



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA FONTANA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM DIFERENTES SUPORTES
VISANDO O USO EM BIOCATALISE**

Londrina
2017

MARIANA FONTANA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM DIFERENTES SUPORTES
VISANDO O USO EM BIOCATÁLISE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico
apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Bioenergia da Universidade Estadual de
Londrina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Luisa
Barbosa Guedes.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Milena Martins
Andrade.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F679i Fontana, Mariana.

Imobilização de lipase em diferentes suportes visando o uso em biocatálise / Mariana Fontana. - Londrina, 2016.
62 f.: il.

Orientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Coorientador: Milena Martins Andrade.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Lipase - Teses. 2. Adsorção - Teses. 3. Biocatálise - Teses. I. Guedes, Carmen Luisa Barbosa. II. Andrade, Milena Martins. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

CDU 662:541.1

MARIANA FONTANA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM DIFERENTES SUPORTES VISANDO
O USO EM BIOCATALISE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico
apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Bioenergia da Universidade Estadual de
Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carmen Luisa Barbosa
Guedes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Milena Martins Andrade
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de Outubro de 2017.

Aos meus pais, irmão e querida avó, por toda a força e amor.

*Ao Bruno, meu amado companheiro, por
sempre estar presente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando ao longo das adversidades encontradas, me dando força para continuar.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às pessoas e professores que estiveram presentes em momentos distintos e me fizeram avançar pela ajuda que me dispensaram.

À secretaria de pós-graduação e seus funcionários por toda atenção e paciência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

FONTANA, Mariana. **Imobilização de lipase em diferentes suportes visando o uso em biocatálise**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Com o intuito de tornar o uso de lipases atrativo economicamente, a imobilização enzimática é uma opção, pois possibilita a recuperação e a reutilização da enzima. O método mais utilizado é a adsorção por ser de baixo custo, simples e de fácil manipulação. O uso de resíduos e produtos reciclados como suporte para imobilização da enzima é outra forma de reduzir o custo desta, e assim, do produto final. O presente trabalho tem como objetivo purificar parcialmente as lipases produzidas por fermentação submersa utilizando torta de soja como fonte de nutrientes para o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 e imobilizá-las utilizando planejamentos fatoriais comparando a atividade enzimática nos suportes: carvão de eucalipto ativado, carvão de peroba ativado, poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas. A precipitação da enzima utilizando sulfato de amônio na concentração de 20% (m/v) aumentou a atividade específica de para 215 U mg^{-1} . O suporte com melhor resultado de imobilização foi a poliamida reciclada com volume de poros de $3,33 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ e raio médio de 1,7 nm, para a poliamida reciclada com partículas magnéticas também com altos resultados, as diferenças nas características físico-químicas dos suportes influenciaram na adsorção da lipase dos suportes, tendo em vista a variação na atividade e atividade específica das enzimas imobilizada. As melhores condições de imobilização de lipase utilizando a PR como suporte foi 90 minutos e $32 \text{ }^\circ\text{C}$, onde a atividade enzimática máxima foi alcançada ($760 \text{ U g}^{-1} \text{ suporte}$) e também maior retenção (95,4 %). Já a imobilização com PRPM, os experimentos nos pontos centrais (195 min e $25 \text{ }^\circ\text{C}$) do planejamento corresponderam as maiores atividades enzimáticas e retenção da atividade, sendo os maiores valores alcançados de $360 \text{ U g}^{-1} \text{ suporte}$ e 41,3 %, respectivamente. Esses resultados demonstraram que estes suportes são promissores e que os biocatalisadores produzidos possuem grande potencial para serem aplicados em reações de biocatálise, tendo em vista a elevada atividade enzimática relatada, além disso, trata-se de resíduos e materiais recicláveis.

Palavras-chave: Fermentação submersa. Torta de soja. Adsorção. Planejamentos fatoriais

FONTANA, Mariana. **Immobilization of lipase in different supports for biocatalysis.** 2017. 62 p. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

In order to make the use of lipases economically attractive, enzymatic immobilization is an option, since it allows recovery and reuse of the enzyme. The most commonly used method is low cost, simple adsorption and easy manipulation. The use of waste and recycled products as a support for immobilization of the enzyme is another way to reduce the cost of this, and thus, the final product. The present work aims to partially purify the lipases produced by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 and to immobilize them using factorial schemes comparing the enzymatic activity in the substrates: activated eucalyptus charcoal, activated peroba charcoal, recycled polyamide without and with magnetic particles. The enzyme precipitation using 20% (w/v) ammonium sulfate increased the specific activity of 32.0 U mg⁻¹ in the crude extract to 215 U mg⁻¹. The support with the best immobilization result was recycled polyamide with a pore volume of 3.33 cm³g⁻¹ and a mean radius of 1.7 nm, for polyamide recycled with magnetic particles also with high results of enzymatic activity, 9, 46 cm³g⁻¹ and mean radius of 8.2 nm, the differences in the physical-chemical characteristics of the substrates influenced the adsorption of the lipase from the supports, due to the variation in the activity and specific activity of the immobilized enzymes. With the results obtained in the factorial 2² with axial points for immobilization of lipases, it was possible to observe that temperatures in the range of 29 °C for CEA and for CPA 41 and 49 °C did not show a positive influence on the immobilization in the carbons. The immobilization using CEA as support obtained maximum activity of 296 U g⁻¹ support when enzyme concentration and temperature were 138% (v/v) and 21 °C, respectively. Under these conditions, the immobilization efficiency was 97.7% and the retention of activity was 22%. On the other hand, the immobilization in CPA, the maximum activity achieved was 58 U g⁻¹ support, with enzyme concentration and temperature of 138% (v/v) and 45 °C, respectively. The best lipase immobilization conditions using PR as support were 90 minutes and 32 °C, where maximum enzymatic activity was achieved (760 U g⁻¹ support) and also higher retention (95.4%). The immobilization with PRPM, the experiments at the central points (195 min and 25 °C) of the planning corresponded to the greater enzymatic activities and retention of the activity, with the highest values being 360 U g⁻¹ support and 41.3%, respectively. These results showed that these supports are promising and that the biocatalysts produced have great potential to be applied in biocatalysis reactions, due to the high enzymatic activity reported, in addition, they are waste and recyclable materials.

Keywords: Submerged fermentation. Soybean cake. Adsorption. Factorial Planning Adsorption. Immobilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado a glicerol e ácidos graxos, ou o reverso (síntese) que combina glicerol e ácidos graxos para formar triacilgliceróis.	14
Figura 2	- Reações catalisadas por lipases.....	15
Figura 3	- Representação dos métodos para a imobilização enzimática.	19
Figura 4	- Reação de obtenção da poliamida 66.....	24
Figura 5	- Esquema da produção da lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01.....	27
Figura 6	- Esquema da precipitação de lipases com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	28
Figura 7	- Determinação da atividade enzimática.	29
Figura 8	- Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em carvão de eucalipto ativado.....	43
Figura 9	- Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em poliamida reciclada.	50
Figura 10	- Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em poliamida reciclada com partículas magnéticas.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio Batata Dextrose Ágar.	26
Tabela 2 - Meio mínimo de sais de Vogel*	26
Tabela 3 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)	26
Tabela 4 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de concentração de enzima (% v/v) e temperatura (°C) na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto.....	32
Tabela 5 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de concentração de enzima (% v/v) e temperatura (°C) na imobilização de lipase em carvão ativado de peroba.	33
Tabela 6 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de tempo (minutos) e temperatura (°C) na imobilização de lipase em poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas.....	34
Tabela 7 - Comparação de atividade enzimática, proteínas totais e atividade específica da lipase antes e após a purificação parcial. ¹	36
Tabela 8 - Comparação das diferentes áreas superficiais e volumes de poros de diferentes suportes.	38
Tabela 9 - Atividade enzimática das diferentes concentrações de solução de lipases utilizadas no planejamento de imobilização dos carvões ativados.	40
Tabela 10 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em carvão de eucalipto ativado.....	41
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em carvão ativado de eucalipto	42
Tabela 12 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em carvão de peroba ativado.	44
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em carvão de peroba ativado.	45
Tabela 14 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em poliamida reciclada.....	48
Tabela 15 - Resultados do modelo estatístico ANOVA do planejamento com o suporte poliamida reciclada sem partículas magnéticas.	49

Tabela 16 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em poliamida reciclada com partículas magnéticas.	51
Tabela 17 - Resultados do modelo estatístico ANOVA do planejamento com o suporte poliamida reciclada com partículas magnéticas.	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	13
2.1	Objetivos Específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Lipases definição, Mecanismos de Ação e Propriedades	14
3.1.1	Micro-organismos produtores de lipases.....	16
3.1.2	Composição do meio de cultivo para a produção de lipases	17
3.1.3	<i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 como produtor de lipases	18
3.2	Imobilização de Enzimas.....	18
3.2.1	Suportes para imobilização de lipases	20
3.2.1.1	Carvão ou carvão de pirólise.....	21
3.2.1.1.1	Ativação do carvão.....	22
3.2.1.2	Poliamida reciclada	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Materiais.....	25
4.1.1	Torta de soja	25
4.1.2	Carvão de pirólise	25
4.1.3	Poliamida reciclada	25
4.1.4	Substrato para atividade de lipase	25
4.1.5	Meios de Cultivo.....	26
4.1.6	Micro-organismo	26
4.2	Métodos	27
4.2.1	Manutenção do micro-organismo	27
4.2.2	Produção de Lipase	27
4.2.3	Purificação parcial da lipase.....	28
4.2.4	Determinação do teor de proteínas	28
4.2.5	Determinação da atividade enzimática.....	29
4.2.6	Poliamida reciclada contendo partículas magnéticas.....	30

4.2.7	Análise de área superficial e volume de poros dos suportes	31
4.3	Imobilização de Lipases Utilizando Planejamento Fatorial.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Purificação Parcial de Lipase	36
5.1.1	Área específica e volume de poros	37
5.2	Imobilização de lipases utilizando planejamento fatorial.....	39
6	CONCLUSÃO	54
7	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como catalisadores em processos industriais é uma alternativa aos catalisadores químicos. Dentre as vantagens pode-se destacar seletividade pelo substrato, processos industriais ocorrerem em condições mais brandas de pressão e temperaturas, e ainda, a não geração de subprodutos poluentes.

A capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico fazem as lipases serem as principais enzimas utilizadas em processos de biocatálise. Atualmente, a utilização de lipases nesses processos é limitada devido ao custo destas enzimas.

O uso de micro-organismos como fonte de lipases é atrativo por sua relativa facilidade de produção e devido a maioria desses possuir enzimas extracelulares, exigindo mecanismos mais simples de extração, isolamento e purificação. Utilizar coprodutos, como a torta de soja, como fonte de nutrientes para o crescimento desses micro-organismos é uma alternativa para redução do custo de produção dessas enzimas. O fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, foi previamente selecionado como bom produtor de lipases quando cultivado em torta de soja e glicerol por fermentação submersa (MESSIAS, 2008).

Outra estratégia importante para tornar lipases atrativas economicamente é a imobilização enzimática, que possibilita a recuperação e a reutilização. A imobilização por adsorção é um método simples, de baixo custo e muito empregado. O aproveitamento de resíduos e produtos reciclados como suporte para imobilização da enzima é também outra forma de tornar o processo economicamente viável.

Técnicas como planejamento fatorial e análise de superfície de resposta têm sido utilizadas para a otimização das condições de imobilização e catálise, visando o aumento da atividade enzimática e economia de tempo e reagentes.

Este trabalho teve como objetivo a imobilização de lipases, parcialmente purificadas, produzidas pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando planejamento fatorial, em diferentes suportes.

2 OBJETIVO GERAL

Purificar parcialmente lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e avaliar sua imobilização nos suportes: carvão de eucalipto e peroba ativados e poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas utilizando planejamentos fatoriais.

2.1 Objetivos Específicos

- Purificar parcialmente a lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 com solução saturada de sulfato de amônio;
- Comparar as Análises de área superficial e volume de poros dos suportes: carvão de eucalipto sem e com ativação, carvão de peroba sem e com ativação, poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas.
- Imobilizar a enzima parcialmente purificada nos suportes: carvão de eucalipto ativado, carvão de peroba ativado, poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas de acordo com planejamentos fatoriais.

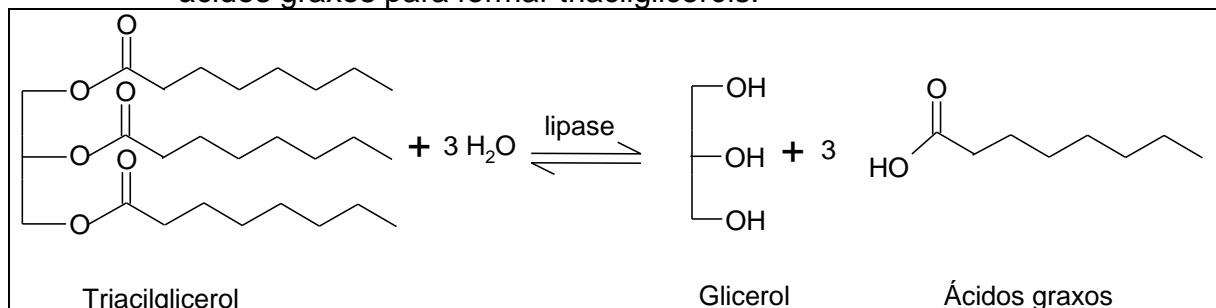
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Lipases definição, Mecanismos de Ação e Propriedades

Enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas com alta especificidade ao substrato, evitando geração de subprodutos. As lipases são enzimas que se diferenciam pela capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico.

Lipases é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1) e são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) pois atuam na hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999; JAEGER; EGGERT, 2002) A Figura 1 ilustra a ação catalíticas destas enzimas.

