Após 16 h de agitação suave à temperatura ambiente, lavou-se com água destilada e armazenou-se a 4 °C.

##### *4.11.2 Hidroxilação*

Para o processo de hidroxilação, as enzimas enriquecidas com grupos amino por aaminação química reagem com polialdeído dextrano (dextrano 100% oxidado) para forçar os cruzamentos intramoleculares e formar, após redução com borohidreto de sódio, uma camada poli-hidroxílica cobrindo a superfície da enzima, que pode ter efeitos estabilizadores (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; MORENO-PÉREZ et al., 2016) (Mateo et al., 2000). Para isso, adicionou-se 1 g de lipase imobilizada a 10 mL de polialdeído dextrano de modo a obter uma reticulação elevada. Após 16 h de agitação suave à temperatura ambiente, as preparações imobilizadas foram reduzidas com 1 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados com água destilada e armazenados a 4°C.

#### 4.11.3 PEGuilação

O derivado (1 g) foi adicionado a 10 mL de solução de polialdeído-dextrano (dextrano 20% oxidado). Após 16 h de agitação suave a 4 ° C, o derivado de lipase-dextrano imobilizado foi filtrado a vácuo. Um grama de derivado de lipase-dextrano imobilizado foi adicionado a 15 mL de uma solução 8,3 M de o-(2-aminoethyl)-o'-methylpolyethylene G 2000 Da, preparada em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,5. Após 2 h de agitação suave à temperatura ambiente, o derivado lipase-dextrano-PEG foi reduzido a pH 8,5 por adição de 15 mg de borohidreto de sódio sólido durante 30 min a 25 ° C. Finalmente, o derivado modificado foi filtrado e lavado cuidadosamente com 50 mL de água destilada cinco vezes e armazenado a 4 ° C (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; MORENO-PÉREZ et al., 2016).

#### 4.12 Secagem dos derivados

Vinte mililitros de várias soluções de acetona-água destilada foram adicionados para cada grama de derivado. Primeiramente, eles foram lavados somente com água e, em seguida, a porcentagem de acetona na solução foi gradualmente aumentada até atingir 100% de acetona pura. A acetona foi completamente evaporada após incubação *overnight* à temperatura ambiente. Também realizou-se a secagem dos derivados em estufa a 37°C, obtendo-se os mesmos resultados do procedimento de secagem feito com varias soluções de acetona-água destilada.

#### 4.13 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão para a construção de uma curva de calibração Absorvância (595 nm) vs. concentração de proteína (0,125 - 2 mg/mL).

#### 4.14 Determinação da atividade de hidrólise

Métodos comuns para determinação de atividade de lipase baseiam-se em ensaios de titulação de ácidos graxos liberados na hidrólise de um triglicerídeo emulsificado ou ensaios espectrofotométricos na hidrólise de ésteres de p-nitrofenil (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006). Uma unidade de atividade lipolítica é geralmente definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições ensaiadas.

##### 4.14.1 Hidrólise do Azeite de Oliva Emulsificado

A atividade hidrolítica das lipases na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com metodologia descrita por Soares e colaboradores (1999). O método baseia-se na hidrólise de uma emulsão de óleo de oliva-goma arábica (7% m/v, em água) na razão volumétrica 1:1. Em erlenmeyer foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 e a lipase (solúvel ou imobilizada). A mistura foi incubada a 37°C por 10 min com agitação de 250 rpm. Após o período de incubação de 10 min, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de solução etanol:acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados (produto da reação enzimática) foram titulados com solução de KOH 0,02 M até pH 9,0 com auxílio de titulador automático (Tritrino pH-Stat, Metrohm). O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado segundo a equação (1). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, sob as condições de ensaio.

$$A_H(U_{\text{azeite}} / \text{mg ou } U_{\text{azeite}} / \text{g}) = \frac{(V_a - V_b) 10^3 M}{tm} \quad (1)$$

Onde  $V_a$  é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);  $V_b$  é o volume de KOH gasto na titulação do controle (solução de substrato inicial, sem enzima) (mL); M é a concentração molar da solução de KOH; m é a massa de

derivado (g de derivado, ou pode ainda ser o volume de enzima utilizado, em mL, quando da utilização da enzima livre) e  $t$  é o tempo de reação (min).

#### 4.14.2 Hidrólise do *p*-Nitrofenil-palmitato (pNPP) e *p*-Nitrofenil-butirato (pNPB)

A atividade de hidrólise do pNPP de lipases livres também foi determinada espectrofotometricamente acompanhando-se o aumento da absorvância a 348 nm devido à liberação de *p*-nitrofenol segundo metodologia descrita por Kordel et al. (1991).

O ensaio de atividade com pNPB como substrato sintético utilizou um espectrofotômetro com uma célula termostatizada e agitação magnética contínua (500 rpm) durante 1 min. Foi mensurado o aumento da absorvância a 405 nm ( $\epsilon = 6080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) produzido por *p*-nitrofenol (pNP) liberado na hidrólise de *p*-nitrofenil butirato 0,4 mM (pNPB) em fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25°C (MUÑÍO et al., 2008). Para iniciar a reação adicionou-se 0,05-0,2 mL de soluções das lipases livres (branco ou sobrenadante) ou das suspensões das preparações imobilizadas a 2,0 mL da solução de substrato. A atividade enzimática foi calculada como um  $\mu\text{mol}$  de pNPB hidrolisado por minuto por mg de enzima (IU) nas condições descritas.

Durante a pesquisa realizada no Instituto de Catalisis y Petroleoquímica de Madrid, o ensaio de atividade utilizou a mesma metodologia acima, porém diferindo nos volumes utilizados e em alguns parâmetros: foi medido o aumento da absorvância a 348 nm ( $\epsilon = 5,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) produzido pelo *p*-nitrofenol (pNP) liberado na hidrólise de 0,4 mM de *p*-nitrofenil butirato (pNPB) em fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25°C (MUÑÍO et al., 2008). Para inicializar a reação, foram adicionados 0,05-0,2 mL das lipases livres (branco ou sobrenadante) e as suas preparações imobilizadas (suspensão) a 2,5 mL da solução de substrato. A atividade enzimática foi calculada como um  $\mu\text{mol}$  de pNPB hidrolisado por minuto por mg de enzima (IU) nas condições descritas.

#### 4.15 Síntese de oleato de octila

A atividade de esterificação de lipases imobilizadas foi medida de acordo com o método descrito por Paula e colaboradores (2008) com modificações. A síntese

de oleato de octila ocorreu a partir da reação de ácido oleico (0,1M) com o álcool n-octílico (0,1M) em heptano a 37°C. A reação foi iniciada pela adição do biocatalizador ao meio reacional (10 mL) em frascos de vidro fechados e mantidos sob agitação de 200 rpm. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados (1, 2, 4, 6, 8 e 24h) para a quantificação de ácido consumido por titulação com KOH 0,02 M. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a taxa de formação de 1  $\mu$ mol de oleato de octila por minuto nas condições do ensaio.

#### **4.16 Etanólise de óleo de girassol (rico em ácido oleico) na presença de hexano**

A etanólise foi realizada com 0,1 g de derivado totalmente seco carregado com uma carga de 20 mg de proteína/g de suporte. Os derivados foram incubados em 4,1 mL de hexano na presença de 0,2 g de peneiras moleculares para evitar a presença de água durante a reação. Foi adicionado um volume de 0,3 mL de etanol anidro e 0,6 mL de óleo de girassol para iniciar a reação de etanólise, a qual foi conduzida a 40 °C com agitação de 150 rpm em agitador orbital. A reação foi rotineiramente acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e os resultados mais interessantes foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

#### **4.17 Etanólise de óleo de girassol (rico em ácido oleico) em sistema livre de solvente**

Uma massa de 0,1 g de lipase imobilizada seca (contendo 20 mg de enzima/g de derivado) foi adicionada à solução de substrato contendo 3,42 mmol de óleo e 29,11 mmol de etanol. Também foram adicionados 200 mg de peneiras moleculares à mistura reacional para se obter valores de atividade na ausência de água. A reação foi conduzida a 40 °C com agitação de 150 rpm em agitador orbital. A reação foi rotineiramente acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e os

resultados mais interessantes foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

#### **4.18 HPLC-ELSD**

Amostras da reação de transesterificação foram quantificadas por cromatografia líquida em um Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity equipado com ELSD Agilent 385 (Palo Alto, CA, USA) e coluna sílica normal-phase ACE (25 x 4.6 mm) mantida a 40 °C.

Os volumes de injeção de 10 µL e a taxa de fluxo de 1 mL/min foram utilizados em todos os experimentos. Todas as amostras foram dissolvidas em 2-propanol-hexano (5: 4, v/v). As fases móveis eram água destilada (fase A), acetonitrila (fase B) e 2-propanol-hexano (5:4, v/v, fase C). Foi utilizado um gradiente ternário de 25 min com dois passos de gradiente linear: 30% A + 70% B em 0 min, 100% B em 10 min, 50% B + 50% C em 20 min, seguida de eluição isocrática com 50% de B + 50% C nos últimos 5 min (HOLČAPEK et al., 1999).

#### **4.19 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

As placas de CCD consistiam de TLC Sílica gel 60 F254 (Merck) na forma de folhas de alumínio (10 x 10 cm, altura x largura). As amostras de lipídios (0,3 µL) foram aplicadas na base das placas distantes 1,0 cm uma da outra e cerca de 1-2 cm da parte inferior. O eluente utilizado foi acetato de etila em hexano (10% em volume) e o desenvolvimento da cromatografia foi realizado até a frente do eluente atingir o topo da folha de alumínio. Após uma breve secagem, as manchas foram reveladas após a reação com iodo.

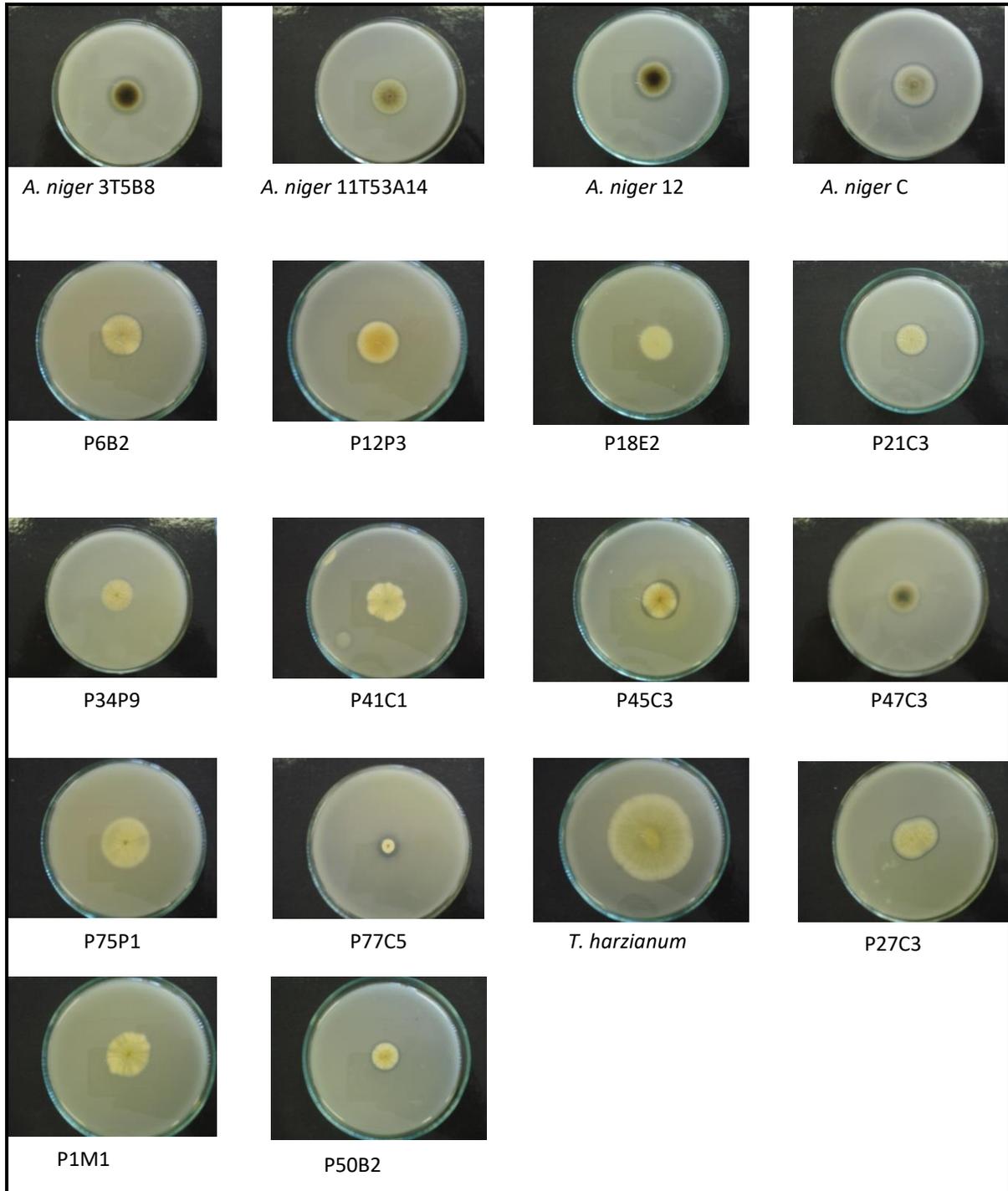
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem de fungos produtores de lipases

O primeiro procedimento realizado foi o plaqueamento de 18 linhagens de fungos em meio contendo tributirina como substrato para as lipases (Figura 4). Os prováveis microrganismos produtores desta enzima foram identificados pela formação de halo transparente ao redor da colônia. Tal ensaio foi acompanhado por 96 h, medindo-se o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo a cada intervalo de 24 h, sendo possível calcular o índice enzimático de cada linhagem (razão diâmetro do halo/diâmetro da colônia), conforme apresentado na Tabela 3. As linhagens que apresentaram maiores índices enzimáticos em tributirina foram P77C5, P50B2 e *Aspergillus niger* 12.

A partir deste plaqueamento inicial foram selecionadas 8 linhagens para posterior confirmação com novo plaqueamento contendo óleo de oliva como substrato para as lipases e também rodamina B para revelação do halo lipolítico sob incidência de radiação UV (Figura 5). Esse teste é importante uma vez que a tributirina (lipídeo solúvel em água) pode ser substrato de outras esterases, ou seja, não é substrato específico de lipases, podendo gerar um resultado falso positivo. Desta forma, recomenda-se posterior confirmação utilizando lipídeos insolúveis como substrato (COLEN, 1992).

Figura 4 – Plaqueamento em tributirina de fungos filamentosos da coleção Embrapa para seleção de microrganismos potencialmente produtores de lipases. Fotos tiradas após 96 h de plaqueamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Cálculo dos índices enzimáticos de fungos filamentosos da coleção da Embrapa plaqueados em tributirina após 96 h de crescimento.

	Fungos	Média Øc	Média Øh	i.e.	Desvio Padrão
1	<b>P77C5</b>	6,67	11,67	1,75	0,10
2	<b>P50B2</b>	11,67	19,33	1,66	0,02
3	<b><i>A. niger</i> 12</b>	21,67	29,00	1,34	0,02
4	<b><i>A. niger</i> 3T5B8</b>	22,33	29,33	1,31	0,01
5	<b>P45C3</b>	17,67	22,33	1,26	0,09
6	<b>P12P3</b>	20,33	23,67	1,16	0,02
7	<b><i>A. niger</i> C</b>	26,33	29,67	1,13	0,04
8	<b><i>A. niger</i> 11T53A14</b>	21,67	24,00	1,11	0,03
9	<b>P27C3</b>	23,33	25,33	1,09	0,00
10	<b>P6B2</b>	22,33	23,67	1,06	0,03
11	<b>P47C3</b>	20,33	21,33	1,05	0,00
12	<b>P21C3</b>	22,33	23,33	1,04	0,00
13	<b>P34P9</b>	23,33	24,00	1,03	0,02
14	<b>P41C1</b>	23,00	23,67	1,03	0,03
15	<b>P1M1</b>	23,00	23,33	1,01	0,03
16	<b>P75P1</b>	27,00	0,00	0,00	0,00
17	<b>P18E2</b>	19,33	0,00	0,00	0,00
18	<b><i>T. harzianum</i></b>	48,67	0,00	0,00	0,00

Øc= diâmetro da colônia (mm);  
 Øh= diâmetro do halo (mm);  
 i.e.= índice enzimático (Øh / Øc).  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o plaqueamento em rodamina B com óleo de oliva como substrato (teste qualitativo, ou seja, apenas indica a presença ou ausência de lipase através da fluorescência sob incidência da luz UV) (Figura 5), as seguintes linhagens foram avaliadas: P77C5, P50B2 e *A. niger* 12 (possíveis melhores produtores de lipase); *A. niger* C e *A. niger* 11T53A14 (produtores intermediários); P75P1, P18E2 e *T. harzianum* (controles negativos).

Os resultados destes plaqueamentos são apresentados na Tabela 4 e confrontados com os resultados obtidos com tributirina como substrato. Neste ensaio, as linhagens P77C5 e P75P1 apresentaram resultados negativos (ausência de lipase), enquanto que todas as outras linhagens apresentaram produção da enzima. Assim, obtiveram-se alguns resultados conflitantes entre os dois plaqueamentos testados: P77C5 apresentou halo quando plaqueado em tributirina e não apresentou fluorescência no teste da Rodamina B; e os fungos P18E2 e *T. harzianum* apresentaram fluorescência em Rodamina B, porém não apresentaram

halo hidrolítico quando cultivados em tributirina.