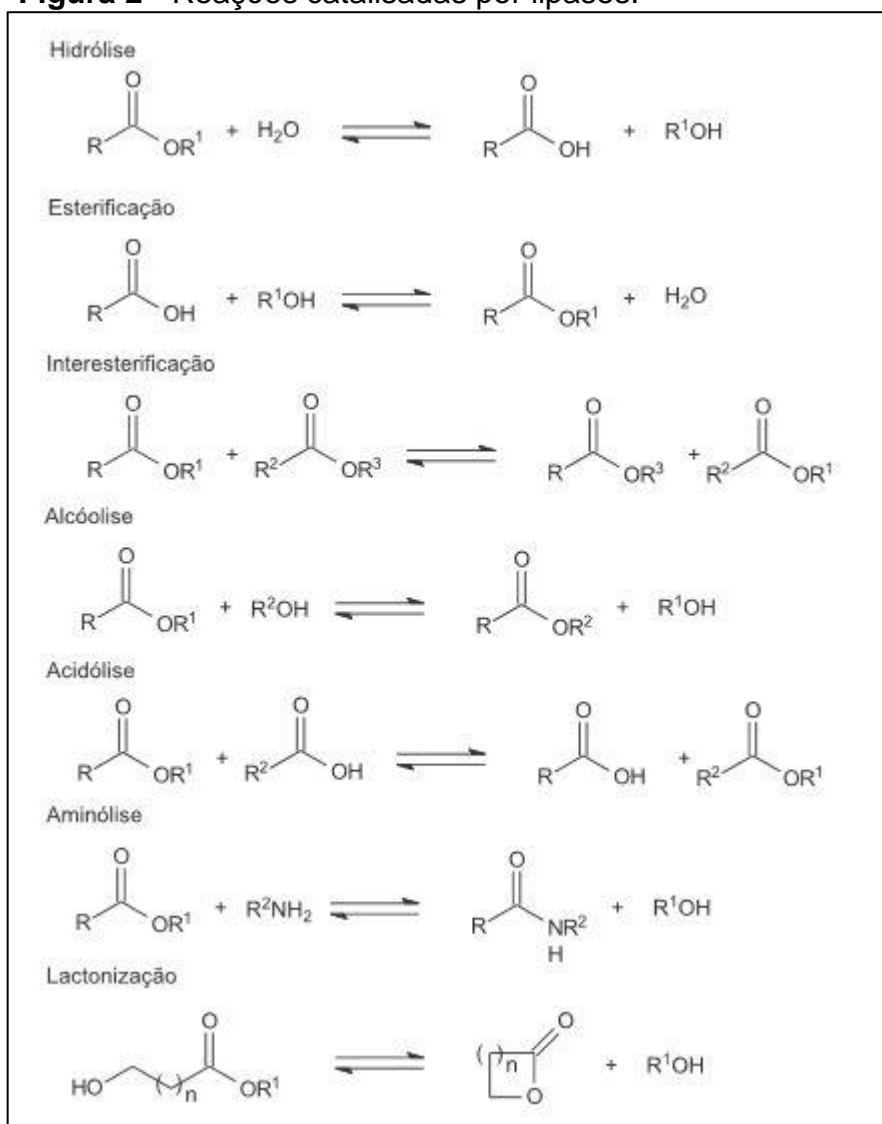
Figura 1 - Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado a glicerol e ácidos graxos, ou o reverso (síntese) que combina glicerol e ácidos graxos para formar triacilgliceróis.



Fonte: JAEGER; REETZ (1998).

O mecanismo de hidrólise das lipases envolve o ataque nucleofílico da água sobre o intermediário acil enzima, liberando o ácido carboxílico correspondente. Uma vez que a água no meio é substituída por álcoois, amins ou ácidos, outras reações como esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise podem ocorrer (JAEGER et al., 1994; JAEGER e EGGERT, 2002; PAQUES; MACEDO, 2006). Essas reações estão demonstradas na Figura 2.

Figura 2 - Reações catalisadas por lipases.



Fonte: PAQUES; MACEDO (2006).

O sítio catalítico das lipases é formado por uma serina, uma histidina e ácido aspártico ou glutâmico, compondo a denominada tríade catalítica (JAEGER; REETZ,1998), esse é frequentemente protegido na molécula por uma "tampa"

hidrofóbica ou "lid" que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo (BALCÃO et al., 1996).

A aplicação de lipases em processos industriais como a biocatálise e a tecnologia enzimática são promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. A temperatura de atividade ótima dessas enzimas geralmente está na faixa entre 30 e 55 °C e embora suas características de termoestabilidade possam ser influenciadas em função da sua origem, as enzimas microbianas são, em geral, as mais estáveis quando comparadas as de origem animal e vegetal. Comumente as lipases, não necessitam de cofatores e são ativas em pH entre 5 e 9, com uma faixa máxima entre 6 e 8 (FREIRE; CASTILHO, 2000). Apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (PANDEY et al., 1999).

As lipases são naturalmente encontradas em tecidos de animais, principalmente no pâncreas; em plantas como a mamona (*Ricinus communis*) e canola (*Brassica napus*); e em micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (JAEGER; REETZ, 1998; PANDEY et al., 1999).

3.1.1 Micro-organismos produtores de lipases

Os estudos sobre produção de lipases utilizando micro-organismos iniciaram em 1906. Uma das vantagens na utilização de enzimas microbianas está relacionada a sua estabilidade, pois estas são mais estáveis quando comparadas com as extraídas por plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura.

Hoje são conhecidos um grande número de micro-organismos produtores de lipases entre as bactérias destacam-se os gêneros *Achromobacter*., *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* e *Chromobacterium*; e entre os fungos os gêneros como *Mucor*, *Rhisopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Humicola* (HANSAN et al., 2006).

Lipases obtidas de micro-organismos são facilmente produzidas, quando comparadas a outras fontes de lipases, e também há abundância de micro-

organismos que podem sintetiza-las, com isso do ponto de vista econômico e industrial são as mais utilizadas.

As enzimas extracelulares presentes nos fungos os tornam atrativos, pois essas facilitam a sua recuperação do meio de fermentação (JAEGER et al., 1994).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus sp* (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004; SAXENA et al., 2003), *Rhizomucor miehei* (PALLA, PACHECO e CARRIN, 2011), *Penicillium aurantiogriseum* (LIMA et al., 2003) e da levedura *Candida rugosa* (LI; HU e HAN, 2015).

A produção de lipase por fungos filamentosos varia de acordo com a cepa e com os fatores abióticos como: composição do meio de crescimento, ambiente de cultura, pH, temperatura, e fonte de carbono e nitrogênio (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004). Em condições apropriadas de cultivo algumas espécies de fungos filamentosos produzem quantidades consideráveis de lipase, sendo seus extratos facilmente obtidos (SALLEH et al., 1993).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como as melhores fontes produtoras de lipases, sendo estudados do ponto de vista genético e bioquímico. A busca de cepas selvagens produtoras de enzimas é uma técnica de grande importância em países com grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE; CASTILHO, 2000).

3.1.2 Composição do meio de cultivo para a produção de lipases

Lipases fúngicas são na sua maioria extracelulares e sua produção é influenciada pela composição do meio, além de fatores físico-químicos tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido.

Um fator importante para a produção de lipases está relacionado com a fonte de carbono, uma vez que atua como indutor. Estas enzimas são geralmente produzidas na presença de um lipídio, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tensoativos, sais biliares, e glicerol (SHARMA et al., 2001).

A fonte de nitrogênio, tanto orgânicas quanto inorgânicas, favorecem o crescimento e produção da enzima (GHOSH et al., 1996). Estes requisitos nutricionais são fornecidos ao micro-organismo pela adição ao meio de cultivo de

ureia, sulfato de amônio, nitrato de amônio, ou componentes complexos, tais como: extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte e peptona, uma alternativa interessante é a utilização de resíduos agroindustriais como torta de soja e trigo, casca de arroz, torta de mamona, milhocina, entre outros (TREICHEL et al., 2010).

Visando a diminuição dos custos, os coprodutos agroindustriais, como a torta de soja, podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, fonte de carbono e também nitrogênio, para a produção de lipases em fermentação submersa.

3.1.3 *Botryosphaeria ribis* EC-01 como produtor de lipases

Os fungos da família *Botryosphaeriaceae* são descritos como potenciais produtores de enzimas a partir de 1995, quando Barbosa e colaboradores isolaram o ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (MAMB-05) de cancro de eucalipto (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA et al., 1996).

Dos nove isolados do gênero *Botryosphaeria*, o *B. ribis* EC-01 foi o melhor produtor de lipase nos cultivos contendo óleo de milho ou óleo de soja, em condição de fermentação submersa. A atividade específica da lipase foi maior nos cultivos contendo óleo de soja ou glicerol (MESSIAS, 2008; MESSIAS et al., 2009).

Andrade et al. (2013) otimizaram a produção de lipases através de fermentação submersa utilizando torta de soja como substrato, minimizando os custos para a produção utilizando coprodutos no meio de cultivo.

3.2 Imobilização de Enzimas

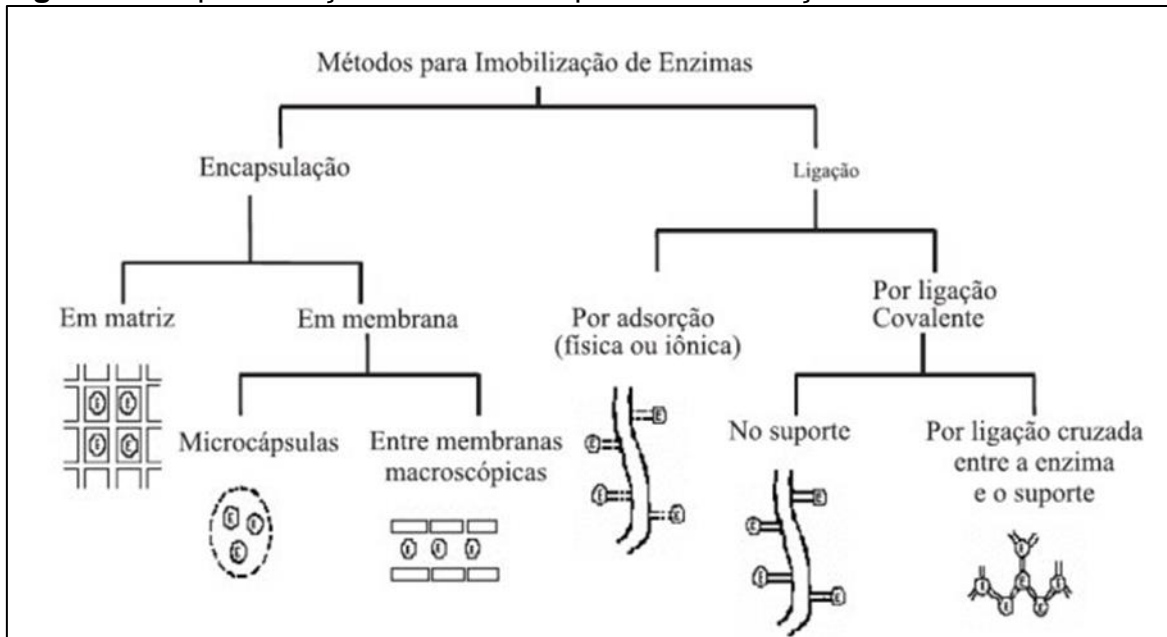
O desenvolvimento de técnicas de imobilização são importantes no sentido de proporcionar a reutilização das enzimas, mas a imobilização pode ocasionar a melhoria da atividade enzimática e, ainda, atende aos princípios da química verde e sustentabilidade, uma vez que não ocorre a formação de subprodutos durante o processo (KAPOOR; GUPTA, 2012).

Outra vantagem da imobilização de enzimas é que permite a separação física da enzima com o meio de reação, o que facilita a sua recuperação e reutilização

(BALCÃO et al., 1996), com isso há a redução do custo da enzima e consequentemente do produto.

Entre as técnicas utilizadas na imobilização de enzimas estão a adsorção física, ligação covalente a um suporte sólido, encapsulamento físico dentro de um suporte de matriz polimérica, entre outras, que podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 - Representação dos métodos para a imobilização enzimática.



Fonte: (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A adsorção física é um método simples e muito utilizado, ocorre a imobilização no suporte por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas.

As propriedades como área superficial, porosidade, capacidade de adsorção da enzima e custo, são características a serem analisadas na escolha do material que será utilizado como suporte. Outra característica do suporte que deve ser levada em consideração são os grupos funcionais de superfície, que informam sobre o tipo de interação entre a enzima e o suporte. Vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, sílica, celite, Octil-Sepharose, celulose, Sephadex, entre outros (VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização de enzimas no interior de poros de suportes proporciona a proteção da estrutura proteica com relação à desnaturação pelo contato com

solventes orgânicos ou a ação de bolhas de gases e forte agitação (YU, WU e CHING, 2004).

Além do suporte e do método de imobilização escolhidos para imobilização de enzimas, uma característica importante desse processo é que a enzima deve estar imobilizada de forma que esteja acessível ao substrato, mantendo sua atividade enzimática (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

3.2.1 Suportes para imobilização de lipases

As lipases têm sido imobilizadas em diversos suportes: quitosana (PALLA et al., 2011; ROMDHANE et al., 2011), resinas (ZHAO et al., 2013; BASSO et al., 2016), partículas magnéticas (XIE; MA, 2009; AKIL et al., 2016) e celite (LIU et al., 2009; ANDRADE et al., 2013), envolvendo várias técnicas de imobilização.

A adsorção é a técnica simples e muito utilizada, que possui custos mais baixos quando comparada as outras técnicas de imobilização, devido à ausência de produtos químicos muitas vezes tóxicos (BALCÃO et al., 1996).

Vários tipos de materiais para imobilização de lipase estão sendo desenvolvidos para aplicação na síntese de biodiesel. Liu et al. (2012b) desenvolveram partículas hidrofóbicas magnéticas a partir de uma solução de FeSO_4 e tetrasiloxano (TEOS) para imobilizar a lipase de *Burkholderia* sp. Xie e Wang (2012) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em esferas de quitosana magnéticas (Fe_3O_4 -quitosana). Xie e Ma (2009) utilizaram nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 como suporte para a lipase de *Thermomyces lanuginosa*.

O carvão ativado é um material poroso e de baixo custo de produção. Essas características são desejáveis na imobilização de enzimas, podendo este servir de suporte para este uso (RAMANI et al., 2010). O carvão ativado como suporte para lipases já foi utilizado para aplicação na produção de biodiesel (NARANJO et al., 2010; MORENO-PIRAJÁN; GIRALDO, 2011).

A utilização de coprodutos e materiais reciclados como suporte para imobilização de lipases reduz o custo de imobilização, sendo importante para que tornar a aplicação economicamente viável.

3.2.1.1 Carvão ou carvão de pirólise

O carvão é definido pela Iniciativa Internacional de Biocarvão (Internacional Biochar Initiative - IBI), como um material sólido formado durante a decomposição termoquímica de biomassa (CHA et al., 2016). O carvão de pirólise é de baixo custo, ambientalmente correto e pode ser utilizado em vários setores, como remediação de solos, tratamento de água, redutor de gases de efeito estufa, geração de energia, e vários estudos vêm sendo desenvolvidos para novas aplicações (LEHMANN; JOSEPH, 2012). Embora o principal elemento do carvão seja o carbono (C), também contém hidrogênio (H), oxigênio (O), cinzas, e traços de nitrogênio (N) e enxofre (S). A composição do carvão varia de acordo com a biomassa utilizada, processo de carbonização (DUKU et al., 2011; KAMBO; DUTTA, 2015).

Devido à alta área de superfície, estrutura porosa, grupos funcionais, e alto conteúdo mineral, o carvão tem diversas aplicações como adsorção de poluentes da água e atmosféricos (KAMBO e DUTTA, 2015; LEHMANN; JOSEPH, 2012) e catálise (imobilização de lipase para a produção de biodiesel) (CHA et al., 2016; HU et al., 2015).

Resíduos sólidos orgânicos, como a serragem, são gerados em grandes quantidades no mundo e são pouco utilizados para geração de energia, devido ao alto teor de água. A pirólise é uma tecnologia promissora para conversão biomassa lignocelulósica, como madeira, casca de coco, turfa, palha de cana-de-açúcar (ROCHA et al., 2004; FAAIJ et al., 2005).

A pirólise baseia-se na conversão termoquímica de biomassa, na ausência de oxigênio. O processo de decomposição libera espécies voláteis, como o bio-óleo, e não voláteis, estes como carvão. O gás que também é obtido no processo, pode ser queimado para ajudar na diminuição de umidade da biomassa de entrada e operar o reator, já o carvão e cinzas são promissores para o solo e como adsorventes. (DENG et al., 2008; MARTINS et al., 2007; FAAIJ et al., 2005).

Os métodos de pirólise se diferem devido à temperatura, a velocidade de aquecimento e o tempo de permanência da biomassa no reator, afetando diretamente nas porcentagens de produtos que se pode obter. São divididos em duas classes: pirólise rápida e a lenta (ROCHA et al., 2004; FAAIJ et al., 2005).

A pirólise rápida é um processo relativamente novo, que produz em maior quantidade o produto líquido (bio-óleo), através de altas taxas de aquecimento em um curto período de tempo. A pirólise lenta é caracterizada pelas taxas de aquecimento lentas, aproximadamente $0,1-1^{\circ}\text{C}$ por segundo, e um tempo de permanência da biomassa muito maior no reator. Este processo mais demorado produz quantidades aproximadamente iguais de carvão, gás e líquido. (DENG et al., 2008; NANDA et al., 2014; MAHINPEY et al., 2009).

Segundo ROCHA et al. (2004), o carvão é considerado um resíduo sólido do carvão vegetal obtido da pirólise, mas estudos demonstram que a caracterização de carvões derivados da pirólise apresentam uma superfície em que a matriz carbonácea é promissora e a sua ativação pode ser uma maneira alternativa de utilização do carvão que contribui para a produção de outros biocombustíveis, como também para tratamento de efluentes da indústria de biocombustíveis, entre outras. (MARTINS et al., 2007 ; ROCHA et al., 2004 ; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

3.2.1.1.1 Ativação do carvão

Para a utilização do carvão como adsorvente, estudos sobre o preparo de carvões ativados com propriedades químicas e físicas adequadas tem sido desenvolvido visando a obtenção de um produto com estrutura porosa desejada. O método de ativação contribui para o aumento do número de poros, além de dos poros já existentes, com distribuição e tamanho esperados (HADOUN et al., 2013; LIOU, 2008).

O preparo de carvão ativado pode ser dividido em dois processos: físico e químico. A ativação física é o método em que o precursor passa pelo processo de pirólise e gaseificação a temperaturas elevadas que variam entre $700 - 1000^{\circ}\text{C}$, sob fluxo de gás oxidante, podendo estes ser em vapor d'água, CO_2 ou ar atmosférico. A ativação física faz com que aumente o número de poros e por consequência a sua área superficial. O gás oxidante utilizado no processo faz com que carbonos sejam retirados seletivamente da estrutura, formando aberturas e produzindo poros (BANSAL et al., 1988; TZVETKOV et al., 2016).

No processo de ativação química, a matéria prima é impregnada com agentes ativadores que reagem fortemente podendo ser ácidos como H_3PO_4 , ou básicos como NaOH e KOH , estes reagentes com características desidratantes, impedindo o

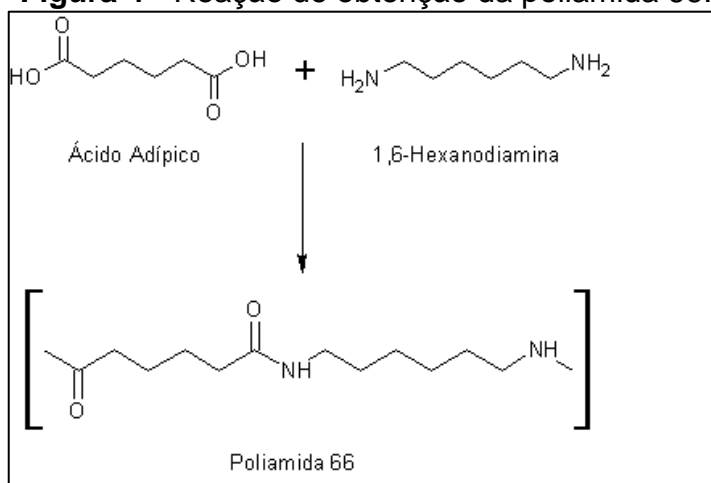
desenvolvimento de betuminosos no interior dos poros. Após o processo de impregnação, é feita a ativação termoquímica, atingindo temperaturas entre 450-700 °C, sob atmosfera inerte, como por exemplo em fluxo de N₂ (TZVETKOV et al., 2016; AL-LAGTAH et al., 2016). O efeito desidratante dos agentes ativadores impede a formação de alcatrão, levando a um maior rendimento de carvão ativado, tendo maior vantagem do que a ativação física. Além disso, emprega uma temperatura de ativação menor, obtém-se um maior controle na distribuição de poros e produz maior área superficial em relação ao procedimento realizado na ativação física (EL-HENDAWY; SAMRA; GIRGIS, 2001; SYCH et al., 2012; KLIJANIENKO; LORENC-GRABOWSKA; GRYGLEWICZ, 2008).

Após a ativação espera-se que o material tenha um maior volume de poros em sua superfície, assim como uma maior área superficial e favorecendo a adsorção de substâncias que possuam afinidade pelos constituintes do suporte, como lipases. Além disso após a ativação ocorre a presença de átomos de oxigênio e hidrogênio, derivados do material de partida ou ligados quimicamente à estruturas durante a preparação, e também componentes das cinzas inorgânicas (RODRIGUÉZ-REINOSO, 1998).

3.2.1.2 Poliamida reciclada

A poliamida reciclada (Patente Requerida BR 10 2013 032157 5) é produzida utilizando um processo que envolve a reciclagem de retraços têxteis. O retraço têxtil utilizado era constituído por poliamida 66.

A poliamida 66 com nome IUPAC Poli[imino(1,6-dioxohexametileno) iminohexametileno]one (C₁₂H₂₂N₂O₂)_n é também conhecida como poli (adipamida hexanodila), poliamida 6.6, PA 66 (LAVADO, 2013). A nomenclatura dada a essa poliamida é devido ao fato de que os dois compostos que dão origem ao polímero possuem 6 carbonos e por isso a denominação “66” (BRYDSON, 1999). Esse tipo de poliamida é obtido da reação de desidratação intermolecular entre o ácido adípico (ácido hexanodióico) e a 1,6-hexanodiamina, ambos compostos derivados do petróleo, gerando água como coproduto (Figura 4).

Figura 4 - Reação de obtenção da poliamida 66.

Fonte: BRYDSON, 1999.

A presença de grupos amida ($-(C=O)-NH-$) nesse material permite a funcionalização de sua superfície, suportes com grupos amino livres na superfície, grupos que são conhecidos por terem uma elevada afinidade para as lipases (VILLENEUVE et al., 2000).

A adição de partículas magnéticas no suporte para imobilização de lipases facilita o processo de recuperação e reutilização (DEKKER, 1990).

O material mais utilizado na síntese de partículas magnéticas o ferro, assim como é a magnetita (Fe_3O_4) o material mais utilizado em aplicações biotecnológicas. A magnetita é um material que oxida facilmente em contato com o ar, levando a maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), porém não ocorre a perda de propriedade magnética (REBELO, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Torta de soja

A torta de soja utilizada neste trabalho para a produção de lipases foi doada pela empresa IMCOPA (Cambé-PR).

4.1.2 Carvão de pirólise

Os carvões de eucalipto (reflorestamento) e de peroba (madeira de demolição) foram obtidos por pirólise rápida cedidos pela empresa BLOWARE Tecnologia, Campinas, SP. Estes foram ativados quimicamente (DORTA, 2016) no LAFLURPE (Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica).

O carvão de pinus, previamente ativado, foi adquirido comercialmente (marca Quimidrol).

4.1.3 Poliamida reciclada

A poliamida reciclada utilizada neste trabalho foi produzida (Patente Requerida BR 10 2013 032157 5) e caracterizada (BAUMI, 2015) no LAFLURPE (Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica) através de processo que envolve a reciclagem de retraços têxteis.

4.1.4 Substrato para atividade de lipase

Foi utilizado como substrato para determinação de atividade hidrolítica da lipase, foi utilizado o éster palmitato de *p*-nitrofenila adquirido comercialmente de Sigma-Aldrich® (EUA).

4.1.5 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados foram o meio Meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Tabela 1), meio mínimo de sais de Vogel (1956) (Tabela 2) e o meio Vogel, Glucose e Ágar (VGA) (Tabela 3).

Tabela 1 - Meio Batata Dextrose Ágar.

Compostos	Quantidades
Infusão de batata	20 g
Dextrose	2 g
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: PITT; HOCKING, 1997.

Tabela 2 - Meio mínimo de sais de Vogel*

Citrato de sódio. 5 ½ H ₂ O	150 g	Solução de Elementos-traços:	
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g	Ácido cítrico. 1 H ₂ O	5 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10 g	Fe(NH ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5 g	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25 g
Solução de elementos-traços	5 mL	MnSO ₄ . 1 H ₂ O	0,05 g
Solução de biotina 0,1 mg/mL	2,5 mL	H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Água destilada qsp.	1000 mL	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,05 g
		Água destilada qsp.	100 mL

Fonte: VOGEL, 1956.

* Concentrado 50 vezes

Tabela 3 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)

Meio mínimo de sais de Vogel (50 vezes concentrado)	2 mL
Glucose	1 g
Ágar	2 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: VOGEL, 1956.

4.1.6 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Acession Number DQ852308).

4.2 Métodos

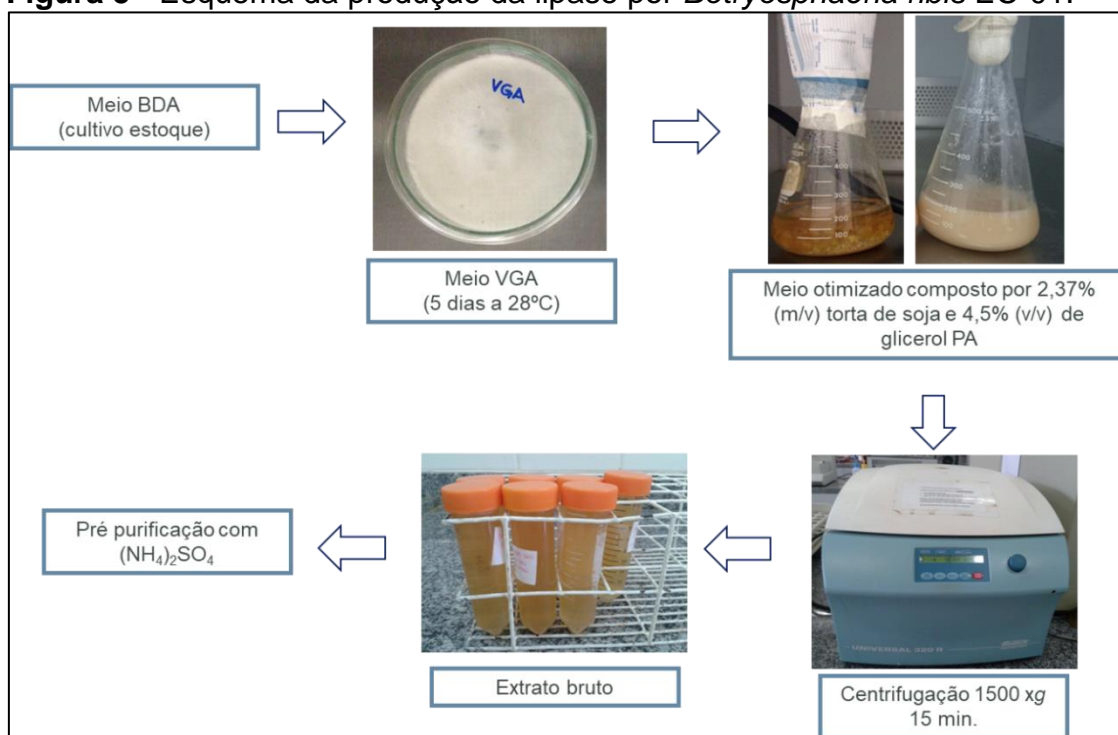
4.2.1 Manutenção do micro-organismo

O micro-organismo foi mantido em BDA inclinado à temperatura de 4 ± 2 °C e repicados trimestralmente.