Assim como os plaqueamentos realizados por Gutarra e colaboradores (2005) também sugerem, os resultados deste trabalho mostram certo perfil de secreção das enzimas lipases e esterases pelos diferentes fungos: a linhagem P77C5 somente apresentou halo de hidrólise para substrato de cadeia curta (tributirina, C4) indicando uma predominância na produção de esterases, enquanto que as linhagens P18E2 e *Trichoderma harzianum* apresentaram halo de hidrólise para substrato de cadeia longa (óleo de oliva, majoritariamente C18) indicando que produzem predominantemente lipases. Os demais fungos provavelmente sintetizam as duas referidas enzimas, com exceção do fungo P75P1 que não apresentou nenhum halo hidrolítico.

Figura 5 – Plaqueamento com óleo de oliva como substrato e Rodamina B. Fotos tiradas após 96 h de plaqueamento da linhagem *Trichoderma harzianum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Diferença de padrão detectável de atividade lipolítica de fungos filamentosos da coleção Embrapa na presença de substratos com tamanhos de cadeias carbônicas diferentes: Tributirina (C4) e óleo de oliva (majoritariamente C18) na presença do corante rodamina B.

Fungos	Tributirina			Óleo de oliva e rodamina B	
	Média Øc	Média Øh	i.e.	Desvio Padrão	Revelação sob U.V.
1 <b>P77C5</b>	6,67	11,67	1,75	0,10	-
2 <b>P50B2</b>	11,67	19,33	1,66	0,02	+
3 <b>A. niger 12</b>	21,67	29,00	1,34	0,02	+
4 <b>A. niger C</b>	26,33	29,67	1,13	0,04	+
5 <b>A. niger 11T53A14</b>	21,67	24,00	1,11	0,03	+
6 <b>P75P1</b>	27,00	0,00	0,00	0,00	-
7 <b>P18E2</b>	19,33	0,00	0,00	0,00	+
8 <b>T. harzianum</b>	48,67	0,00	0,00	0,00	+

Øc= diâmetro da colônia (mm);

Øh= diâmetro do halo (mm);

i.e.= índice enzimático (Øh / Øc);

(+) = presença de halo lipolítico fluorescente;

(-) = ausência de halo lipolítico fluorescente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

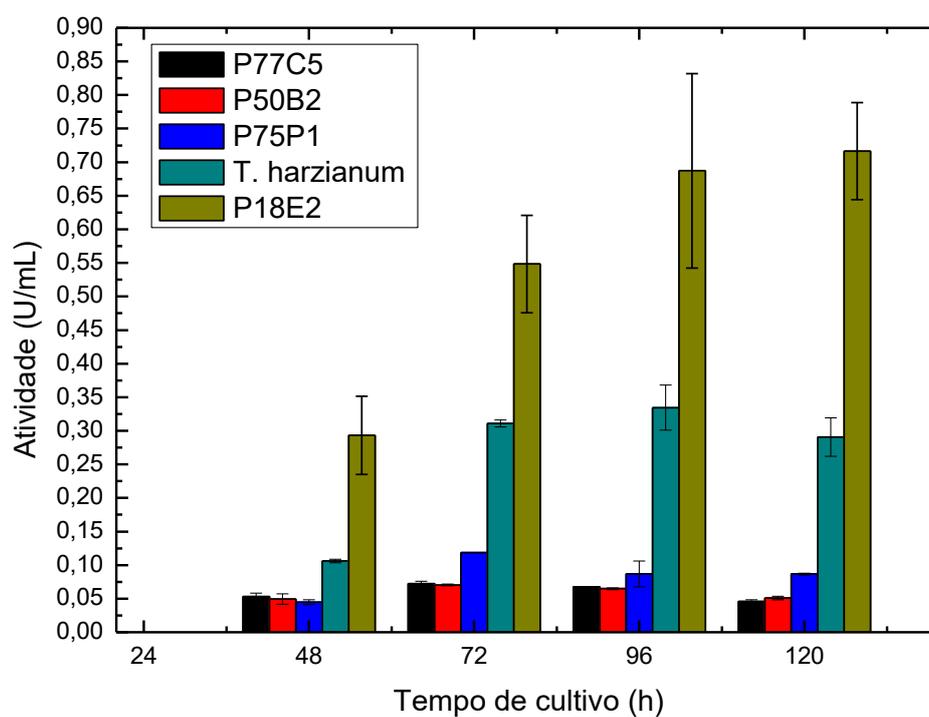
## 5.2 Cultivo dos microrganismos

Foram realizados cultivos por FES com farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor (uma das principais condições descritas na literatura para indução de lipases, conforme mostra Tabela 5) para as 8 linhagens testadas com o plaqueamento em rodamina B e óleo de oliva a fim de confirmar o potencial de produção de lipases das diferentes linhagens de fungos, uma vez que os plaqueamentos em distintos meios diferenciais apresentaram resultados divergentes para certas linhagens, em uma situação real de fermentação e dosadas as atividades lipolíticas, inicialmente através do método espectrofotométrico utilizando o p-NPP (para-nitrofenil-palmitato SIGMA, substrato sintético) (Figura 6).

Como os extratos das linhagens de *A. niger* são de coloração escura (Figura 7), não foi possível dosar a atividade desses extratos utilizando o método do p-NPP. Portanto, optou-se pela titulação dos ácidos graxos liberados da hidrólise do óleo de

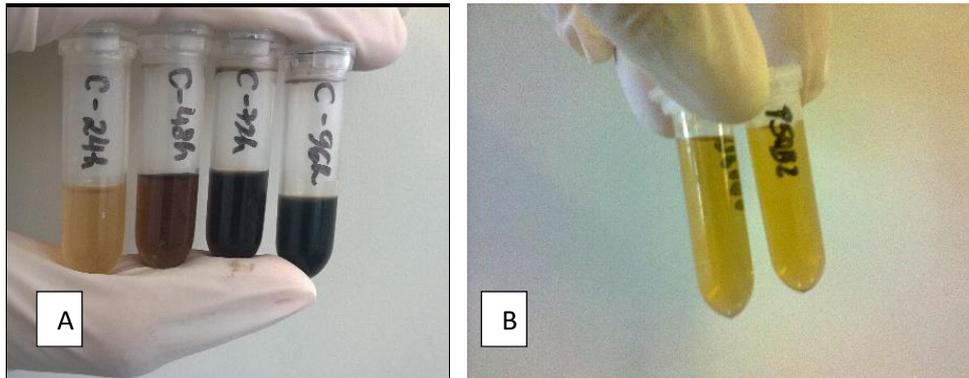
oliva (substrato natural) para prosseguir com os experimentos e poder comparar todas as linhagens (Figura 8). A partir da compilação de todos os resultados anteriores e, principalmente dos resultados obtidos na fermentação, selecionou-se o fungo *A. niger* C para continuidade dos experimentos previstos neste projeto, já que esta linhagem apresentou os maiores níveis de atividade lipolítica (42,67 U<sub>azeite</sub>/mL) dentre as demais linhagens durante o cultivo por FES em farelo de trigo.

Figura 6 – Gráfico das atividades lipolíticas quantificadas pelo método do pNPP durante 120 h de cultivo em FES a 30°C contendo farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor.



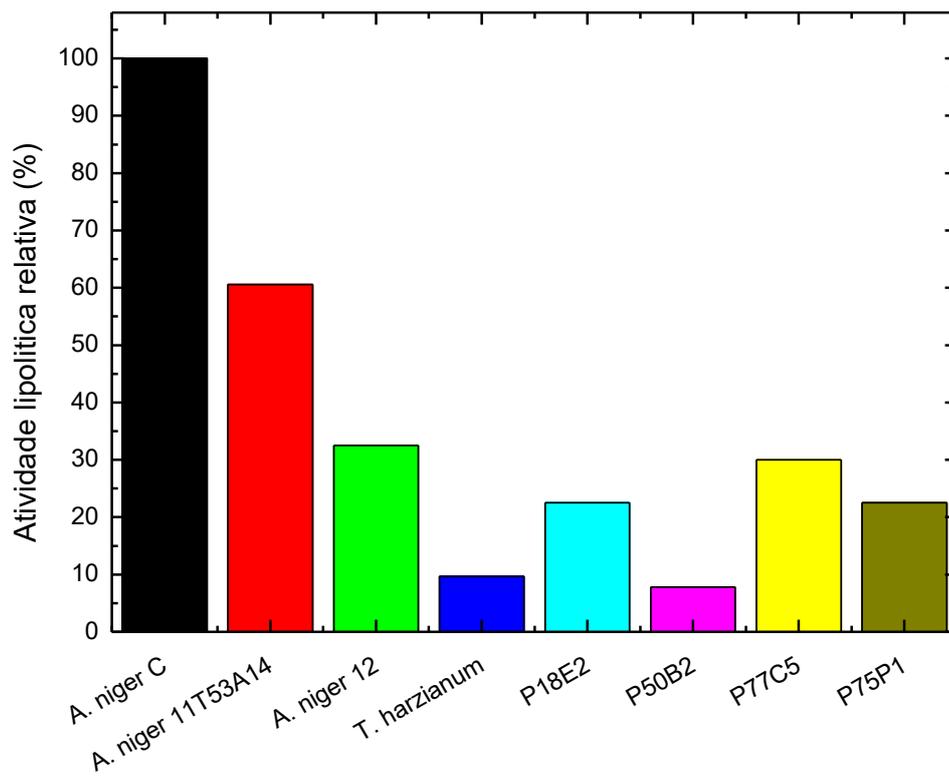
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – (A) Extratos escuros da linhagem *A. niger* C; (B) Extratos mais claros da linhagem P50B2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Gráfico das atividades lipolíticas após 72 h de cultivo em FES a 30°C contendo farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor das 8 linhagens selecionadas na etapa de triagem.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Dados da literatura para produção de lipases por diferentes fungos e condições de cultivos para FES.

<b>Microrganismo</b>	<b>Biorreator</b>	<b>Substrato</b>	<b>Fonte C</b>	<b>Fonte N</b>	<b>Indutor</b>	<b>Condições do cultivo</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Frascos cônicos	Torta de dendê	-	Sulfato de amônio 1,2%	Borra alcalina de dendê	96h, 30°C e pH7,0	77,05 U <sub>(azeite)</sub> /gms	Silveira et al. (2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	Frascos cônicos	Farelo de trigo + torta de mamona	Glicose 2%	Sulfato de Amônio 0,75% + Uréia 0,34%	*Óleo de mamona 3,6%	96h, 30 °C e pH7,0	121,35 U <sub>pNPB</sub> /gms	Toscano et al. (2013b)
<i>Aspergillus niger</i>	Frascos cônicos de 250 mL	Farelo de trigo	Glicose 1,5%	Sulfato de Amônio 0,75% + Uréia 0,34%	Óleo de oliva 1,5%	7 dias, 30 °C	9,14 U <sub>pNPP(propiontao)</sub> /gms	Falony et al. (2006)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	Frascos cônicos de 500 mL	Farelo de trigo	-	NaNO <sub>3</sub> 0,05% + extrato de levedo 0,1% + peptona 0,5%	Óleo de oliva 1%	6 dias, 30 °C e pH5,5	305 U <sub>pNPP</sub> (palmitato)/gms	Mahadik et al. (2002)
<i>Penicillium camembertii</i> KCCM 11268	Frascos cônicos de 250 mL	Farelo de trigo	-	Sulfato de amônio 1%	Óleo de oliva 1%	8 dias, 30 °C e pH6,0	97,5 U/gms (dosagem dos ácidos graxos liberados em espectrofotômetro)	Malilas et al. (2013)

<i>Penicillium chrysogenum</i>	Frascos cônicos	Farelo de trigo	Glicose 2%	Sulfato de Amônio 0,75% + Uréia 0,34%	Óleo de oliva 2%	120h, 30 °C e pH7,0	19,97 U <sub>(pNPB)</sub> /gms	Toscano et al. (2013a)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Biorreator de leite fixo	Torta de babaçu	Melaço de cana	Melaço de cana	-	27 °C	26,4 U <sub>(azeite)</sub> /gms	Cavalcanti et al. (2005)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Biorreator do tipo bandeja	Torta de babaçu	Melaço de cana	Melaço de cana	-	48h, 30°C	20,2 U <sub>(azeite)</sub> /gms	Gutarra et al. (2007)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Biorreator do tipo coluna	Bagaço de cana-de-açúcar	Lactose 0,5%	Uréia 0,4%	Óleo de oliva 4%	12h, 40 °C e pH6,4	1500 U <sub>(azeite)</sub> /gms	Mateos Diaz et al. (2006)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Frascos cônicos	Farelo de trigo	Glicose 2%	Sulfato de Amônio 0,75% + Uréia 0,34%	Óleo de oliva 2%	120h, 30 °C e pH7,0	77,2 U <sub>(pNPB)</sub> /gms	Toscano et al. (2013a)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Frascos cônicos de 250 mL	Farelo de trigo	Glicose 1,5%	Sulfato de Amônio 0,75% + Uréia 0,34%	Óleo de oliva 2%	6 dias, 29 °C, pH6,0	71,3 U <sub>(pNPB)</sub> /gms	Toscano et al. (2013b)

\*Conteúdo de óleo presente na torta de mamona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez avaliados os fungos filamentosos, foram realizados os cultivos em diferentes processos fermentativos envolvendo a linhagem *A. niger* C (linhagem que mais se destacou na etapa de triagem utilizando farelo de trigo e óleo de oliva), partindo da FES e FSm, até finalizar com os ensaios de FC.

O resíduo industrial (borra alcalina de dendê) utilizado nesta etapa do estudo é o principal subproduto da indústria de refino de óleos vegetais. São sabões de sódio formados durante o primeiro refino do óleo bruto através da reação de neutralização para extração dos ácidos graxos livres com hidróxido de sódio. O óleo neutro (ou acilgliceróis) nessa borra alcalina está disponível para o crescimento do fungo e produção de lipase (DOWD, 1996; TRICHES et al., 2008). A borra de dendê, utilizada neste trabalho como indutor para a produção de lipases, é sólida na temperatura de 30° C, fato que configura um ponto importante a ser considerado antes da escolha do tipo de bioprocessamento a ser realizado – FES ou FSm. A utilização da borra alcalina na FES mostrou resultados de produção enzimática com menores desvios entre as repetições, uma vez que todo o cultivo ocorre em meio (fibra de dendê) e indutor (borra alcalina) sólidos. Já na FSm ocorre diferenças na disponibilidade/solubilização do indutor em meio líquido, o que fornece desvios maiores na produção de lipases, ainda que ocorra uma produção considerável das referidas enzimas.

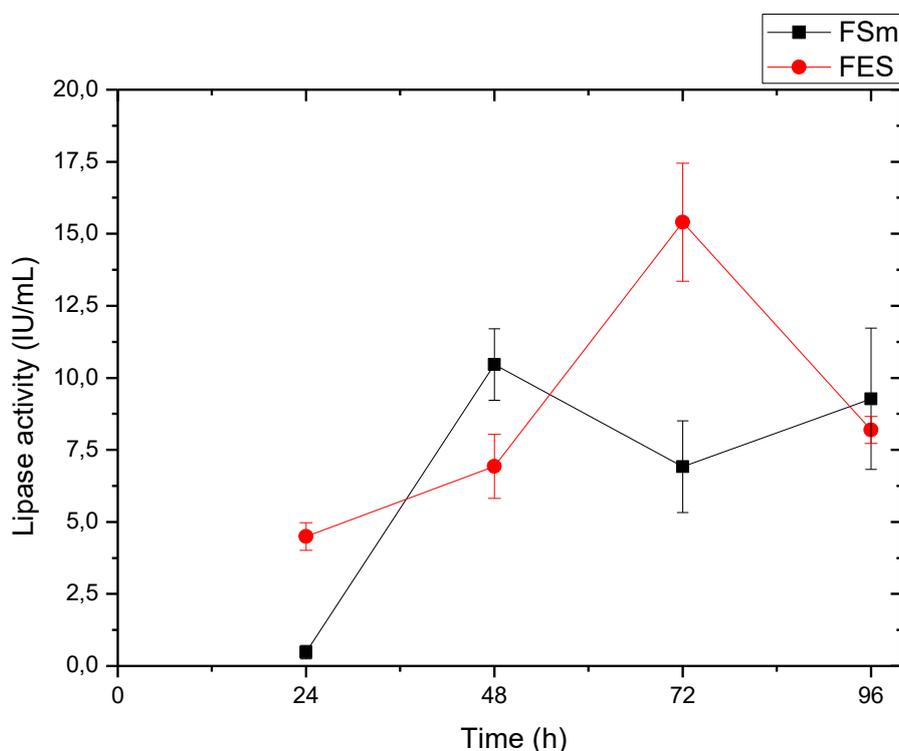
As Figuras 9 e 10 mostram os resultados de atividade lipolítica volumétrica e específica, respectivamente, em cultivos contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê. Para os cultivos em FES, a atividade volumétrica máxima de lipases foi obtida em 72 h de fermentação (15,41 UI/mL), enquanto que para os cultivos realizados em FSm a atividade volumétrica máxima foi obtida em 48 h (10,46 UI/mL). Há de se destacar os maiores valores de atividade específica para o cultivo realizado em FSm com uma atividade específica máxima em 48 h, enquanto que para o cultivo em FES a atividade específica permanece num nível praticamente constante durante toda a fermentação.

Estes resultados mostram-se interessantes quando comparados com aqueles previamente reportados na literatura. Nos trabalhos realizados por Toscano e colaboradores (2011), os níveis de atividade foram medidos também com base no método de titulação do óleo de oliva utilizando uma linhagem selvagem e outra mutante de *Aspergillus niger*. A linhagem selvagem desenvolveu uma atividade de

7,5 UI/mL enquanto que a mutante apresentou 15,5 UI/mL após 96 h de cultivo, ambos cultivados por FSm com meio líquido nutriente igual ao deste trabalho.