4.2.2 Produção de Lipase

A lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi produzida por fermentação submersa de acordo com metodologia otimizada por Andrade et al. (2013). O processo consiste em cultivar o ascomiceto em meio VGA por 5 dias a 28 °C e após o crescimento, esferas de 7 mm de diâmetro contendo hifas homogêneas do fungo são transferidas para o meio líquido contendo 25 mL de água destilada, 2,37 % (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA que permanecem em agitação por 5 dias a 180 rpm e 28 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9000 rpm/ 15 minutos) e o extrato bruto enzimático foi utilizado como fonte de lipases e matéria-prima para precipitação de proteínas por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da produção da lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01.



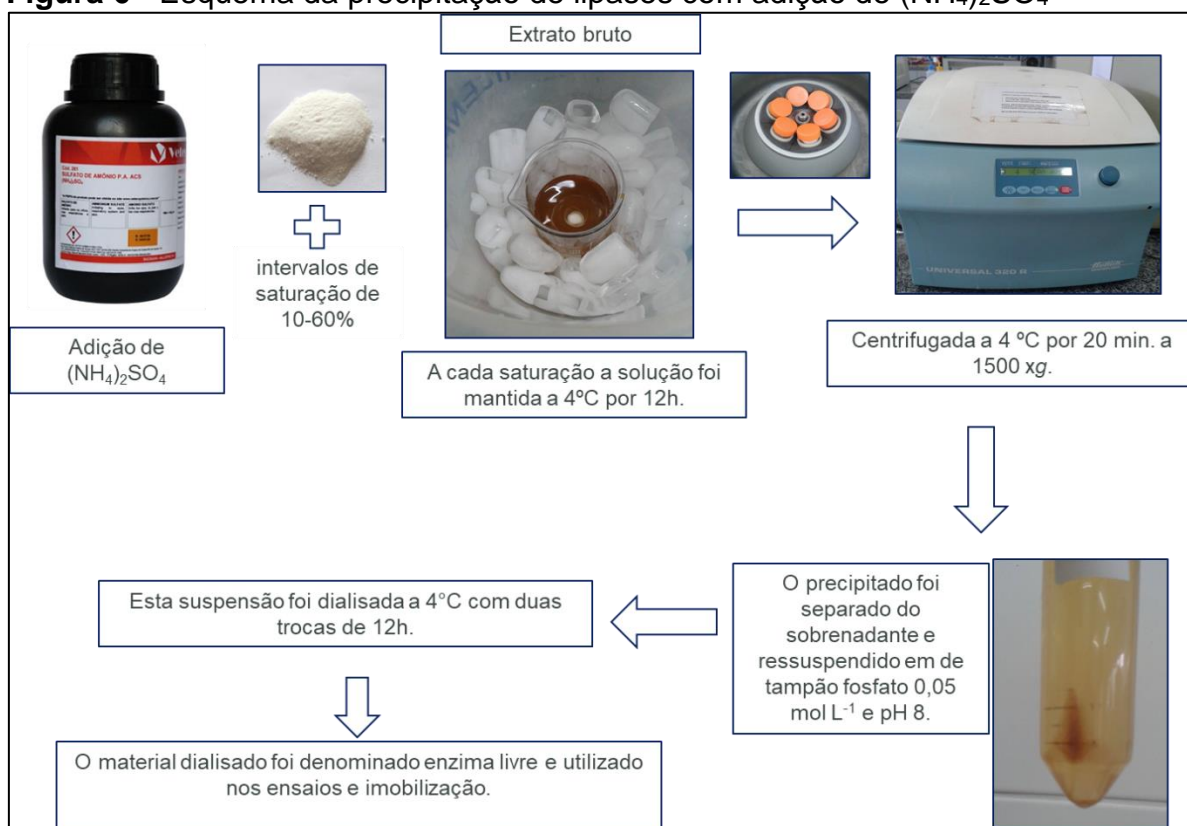
Fonte: própria autora.

4.2.3 Purificação parcial da lipase

O extrato bruto da produção de lipase foi coletado e utilizado para precipitação fracionada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em intervalos de saturação de 10-60% de saturação. Esta análise visa a precipitação de proteínas, de acordo com Scopes (1993).

A cada etapa de saturação a solução foi mantida a 4 °C por 12 h ao final deste tempo foi centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 3500 rpm. O precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspendido em um volume mínimo de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e pH 8,0. Esta suspensão foi dialisada a 4°C com duas trocas de água deionizada com intervalos de 12 h. O material dialisado foi denominado enzima livre e utilizado nos ensaios de imobilização. Este processo está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema da precipitação de lipases com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Fonte: própria autora.

4.2.4 Determinação do teor de proteínas

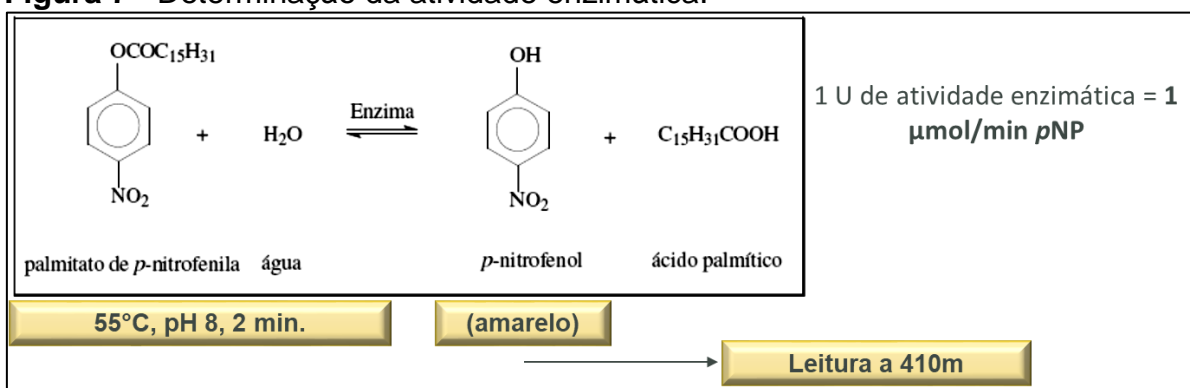
Para análise de proteínas foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o corante de Cromassie brilliant blue BG-250, e a soro albumina-BSA como padrão.

Para preparação da amostra 1 mL de reagente de Bradford foi adicionado a uma alíquota de 100 μL de lipase, que permaneceu em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Os valores de absorvância da amostra foram obtidos a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1240). A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão BSA, na faixa de 25 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.5 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo Winkler e Stuckmann (WINKLER; STUCKMANN, 1979). Esta técnica é baseada na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) que libera *p*-nitrofenol de cor amarela que pode ser quantificado espectrofotometricamente a 410nm. Uma unidade (1U) de atividade de lipase foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima (**Figura 7 - Determinação da atividade enzimática.Figura 7**).

Figura 7 - Determinação da atividade enzimática.



Fonte: própria autora.

Como observado na Figura 7, a análise foi realizada nas condições de pH 8,0, 55 °C em 2 minutos de tempo de reação, segundo procedimento otimizado por Messias et al. (2009).

As soluções foram:

Solução A: palmitato de p-nitrofenila em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg mL⁻¹.

Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão Fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0.

Foi homogeneizado 1 mL da solução A em 10 mL da solução B, utilizando um béquer e mantido a uma temperatura de 55 °C. Logo após, 0,9 mL desta mistura foi adicionada a 0,1 mL do extrato enzimático em tubo de ensaio. Após o tempo de reação (2 minutos), foi determinada a absorvância a 410 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi utilizada a equação:

$$U \text{ mL}^{-1} \text{ ou } U \text{ g}^{-1} \left[\frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } m_e/V_{sol}} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 10^3 \right] \quad (4.1)$$

onde:

$U \text{ mL}^{-1}$ = unidade de atividade enzimática da solução;

$U \text{ g}^{-1}$ = unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte;

Abs = absorvância a λ (nm);

ε = coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = $1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_e = volume de enzima utilizado no ensaio (m L^{-1});

m_e = massa da enzima utilizada no ensaio (g)

t_r = tempo de reação (minutos);

DF = fator de diluição e

1000 = fator de conversão de M para $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

4.2.6 Poliamida reciclada contendo partículas magnéticas.

O material utilizado como suporte para lipase foi a poliamida reciclada em pó (Patente: 10 2013032153-2,2013) contendo partículas magnéticas produzida no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética de Eletrônica (LAFLURPE) da UEL.

O preparo das partículas magnéticas (Fe_3O_4) foi realizado segundo metodologia proposta por Xie e Ma (2009) com modificações.

4.2.7 Análise de área superficial e volume de poros dos suportes

A área superficial e a distribuição de tamanho dos poros dos suportes foram obtidas por meio das isotermas de adsorção e dessorção de N₂ a 77 K (-196,15 °C) com pressões relativas de 0,01 a 0,2, em equipamento de adsorção de N₂ da marca Quantachrome Instruments, modelo NOVA 2000. As amostras foram previamente tratadas termicamente a 150 °C, por 6 horas.

A área superficial específica foi calculada pelo método BET (BRUNAUER et al., 1938) e a distribuição de volume de poros foi calculada pelo método BJH (HADOUN et al., 2013). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Analítica da Universidade Estadual de Londrina.

Para obtenção das isotermas de adsorção e dessorção de N₂ segundo BET (BRUNAUER et al., 1938), utilizou-se da equação apresentada por Greg; Sing, 1982:

$$Q_e = \frac{q_m \cdot b \cdot C_e}{(C_s - C_e) \cdot [1 + (b - 1) C_e / C_s]} \quad (4.2)$$

Onde:

Q_e = quantidade adsorvida para uma dada concentração de adsorvato (mg g⁻¹);

q_m = quantidade máxima adsorvida para uma dada concentração de adsorvato (mg g⁻¹);

b = constante relacionada à saturação em todas as camadas ;

C_e = concentração de equilíbrio (mg L⁻¹);

C_s = concentração do soluto na saturação de todas as camadas (mg L⁻¹).

4.3 Imobilização de Lipases Utilizando Planejamento Fatorial

A imobilização de lipases foi realizada pelo contato de 0,1 g do suporte (carvão de eucalipto, carvão de peroba, poliamida reciclada, com e sem partículas magnéticas) com 5 mL de solução de lipase em tampão fosfato (0,05 M pH 8) a 200 rpm em tempos e temperaturas pré-determinados segundo planejamentos fatoriais.

A influência das variáveis selecionadas foi estudada pelo desenvolvimento de planejamentos estatísticos 2² com pontos axiais ($\pm\alpha$, com $\alpha = (2^k)^{1/4}$) totalizando 11 experimentos. As Tabelas a seguir apresentam os planejamentos realizados com os

níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e também os axiais ($\pm 1,41$), que vão além dos inferiores e superiores.

Os fatores estudados foram concentração de enzima (X1) e temperatura (X2) para os carvões de eucalipto (Tabela 4) e peroba (Tabela 5). O tempo foi mantido fixo em 240 minutos para o carvão de eucalipto ativado e em 60 minutos para o carvão de peroba ativado de acordo com os resultados planejamentos fatoriais realizados anteriormente por Bonfinger (2015).

Tabela 4 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de concentração de enzima (% v/v) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto.

Experimento	Variáveis codificadas				
	X1	X2			
1	-1	-1			
2	-1	1			
3	1	-1			
4	1	1			
5	-1,41	0			
6	1,41	0			
7	0	-1,41			
8	0	1,41			
9 (C)	0	0			
10 (C)	0	0			
11 (C)	0	0			
Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ (enzima, %v/v)	76	94	138	182	200
X ₂ (temperatura, $^{\circ}\text{C}$)	21	22	25	28	29

Fonte: própria autora.

Tabela 5 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de concentração de enzima (% v/v) e temperatura (°C) na imobilização de lipase em carvão ativado de peroba.

Experimento	Variáveis codificadas				
	X1	X2			
1	-1	-1			
2	-1	1			
3	1	-1			
4	1	1			
5	-1,41	0			
6	1,41	0			
7	0	-1,41			
8	0	1,41			
9 (C)	0	0			
10 (C)	0	0			
11 (C)	0	0			
Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ (enzima, %v/v)	76	94	138	182	200
X ₂ (temperatura, °C)	41	42	45	48	49

Fonte: própria autora.

A imobilização de lipase de *B. ribis* EC-01 em poliamida reciclada com e sem partículas magnéticas se encontra em fase inicial, portanto não há relatos na literatura. As variáveis estudadas foram tempo (X₁) e temperatura (X₂) e a concentração da solução de enzima foi fixa (20 U mL⁻¹). O planejamento está apresentado na

Tabela 6.

Tabela 6 - Planejamento fatorial para avaliar os efeitos de tempo (minutos) e temperatura (°C) na imobilização de lipase em poliamida reciclada sem e com partículas magnéticas

Experimento	Variáveis codificadas				
	X1	X2	Níveis reais		
1	-1	-1			
2	-1	1			
3	1	-1			
4	1	1			
5	-1,41	0			
6	1,41	0			
7	0	-1,41			
8	0	1,41			
9 (C)	0	0			
10 (C)	0	0			
11 (C)	0	0			
Fatores	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ (tempo min)	47	90	195	300	343
X ₂ (temperatura, °C)	15	18	25	32	35

Fonte: própria autora.

A atividade enzimática pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) descrito anteriormente foi determinada na solução inicial oferecida para imobilização, no sobrenadante resultante da imobilização e no derivado imobilizado.

A atividade específica foi quantificada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{(\text{Atividade da enzima imobilizada})}{(\text{proteínas totais})} \quad (4.3)$$

A partir dos resultados experimentais, foram calculados os parâmetros do processo de imobilização E (Eficiência da imobilização) e R (Retenção da atividade), a partir das Equações 1 e 2 respectivamente (YADAV E JADHAV, 2005; BON ET AL., 1986):

$$E = \frac{(At_i - At_f).100}{At_i} \quad (1) \quad R = \frac{A_o.100}{A_T} \quad (2)$$

Sendo: At_i : atividade inicial total de hidrólise frente ao pNPP, antes da imobilização (U);

At_f : atividade final total de hidrólise frente ao pNPP no sobrenadante após a imobilização (U);

A_o : atividade observada (real) da enzima imobilizada (U.mg⁻¹ do suporte);

A_T : atividade teórica da enzima imobilizada (U.mg⁻¹ do suporte).

U: unidades totais de atividade (μmols do produto/min)

Para o cálculo da eficiência (E), considerou-se atividade inicial e final do sobrenadante, após a imobilização. Para os cálculos de retenção da atividade (R), considerou-se a atividade da enzima imobilizada frente à reação de hidrólise do pNPP em meio aquoso.

As análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 5 % de significância utilizando o programa STATISTICA® Version 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação Parcial de Lipase

Após a produção de lipase segundo condição otimizada por Andrade et al. (2013), descrita no item 4.2.2, o chamado aqui de extrato bruto foi submetido ao processo de purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e o produto desse procedimento foi chamado de solução de enzima e foi utilizado na imobilização de lipases nos suportes.

A Tabela 7 apresenta a comparação do extrato bruto com a enzima após purificação parcial com sulfato de amônio e diálise. Os resultados apontam que a concentração de 20 % (m/v) de (NH₄)₂SO₄ precipitou maior quantidade de enzimas, evidenciado pela elevada atividade enzimática (64,4 ± 0,27 U mL⁻¹). A eficiência do processo foi verificada após a dosagem de proteínas totais e cálculo da atividade específica que passou de 32,0 U mg⁻¹ no extrato bruto para 215 U mg⁻¹ após a purificação parcial.

Tabela 7 - Comparação de atividade enzimática, proteínas totais e atividade específica da lipase antes e após a purificação parcial.¹

Lipase	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Proteínas totais (mg mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)
Extrato bruto	9,60 ± 0,08	0,30 ± 0,01	32,0 ± 1,41
Precipitado a 20%	64,4 ± 0,27	0,30 ± 0,01	215 ± 8,57
Precipitado a 60%	20,5 ± 0,10	0,95 ± 0,01	21,5 ± 0,36

¹os resultados estão expressos pelas médias de três repetições

Fonte: próprio autora.

A purificação parcial de lipases utilizando a precipitação com sulfato de amônio é observada em artigos encontrados na literatura.

Autores como Yong e colaboradores (YONG et al., 2016) também utilizaram essa mesma técnica para a lipase do micro-organismo *Botryococcus sudeticus* obteve a atividade lipolítica da enzima em solução com atividade específica 46,80 U

mg⁻¹, após o processo de purificação com sulfato de amônio (15-65%, m/v) 63,60 U mg⁻¹.

Ulker e Karaoglu (ÜLKER; KARAOĞLU, 2012), utilizando o micro-organismo *Mucor hiemalis* como fonte de lipases, obteve atividade enzimática específica de 1,74 U mg⁻¹ antes da precipitação e 5,70 após a precipitação com sulfato de amônio (precipitação de 40-75%).

Tripathi e colaboradores (TRIPATHI et al., 2014), utilizaram *Microbacterium* sp. como fonte de lipases e obtiveram a atividade específica na lipase antes da precipitação era de 2.3 U mg⁻¹ e após a precipitação (0-70%) com sulfato de amônio 3.5 U mg⁻¹.

Os resultados alcançados no presente trabalho na precipitação enzimática utilizando 20 % (m/v) de (NH₄)₂SO₄ podem ser importantes para a aplicação destas enzimas, visto que a atividade específica aumentou mais de seis vezes e é um método simples, utilizando pouca quantidade do sal comparando-se com os resultados obtidos por outros autores acima citados , uma vez que atividade específica passou de 32 U mg⁻¹ para 215 U mg⁻¹.

5.1.1 Área específica e volume de poros

A análise da área superficial e caracterização dos poros é um procedimento padrão e está relacionado com a adsorção do nitrogênio ao material, a uma temperatura de 77 K. As isotermas obtidas no método fornecem informações qualitativas sobre a estrutura porosa do carvão (SING, 1985).

Devido ao método de preparação dos carvões ativados, que influencia nas isotermas, é possível prever as diferenças na morfologia do material após o efeito do agente ativador, no caso H₃PO_{4(aq)}. A Tabela 8 apresenta os resultados da análise da superfície dos diferentes suportes.

Tabela 8 - Comparação das diferentes áreas superficiais e volumes de poros de diferentes suportes.

Suportes	Área Superficial (m ² g ⁻¹)	Volume do poro (cm ³ g ⁻¹)	Raio médio do poro (nm)
Carvão comercial ativado	53,04	0,068	1,8
Carvão de eucalipto não ativado	1,40	0,002	1,6
Carvão de eucalipto ativado	218,00	0,323	8,4
Carvão de peroba não ativado	5,00	0,009	1,1
Carvão de peroba ativado	466,00	0,225	1,6
Poliamida reciclada sem partículas magnéticas	6,47	3,330	1,7
Poliamida reciclada com partículas magnéticas	15,08	9,460	8,2

Fonte: própria autora.

A área superficial específica foi calculada pelo método BET (BRUNAUER et al., 1938) essa equação é baseada na hipótese de que as forças responsáveis pela condensação do gás são responsáveis também pela atração de diversas moléculas para a formação de multicamadas (TEIXEIRA et al., 2001). Os diferentes valores de área superficial e volume de poros entre os carvões sem ativação e após ativação indicam que a impregnação do agente ativador H₃PO_{4(aq)} resultou em um aumento significativo de área superficial passando de 1,40 m²g⁻¹ para 218 m²g⁻¹ para o carvão de eucalipto e 5,00 m²g⁻¹ para 466 m²g⁻¹ aumentando também o raio médio e volume de poros. Além da ação do agente ativador há também a interferência da temperatura de carbonização na área superficial, que pode ter ocorrido devido a rápida degradação térmica liberando compostos voláteis que levam a ampliação de poros e conseqüente aumento da área superficial dos adsorventes (YAKOUT & SHARAF 2012).

Para a poliamida reciclada pode-se concluir que a adição de partículas magnéticas aumentou a área superficial, volume e raio médio dos poros.

O raio médio dos poros pode classificar os suportes segundo a IUPAC se são micro, meso ou macroporosos. O volume de poros foi calculado pelo método BJH (HADOUN et al., 2013). Os poros são os principais responsáveis pelo aumento da área superficial, e dependendo do seu tamanho influencia diretamente na capacidade de adsorção de certas moléculas, tornando-se um importante fator para o resultado final.

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem sua elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. O diâmetro dos poros do suporte deve receber devida atenção, pois, devem ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato e difusão dos produtos (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Estudos relatam uma imobilização mais eficiente de enzimas ao se utilizar suportes porosos em comparação com não porosos, devido ao seu tamanho e volume dos poros, da elevada área superficial e estruturas abertas características desses materiais (ZHAO et al., 2013).

5.2 Imobilização de lipases utilizando planejamento fatorial

A influência de fatores na atividade da enzima imobilizada foi avaliada através de planejamentos fatoriais 2^2 acrescidos de pontos axiais, em que se variou a temperatura e a concentração de lipase para imobilização, para os suportes carvão de eucalipto ativado (CEA) e carvão de peroba ativado (CPA).

Para a imobilização nos carvões ativados as concentrações e as respectivas atividades enzimáticas estão representadas na

No caso da poliamida com (PRPM) ou sem partículas magnéticas (PR) planejamentos fatoriais 2^2 também acrescidos de pontos axiais foram realizados onde as variáveis tempo e temperatura foram avaliadas. A concentração da solução de enzima foi mantida fixa (20 U mL^{-1}).

Foram calculadas as atividades em $\text{U g}^{-1}\text{suporte}$ e específicas $\text{U mg}^{-1}\text{ proteína}$, que relaciona a atividade com a quantidade de proteínas totais ligada ao suporte ($\text{mg g}^{-1}\text{suporte}$). Também foi avaliada a eficiência de imobilização. Entretanto, o modelo matemático foi avaliado apenas para a atividade da enzima imobilizada ($\text{U g}^{-1}\text{suporte}$).

Tabela 9.

No caso da poliamida com (PRPM) ou sem partículas magnéticas (PR) planejamentos fatoriais 2^2 também acrescidos de pontos axiais foram realizados onde as variáveis tempo e temperatura foram avaliadas. A concentração da solução de enzima foi mantida fixa (20 U mL^{-1}).

Foram calculadas as atividades em $\text{U g}^{-1}_{\text{suporte}}$ e específicas $\text{U mg}^{-1}_{\text{proteína}}$, que relaciona a atividade com a quantidade de proteínas totais ligada ao suporte ($\text{mg g}^{-1}_{\text{suporte}}$). Também foi avaliada a eficiência de imobilização. Entretanto, o modelo matemático foi avaliado apenas para a atividade da enzima imobilizada ($\text{U g}^{-1}_{\text{suporte}}$).

Tabela 9 - Atividade enzimática das diferentes concentrações de solução de lipases utilizadas no planejamento de imobilização dos carvões ativados.

% Enzima (v/v)	Atividade enzimática (U mL^{-1})
75	15
94	19
138	30
182	36
200	40

Fonte: própria autora.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na imobilização de lipase em carvão de eucalipto ativado (CEA). A imobilização de lipase em CEA variou de 5,38 a $296 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$, sendo este maior valor encontrado no experimento 7, onde a concentração de enzima e temperatura foram de 138 % (v/v) e $21 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Nestas condições a eficiência de imobilização (E) foi de 97,7 % e a retenção (R) foi próxima a 22 %, evidenciando que grande quantidade de enzima foi adsorvida no suporte (E), porém após o processo de imobilização nem toda enzima esta ativa no suporte (R) em comparação com a enzima livre.

Entretanto, observa-se que no experimento 4 foi obtido valor semelhante de eficiência de imobilização (97,9 %), porém a atividade da enzima imobilizada no suporte foi de $47 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$. Isto é devido ao baixo valor de retenção obtido (2,64 %). Observa-se, para todos os ensaios, alta eficiência (acima de 90%) e retenção inferior a 100%, o que sugere mudanças conformacionais na enzima após o processo de imobilização.

Com o aumento da temperatura (experimento 8) é possível observar um decréscimo de mais de 98%. Este efeito é mostrado na equação preditiva 5.1 ($R^2 = 0,90$), onde os termos significativos ($p \leq 0,05$) estão em negrito e a temperatura aparece como X_2 . O sinal negativo mostrado na equação significa que a variável influencia negativamente na imobilização desta enzima.

O aumento da temperatura ocasiona maior energia cinética às moléculas de lipase, sendo assim maior o número de choques entre as moléculas e menor a taxa de imobilização (KHOABI et al., 2014).

Tabela 10 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em carvão de eucalipto ativado.

Exp.	Variáveis codificadas		Respostas				
	X_1	X_2	Atividade enzimática (U g ⁻¹)	Proteínas totais (mg g ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Eficiência (%)	Retenção (%)
1	-1	-1	52,8	1,63	32,4	95,7	5,86
2	-1	1	59,5	3,25	18,3	96,1	6,58
3	1	-1	260	3,65	71,3	98,5	14,5
4	1	1	47,0	4,64	10,1	97,9	2,64
5	-1,41	0	46,4	2,11	9,99	94,8	6,53
6	1,41	0	265	1,43	186	94,3	14,1
7	0	-1,41	296	1,90	156	97,7	21,9
8	0	1,41	5,38	1,34	4,01	97,2	0,40
9	0	0	62,3	1,64	38,0	97,2	4,65
10	0	0	63,3	2,37	26,7	90,4	5,08
11	0	0	66,0	1,89	34,3	97,2	4,92
Fatores	Níveis reais						
			-1,41	-1	0	1	-1,41
X_1 (enzima, %v/v)			76	94	138	182	200
X_2 (temperatura, °C)			21	22	25	28	29

Fonte: própria autora.