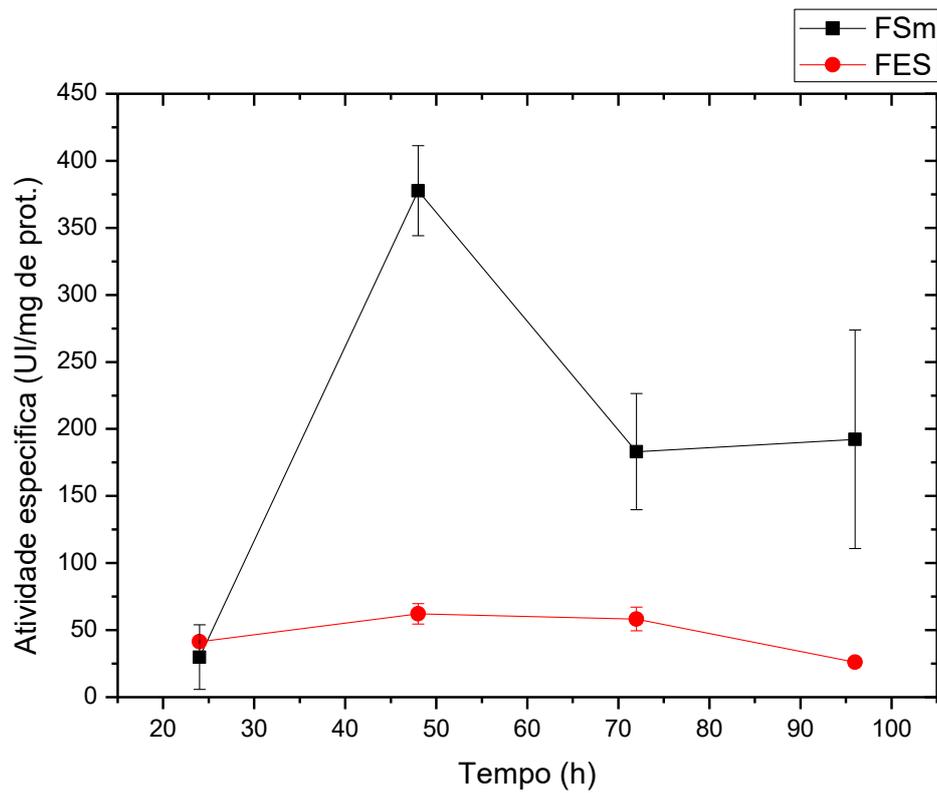
Falony e colaboradores (2006) e colaboradores testaram a produção de lipases por *Aspergillus niger* J-1 em FSm e FES utilizando meio de cultura mineral e farelo de trigo como suporte, respectivamente. Foi obtida uma atividade máxima de lipase de 1,46 IU/mL para a FSm em meio contendo 2% de glicose e 2% de azeite de oliva. Entretanto, para a FES contendo 0,75% de sulfato de amônio e 0,34% de uréia, a atividade máxima obtida foi de 4,8 IU/mL, ambos através de método espectrofotométrico (hidrólise do p-nitrofenil-propionato). Coradi e colaboradores (2013) obtiveram 1,4 U/mL de atividade lipolítica, mensurados pelo método do p-NPP, para ensaios realizados em FSm em meio contendo 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 1% (v/v) de azeite e razão C:N de 2,5.

Figura 9 – Gráfico das atividades volumétricas de lipases da linhagem *A. niger* C em cultivos a 30°C (FSm e FES) contendo os resíduos agroindustriais fibra e borra alcalina do processamento do dendê.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Gráfico das atividades específicas de lipases da linhagem *A. niger C* em cultivos a 30°C (FSm e FES) contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.

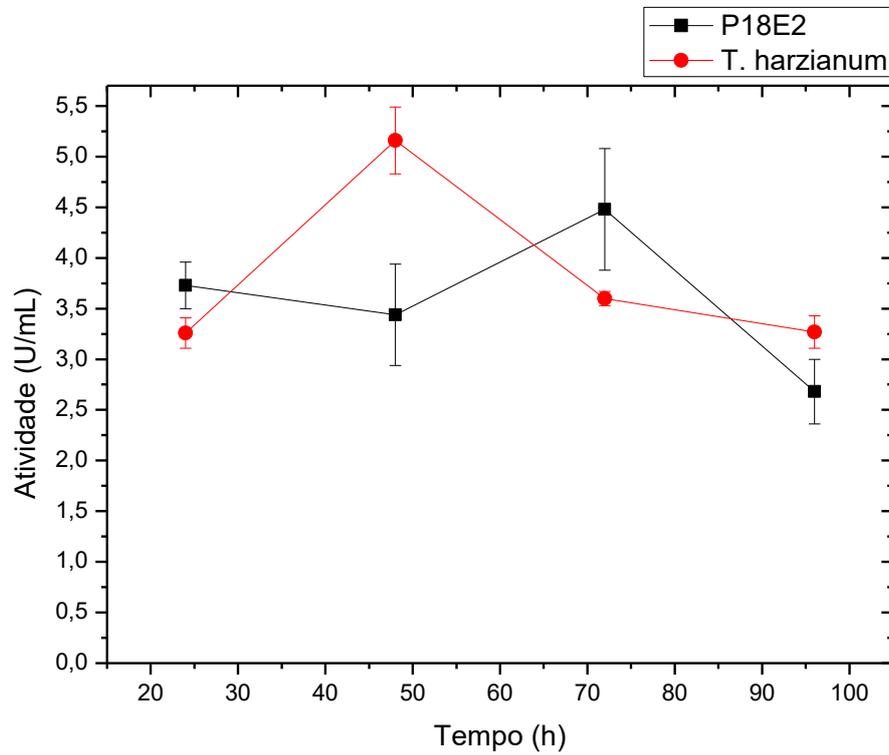


Fonte: Elaborado pelo autor.

Ambos os bioprocessos (FES e FSm) foram realizados exatamente da mesma forma como os descritos anteriormente para a linhagem *A. niger C*, isto é, foram também utilizados os resíduos industriais do processamento do dendê para o cultivo de outras duas linhagens de fungos filamentosos: *Trichoderma harzianum* e P18E2. Os resultados seguem na Figura 11. Nenhuma destas duas linhagens apresentou níveis de atividade lipolítica detectáveis em FSm, somente apresentaram uma atividade volumétrica relativamente baixa quando cultivadas em FES. No entanto, quando se trata de atividade específica (Figura 12), a linhagem P18E2 possui níveis bem maiores que, inclusive, se aproximam aos níveis da linhagem *A. niger C* em FES, indicando possuir um extrato com maior concentração de lipases ao se levar em consideração a dosagem de proteínas totais. Portanto, frente a baixa atividade lipolítica obtida na FSm, não foram feitas fermentações combinadas, pois as atividades não seriam detectáveis em grande volume de meio. Porém, estas linhagens podem ser exploradas futuramente para produção de lipases em cultivo

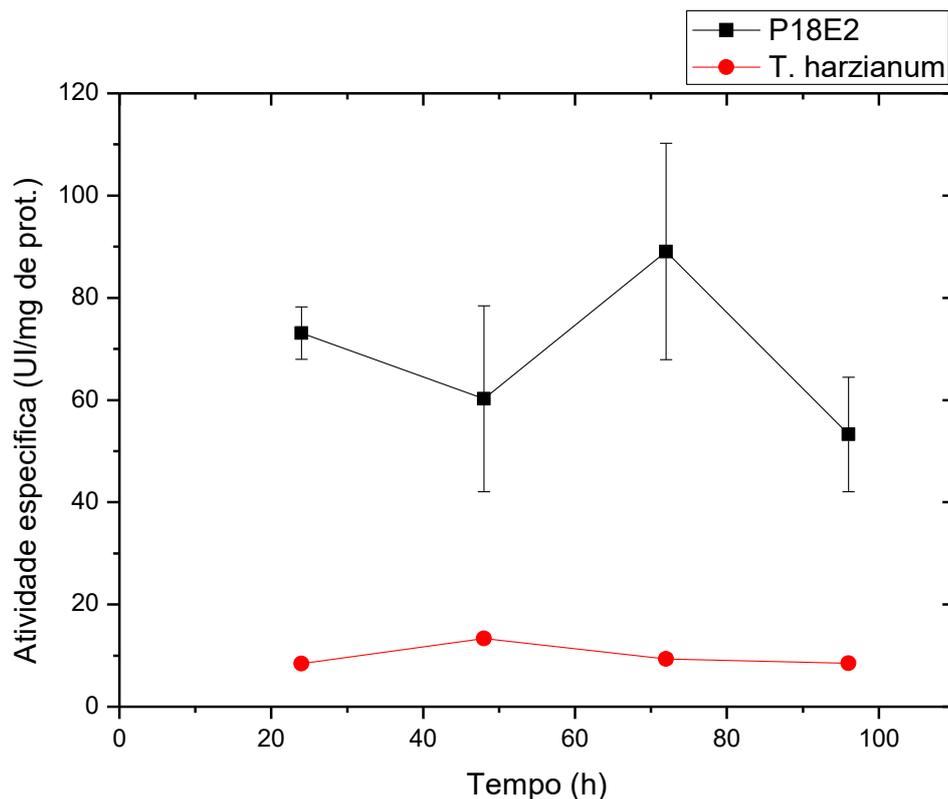
sólido e, claro, não somente utilizando o resíduo de dendê como substrato.

Figura 11 – Gráfico das atividades volumétricas de lipases das linhagens *T. harzianum* e P18E2 em cultivos por FES a 30°C contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Gráfico das atividades específicas de lipases das linhagens *T. harzianum* e P18E2 em cultivos por FES a 30°C contendo os resíduos agroindustriais do processamento do dendê.

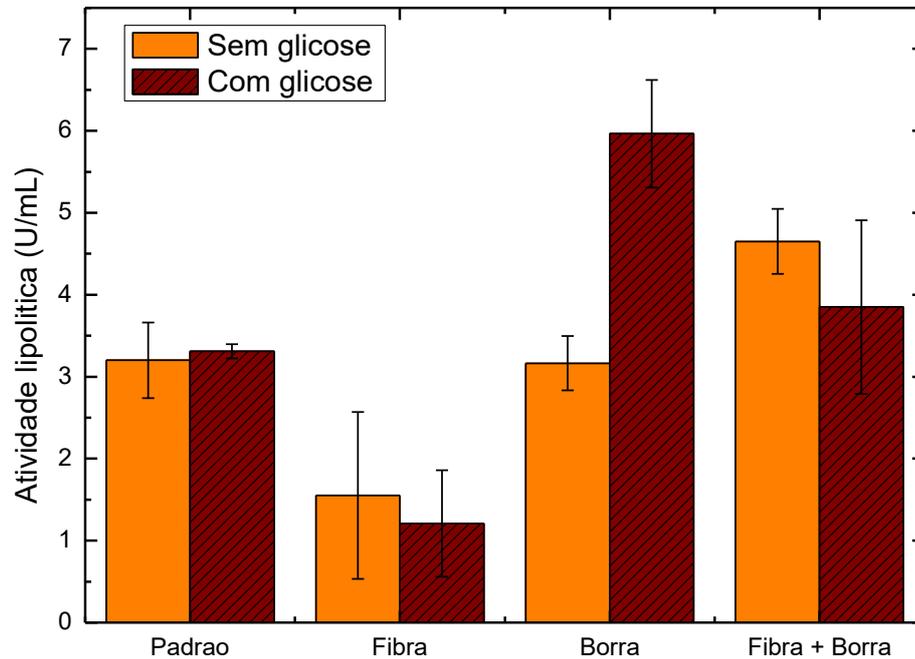


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para os resultados em FC, não foi possível detectar atividade lipolítica dos extratos utilizando a linhagem *A. niger* C. Há hipótese de que algum inibidor possa ser extraído para o meio líquido durante a fase de pré-inóculo da FC, uma vez que está presente grande quantidade de resíduo sólido do processamento do dendê (torta) em contato com este meio nutriente líquido, culminando na não produção de lipases – o que não ocorre na FES nem na FSm. De fato, como é mostrado na figura 13, quando se utiliza a fibra como indutor, há um decréscimo de atividade de 2,0-2,7 vezes em comparação com a fermentação padrão realizada apenas na ausência ou presença de 10 g/L de glicose (sem indutores). Na presença também da borra alcalina como indutor, há um aumento de aproximadamente 2 vezes na atividade lipolítica em fermentação conduzida com glicose no meio. Porém, quando foi adicionado fibra e borra juntos ao bioprocessamento, na presença de glicose, foi possível observar um decréscimo de 1,5 vezes na atividade, provavelmente devido a algum

inibidor presente na fibra, o qual é extraído para o meio líquido e influencia negativamente na produção de lipase.

Figura 13 – Ensaio fermentativo evidenciando possíveis indutores/inibidores da atividade lipolítica em FSm na presença e/ou ausência de 10 g/L de glicose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 Caracterização bioquímica da lipase de *A. niger* C livre do extrato bruto da FES

Os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade da lipase no extrato enzimático bruto obtido após 72 h de FES utilizando a linhagem *A. niger* C foram avaliados através de planejamento estatístico de experimentos e análise de superfície de resposta. A Tabela 6 apresenta os resultados do planejamento fatorial completo para a atividade da lipase. A análise de ANOVA para a atividade da lipase (Tabela 7), com F 3,53 vezes superior ao valor F tabelado (confiança de 90%),

mostrou uma predição satisfatória do modelo utilizado para gerar o gráfico de superfície de resposta da atividade enzimática como uma função de pH e temperatura (Figura 14). O gráfico de superfície de resposta mostra valores mais elevados de atividade lipásica para valores de pH na faixa de 4,0 a 6,5 e para valores de temperatura entre 37 e 55°C.

Uma vantagem do uso da metodologia de planejamento experimental foi o fato de se identificar faixas ótimas de pH e de temperatura para a atividade enzimática e não um ponto específico, permitindo, assim, maior flexibilidade durante as operações do processo. O maior valor de atividade enzimática foi encontrado para as condições do ponto central do planejamento experimental (pH 5,0 e 45°C). No entanto, é importante notar que tais valores de atividade estão dentro da faixa ótima mostrada no gráfico de superfície, em que os valores não são estatisticamente diferentes. Em termos de pH e temperatura ótimos, esta lipase mostrou propriedades em comum com as lipases de outras linhagens de *A. niger*, pois tais linhagens apresentam lipases geralmente ativas numa faixa de pH entre 4 e 7 e numa faixa de temperatura entre 40 e 55°C. Kamini e colaboradores (1998) produziram uma lipase de *A. niger* por FES com óleo de gergelim e obtiveram uma lipase que apresentou atividade ótima a pH 7 e 37°C. Outra lipase do fungo *A. niger* cultivado em FES com farelo de trigo foi relatada como sendo mais ativa em pH 6 e temperatura em torno de 40°C (FALONY et al., 2006). Os presentes dados estão, portanto, de acordo com o reportado anteriormente na literatura para as lipases de *A. niger*.

Tabela 6 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental estatístico para atividade de lipase dos extratos produzidos em FES por *A. niger* C utilizando os resíduos da indústria de óleo de dendê.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade (IU/mL)
			Média
1	3,6 (-1)	35 (-1)	7,90
2	3,6 (-1)	55 (1)	7,86
3	6,4 (1)	35 (-1)	9,93
4	6,4 (1)	55 (1)	9,41
5	3,0 (-1,41)	45 (0)	7,21
6	7 (1,41)	45 (0)	8,67
7	5,0 (0)	30,9 (-1,41)	9,03
8	5,0 (0)	59,1 (1,41)	7,30
9	5,0 (0)	45 (0)	11,00
10	5,0 (0)	45 (0)	10,43
11	5,0 (0)	45 (0)	11,20

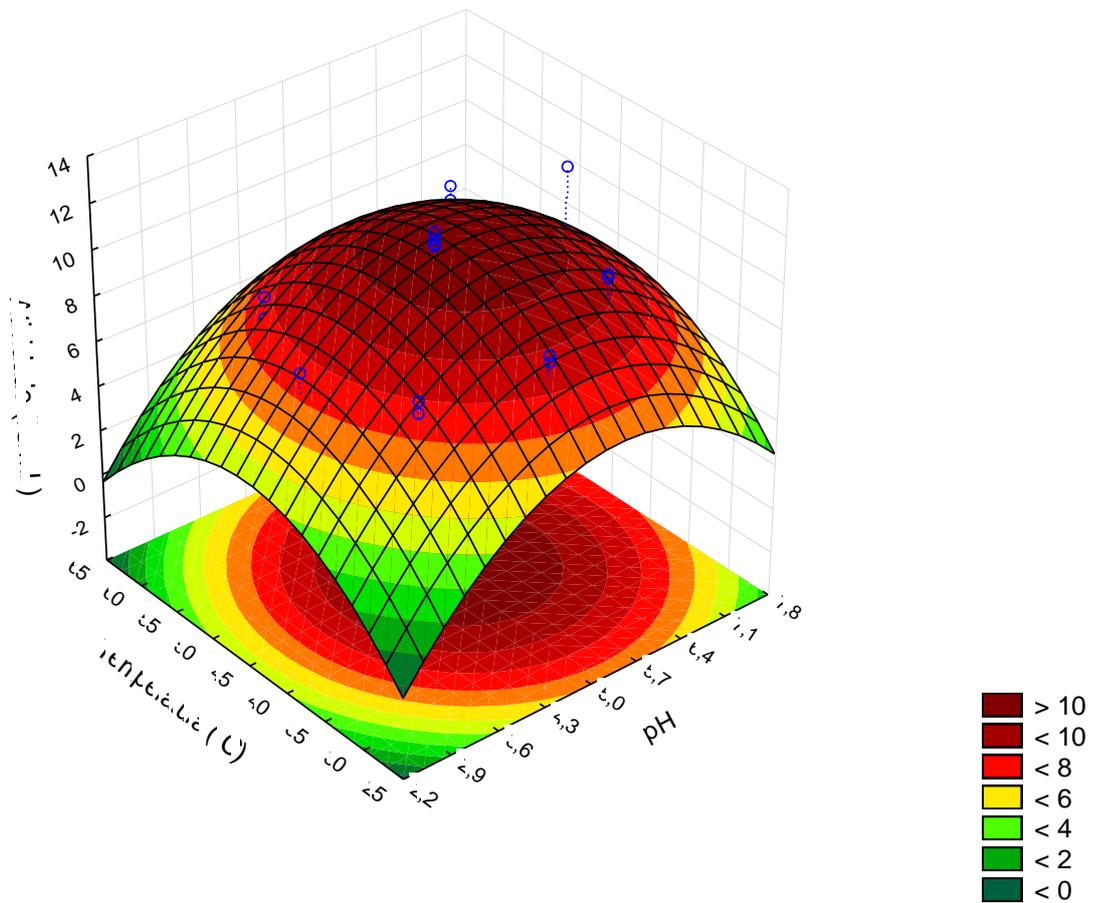
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Valores de coeficientes e análise estatística da atividade da lipase nos extratos produzidos por *A. niger* cultivados sob FES utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma.

Fator	coeficiente	p-valor
pH	0.70456	0.041152
pH <sup>2</sup>	-1.28240	0.003460
T <sup>2</sup>	-1.17365	0.006480
R <sup>2</sup>	0.54	
$F_{\text{tabelado}}$	8.54	
$F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$	3.53	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Superfície de resposta mostrando o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato bruto produzido por *A. niger* C cultivado em FES.



Fonte: Elaborado pelo autor.

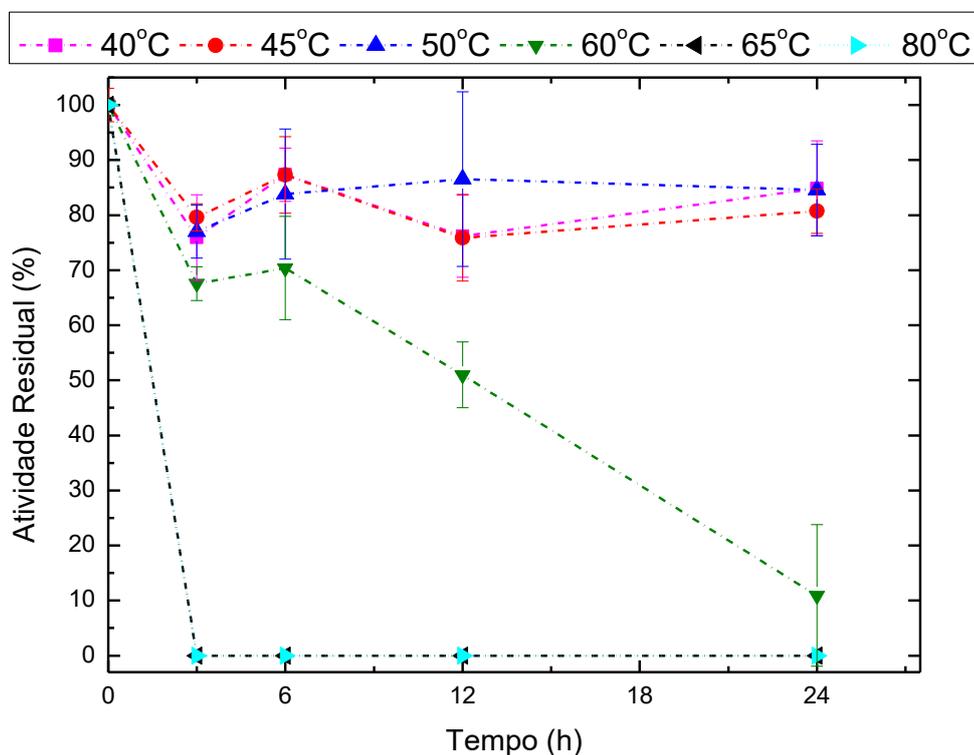
#### 5.4 Inativação térmica em meio aquoso da lipase livre de *A. niger* C do extrato bruto da FES

A estabilidade térmica da lipase produzida por FES utilizando *A. niger* C e os resíduos do processamento do óleo de palma é mostrada na Figura 15. Foram utilizados períodos de incubação total de 24 h a 40, 45, 50, 60, 65 e 80°C. A lipase incubada a temperaturas de 40, 45 e 50°C manteve-se altamente estável, com retenção de cerca de 80% da sua atividade inicial no final do período de 24 h. Estas temperaturas situam-se dentro da faixa ótima de temperatura previamente

evidenciada pela superfície de resposta (Figura 14). No entanto, observou-se uma diminuição significativa da atividade a 60°C, com aproximadamente 10% de atividade residual após 24 h. A lipase mostrou perda total de atividade hidrolítica após 3 h de exposição a 65 e 80°C.

As lipases produzidas neste estudo demonstraram estabilidade térmica favorável quando comparadas às lipases produzidas anteriormente utilizando linhagens de *Aspergillus*. Por exemplo, a lipase de *A. niger* cultivada em FES com farelo de trigo reteve 60% da sua atividade após exposição a 50°C durante 24 h (FALONY et al., 2006). A estabilidade térmica da lipase também foi melhor quando comparada com as enzimas de outras linhagens fúngicas. Gutarra e colaboradores (2009) relataram uma rápida perda da atividade das lipases de *Penicillium simplicissimum* submetidas a uma temperatura de 50°C, com meia-vida de 5 h a pH 5. É amplamente reconhecido que uma característica importante para as enzimas usadas em aplicações industriais seja a estabilidade frente a altas temperaturas devido às taxas de reação mais altas associadas, e por isso há uma grande demanda por enzimas termoestáveis em aplicações industriais (HASAN et al., 2006). No entanto, a maioria das lipases produzidas pelos fungos mesofílicos que têm sido relatados na literatura têm baixa estabilidade térmica, com perda da maior parte da atividade a temperaturas acima de 40°C. No presente estudo, a lipase de *A. niger* produzida utilizando o resíduo de óleo de palma apresentou uma estabilidade térmica muito satisfatória na faixa de 40 a 50°C, durante um período relativamente longo (24 h), o que poderia ser de interesse considerável em aplicações industriais.

Figura 15 - Termoestabilidade da lipase presente nos extratos produzidos por *A. niger* C utilizando os resíduos da indústria de óleo de palma após 72h de FES.



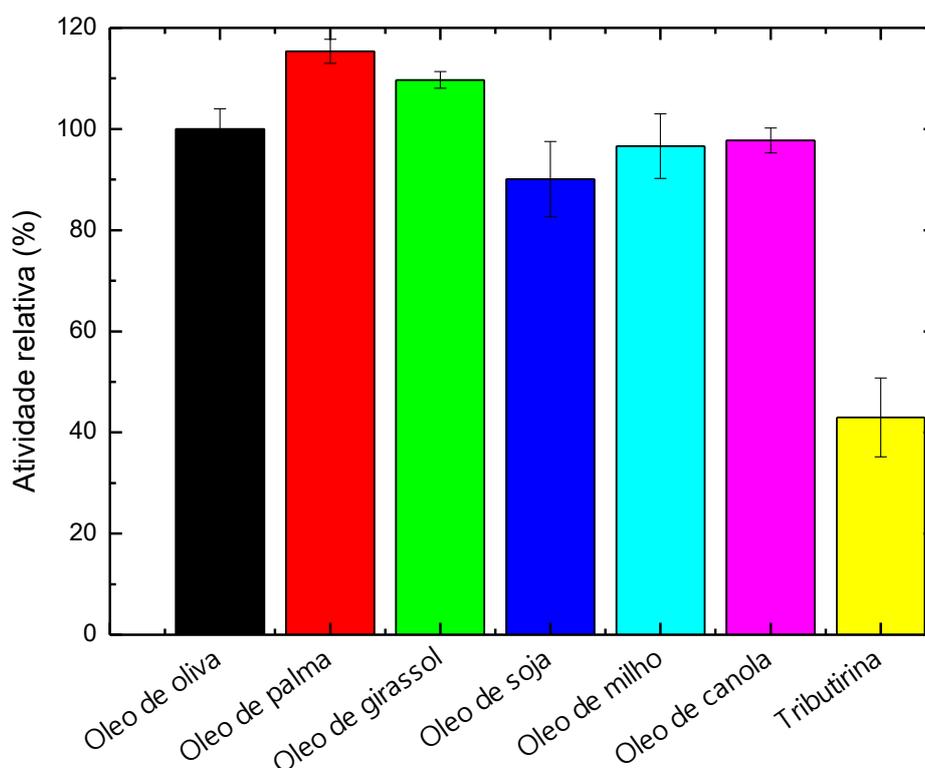
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5 Especificidade da lipase livre de *A. niger* C no extrato bruto da FES frente a diferentes substratos oleosos

A lipase produzida por cultivo em FES utilizando *A. niger* C e resíduos industriais de óleo de palma apresentou maior especificidade para a hidrólise dos acilglicerídeos de cadeia carbônica longa presentes no óleo de palma, no óleo de girassol e no óleo de oliva, e apresentou ainda uma menor atividade para o substrato de cadeia carbônica curta tributrina (Figura 16). Esta é uma propriedade muito importante, confirmando que esta enzima de *A. niger* C pode ser classificada como uma lipase verdadeira (HOUDE et al., 2004). A elevada especificidade da lipase de *A. niger* para os acilgliceróis de cadeia longa obtida a partir de cultivos em FES pode estar relacionada com o substrato usado como indutor. O gráfico da figura

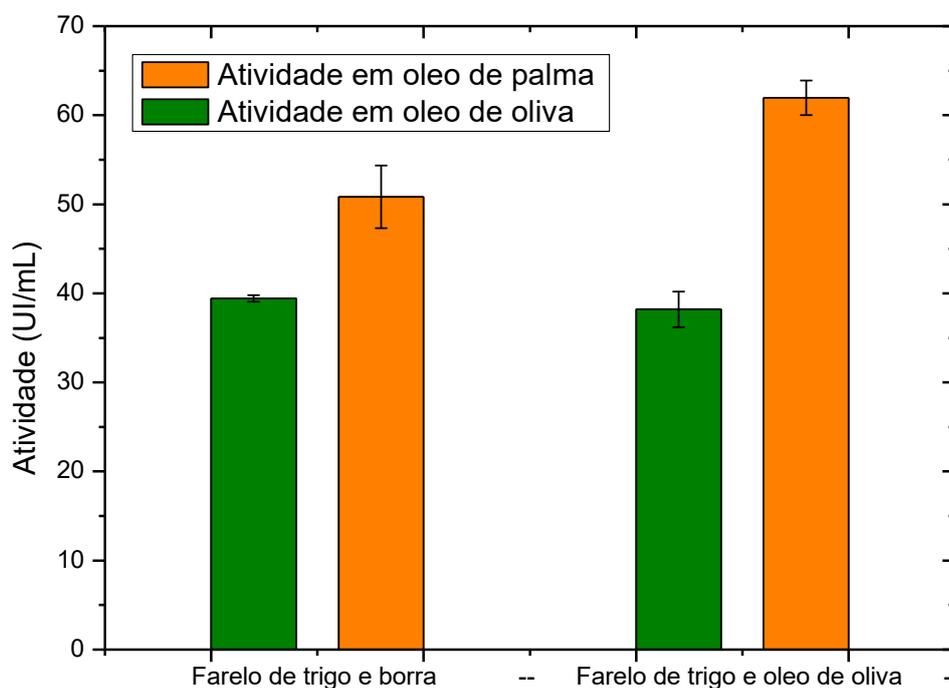
17 mostra que a lipase é produzida em quantidade semelhante mesmo quando se utilizam indutores diferentes na etapa de fermentação, porém evidencia ainda uma maior atividade lipolítica quando se utiliza o óleo de palma para determinação do valor da atividade, isto é, trata-se de uma lipase com maior especificidade para substratos de cadeia longa e saturada, uma vez que uma característica do óleo de palma é que este contém proporções semelhantes de ácidos graxos saturados (43,7% ácido palmítico, C16:0) e ácidos graxos monoinsaturados (40,2% de ácido oleico, C18: 1) (TAN et al., 2009). A aplicação bem-sucedida de lipases em processos industriais também requer esta especificidade (HASAN et al., 2006). A lipase de *A. niger* produzida sob FES utilizando resíduos industriais de óleo de palma é, portanto, um candidato promissor para utilização em aplicações industriais envolvendo transformações biotecnológicas.

Figura 16 - Especificidade da lipase de *A. niger* frente a diferentes substratos oleosos emulsificados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Diferentes indutores na produção de lipases por *A. niger* C através de FES e utilização de diferentes substratos oleosos emulsificados na determinação da atividade hidrolítica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.6 Imobilização das lipases de *A. niger* C (extrato bruto da FES) e de *Thermomyces lanuginosus* (preparação líquida comercial)

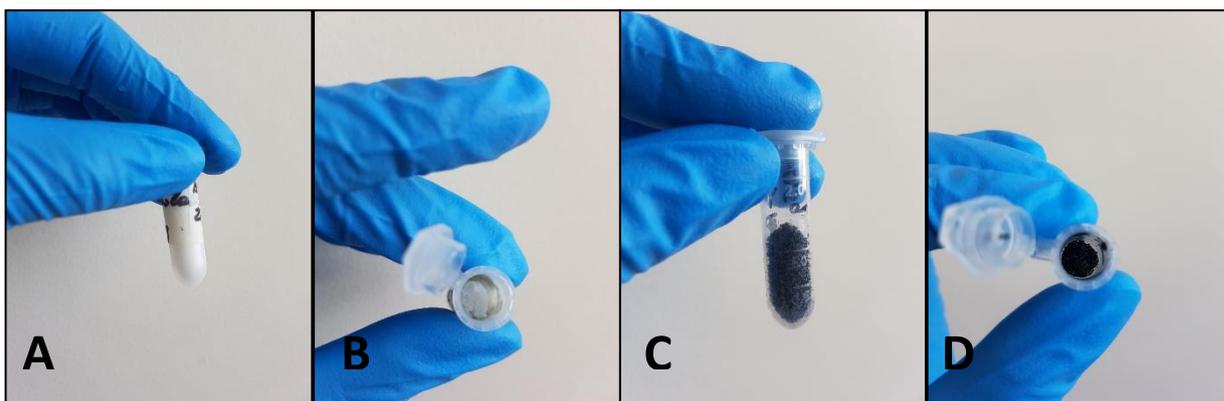
Nesta etapa do trabalho foram realizados experimentos a fim de imobilizar seletivamente as lipases do fungo filamentoso *A. niger* C (LAN) presentes no extrato bruto da FES e as lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) (Novozymes). Foram conduzidas imobilizações por adsorção em suportes hidrofóbicos para as diferentes lipases utilizadas neste estudo. Para a lipase de *Aspergillus niger* (LAN), foram utilizados os suportes Octil-sílica (OS) e Purolite C18. Já para a lipase comercial LTL, foram utilizados todos os suportes descritos no item 4.1.2.

Preliminarmente, foi oferecido o suporte Purolite diretamente ao extrato bruto na tentativa de imobilizar seletivamente as lipases na proporção de 30,0 mL de extrato, o qual continha 0,70 mg de proteínas por mililitro, para cada 0,5 g de suporte (42 mg de proteínas/g de suporte), visto que o suporte é bastante hidrofóbico e poderia imobilizar preferencialmente as lipases. Como se pode notar na figura 18, foi adsorvido também ao suporte algumas substâncias e proteínas não conhecidas além das lipases, tornando o derivado de coloração preta após 24 h de imobilização, enquanto que o derivado com a lipase comercial LTL permanece de coloração branca. Entretanto, quando o derivado da lipase de *Aspergillus niger C* imobilizada diretamente do extrato bruto em Purolite C18 (Puro-LAN-bruto) foi submetido à reação de hidrólise do pNPB em reator encamisado, foi detectada atividade de 26,98  $U_{pNPB}/g$ , mostrando que as lipases do extrato bruto foram imobilizadas e purificadas parcialmente a partir daquele extrato.

Ademais, também foram conduzidos os mesmos ensaios citados anteriormente, porém com a enzima comercial Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Novozyme) como um controle. Para esta lipase comercial foi oferecido 2,5 mg de proteína por cada grama de suporte Purolite. Após 24 h de imobilização, a atividade desenvolvida pelo derivado Puro-LTL (lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Purolite) apresentou a mesma coloração clara do suporte (Figura 18) e uma atividade de 35,54  $U_{pNPB}/g$ .

Ao final destes ensaios preliminares, também foi avaliada a metodologia de modificação do derivado com PEI (polietilenamina), a fim de se avaliar a influência deste recobrimento na estabilidade do biocalisador. Entretanto, o derivado de lipase de *Aspergillus niger C* que apresentava  $17,25 \pm 2,10 U_{pNPB}/g$  de atividade antes da modificação, passou a apresentar  $1,29 \pm 0,30 U_{pNPB}/g$  de atividade hidrolítica. Tais resultados levantam duas hipóteses a serem testadas futuramente: 1- Houve recobrimento do derivado com PEI acompanhado de um impedimento estérico e/ou difusional do substrato ao sítio ativo da enzima ou 2- Ocorreu a dessorção da lipase, esta se ligando ao polímero PEI em solução.