Na equação também se pode notar que a concentração de enzima (X_1) também foi estatisticamente significativa e esta relação pode ser exemplificada no experimento 5 e 6, onde a concentração foi de 76 e 200 % (v/v), respectivamente e a

atividade enzimática obtida passou de 46,4 para 265 U g⁻¹_{suporte}, mantendo-se a temperatura de 25 °C. No experimento 6 também foi determinado o melhor resultado de atividade específica (186 U mg⁻¹_{suporte}).

$$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}} = 64,08 + 63,17 X_1 + 33,88 (X_1)^2 - 77,22 X_2 + 31,20 (X_2)^2 - 55,02 (X_1 X_2) \quad (5.1)$$

A Tabela 11 apresenta o modelo quadrático e mostra que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondentes à imobilização de lipase em U g⁻¹_{suporte}. O valor F e o valor do coeficiente de regressão (R^2) mostram que o modelo teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em carvão ativado de eucalipto

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}	F_{list}
U g ⁻¹ _{suporte}	Modelo	100703,6	2	100703,6	69,1	4,46
	Resíduo	11655,4	8	1456,9		
	Total	112359,0	10			

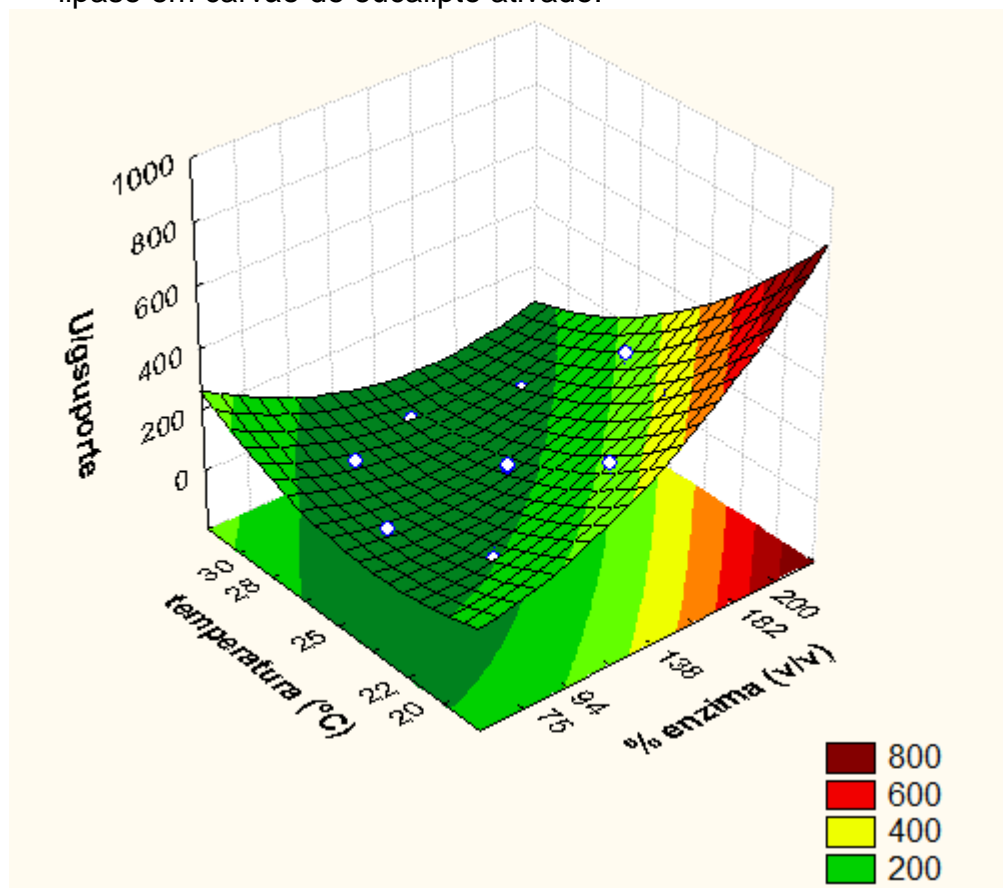
$R^2=0,90$; F 95%.2,8

O gráfico de superfície de resposta gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 8) indica a influência da concentração de enzima e temperatura na imobilização de lipase em CEA (U g⁻¹_{suporte}) e a resposta obtida pelo modelo preditivo foi 368,0 U g⁻¹_{suporte}, nas condições de 200 % (v/v) de concentração de enzima e 22,5 °C porém como pode-se verificar este modelo não é conclusivo, apenas indicativo para novos experimentos.

As regiões em vermelho na Figura 8 indicam a maior atividade enzimática para a imobilização de enzima no suporte CEA, enquanto que as regiões verdes indicam as de menor atividade. Pode-se observar que quanto maior a porcentagem de enzima e menor a temperatura, maior a atividade da enzima imobilizada. Observa-se também um leve aumento na atividade enzimática na temperatura de 32

°C, indicando que ainda se pode obter um planejamento com temperaturas mais extremas, pois a atividade enzimática continua aumentando.

Figura 8 - Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em carvão de eucalipto ativado.



Fonte: própria autora.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na imobilização de lipases em CPA. As atividades obtidas mostram novamente que em maiores temperaturas a adsorção é desfavorecida tendo a menor resposta de atividade enzimática para a temperatura de 49 °C. Os melhores resultados foram obtidos nos pontos centrais onde a atividade da enzima imobilizada e retenção da atividade ficou em torno de 58 U g⁻¹suporte e 4,5 %, respectivamente. A concentração de enzima e temperatura desses experimentos foram de 138 % (v/v) e 45 °C, respectivamente. O resultado obtido no experimento 6, onde a temperatura também era de 45°C foi o mais alto em termos de atividade enzimática (61,7 U g⁻¹suporte) e eficiência de imobilização (95,1 %), entretanto, a retenção foi menor neste ponto (3,24 %), comparado aos

experimentos realizados nos pontos centrais que utilizaram a mesma temperatura. O melhor resultado de atividade específica foi também obtido no ponto central (32,4 U mg⁻¹ suporte).

Tabela 12 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em carvão de peroba ativado.

Exp.	Variáveis codificadas		Respostas				
	X ₁	X ₂	Atividade enzimática (U g ⁻¹)	Proteínas totais (mg g ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Eficiência (%)	Retenção (%)
1	-1	-1	19,6	1,38	14,2	89,3	2,33
2	-1	1	15,2	1,73	8,76	87,2	1,85
3	1	-1	40,4	1,42	28,4	95,0	2,33
4	1	1	26,8	2,36	11,4	93,3	1,58
5	-1,41	0	14,2	3,23	4,39	86,6	2,19
6	1,41	0	61,7	3,01	20,5	95,1	3,24
7	0	-1,41	34,0	2,32	14,6	93,5	2,63
8	0	1,41	6,07	2,09	2,90	91,0	0,48
9	0	0	59,0	1,82	32,4	93,4	4,58
10	0	0	58,6	2,33	25,1	94,0	4,52
11	0	0	58,8	2,78	21,1	93,0	4,58
Fatores			Níveis reais				
			-1,41	-1	0	1	-1,41
	X ₁ (enzima, %v/v)		76	94	138	182	200
	X ₂ (temperatura, °C)		41	42	45	48	49

Fonte: própria autora.

A equação preditiva 2 ($R^2 = 0,89$) em função das variáveis independentes para a imobilização de lipase em CPA indicou que tanto concentração de enzima como temperatura tiveram efeito significativo ($p \leq 0,05$) e estão em negrito na equação.

$$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}} = 58,80 + 12,51X_1 - 11,30 (X_1)^2 - 3,95 X_2 - 0,33 (X_2)^2 + 4,15 (X_1 X_2) \quad (5.2)$$

A Tabela 13 apresenta o estudo do modelo para a imobilização da lipase em CPA em termos de atividade lipolítica ($U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$). Como pode ser verificado pelo valor de R^2 obtido e o valor de $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ nos graus de liberdade correspondente à imobilização o modelo teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em carvão de peroba ativado.

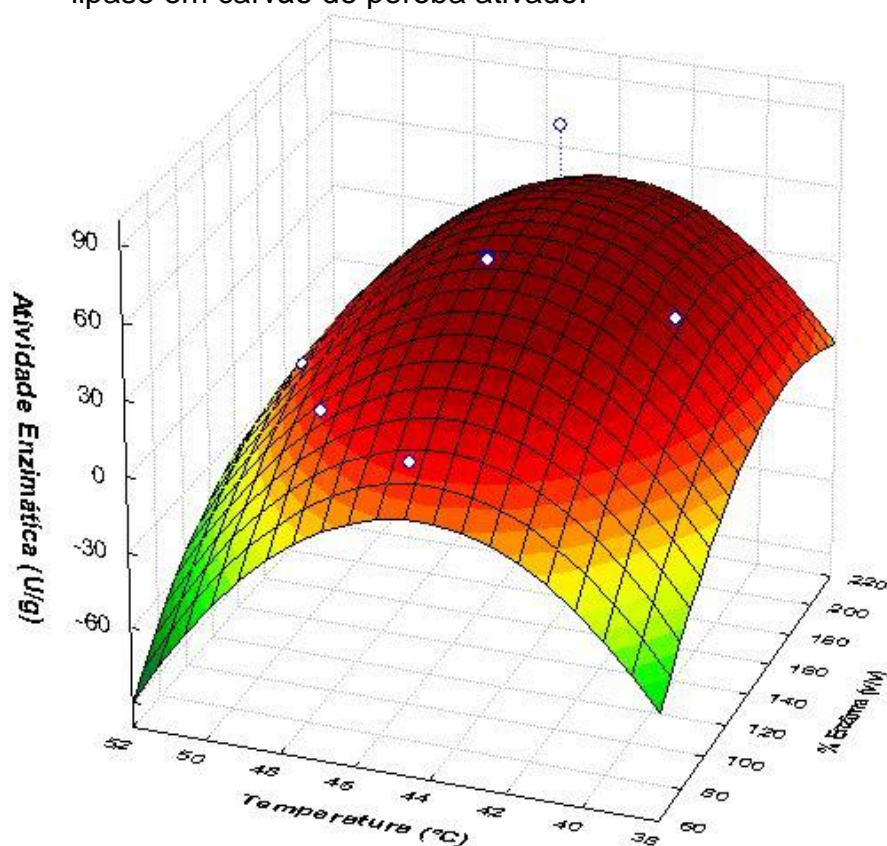
Resposta	Fonte de variação	Soma	Graus de	Média	F teste	
		Quadrados (SS)	Liberdade (DF)	Quadrados (MS)	F_{calc}	F_{ist}
$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$	Modelo	3930,169	3	3930,169	58,5	4,35
	Resíduo	470,117	7	67,16		
	Total	4400,286	10			

$R^2=0,89$; $F_{95\%} 3,7$

O gráfico de superfície de resposta gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 9) indica a influência da concentração de enzima e temperatura na imobilização de lipase em CPA ($U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$) e a resposta obtida pelo modelo preditivo foi próximo de $60 U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$.

As regiões em vermelho indicam a maior atividade enzimática enquanto as verdes regiões de menor atividade. Pode-se observar que quanto maior a porcentagem de enzima maior a atividade enzimática, temperaturas nos extremos não foram favoráveis à imobilização diminuindo as respostas, sendo que na temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ foi obtido o maior valor de atividade enzimática, na qual se observa a faixa ótima de temperatura para a imobilização em CPA, pois temperaturas maiores acabam ocasionando perda da atividade enzimática, pois acarreta a maior energia cinética às moléculas de lipase, com isso maiores choques entre as moléculas e menor a taxa de imobilização (KHOABI et al., 2014). A adsorção física é favorecida em temperaturas mais baixas (AL-ANBER, 2011).

Figura 9 - Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em carvão de peroba ativado.



Fonte: própria autora.

Comparando os dois carvões utilizados para a imobilização, o CPA obteve maiores valores de atividades ($U\ g^{-1}_{suporte}$ e $U\ mg^{-1}_{suporte}$), Eficiência de Imobilização (E) e Retenção da Atividade (R), isto se deve ao fato de que a superfície do carvão de eucalipto ativado obter poros com volume maior, raio médio de 8,4 nm, que os do carvão de peroba ativado, raio médio de 1,6 nm. Os poros são os principais responsáveis pelo aumento da área superficial, e dependendo do seu tamanho influencia diretamente na capacidade de adsorção do suporte (DORTA, 2016), além disso um pequeno tamanho dos poros pode causar a limitação da difusão, resultando em rearranjo estrutural das enzimas e subsequente redução da atividade (MILETIC et al., 2012).

Andrade (2013), que utilizou como produtor de lipases o mesmo micro-organismo, imobilizado em carvão ativado de coco comercial ativado fisicamente, nas condições de tempo 30 minutos e temperatura de 5°C, obteve $42,9\ U\ g^{-1}_{suporte}$.

Bofinger (2015) utilizou planejamentos experimentais 2^3 para imobilizar a lipase de *B. ribis* EC-01 em dois tipos de carvões de madeira, e segundo dados do planejamento, os suportes carvão de eucalipto e peroba, ativados pelo mesmo método utilizado no presente trabalho, apontou que as variáveis e suas interações não foram significativas, sugerindo um novo planejamento, este realizado neste trabalho, confirmando que os planejamentos de 2ª ordem foram satisfatórios nas interações entre as variáveis temperatura e concentração de enzima.

Dando sequência aos resultados, a seguir serão apresentados os planejamentos fatoriais para a imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 nos suportes poliamida reciclada (PR) e poliamida reciclada com partículas magnéticas (PRPM).

A Tabela 14 indica as respostas obtidas no planejamento fatorial para avaliar a imobilização de lipase de *B. ribis* EC-02 em PR. O experimento 2 exibiu o maior valor de atividade enzimática ($760 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$) quando tempo e temperatura foram de 90 minutos e $32 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Neste experimento a retenção de atividade enzimática teve o valor mais alto (95,4 %) mostrando que após o processo de imobilização a enzima ficou ativa. Valor de retenção próximo a este (93,3 %) foi obtido no experimento 5 onde tempo e temperatura foram de 47 minutos e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade enzimática neste experimento também foi alta ($700 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$), assim como sua atividade específica ($534 \text{ U mg}^{-1}_{\text{suporte}}$). Estes resultados evidenciam que a temperatura de $32 \text{ }^\circ\text{C}$ não influenciou negativamente na imobilização de lipases no suporte, mas a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (experimento 8) e $15 \text{ }^\circ\text{C}$ (experimento 7) reduziu a atividade da enzima no suporte e sua retenção para $412 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$ e 48,3 %, respectivamente no experimento 8 e $270 \text{ U g}^{-1}_{\text{suporte}}$ e 29,9 %, respectivamente, no experimento 7.