Figura 18 – Fotos dos derivados imobilizados de diferentes lipases no suporte Purolite ECR8806F. A e B: Derivado com a enzima comercial lipolase (lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Novozyme). C e D: Derivado com a enzima do extrato bruto da FES (*A. niger* C) após 72 h de cultivo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Bastida e colaboradores (1998) relatam que a lipase de *Rhizopus niveus* se imobiliza muito mais rapidamente em octyl-agarose quando a concentração de sulfato de amônio é diminuída. Descrevem ainda que a uma concentração de 10 mM de fosfato de sódio a imobilização é 6 vezes mais rápida do que na presença de 1 M de sulfato de amônio. Este comportamento é o inverso daquele mostrado numa adsorção hidrofóbica padrão de outras proteínas, isto é, neste caso, a taxa e o rendimento da adsorção aumentam fortemente quando altas concentrações de sulfato de amônio estão presentes. Sabendo disto, e tendo em mente também o fato de a extração das lipases ocorrer através da adição de tampão fosfato de sódio 100 mM, etapas adicionais como precipitação com acetona à frio e ressuspensão das enzimas em tampão de molaridade igual a 5 mM e pH 7,0 foram necessárias antes de submeter as lipases do extrato bruto de *A. niger* C ao processo de imobilização em si com a finalidade de favorecer a imobilização seletiva das lipases, além de promover a remoção de outras proteínas e moléculas interferentes presentes no extrato bruto (Figura 19).

Figura 19 - Derivado obtido com ensaio de imobilização da lipase de *A. niger* C feito antes da precipitação (preto) e depois da precipitação/resuspensão do extrato (mais claro), evidenciando a remoção parcial dos contaminantes presentes no extrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após os testes preliminares e novas fermentações para produção de lipases, a partir de um extrato bruto que continha 0,52 mg de proteínas totais para cada mililitro de extrato e uma atividade de hidrólise de 6,09 U<sub>(óleo oliva)</sub>/mL, foi conduzida a precipitação com acetona à frio na proporção de 1V (extrato) : 2V (acetona) durante 12 h. Após a precipitação e resuspensão (de forma a concentrar 3 vezes o extrato inicial, ou seja, parte-se de 15 mL de extrato bruto e, após precipitação, resuspende-se a um volume de 5 mL) das proteínas em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,0, a nova suspensão apresentou concentração de 0,34 mg de proteínas e revelou uma atividade de hidrólise de 13,15 U<sub>(óleo oliva)</sub>/mL. Desta forma, foi possível purificar parcialmente o extrato bruto, concentrando as lipases e eliminando interferentes. Ademais, a atividade específica partiu de um valor de 8,59 para 38,68 U/mg de proteínas, evidenciando um fator de purificação de 4,5. A Tabela 8 abaixo resume tais valores.

Tabela 8 – Purificação parcial da lipase presente no extrato bruto da FES de *Aspergillus niger* C após 72 h de cultivo através da precipitação com acetona à frio.

	[Proteínas] (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade Específica (U/mg de proteínas)	Rendimento (%)	Fator de purificação (n° de vezes)
<b>Extrato bruto</b>	0,52 ± 0,15	6,09	8,59	100	1
<b>Após Precipitação</b>	0,34 ± 0,05	13,15 ± 1,06	38,68 ± 3,11	71,98	4,50

U =  $\mu\text{mol}/\text{min}$

\*o processo de diálise não foi eficiente, pois pigmentos e substâncias desconhecidas presentes no extrato bruto entopem os poros da membrana de diálise.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, a partir da nova suspensão obtida, seguiu-se com os experimentos de imobilização da lipase de *A. niger* C (LAN) sobre o suporte hidrofóbico Purolite Lifetech™ ECR8806F. A imobilização foi acompanhada medindo-se a concentração de proteínas totais presentes no sobrenadante através da metodologia de (Bradford, 1976). Após 48 h de imobilização, o rendimento de imobilização foi de 52,17% e a atividade foi de 21,719 U<sub>(óleo oliva)</sub>/g de derivado. Como não houve diferença significativa no processo de imobilização para os tempos de 24 e 48 h, seguiu-se imobilizando as lipases para tempos limites de 24 h. Para a LTL imobilizada em Purolite, o rendimento de imobilização (em termos de atividade lipolítica no sobrenadante), a atividade recuperada e a atividade do derivado (em U/g) foram, respectivamente, 98,99%, 53,12% e 74,58. Quando foi oferecido o suporte Octil-Sílica à suspensão de LTL, os valores obtidos foram 98,97%, 70,99% e 193,36 respectivamente. Já para a lipase de *A. niger* imobilizada em Purolite, o rendimento de imobilização (em termos de proteínas totais no sobrenadante), a atividade recuperada e a atividade do derivado (em U/g) foram, respectivamente, 38,83%, 21,86% e 33,08. E, por fim, quando foi oferecido o suporte Octil-Sílica à suspensão de LAN, os valores obtidos foram 48,03%, zero e zero (conforme resume a Tabela 9). Todavia, há de se destacar um procedimento importante: a imobilização de LAN no suporte Octil-Sílica foi conduzida a partir do sobrenadante de uma primeira imobilização feita em Purolite no qual estavam presentes lipases não adsorvidas.

Tabela 9 - Resultado das imobilizações de LTL e LAN nos diferentes suportes após 24h. Carga oferecida igual a 10 mg de proteína / g de suporte.

Enzima	Suporte	RI (%) <sup>1</sup>	RI (%) <sup>2</sup>	AR (%)	A <sub>H</sub> (U/g)	Método análise
LTL	ECR8806F	-	98,99 ± 0,02	53,12 ± 4,93	74,58 ± 6,97	Hidrólise pNPB
	Octil-Sílica	-	98,97 ± 0,09	70,99 ± 6,61	193,36 ± 17,28	
LAN	ECR8806F	38,83 ± 2,94	28,10 ± 5,68	21,86 ± 5,71	33,08 ± 12,62	Hidrólise azeite
	Octil-Sílica	48,03 ± 9,93*	68,62 ± 1,61	0	0	

<sup>1</sup>Em termos de proteínas totais no sobrenadante

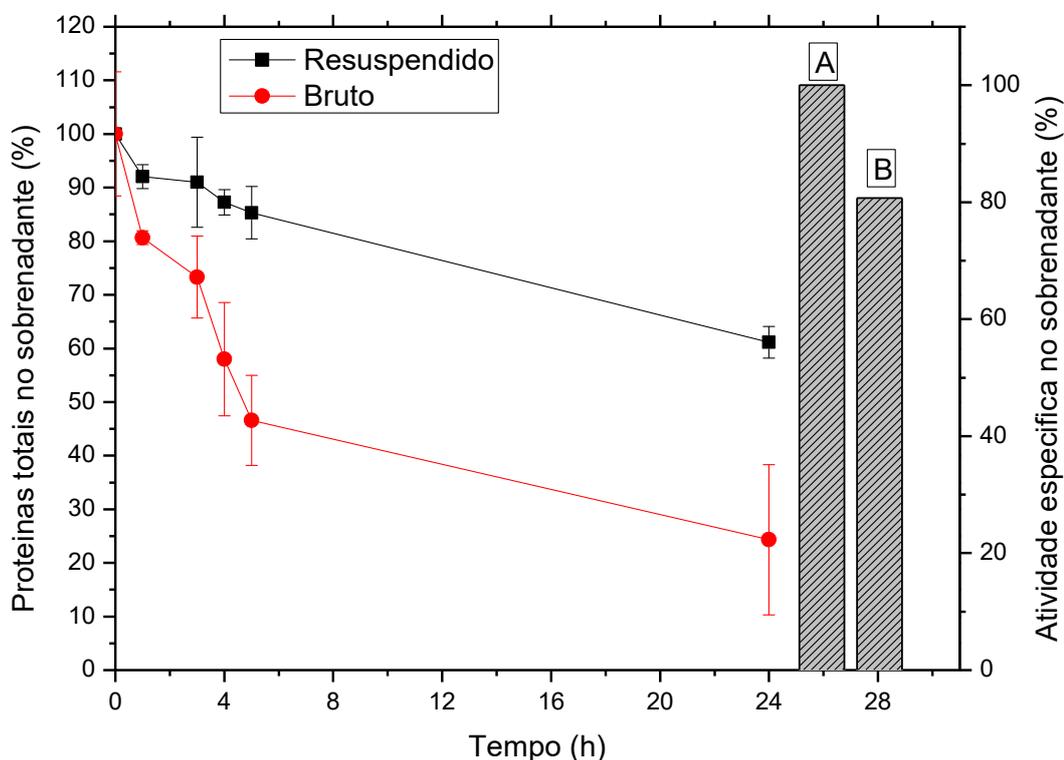
<sup>2</sup>Em termos de atividade lipolítica no sobrenadante

\*Foi oferecido o suporte Octil-Sílica ao sobrenadante final da imobilização em ECR8806F.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da análise da Figura 20, pode-se explicar de forma gráfica algumas particularidades destes procedimentos de imobilização da LAN produzida por FES. Nota-se que há uma imobilização mais intensa no extrato bruto em comparação com o extrato parcialmente purificado após a precipitação com acetona. Este fato se deve à imobilização das proteínas totais (e não somente das lipases) e moléculas interferentes presentes em maior quantidade no extrato bruto. Além disso, 80% da atividade específica dosada antes do início da imobilização ainda permanece no sobrenadante após 24 h de ensaio. De fato, ainda há a necessidade de realização de etapas adicionais de purificação das lipases do extrato bruto, ou mesmo de otimização da etapa de precipitação com acetona à frio, antes de se iniciar o processo de imobilização propriamente dito a fim de maximizar a quantidade de lipase imobilizada e melhorar o biocatalizador produzido ao final do processo.

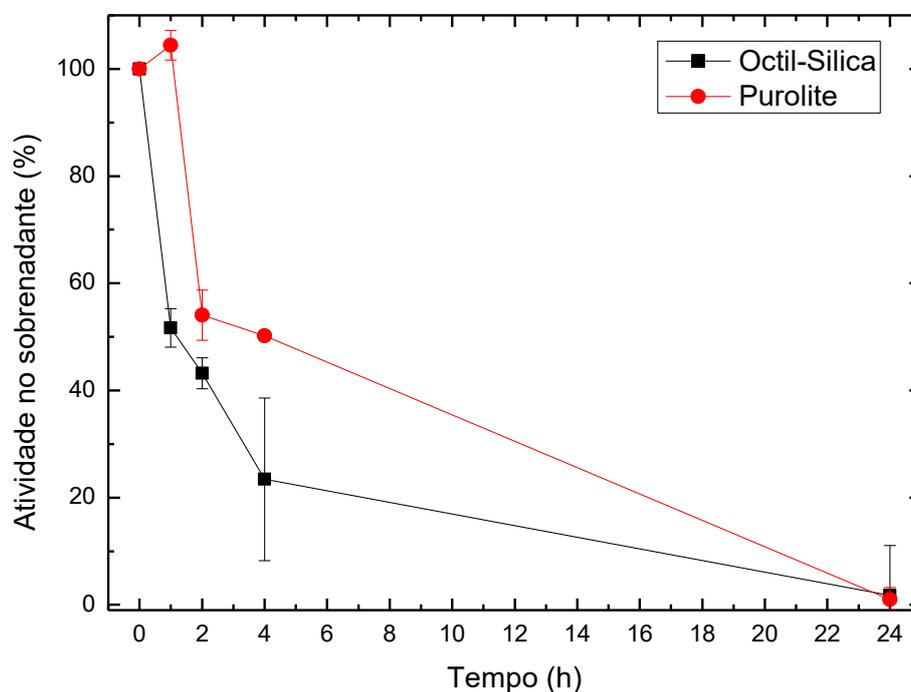
Figura 20 - Perfil da quantidade de proteínas totais nos sobrenadantes das suspensões de imobilização da lipase de *A. niger* em Purolite e as atividades específicas no sobrenadante no início (A) e após 24 h de imobilização (B) para o extrato resuspendido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além da lipase do extrato da FES, foi utilizada também a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* a fim de se estabelecer um padrão comparativo conforme já comentado anteriormente quando da realização de experimentos preliminares. Para tanto, todas as imobilizações foram iniciadas com uma concentração inicial de proteínas totais de 10 mg por cada grama de suporte oferecido, tanto para as lipases comerciais quanto para as lipases produzidas por FES. A imobilização da LTL em ambos os suportes, Purolite e Octil-Sílica, foi bastante similar, tendo por volta de 50% de rendimento de imobilização (em termos de atividade hidrolítica) após 2 h de imobilização e aproximadamente 98,90% da LTL imobilizada ao final de 24 h de experimento conforme é apresentado na Figura 21 abaixo.

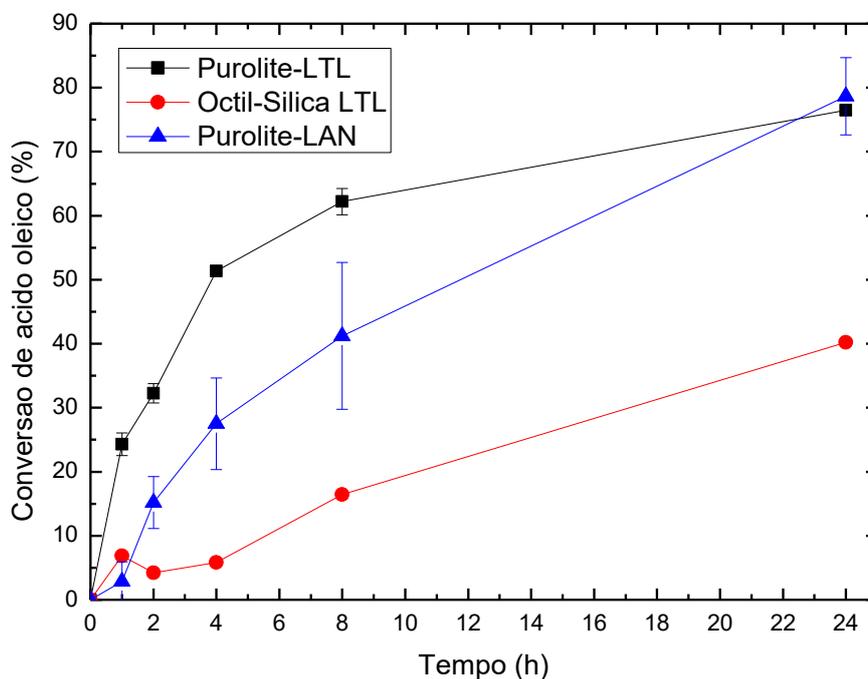
Figura 21 - Perfil da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização da LTL em Purolite e em Octil-Sílica em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e a temperatura ambiente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após as imobilizações das referidas lipases (LTL e LAN), os derivados obtidos foram submetidos a reações de esterificação do ácido oleico com o álcool n-octílico (razão molar 1:1) na presença de heptano como solvente orgânico. Os perfis de conversão da reação de esterificação com o tempo são mostrados na Figura 22 para os derivados Purolite-LAN, Purolite-LTL e Octil-Sílica-LTL. Percebe-se que a cinética de esterificação apresenta um perfil bastante similar entre a lipase comercial LTL e a lipase de *Aspergillus niger* imobilizadas em Purolite, sendo que, após 24 h de reação, os valores de conversão praticamente se equivalem para ambos (aproximadamente 80% de conversão). Porém, a conversão de oleato de octila é sensivelmente mais rápida quando se utiliza o derivado Purolite-LTL. Por fim, mesmo com a LTL imobilizada, o derivado Octil-Sílica-LTL não apresentou rendimentos satisfatórios para os ensaios de esterificação alcançando aproximadamente 40% de conversão em oleato de octila após 24 h de reação.

Figura 22 – Conversão de ácido oleico, a 37°C e 200 rpm, na reação de esterificação de ácido oleico e n-octanol (razão molar 1:1) em heptano catalisada por derivados de lipases de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e *Aspergillus niger* C (LAN). Carga enzimática no reator de 20 Uazeite.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A conversão de 80% em oleato de octila são dados muito satisfatórios para o derivado Purolite-LAN quando o comparamos com dados da literatura e se levarmos em consideração ainda o fato de ser um derivado de lipases imobilizadas diretamente do extrato bruto da FES onde há diversos interferentes. Bassi e colaboradores (2016) atingiram um máximo de 95% de conversão do mesmo bioproduto (oleato de octila) a partir de uma razão molar de 1,5:1 de octanol:ácido oleico, 10% (m/v) g de biocatalisador – lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas de poli-metacrilato – a 45°C e em sistema livre de solvente. Laudani e colaboradores (2006) em condições livres de solventes, a 50°C, com agitação de 500 rpm e 5,45% m/m) de Lipozyme IM RM em mistura de reação equimolar de 1-octanol e ácido oleico alcançaram uma conversão de 84% após 5 h de reação.

### **5.7 Inativação térmica em meio aquoso para derivados de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) immobilizada em Octyl-Sepharose na presença de diferentes cátions**

Em primeiro lugar, vários ensaios de atividade lipolítica (método pNPB) para a LTL solúvel foram realizados na presença de diferentes concentrações de diferentes cátions (Tabela 10) com o objetivo de verificar se houve alguma alteração nos valores da atividade quando comparada à LTL immobilizada em Octyl-Sepharose sem qualquer íon. Depois, realizaram-se experimentos de inativação térmica a 60°C e 70°C dos derivados de LTL preparados na presença de diferentes íons que influenciaram a atividade lipolítica a pH 7,0 (Figuras 23A e 23B).