Esses resultados também indicam que o equilíbrio de interação enzima/suporte foi rapidamente alcançado, ou seja, nos tempos de contato mais baixos, 45 e 90 minutos obteve-se os melhores valores de atividade enzimática. Baumi (2015) através de espectroscopia de absorção de infravermelho indicou a presença de terminais aminas e compostos oxigenados presentes na PR, que podem reagir com os grupamentos carbonilas e aminos, respectivamente, presentes nas enzimas. A alta atividade alcançada nos menores tempos de contato pode ser atribuída a elevada afinidade da enzima com os grupamentos amina do suporte

(VILLENEUVE et al., 2000). A presença e a distribuição de grupos funcionais no material determinam a eficiência da imobilização (TISCHER e WEDEKIND, 1999).

Tabela 14 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em poliamida reciclada.

Exp.	Variáveis codificadas		Respostas				
	X ₁	X ₂	Atividade enzimática (U g ⁻¹)	Proteínas totais (mg g ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Eficiência (%)	Retenção (%)
1	-1	-1	477	6,03	79,1	87,2	54,7
2	-1	1	760	1,54	494	79,7	95,4
3	1	-1	235	4,01	58,6	91,6	25,7
4	1	1	400	1,33	301	85,7	46,7
5	-1,41	0	700	1,31	534	75,0	93,3
6	1,41	0	408	2,3	177	85,4	47,8
7	0	-1,41	270	3,63	74,4	90,4	29,9
8	0	1,41	412	2,15	192	85,2	48,3
9	0	0	540	4,18	129	71,1	76,0
10	0	0	600	3,75	160	67,9	88,4
11	0	0	545	3,62	151	70,8	77,0
Fatores			Níveis reais				
			-1,41	-1	0	1	1,41
	X ₁ (tempo min)		47	90	195	300	343
	X ₂ (temperatura, °C)		15	18	25	32	35

Fonte: própria autora.

A equação preditiva ($R^2=0,96$) em função das variáveis independentes para a imobilização de lipase em PR está apresentada abaixo e os valores em **negrito** indicam que tanto a variável tempo (X_1) como temperatura (X_2) tiveram efeito significativo ($p \leq 0,05$).

$$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}} = -1029,84 - 0,93 X_1 + 11,30 (X_1)^2 + 134,30 X_2 - 2,29 (X_2)^2 - 0,04 (X_1 X_2)$$

(5.3)

A Tabela 15 apresenta o estudo do modelo para a imobilização da lipase em PR em termos de atividade lipolítica ($U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$). Como pode ser verificado, pelo valor de R^2 obtido e o valor de $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ nos graus de liberdade correspondente à imobilização, o modelo teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 15 - Resultados do modelo estatístico ANOVA do planejamento com o suporte poliamida reciclada sem partículas magnéticas.

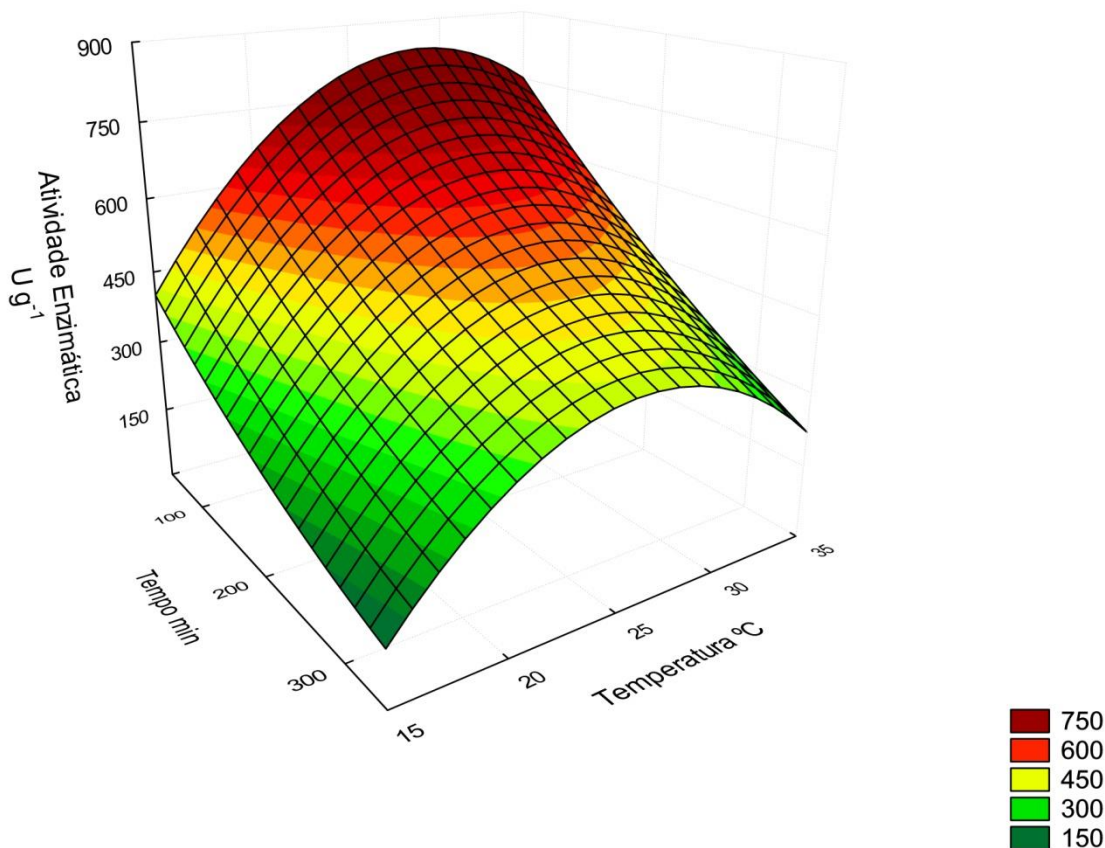
Resposta	Fonte de variação	Soma	Graus de	Média	F teste	
		Quadrados (SS)	Liberdade (DF)	Quadrados (MS)	F_{calc}	F_{ist}
$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$	Modelo	321379,4	3	321379,4	257,5	3,86
	Resíduo	11230,9	9	1247,9		
	Total	332610,3	12			

$R^2=0,96$; $F_{95\%} 3,9$

Pode-se observar na os melhores resultados de atividade enzimática na imobilização em PR foi em temperaturas intermediárias (25 °C), observadas na região em vermelho do gráfico. Regiões mais afastadas desta temperatura (15 e 35 °C) há uma queda na atividade enzimática. Indicando condições de temperatura ótima para imobilização. Já para tempo de contato observa-se que quanto menor o tempo de contato maior a resposta, isto pode ser explicado porque a cinética de adsorção pode ser influenciada tanto pela área superficial quando pela natureza e concentração dos grupos de superfície do suporte que interagem com o adsorvato (AL-ANBER, 2011).

A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície para a imobilização de lipase de *B. ribis* EC-01 em PR. Pelo modelo foi possível calcular o máximo de atividade (776 $U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}}$) predito com tempo e temperatura de 45 minutos e 30 °C, respectivamente (valores estimados).

Figura 9 - Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em poliamida reciclada.



Fonte: própria autora.

A Tabela 16 apresenta as atividades de imobilização de lipase em PRPM. É possível observar que no experimento 9 (195 min e 25 °C) foi alcançado o melhor resultado de atividade enzimática (360 U g⁻¹_{suporte}), com retenção de 41,3 % da atividade. Valor semelhante (42,1 %) de retenção foi obtido no experimento 6, também com elevada atividade enzimática (343 U g⁻¹_{suporte}), onde tempo e temperatura foram de 343 e 25 °C. Estes resultados evidenciam que o aumento do tempo de 195 para 343 minutos não ocasionou efeito negativo na imobilização da enzima, entretanto, em menores tempos de contato (47 minutos) desfavorecem o processo de imobilização, nestas mesmas condições, como pode ser observado no experimento 5. O experimento 6 também apresentou a maior atividade específica (192 U mg⁻¹_{suporte}). Referente à eficiência de imobilização o maior valor obtido foi 92,5 % (experimento 1), entretanto, este valor não reflete as melhores condições

para as outras respostas estudadas, indicando que a enzima não ficou ativa após o processo de imobilização.

Tabela 16 - Respostas obtidas (atividades de lipase) no planejamento fatorial para imobilização de lipase em poliamida reciclada com partículas magnéticas.

Exp.	Variáveis codificadas		Respostas				
	X ₁	X ₂	Atividade enzimática (U g ⁻¹)	Proteínas totais (mg g ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Eficiência (%)	Retenção (%)
1	-1	-1	209	1,89	111	92,5	22,6
2	-1	1	284	2,06	138	89,9	31,6
3	1	-1	258	3,97	65,0	90,8	28,4
4	1	1	320	3,1	103	88,6	36,1
5	-1,41	0	230	1,75	131	91,8	25,1
6	1,41	0	343	1,79	192	81,6	42,1
7	0	-1,41	267	2,26	118	85,8	31,2
8	0	1,41	316	2,64	120	83,1	38,0
9	0	0	360	2,2	164	87,1	41,3
10	0	0	344	2,02	170	87,7	39,2
11	0	0	345	2,5	138	87,8	39,3
Fatores			Níveis reais				
			-1,41	-1	0	1	-1,41
	X ₁ (tempo min)		47	90	195	300	343
	X ₂ (temperatura, °C)		15	18	25	32	35

Fonte: própria autora.

A equação preditiva que representam os dados experimentais do modelo está representada abaixo. Os valores em negrito indicam que a variável é significativa e os valores negativos influenciam negativamente na atividade enzimática.

$$U \text{ g}^{-1}_{\text{suporte}} = - 448,49 + \mathbf{1,86 X_1} - \mathbf{0,0037 (X_1)^2} + \mathbf{44,19 X_2} - \mathbf{0,79 (X_2)^2} - \mathbf{0,004 (X_1 X_2)}$$

(5.4)

A Tabela 17 apresenta o estudo do modelo para a imobilização da lipase em PRPM magnéticas em termos de atividade lipolítica ($U\ g^{-1}$ suporte). Como pode ser verificado pelo valor de R^2 (0,90) e o valor de $F_{calc} > F_{tab}$ nos graus de liberdade correspondente à imobilização, o modelo teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 17 - Resultados do modelo estatístico ANOVA do planejamento com o suporte poliamida reciclada com partículas magnéticas.

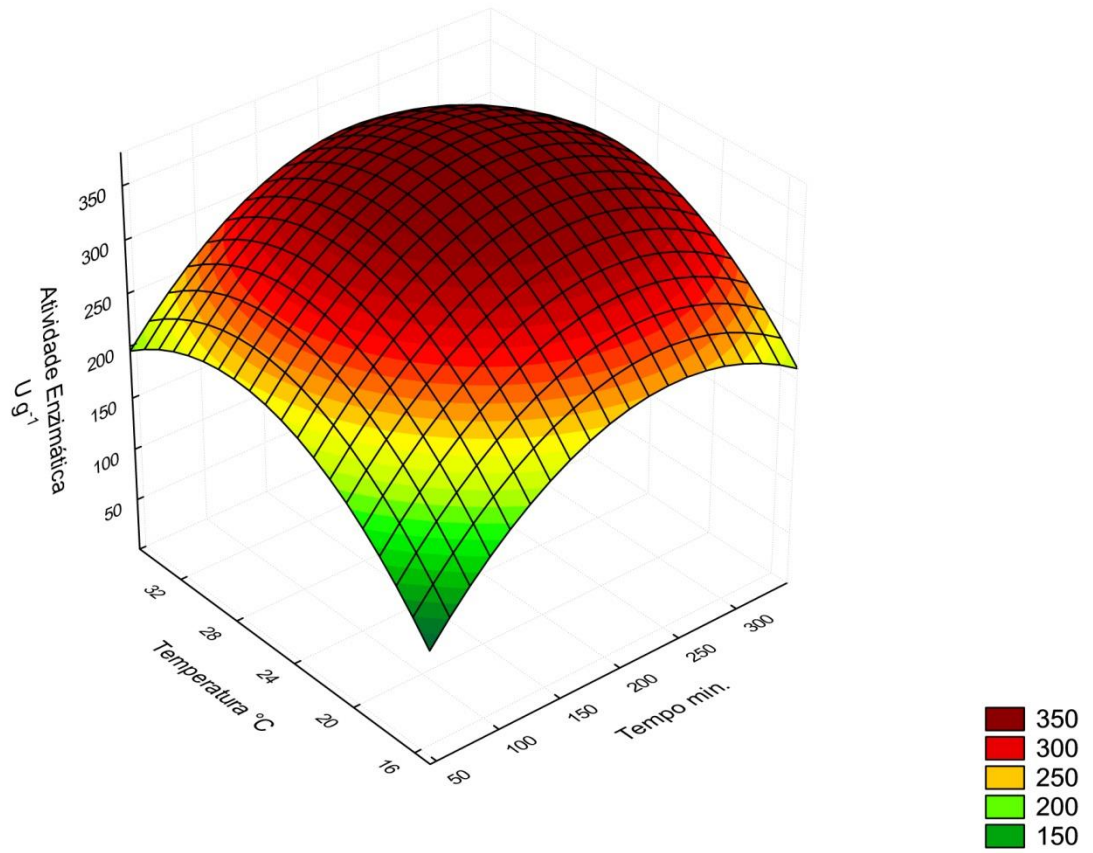
Resposta	Fonte de variação	Soma	Graus de	Média	F teste	
		Quadrados (SS)	Liberdade (DF)	Quadrados (MS)	F_{calc}	F_{ist}
$U\ g^{-1}_{suporte}$	Modelo	33100,65	4	33100,65	772,5	3,83
	Resíduo	3328,05	8	416,00		
	Total	36428,7	12			

$R^2=0,90$; $F\ 95\% 4,8$

De acordo com a curva tridimensional (Figura 10), a atividade máxima de imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 estimada pelo modelo foi $360\ U\ g^{-1}_{suporte}$, com tempo e temperatura de 195 minutos e $25\ ^\circ C$, respectivamente.