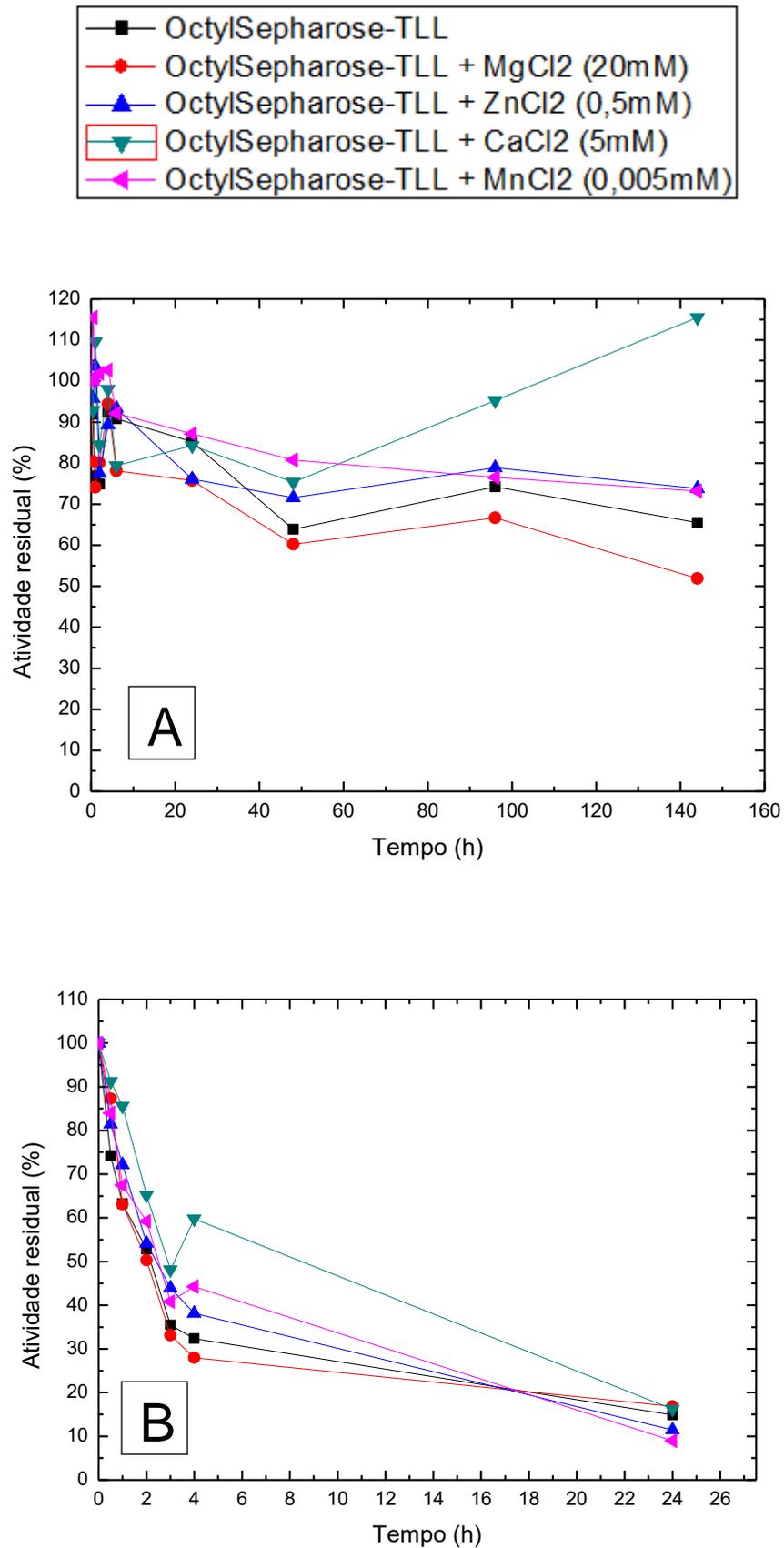
Tabela 10 – Influência de diferentes cátions na atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), usando p-NPB como substrato (25°C, pH 7,0).

[10 <sup>-3</sup> mol/L]	Atividade lipolítica (%)										
	MgCl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	KCl	NaCl	FeCl <sub>2</sub>	CuSO <sub>4</sub>	CoCl <sub>2</sub>	NiSO <sub>4</sub>	NaMoO <sub>4</sub>
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>5</b>	89,42	118,48	148,05	139,58	61,16	121,52	109,03	78,70	63,47	75,68	93,70
<b>50</b>	106,03	147,40	140,14	130,08	83,85	94,01	93,49	71,50	86,98	83,59	86,17
<b>500</b>	123,02	162,28	198,92	111,13	74,82	87,59	125,22	80,01	86,65	92,73	86,65
<b>5000</b>	119,84	*	287,03	115,25	84,32	114,69	*	90,96	138,24	140,88	133,72
<b>10000</b>	144,31	*	*	*	110,62	107,44	*	*	*	*	78,32
<b>20000</b>	147,26	*	*	*	91,29	97,70	*	*	*	*	110,16

\*Para estas concentrações, não foi possível mensurar a atividade devido à precipitação das proteínas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Perfil de inativação térmica dos derivados de LTL a (A) 60°C e (B) 70°C em pH 7.0.



Os íons que melhor influenciaram as atividades lipolíticas foram  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ , inclusive, este último, hiperativando a LTL em quase 3 vezes em meio aquoso. A  $60^{\circ}C$ , não foi possível verificar claramente a queda das atividades residuais devido às inativações térmicas lentas. Após 5 dias ainda havia aproximadamente 80% de atividade residual para todos os derivados. Assim, foi necessária a repetição do ensaio em temperatura mais alta. Verificou-se que, para o experimento de inativação térmica realizado a  $70^{\circ}C$  com a LTL imobilizada na presença de 5 mM de  $CaCl_2$ , houve um ligeiro aumento na estabilidade deste derivado.

## **5.8 Diferentes estratégias para a modulação da atividade e da regioseletividade da lipase comercial LTL**

### *5.8.1 Características dos diferentes suportes*

As propriedades funcionais das lipases em síntese orgânica (atividade, estabilidade e seletividade) podem ser intensamente moduladas através da engenharia do biocatalisador. O uso de diferentes protocolos de imobilização, diferentes suportes e a modificação química adicional de enzimas promovem propriedades diferentes para uma dada lipase. Além disso, algumas características de cada suporte (Tabela 1) podem influenciar muito essa modulação de propriedades catalíticas.

Lifetech™ ECR8806F (Purolite C18) e Sepabeads EC-OD (Sepabeads C18) são ambos polímeros metacrílicos funcionalizados com grupos octadecil, enquanto o Lewatit VP OC 1600 (Lewatit DVB) é um polímero feito de metacrilato reticulado com divinilbenzeno. Lifetech™ ECR8806F é particularmente adequado para a imobilização de LTL devido ao equilíbrio ótimo de hidrofobicidade. Todos os polímeros utilizados são altamente hidrofóbicos em comparação com a matriz (sílica) do biocatalisador imobilizado comercial Lipozyme TL IM devido à presença de grupos octadecil ou o divinilbenzeno na matriz. Todos os polímeros comerciais têm

forma esférica, enquanto o Lipozyme TL IM tem uma forma irregular devido ao processo de revestimento de sílica gel.

Conforme relatam Basso e colaboradores (2016), embora os suportes Lifetech™ ECR8806F e Sepabeads EC-OD sejam ambos polímeros de octadecil metacrilato, há diferença significativa no processo de fabricação desses polímeros. No processo de fabricação do Lifetech™ ECR8806F, em vez de funcionalizar as resinas epóxi metacrílicas, os grupos octadecil foram introduzidos diretamente durante o processo de polimerização, criando assim uma distribuição muito homogênea de grupos funcionais nas esferas deste suporte. Além disso, a quantidade de grupos funcionais disponíveis na superfície do polímero foi ajustada para obter a atividade máxima na imobilização da lipase, com a criação de um microambiente altamente hidrofóbico.

### *5.8.2 Etanolise do óleo de girassol rico em ácido oleico em hexano e em sistema solvent-free*

Os derivados de LTL imobilizada nos suportes hidrofóbicos Lifetech™ ECR8806F (Purolite C18), Sepabeads EC-OD (Sepabeads C18) e Lewatit VP OC-1600 (Lewatit DVB) foram mais ativos do que o derivado comercial da Novozymes (Lipozyme TL IM), conforme mostra a Figura 24 (A e B). Purolite C18-LTL foi muito mais ativo (10 vezes mais) do que os outros derivados hidrofóbicos: 14 mmols de oleato de etila sintetizados/hora utilizando 2% (p/v) de biocatalisador a 40°C em sistema livre de solvente orgânico (Figura 24A).

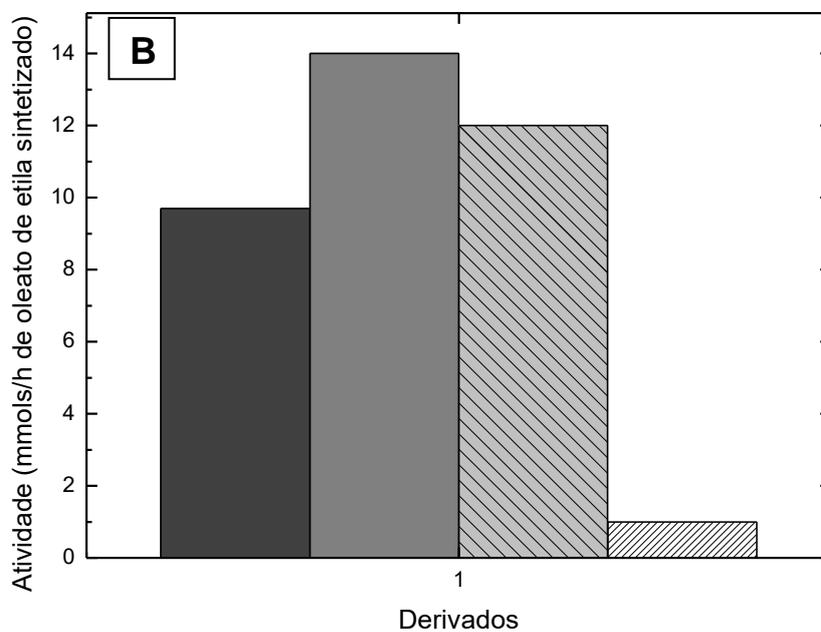
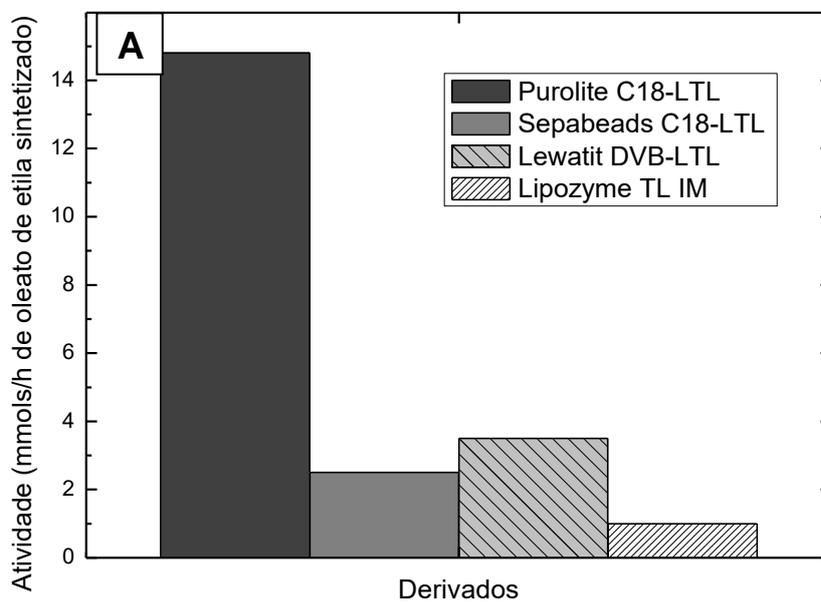
Em meio contendo hexano, mais uma vez, todas as preparações imobilizadas em suportes hidrofóbicos foram mais ativas do que a Lipozyme TL IM (Figura 24B). Os diferentes derivados hidrofóbicos exibiram atividades semelhantes, mas para os Sepabeads-LTL a atividade foi 30% maior em comparação com os derivados adsorvidos nos outros dois suportes.

A hidrofobicidade dos diferentes suportes foi medida pela adsorção/dessorção de p-nitrofenol a pH 6,0. A este pH, o grupo hidroxila não é ionizado e, portanto, p-nitro fenol torna-se bastante hidrofóbico. A concentração de p-nitrofenol em solução é facilmente medida em um espectrofotômetro UV a 320 nm. Em meios totalmente

aquosos, 100% de p-nitrofenol é adsorvido em Purolite C18 e Sepabeads C18, porém apenas 80% de p-nitrofenol é adsorvido em Lewatit DVB. Em solução contendo 50% de etanol, metade da quantidade de p-nitrofenol é desorvido dos suportes Purolite C18 e Sepabeads C18. Portanto, a hidrofobicidade de Sepabeads C18 e Purolite C18 é semelhante e superior à de Lewatit DVB.

A principal diferença entre os três suportes é a hidrofobicidade e o tamanho dos poros. O Sepabeads C18 tem um pequeno tamanho de poro (100-200 Å de diâmetro), que é fortemente reduzido quando o suporte está totalmente carregado com LTL. Em sistemas isentos de solventes orgânicos, um meio de reação viscoso (principalmente óleo) deve apresentar limitações muito importantes para se difundir dentro da estrutura porosa desse suporte. Por outro lado, Purolite C18 tem um tamanho de poro muito maior (616 Å de diâmetro) e a difusão do meio de reação viscoso é claramente favorecida. Por esse motivo, os derivados de LTL de alta carga são muito mais ativos quando a LTL é adsorvida em Purolite C18 do que quando LTL é adsorvida no Sepabeads C18. Por outro lado, o Lewatit DVB tem um tamanho de poro maior do que o Sepabeads, mas seus derivados expressaram atividades semelhantes, como pode ser visto na Figura 24A. Parece que a hidrofobicidade do suporte também desempenha um papel crítico. Desta forma, os suportes altamente hidrofóbicos com tamanho de poro grande parecem ser os ideais para a imobilização de lipases quando se trabalha em sistemas viscosos isentos de solventes orgânicos. Por fim, a etanólise em hexano parece seguir um padrão diferente. O tamanho do poro e a hidrofobicidade se tornam menos relevantes. Talvez a forma exata da LTL adsorvida seja agora o ponto chave para esta configuração de reação.

Figura 24 – Atividade de etanólise (síntese de oleato de etila) a 40°C utilizando 2%(p/v) de diferentes derivados imobilizados de LTL preparados por adsorção direta da enzima comercial aos suportes. Etanólise em sistema *solvent-free* (A) e na presença de hexano (B).



A atividade catalítica da LTL immobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos em condições experimentais idênticas foi bastante diferente como evidenciado na Tabela 11. Por exemplo, a enzima adsorvida em Sepabeads C18 mostrou ser mais do que 2 vezes mais ativa que a enzima immobilizada em Purolite DVB. A LTL adsorvida em diferentes suportes hidrofóbicos (contendo grupos DVB ou C18) exibe diferentes propriedades de atividade e seletividade para a etanólise de óleo. Essas características diferentes dependem dos grupos hidrofóbicos nos suportes. Os biocatalisadores mais ativos foram aqueles obtidos com grupos C18 e perderam a regioseletividade sn-1,3 presente na LTL solúvel. Por outro lado, os biocatalisadores menos ativos preservam esta seletividade e eles são obtidos com resinas DVB. Parece que as estruturas abertas adsorvidas de LTL podem ser ligeiramente diferentes (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; MORENO-PEREZ et al., 2017), não dependem da resina (por exemplo, Purolite), mas dependem fortemente das porções hidrofóbicas (grupos C18 versus DVB).

Tabela 11 - Atividade catalítica e regioseletividade da LTL immobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos em condições experimentais idênticas.

<b>Suportes</b>	<b>Etanólise (<math>\mu\text{mols}/\text{min}/\text{g}</math> de derivado)</b>	<b>Regioseletividade</b>
Sepabeads C18	0,7	Não seletivo
Purolite C18	0,6	Não seletivo
Lewatit DVB	0,4	1,3
Purolite DVB	0,3	1,3
Lipozyme TL IM	0,25	Não seletivo

Foram obtidos resultados ainda mais relevantes na atividade-seletividade de LTL quando a enzima foi adsorvida no mesmo suporte hidrofóbico (Purolite C18) sob diferentes condições de imobilização (pH, temperatura e presença ou ausência de CTAB durante o processo de imobilização) (Tabela 12). A maior atividade foi obtida quando a enzima foi adsorvida a 30°C na presença de uma baixa concentração de surfactante (CTAB). Ambas as condições, temperatura mais elevada e presença de

surfactante, aumentam consideravelmente a atividade catalítica da LTL solúvel (MORENO-PEREZ et al., 2015; TACIAS-PASCACIO et al., 2016).

Tabela 12 - Atividade catalítica e regioseletividade da LTL imobilizada em Purolite C18 sob diferentes condições experimentais.

<b>Condições de imobilização</b>	<b>Etanólise (<math>\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}</math> de biocatalisador)</b>	<b>Regioseletividade</b>
pH5, sem CTAB, 4°C	0,5	Não seletivo
pH7, Sem CTAB, 25°C	0,6	Não seletivo
pH7, com CTAB, 25°C	0,8	Não seletivo
pH8,5, sem CTAB, 30 °C	0,8	Não seletivo
pH8,5, com CTAB, 30°C	2,5	1,3

Este derivado (Purolite C18) altamente ativo preserva a regioseletividade para as posições sn-1 e sn-3. Tal derivado, mais ativo e seletivo, poderia ser muito útil na produção de oleato de etila e 2-monooleína na proporção molar 2/1 (CALERO et al., 2015). Outros derivados (preparados a 4°C) foram 5 vezes menos ativos e não preservam a regioseletividade para as posições sn-1 e sn-3. Novamente, pequenas mudanças na estrutura exata da molécula aberta de LTL adsorvida em Purolite C18 podem depender das condições de imobilização. Com base nesses resultados, a hipótese é de que alguns biocatalisadores provavelmente apresentam pouca regioseletividade e podem hidrolisar todas as ligações éster do triglicerídeo (especificidade aleatória), dependendo das condições de imobilização e da natureza do suporte. Também é possível que estes biocatalisadores possam mostrar uma preferência de hidrólise parcial para as posições sn-1 e sn-3, e depois de atuarem nessas posições podem atuar na posição sn-2.

Estudos anteriores relataram que os suportes sólidos podem influenciar a migração acil de 2-MAG de acordo com sua natureza (COMPTON et al., 2013; CAO et al., 2016). Assim, esta migração pode ser responsável pela perda de regioselectividade de alguns derivados de LTL. No entanto, ao utilizar o mesmo suporte (Purolite C18), o biocatalisador seletivo e não seletivo foi obtido. Nesse tipo de reações (seletivas e não-seletivas), a enzima, o suporte, as condições de reação, etc., eram idênticos e, portanto, podemos assumir a ausência de migração acil

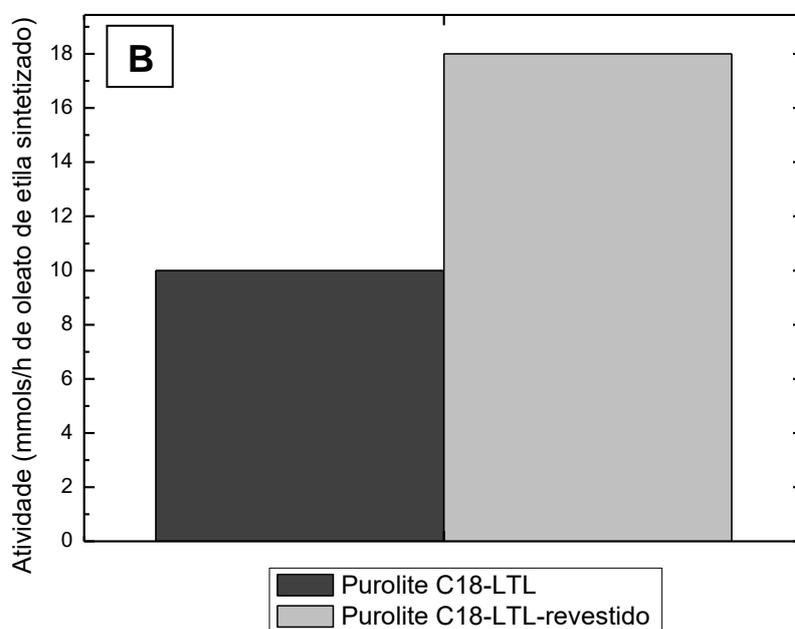
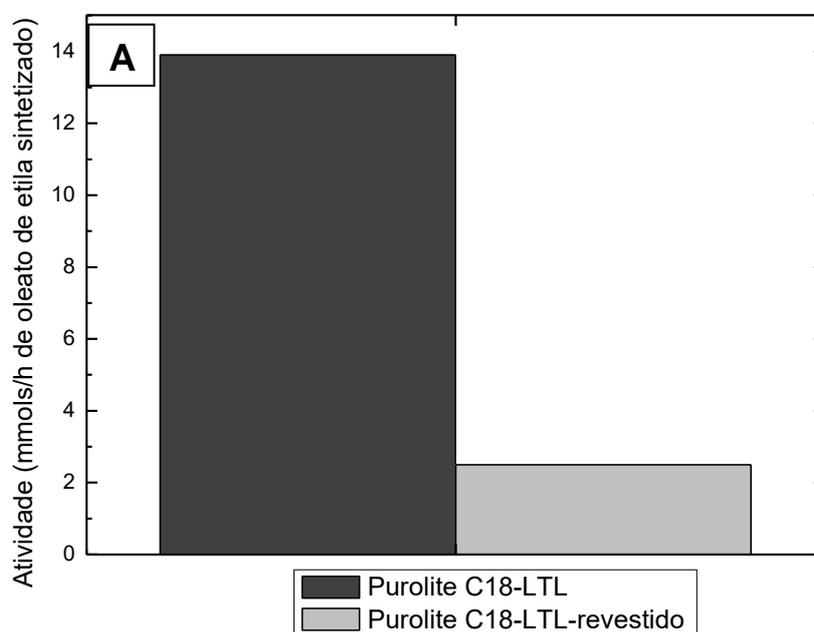
nestes casos. Anteriormente, Lei e Jiang (2011) demonstraram que a combinação de suportes hidrofóbicos e misturas de hexano-etanol não facilita as migrações de acil. Além do suporte, outros fatores, como a atividade da água, temperatura de reação, tempo de reação, solventes, provaram ter efeitos importantes sobre a migração acil (SHELDON e VAN PELT, 2013).

Portanto, as diferentes seletividades observadas nos diferentes biocatalisadores de LTL (bem como as diferentes atividades catalíticas) parecem ser devidas à fixação de diferentes formas abertas de LTL nos diferentes suportes hidrofóbicos e em diferentes condições experimentais (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; FILICE et al., 2011; MANOEL et al., 2015). Demonstrou-se também que os detergentes podem induzir mudanças de conformação na estrutura LTL (JUTILA et al., 2000). Além disso, os efeitos dos detergentes sobre a atividade catalítica e a adsorção interfacial dependem do pH (ALOULOU et al., 2007). Estudos estruturais adicionais serão necessários para esclarecer as mudanças conformacionais que ocorrem na enzima.

### *5.8.3 Atividade dos derivados revestidos por polímeros hidrofílicos*

Purolite C18-LTL apresentou uma atividade menor quando foi revestida com polímeros hidrofílicos (procedimento de peguilação) para melhorar sua estabilidade. O derivado revestido exibiu apenas 15% da atividade correspondente ao derivado padrão (Purolite C18-LTL não revestido) em sistema isento de solvente orgânico (Figura 25A). No entanto, foi a preparação mais ativa (2 vezes mais ativa do que o derivado padrão) na presença de hexano (Figura 25B). Provavelmente, o hexano não foi capaz de distorcer a enzima revestida, mas o óleo a distorceu fortemente.

Figura 25 – Atividade de etanólise (síntese de oleato de etila) a 40°C utilizando 2%(p/v) de diferentes derivados imobilizados de LTL preparados por adsorção direta da enzima comercial ao suporte hidrofóbico, seguido de modificação adicional (PEGuilação). 1- Purolite C18-LTL (derivado padrão); 2- Purolite C18-LTL revestido; Etanólise em sistema *solvent-free* (A) e na presença de hexano (B).



#### *5.8.4 Estabilidade de diferentes derivados de LTL em hexano*

Derivados preparados com os três suportes hidrofóbicos diferentes também exibiram uma estabilidade diferente. Purolite C18-LTL foi o mais estável na presença de hexano conforme é mostrado na Figura 26.

Purolite C18-LTL não se apresentou muito estável em óleo de girassol a 40°C. O tempo de meia-vida verificado foi de apenas 1 dia. Este derivado foi estabilizado por revestimento com camadas poliméricas hidrofílicas e viscosas. Deste modo, foi possível verificar o aumento do tempo de meia-vida para 6 dias (Figura 27A). No entanto, a perda de atividade e o pequeno aumento na estabilidade do derivado obtido por este revestimento indicam que novas estratégias de estabilização devem ser projetadas. Por outro lado, a estabilidade do Purolite C18-LTL foi muito maior quando incubada em hexano (Figura 27B). O derivado de LTL preservou 100% de sua atividade após 20 dias. Além disso, o derivado revestido também era muito ativo em hexano. Pode-se concluir que este derivado de LTL pode ser industrialmente útil na presença de hexano, mas a sua estabilidade deve ser melhorada para trabalhar em condições muito mais sustentáveis, isto é, sistemas isentos de solventes.

Figura 26 – Inativação dos derivados de LTL immobilizada por adsorção em suportes hidrofóbicos e incubados em hexano a 40°C.

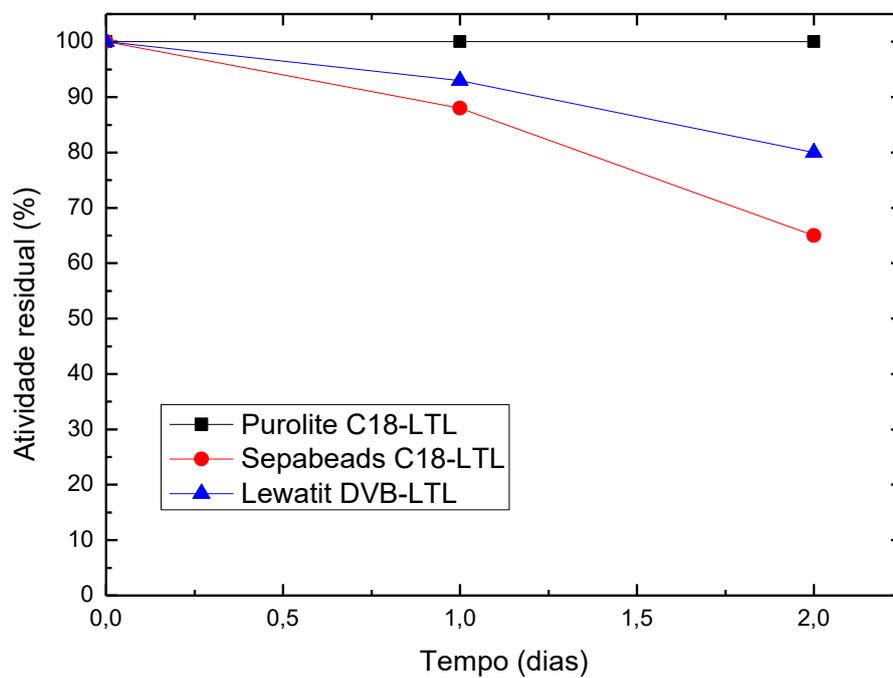
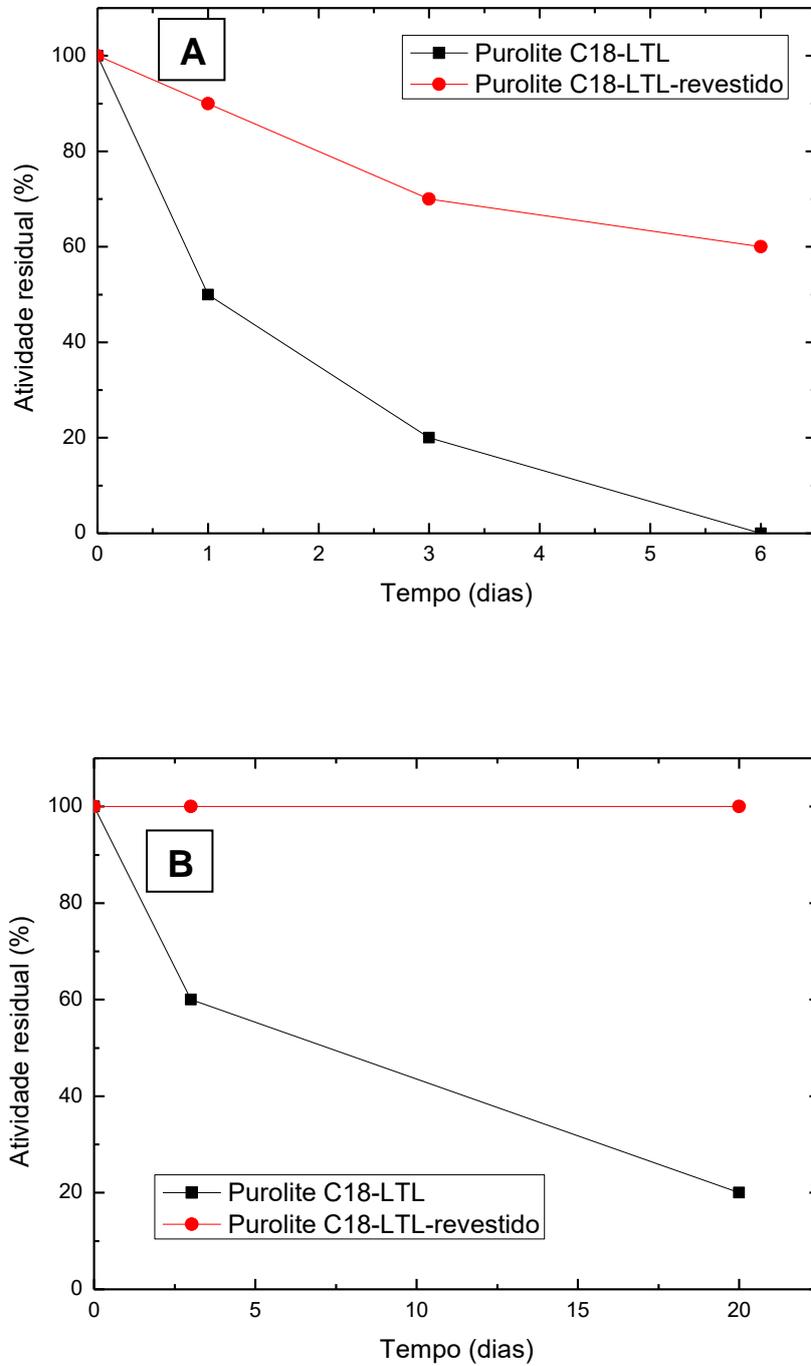


Figura 27 – Inativação de Purolite C18-LTL (derivado padrão) comparada a inativação de Purolite C18-LTL revestido a 40°C em (A) óleo de girassol (alto oleico) e em (B) hexano).



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados de plaqueamentos de fungos filamentosos avaliados da coleção Embrapa mostraram certo perfil de secreção de lipases e esterases. A linhagem P77C5 apresentou uma predominância na produção de esterases, enquanto que as linhagens P18E2 e *Trichoderma harzianum* produziram predominantemente lipases. Os demais fungos provavelmente sintetizam as duas referidas enzimas, com exceção do fungo P75P1 que não apresentou nenhum halo hidrolítico.

Para a produção de lipases fazendo uso de resíduos agroindustriais do processamento do dendê, a fermentação em estado sólido (FES) mostrou-se como a melhor opção, pois é de melhor controle do que a fermentação submersa (FSm), uma vez que se utiliza como indutor um resíduo igualmente sólido (borra alcalina de dendê) e de difícil solubilização no meio nutriente líquido empregado na FSm. Além disso, a FES apresentou níveis de produção expressivos quando comparados com outros resultados na literatura. No entanto, a FSm também possui sua importância, já que, até o melhor de nosso conhecimento, não há estudos com fermentação submersa empregando esta linhagem de fungo filamentoso (*A. niger C*) e tais resíduos agroindustriais (fibra e borra de dendê), isto é, os resultados obtidos neste trabalho foram inéditos neste tema. Por fim, não foi possível detectar atividade de lipase após a fermentação combinada (FC), possivelmente devido à extração de algum inibidor da fibra de dendê quando imersa em meio líquido nutriente, uma vez que há produção desta enzima nos cultivos em FES e FSm quando realizados separadamente.

Quanto à caracterização bioquímica, a lipase produzida pela linhagem *A. niger C* cultivada em FES apresentou um nível elevado de atividade hidrolítica na faixa de temperatura ótima entre 37 e 55°C e uma faixa de pH ótimo entre 4,0 e 6,5. Foi observada alta estabilidade térmica na faixa de 40 a 50°C, durante um período relativamente longo de 24 h. Além disso, a lipase produzida também apresenta maior especificidade para substratos que contenham em sua constituição ácidos graxos de cadeia longa e saturada, como é o caso do óleo de dendê. Esta lipase apresenta, portanto, propriedades catalíticas interessantes e potencial para modificar

gorduras e óleos a fim de produzir diferentes bioprodutos em diversas aplicações industriais.

Foi possível realizar a imobilização da lipase de *A. niger* C mesmo contando ainda com inúmeros contaminantes oriundos do extrato bruto da FES após 72 h de cultivo. O derivado desta lipase imobilizada (Purolite C18-LAN) desenvolveu atividade hidrolítica interessante de 13,15 U<sub>(óleo oliva)</sub>/mL e foram também conduzidos experimentos de esterificação com tal derivado o qual revelou grande potencial para a síntese do biolubrificante oleato de octila.

A imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em Purolite C18 em diferentes condições experimentais permitiu a preparação de derivados imobilizados com diferentes regioselectividades e taxas de reação. A imobilização a pH 8,5 e 30°C na presença de CTAB produziu um derivado com uma regioselectividade sn-1,3 perfeita. Pelo contrário, a imobilização em pH 5 e 4°C na ausência de CTAB produziu um derivado não seletivo que catalisou a etanólise das posições 1 e 3 de forma muito rápida e catalisou continuamente a hidrólise da posição 2.

Os derivados de LTL não seletivos parecem sofrer o efeito de algumas mudanças conformacionais no centro ativo que agora foi então capaz de catalisar a etanólise da posição 2. Os suportes que possuem divinilbenzeno como grupos hidrofóbicos produziram derivados de LTL com uma seletividade 1,3 perfeita. Pelo contrário, o Sepabeads C18 e o Purolite C18 produziram derivados LTL não seletivos. Assim, essa capacidade de não seletividade para hidrolisar 2-monooleína pode estar relacionada à fixação da enzima ao suporte com uma nova configuração do seu sítio ativo.

Em resumo, podemos explorar a mesma lipase para dois processos diferentes, modulando sua seletividade através da engenharia de biocatalizador: produção quantitativa de oleato de etila mais glicerol ou produção de uma mistura 2/1 de oleato de etila e 2-monooleína. Os derivados imobilizados não foram muito estáveis e isso limita sua aplicação industrial. A estabilidade da LTL adsorvida em suportes hidrofóbicos e incubados em hexano anidro é boa o suficiente para a realização de estudos cinéticos precisos, mas é bastante baixa para a aplicação prática em processos industriais de modificação de óleos.

Em geral, o suporte Purolite C18 é o mais hidrofóbico e promoveu as melhores propriedades de estabilidade e de atividade para a lipase de LTL em

sistemas sem solventes orgânicos. Este resultado está de acordo com os resultados anteriores relatados na literatura e é devido à estrutura particular do polímero e à maior densidade de grupos funcionais (grupos octadecil) na área superficial interna do polímero.

O melhor derivado de LTL foi 10 vezes mais ativo do que os derivados padrões Sepabeads C18-LTL e Lewattit DVB-LTL. Além da hidrofobicidade, o grande tamanho de poro do suporte Purolite C18 parece desempenhar um papel crítico em sistemas isentos de solventes quando o meio de reação é muito viscoso. A síntese completa do composto modelo de oleato de etila foi atingida em menos de 4 horas usando 2% (p/v) de derivado de alta carga (20 mg de LTL por grama de Purolite C18) a 40°C. Porém, este derivado não foi muito estável quando incubado em óleo a 40°C (tempo de meia-vida em torno de 1 dia), mas foi estabilizado ao revestir sua superfície com polímeros hidrofílicos e viscosos.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

- Otimização da etapa de purificação parcial da lipase de *A. niger C*.
- Otimização dos protocolos de imobilização desta lipase de *A. niger C* levando em consideração os diversos contaminantes oriundos do extrato bruto da fermentação em estado sólido.
- Ensaios de estabilidade térmica do derivado PuroliteC18-LAN na presença de solventes orgânicos.
- Otimização das condições de reação de esterificação para a síntese de oleato de octila.
- Novos protocolos de estabilização devem ser projetados para explorar as propriedades catalíticas para a etanolise de óleos em escala industrial.

## REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.

ALOULO, A.; PUCCINELLI, D.; DE CARO, A.; LEBLOND, Y.; CARRIERE, F. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 12, p. 1446-1456, 2007.

ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.

ARUMUGAM, A.; THULASIDHARAN, D.; JEGADEESAN, G. B. Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. **Renewable Energy**, v. 116, p. 755-761, 2018.

ASHOK, A.; KUMAR, D. S. Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged and solid state fermentation. **3 Biotech**, v. 7, 2017.

AVILA-CISNEROS, N. et al. Production of Thermostable Lipase by *Thermomyces lanuginosus* on Solid-State Fermentation: Selective Hydrolysis of Sardine Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1859-1872, 2014.

AVISHA, C.; DEBARATI, M.; DIPA, B. Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 139-144, 2013.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BARROS, F. F. C.; SIMIQUELI, A.P.R.; ANDRADE, C.J.; PASTORE, G.M. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Research International**, 9 p. 2013.

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DUCAS, J. D.; CUSTODIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.

- BASSO, A.; HESSELER, M.; SERBAN, S. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. **Tetrahedron**, v. 72, n. 46, p. 7323-7328, 2016.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. 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 1998.
- BEHR, A.; EILTING, J.; IRAWADI, K.; LESCHINSKI, J.; LINDNER, F. Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 13-30, 2008.
- BEZBRADICA, D. I.; MATEO, C.; GUISAN, J. M. Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 102, p. 218-224, 2014.
- BISEN, P. S.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. B. K. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1019-1030, 2010.
- BORA, L.; GOHAIN, D.; DAS, R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 1959-1970, 2013.
- BORNSCHEUER, U. T. **Enzymes in Lipid Modification**. 424p. 2000.
- BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations**. 2 ed. Weinheim: 2006.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRANCO, R. V.; GUTARRA, M. L. E.; GUISAN, J. M.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V.; PALOMO, J. M. Improving the Thermostability and Optimal Temperature of a Lipase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* by Covalent Immobilization. **Biomed Research International**, 2015.
- CABALLERO, V.; BAUTISTA, F. M.; CAMPELO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A.; HIDALGO, J. M.; LUQUE, R.; MACARIO, A.; GIORDANO, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 334-342, 2009.

CALERO, J.; LUNA, D.; SANCHO, E. D.; LUNA, C.; BAUTISTA, F. M.; ROMERO, A. A.; POSADILLO, A.; BERBEL, J.; VERDUGO-ESCAMILLA, C. An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1437-1452, 2015.

CAO, X.; MANGAS-SANCHEZ, J.; FENG, F. Q.; ADLERCREUTZ, P. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effects of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae*, support material, and water activity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 10, p. 1579-1587, 2016.

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. In: (Ed.). **Microbiology: a laboratory manual**. 6 ed. São Francisco: Benjamin Cummings, 2002.

CAVALCANTI, E. D. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 79-84, 2005.

CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 261-269, 2008.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PEREZA, S.; SOUZA, L.; VALERIO, A.; GUISAN, J. M.; DE ARAUJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; DE OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 122, p. 163-169, 2015.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 1992. 206 Faculdade de Farmácia., UFMG, Belo Horizonte, BH.

COMPTON, D. L.; LASZLO, J. A.; EVANS, K. O. Influence of Solid Supports on Acyl Migration in 2-Monoacylglycerols: Purification of 2-MAG via Flash Chromatography. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 90, n. 9, p. 1397-1403, 2013.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 163-171, 2010.

CORADI, G. V.; DA VISITACAO, V. L.; DE LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; DE OLIVA NETO, P.; GOMES DE LIMA, V. M. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production

and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 533-540, 2013.

COSTA, T. M.; HERMANN, K. L.; GARCIA-ROMAN, M.; VALLE, RDSC; TAVARES, L. B. B. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419-427, Apr-2017.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

CUBIDES-ROMAN, D. C.; Perez, V. H.; de Castro, H. F.; Orrego, C. E.; Giraldo, O. H.; Silveira, E. G.; David, G. F. Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. **Fuel**, v. 196, p. 481-487, 2017.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2-3, p. 205-214, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DE CARVALHO, C. M. **A EXPANSÃO SUSTENTÁVEL DO CULTIVO DA PALMA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL: O CASO DO ESTADO DO PARÁ**. 2015. Universidade Federal do Rio de Janeiro

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS, J. C.; DE AGUIAR, C. L. Modification of oils and fats by biotransformation. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DELABONA, P. D. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DOS SANTOS, E. A. L.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; SANTANA, LCLD. Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix. **Acta Scientiarum-Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2017.

DOWD, M. K. Compositional characterization of cottonseed soapstocks. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 10, p. 1287-1295, 1996.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; DUSTET MENDOZA, J. C.; HERNANDEZ, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISEN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.

\_\_\_\_\_. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 7, n. 1-4, p. 181-189, 1999.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUI SAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

\_\_\_\_\_. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 9, p. 2553-61, 2008.

\_\_\_\_\_. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 389-396, 2001.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PIZARRO, C.; LÓPEZ-VELA, D.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; PESSELA, B.; GUI SAN, J. M. Hydrolysis of Fish Oil by Lipases Immobilized Inside Porous Supports. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 6, p. 819-826, 2011.

FERREIRA-LEITAO, V. S.; CAMMAROTA, M. C.; AGUIEIRAS, E. C. G.; DE SA, L. R. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, 2017.

FILICE, M.; MARCIELLO, M.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Hydrolysis of Fish Oil by Hyperactivated *Rhizomucor miehei* Lipase Immobilized by Multipoint Anion Exchange. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 4, p. 961-968, 2011.

FIRDAUS, M. Y.; BRASK, J.; NIELSEN, P. M.; GUO, Z.; FEDOSOV, S. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 133, p. 55-64, 2016.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

GODOY, C. A.; DE LAS RIVAS, B.; GUI SÁN, J. M. Site-directing an intense multipoint covalent attachment (MCA) of mutants of the *Geobacillus thermocatenulatus* lipase 2 (BTL2): Genetic and chemical amination plus immobilization on a tailor-made support. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1324-1331, 2014.

GUI SAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Springer, 2006.

GUI SAN, J. M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; HALLING, P. J.; KENNEDY, D.; MIYATA, E.; RE, D. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 817-824, 2001.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 63-71, 2003.

GUTARRA, M. L. E.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **Seleção de Fungos Produtores de Lipase por Fermentação no Estado Sólido**. XV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM). Recife, PE. 2005.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 313-318, 2007.

\_\_\_\_\_. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HAPPE, M.; GRAND, P.; FARQUET, S.; AEBY, S.; HERITIER, JEAN-CLAUDE; CORTHAY, F.; MABILLARD, E.; MARTI, R.; VANOLI, E.; GROGG, ALAIN-FRANCOIS; NUSSBAUM, S.; RODUIT, A.; TIECHE, F.; SALEM, S.; CONSTANTIN, C.; SCHMITT, E.; ZAHNO, S.; ELLERT, C.; HABIB, A.; WYSS, J.; FISCHER, F. Microwave barrel reactor use in trimethylolpropane oleate synthesis by *Candida antarctica* lipase in a biphasic non-solvent process. **Green Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 2337-2345, 2012.

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

HOELKER, U.; HOEFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

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

HOLMQUIST, M.; CLAUSEN, I. G.; PATKAR, S.; SVENDSEN, A.; HULT, K. Probing a functional-role of glu87 and trp89 in the lid of *humicola-lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic-solvent. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 217-224, 1995.

HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKEŠ, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 1, p. 13-31, 1999.

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

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

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253-264, 2008.

JHA, B. K.; SVENSSON, M.; KRONBERG, B.; HOLMBERG, K. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 213, n. 1, p. 262-264, 1999.

JUTILA, A.; ZHU, K.; PATKAR, S. A.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; KINNUNEN, P. K. J. Detergent-induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 3, p. 1634-1642, 2000.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry (Oxford)**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.

KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAUJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials**, v. 193, p. 217-228, 2015.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. D. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp* strain atcc-21808 - purification, characterization, crystallization, and preliminary-x-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

LAUDANI, C. G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 74-81, 2007.

\_\_\_\_\_. Optimisation of n-octyl oleate enzymatic synthesis over *Rhizomucor miehei* lipase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, n. 2, p. 119-127, 2006.

LEI, Z. L.; JIANG, Q. Synthesis and Properties of Immobilized Pectinase onto the Macroporous Polyacrylamide Microspheres. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2592-2599, 2011.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; DA ROS, P. C. M.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. 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, 2015.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. 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, 2012.

\_\_\_\_\_. A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 439-454, 2016.

MALILAS, W.; KANG, S. W.; KIM, S. B.; YOO, H. Y.; CHULALAKSANANUKUL, W.; KIM, S. W. Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268: Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 405-412, 2013.

MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 1, p. 98-105, 2000.

\_\_\_\_\_. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATEOS DIAZ, J. C.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid

state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

MATOS, M.; SIMPSON, B. K.; RAMÍREZ, H. L.; CAO, R.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; HERNÁNDEZ, K. Stabilization of glucose oxidase with cyclodextrin-branched carboxymethylcellulose. **Biotecnología Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 2012.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. C. Screening of organic supports and activation protocols for immobilization and stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. DE S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011.

\_\_\_\_\_. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

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

MINTEN, I. J.; ABELLO, N.; SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F.; VAN DEN BERG, M. A. Post-production modification of industrial enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 14, p. 6215-6231, 2014.

MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, n. 0, p. 392-403, 2014.

MOBARAK, H. M.; MOHAMAD, E. N.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; AL MAHMUD, K. A. H.; HABIBULLAH, M.; ASHRAFUL, A. M. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34-43, 2014.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689-3694, 2007.

MORENO-PEREZ, S.; FILICE, M.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, p. 48-54, 2013.

\_\_\_\_\_. Dramatic hyperactivation of lipase of *Thermomyces lanuginosa* by a cationic surfactant: Fixation of the hyperactivated form by adsorption on sulfopropyl-sepharose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 199-203, 2015.

MORENO-PEREZ, S.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Selective Ethanolysis of Fish Oil Catalyzed by Immobilized Lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2014.

MORENO-PEREZ, S. et al. Critical Role of Different Immobilized Biocatalysts of a Given Lipase in the Selective Ethanolysis of Sardine Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 117-122, 2017.

MORENO-PÉREZ, S.; ORREGO, A. H.; ROMERO-FERNÁNDEZ, M.; TROBOMASEDA, L.; MARTINS, S.O.; MUNILLA, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 571, p.55-72, 2016.

MUÑO, M. D. M.; ESTEBAN, L.; ROBLES, A.; HITA, E.; JIMÉNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, P. A.; CAMACHO, B.; MOLINA, E. Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1033-1039, 2008.

NAGENDRAMMA, P.; KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 764-774, 2012.

NASSREDDINE, S.; KAROUT, A.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Applied Catalysis a-General**, v. 344, n. 1-2, p. 70-77, 2008.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109-1115, 1916.

NIAZ, M.; IFTIKHAR, T.; QURESHI, F. F.; NIAZ, M. Extracellular Lipase Production by *Aspergillus nidulans* (MBL-S-6) under Submerged Fermentation. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 3, p. 536-542, 2014.

LIMA, L.N.; ARAGON, C. C.; MATEO, C.; PALOMO, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118-123, 2013.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; PEREZ-RODRIGUEZ, N.; DOMINGUEZ, J. M.; VENANCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1123-1132, 2017.

PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 775-783, 2002.

\_\_\_\_\_. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2003.

\_\_\_\_\_. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 19, p. 279-286, 2002.

\_\_\_\_\_. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

\_\_\_\_\_. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1-2, p. 267-273, 2004.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: Properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PENZOL, G.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODES, L.; GUIBAN, J. M. Use of dextrans as long and hydrophilic spacer arms to improve the performance of immobilized proteins acting on macromolecules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 4, p. 518-523, 1998.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. Process for protein PEGylation. **Journal of Controlled Release**, v. 180, p. 134-149, 2014.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONCALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 51, n. 3-4, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 15-32, 2010.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENANCIO, A.; MANUEL DOMINGUEZ, J.; BELO, I. Integrated Use of Residues from Olive Mill and Winery for Lipase Production by Solid State Fermentation with *Aspergillus sp.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1832-1845, 2014.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Use of lipases for the production of biodiesel. In: (Ed.). **Industrial Enzymes**: Springer, p.317-339, 2007.

SELMI, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 6, p. 691-695, 1998.

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

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: A dose book at thermodynamic stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8256-8261, 2008.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; DE CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 2, p. 145-152, 2011.

SILVEIRA, E. A.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; MAMEDE, R. P.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. **BMC Biotechnology**, v. 17, 2017.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of Palm Oil Industrial Waste as Feedstock for Lipase Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 558-571, 2016.

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

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.

SOUZA, C. E. C. et al. Adding Value to Agro-industrial Co-products from Canola and Soybean Oil Extraction Through Lipase Production Using *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1163-1176, 2017.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; PEIRCE, S.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; YATES, M.; ROSALES-QUINTERO, A.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **Royal Society of Chemistry - Advances**, v. 6, n. 102, p. 100281-100294, 2016.

TAN, C.-H.; GHAZALI, H. M.; KUNTOM, A.; TAN, CHIN-PING; ARIFFIN, A. A. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 645-650, 2009.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TOSCANO, L.; GOCHEV, V. MONTERO, G.; STOYTCHEVA, M. Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 1, p. 2243-2247, 2011.

TOSCANO, L.; MONTERO, G.; CERVANTES, L.; STOYTCHEVA, M.; GOCHEV, V.; BELTRAN, M. Production and partial characterization of extracellular lipase from

*Trichoderma harzianum* by solid-state fermentation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 3, p. 3776-3781, 2013a.

TOSCANO, L.; MONTERO, G.; STOYTCHEVA, M.; GOCHEV, V.; CERVANTES, L.; CAMPBELL, H.; ZLATEV, R.; VALDEZ, B.; PEREZ, C.; GIL-SAMANIEGO, M. Lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated fungal strains. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 5, p. 4074-4077, 2013b.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

TRENTIN, C. M.; POPIOLKI, A. S.; BATISTELLA, L.; ROSA, C. D.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 437-448, 2015.

TRICHES DAMASO, M. C.; PASSIANOTO, M. A.; DE FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; ARAUJO LAGO, R. C.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676-681, 2008.

VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K. J.; LEE, S. M.; CHAE, J. C.; SHEA, P. J.; OH, B. T. Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Solid-state fermentation of coconut kernel-cake as substrate for the production of lipases by the coconut kernel-associated fungus *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 129-142, 2015.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. 79 (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 2012.

VESCOVI, V.; DOS SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298-305, 2017.

VESCOVI, V.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis

of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUIBAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055-2066, 2016.

WANG, D.; NI, K.; REN, Y.; WEI, D. Site-directed modification of genetically engineered *Proteus sp.* lipase K107 variants with a polyethylene glycol derivative. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, n. 0, p. 36-42, 2015.

ZHANG, B. H.; WENG, Y. Q.; XU, H.; MAO, Z. P. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 61-70, 2012.

ZHAO, D.; PENG, C.; ZHOU, J. Lipase adsorption on different nanomaterials: a multi-scale simulation study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 2, p. 840-850, 2015.

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

ÖZTÜRK, B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. İzmir Institute of Technology. 2001.