Comparando com a atividade enzimática observada no extrato bruto, produto obtido da produção de lipase antes da purificação parcial, onde os valores eram de atividade enzimática de $9,6\ U\ mL^{-1}$, e lipase livre, após a precipitação de 20% sulfato de amônio, $64,4\ U\ mL^{-1}$ de atividade enzimática (Tabela 7). Os valores de atividade enzimática após a imobilização são muito superiores aos resultados obtidos antes da imobilização, o suporte com maior valor de atividade enzimática foi a poliamida reciclada sem partículas magnéticas, $700\ U\ g^{-1}$. Os altos valores observados na imobilização com a poliamida reciclada podem ser explicados pois essa apresenta grupamentos aminas e compostos oxigenados em sua superfície, suportes com grupos amino livres na superfície apresentam grande importância para o estudo da imobilização de lipases, pois são conhecidos por terem uma elevada afinidade (VILLENEUVE et al., 2000), assim como grupos oxigenados.

Figura 10 - Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 na imobilização de lipase em poliamida reciclada com partículas magnéticas.



6 CONCLUSÃO

O processo de precipitação de enzima com sulfato de amônio na concentração de 20 % (m/v) a atividade específica passou de 32 U mg⁻¹ para 215 U mg⁻¹ mostrando ser um método eficiente para concentração de lipases utilizando pouca quantidade do sal.

As diferenças entre o volume e raio médio de poros entre os carvões de eucalipto e peroba podem explicar as diferenças nos resultados da imobilização dos dois carvões. Assim como as diferentes características entre os suportes poliamida reciclada com e sem partículas magnéticas, podem ter influenciado na imobilização de lipases.

O carvão de eucalipto ativado apresentou a maior atividade enzimática no experimento com 138 % (v/v) de enzima e 21 °C, com alto valor de eficiência de imobilização. O melhor resultado de atividade específica foi obtida no ponto central (138 % (v/v) e 25 °C). O valor predito de atividade enzimática máxima para o carvão de eucalipto ativado segundo o modelo foi de 368 U g⁻¹ nas condições de 200 % (v/v) de concentração enzima e temperatura de 22,5 °C.

O carvão de peroba obteve os melhores resultados de atividade enzimática e específica nos pontos centrais do planejamento, com alta eficiência de imobilização (valores em torno de 93 %) e retenção em torno de 4,5 %.

O suporte com maior valor de atividade enzimática foi a poliamida reciclada sem partículas magnéticas o maior valor de atividade enzimática ocorreu a 90 minutos e 32 °C, onde a retenção de atividade enzimática teve o valor mais alto (95,4 %). Nas condições 47 minutos e 25 °C atividade enzimática e específica também foram altas e com alta retenção.

A poliamida reciclada com partículas magnéticas, foi o segundo suporte com maior atividade enzimática, e teve o melhor resultado de atividade enzimática com 195 minutos e 25 °C, e 41,3 % da atividade.

Os valores preditos de atividade enzimática máxima para os dois melhores suportes para imobilização de lipases poliamida reciclada com e sem partículas magnéticas foram de 776 U g⁻¹_{suporte} (45 minutos e 30 °C) e 360 U g⁻¹_{suporte} (195 minutos e 25 °C), respectivamente.

O presente trabalho evidencia que esses suportes são promissores na imobilização de lipases, sendo estes biocatalisadores potenciais para futuras aplicações biotecnológicas e industriais, uma vez que o custo final de produção do biocatalisador foi reduzido pelo uso de resíduos e materiais reciclados.

7 REFERÊNCIAS

AKIL, E.; CARVALHO, T.; BÁREA, B.; FINOTELLI, P.; LECOMTE, J.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. ; VILLENEUVE, P. Accessing regio-and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v.109, p.101-111, 2016.

AL-ANBER, M. A. Thermodynamics Approach in the adsorption of Heavy Metals, Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases, Dr. Juan Carlos Moreno Piraján (Ed.), InTech, DOI: **10.5772/21326**. Available from: <https://www.intechopen.com/books/thermodynamics-interaction-studies-solids-liquids-and-gases/thermodynamics-approach-in-the-adsorption-of-heavy-metals>

AL-LAGTAH, Nasir M.a. et al. Chemical and physical characteristics of optimal synthesised activated carbons from grass-derived sulfonated lignin versus commercial activated carbons. **Microporous And Mesoporous Materials**, v. 225, n. 12, p.504-514, 2016.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; DE OLIVEIRA, B. H.; DE LIMA, V. M. G. ; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v.170, n.7, p.1792-1806, 2013.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L. ; MALCATA, X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.392-416, 1996.

BANSAL, R. C.; DONNET, J. B.; STOECKLI, F. Active carbon. **New York: Marcel Decker**, 1988.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. ; HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.93-96, 1996.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I. ; HARDY, G. E. In-vivo decolorisation of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **4th Pacific Rim Biotechnol. Conf. Melbourne**, Australia: 88-90 p.,1995.

BASSO, A.; HESSELER, M. ; SERBAN, S. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. **Tetrahedron**, 2016.

BAUMI, J.; Utilização de glicerina da produção de biodiesel na reciclagem de retraço têxtil. **Dissertação de Mestrado em Bioenergia Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2015.

BOFINGER, M. R; Ativação de biocarvão pirolítico para imobilização e aplicação de lipase em biocatálise. **Dissertação de Mestrado em Bioenergia Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2015.

BON,T.R., JACOBS,S., CUATRECASAS,P., KATHURIA,S. and FUJITA-YAMAGUCHI,Y. **Journal Biol. Chem.**, 261, 7685-7689, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.54-248, 1976.

BRUNAUER, S.; EMMET, P. H. ; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal Of The American Chemical Society**, v.60, p.309-319, 1938.

BRYDSON, J. A. **Plastics Materials**. Londres: **Butterworth Heinemann**. 1999

CHA, J. S.; PARK, S. H.; JUNG, S.-C.; RYU, C.; JEON, J.-K.; SHIN, M.-C. ; PARK, Y.-K. Production and utilization of biochar: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.40, p.1-15, 2016.

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

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

DEKKER, R. F. H. et al. Application of a magnetic immobilized glicosidase in the enzymatic saccharification of steam-exploded lignocellulosic residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 23, p. 25-39, 1990.

DENG, C. J.; LIU, R. H.; CAI, J. M.. State of art of biomass fast pyrolysis for bio-oil in China: A review. **Journal of the Energy Institute**, v. 81, n. 4, p. 211-217, 2008.

DORTA, L. L. Caracterização e ativação de biocarvão da pirólise de resíduo agroindustrial. **Trabalho de conclusão de curso (Química) Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2016.

DUKU, M. H.; GU, S. ; HAGAN, E. B. Biochar production potential in Ghana - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, n.8, p.3539-3551, 2011.

EL-HENDAWY, A. A.; SAMRA, S. E.; GIRGIS, B. S.. Adsorption characteristics of activated carbons obtained from corncobs. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 180, n. 3, p.209-221, 2001.

FAAIJ, A.; WALTER, A.; BAUVEN, A.; BEZZON, G.; ROCHA, J. D.; MAREIRA, J. R.; CRAIG, K. R.; OVENREND, R. P.; BAIN, R.L. Novas tecnologias para vetores modernos de energia de biomassa. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.;

ROTHMAN, H. (Org.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Unicamp, Cap. 9, p. 339-411, 2005.

FREIRE, D. M. G. ; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.81, p.48-56, 2000.

GHOSH, P. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P. ; DAVIDSON, S. Microbial Lipases: Production and Applications. **Science Progress**, v.79, p.119-157, 1996.

HADOUN, H.; SADAoui, Z.; SOUAMI, N.; SAHEL, D. ; TOUMERT, I. Characterization of mesoporous carbon prepared from date stems by H3PO4 chemical activation. **Applied Surface Science**, v.280, p.1-7, 2013.

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

HU, C.; WAN, S.; ZHANG, Y. ; LUO, W. Chitosan-modified biochar-immobilized lipase, prepared by decomposing biomass e.g. peanut shell, modifying biochar with chitosan, mutual crosslinking chitosan and immobilizing lipase, useful to convert kitchen waste into biodiesel. **Chinese Acad. Sci.**, 2015.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M. T. Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

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

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F. ; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **Microbiology Reviews**, v.15, p.29-63, 1994.

KAMBO, H. S. ; DUTTA, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.45, p.359-378, 2015.

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

KLIJANIENKO, A.; LORENC-GRABOWSKA, E.; GRYGLEWICZ, G.. Development of mesoporosity during phosphoric acid activation of wood in steam atmosphere. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p.7208-7214, 2008.

KHOobi, M. MOTEVALIZADEH, S.F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M.A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase

immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p.131–141, 2014.

LAVADO, F. E. L., . P.DISPONÍVEL EM: <>. ACESSO EM: 06 JAN. 2015. LA INDUSTRIA TEXTIL Y SU CONTROL DE CALIDAD: Fibras textiles. **Espanha: Online**, p.138, 2013.

LEHMANN, J. ; JOSEPH, S. Biochar for environmental management: An introduction. In: (Ed.). **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**, 2012. p.1-12.

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

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P. ; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, p.105-110, 2003.

LIU, T.-H. Development of mesoporous structure and high adsorption capacity of biomass-based activated carbon by phosphoric acid and zinc chloride activation. **Chemical Engineering Journal**, v.158, n.2, p.129-142, 2010.

LIU, C.-H.; LIN, Y.-H.; CHEN, C.-Y. ; CHANG, J.-S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.40, n.4, p.359-363, 2009.

MAHINPEY, N.; MURUGAN, P.; MANI, T.; RAINA, R.. Analysis of Bio-Oil, Biogas, and Biochar from Pressurized Pyrolysis of Wheat Straw Using a Tubular Reactor. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 5, p. 2736-2742. 2009.

MARTINS, A. F.; DINIZ, J.; STAHL, J. A.; CARDOSO, A. L.. Caracterização dos produtos líquidos e do carvão da pirólise de serragem de eucalipto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 873-878, 2007.

MARTINS, S. B.; BAUMI, J.; SAMPAIO, C. P. ; GUEDES, C. L. B. Processo de produção de material sólido em pó a partir de Poliamida; Elastano e Glicerina. **UEL, Brasil**. 10 2013032153-2,2013.

MESSIAS, J. M. Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono. **Dissertação de Mestrado Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2008.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N. ; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.426-431, 2009.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126-135, 2012.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H.. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-Oil: A Critical Review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 1, p.848-889, out. 2006.

MORENO-PIRAJÁN, J. C. ; GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.55-62, 2011.

NANDA, Sonil et al. Physico-Chemical Properties of Bio-Oils from Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass with High and Slow Heating Rate. **Energy And Environment Research**, v. 4, n. 3, p.21-32, 2014.

NARANJO, J. C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S. ; MORENO-PIRAJÁN, J. C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n.1–2, p.166-171, 2010.

PALLA, C. A.; PACHECO, C. ; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v.55, n.3, p.199-207, 2011.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N. ; SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.29, p.119-131, 1999.

PAQUES, F. W. ; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, p.93-99, 2006.

PITT, J. I. ; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London. 1997.

RAMANI, K.; BOOPATHY, R.; VIDYA, C.; KENNEDY, L. J.; VELAN, M. ; SEKARAN, G. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. **Process Biochemistry**, v.45, n.6, p.986-992, 2010.

ROCHA J.D.; MESA PÉREZ J.M.; CORTEZ L.A.B.. Aspectos Teóricos e Práticos do Processo de Pirólise de Biomassa. In: **Curso “Energia na Indústria de Açúcar e Alcool”**. UNIFEI, Itajubá, 2004.

RODRIGUEZ-REINOSO, F.; LINARES-SOLANO, A. Chemistry and physics of carbon. v.21, New York: **Marcel Decker**, 1989.

ROMDHANE, I. B.-B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A. ; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, n.3–4, p.230-239, 2011.

SALLEH, A. B.; MUSANI, R. ; RAZAK, C. N. A. Extra and Intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. **Can J Microbiol**, v.39, p.978–81, 1993.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A. ; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, n.2, p.239-247, 2003.

SCOPES, R. K. Protein Purification: Principles and Practice: **Springer New York**. 1993.

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

SYCH, N. V.; TROFYMENKO, S. I.; PODDUBNAYA, O. I.; TSYBA, M. M.; SAPSAY, V. I.; KLYMCHUK, D. O. ; PUZIY, A. M. Porous structure and surface chemistry of phosphoric acid activated carbon from corncob. **Applied Surface Science**, v.261, p.75-82, 2012.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B. ; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v.24, p.808-818, 2001.

TING, W. J.; TUNG, K. Y.; GIRIDHAR, R. ; WU, W. T. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.42, n.1–2, p.32-38, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In: Fessner WD. et al. (eds) Biocatalysis - From Discovery to Application. **Topics in Current Chemistry**, v. 200, 1999.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M. ; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.2, p.182-196, 2010.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; BHARTI, R. K. ; THAKUR, I. S. 4th International Conference on Advances in Energy Research (ICAER 2013) Isolation, Purification and Characterization of Lipase from *Microbacterium* sp. and its Application in Biodiesel Production. **Energy Procedia**, v.54, p.518-529, 2014.

TZVETKOV, George et al. Mechanochemical and chemical activation of lignocellulosic material to prepare powdered activated carbons for adsorption applications. **Powder Technology**, v. 299, n. 8, p.41-50, 2016.

ÜLKER, S. ; KARAOĞLU, Ş. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.114, n.4, p.385-390, 2012.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. ; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for Neurospora (Medium N). **Microbiol. Genet. Bull.** , v.13, p.42-43, 1956.

WINKLER, U. K. ; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p.663-670, 1979.

XIE, W. ; MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Energy & Fuels**, v. 23, p.1347–1353, 2009.

XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 373-380, 2012.

YAKOUT, S.M.; SHARAF, G. S. Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. **Arabian Journal of Chemistry**, p.1-8, 2012.

YONG, S. K.; LIM, B. H.; SALEH, S. ; TEY, L.-H. Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.126, p.99-105, 2016.

ZHAO, X.; FAN, M.; ZENG, J.; DU, W.; LIU, C. ; LIU, D. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.52, n.4–5, p.226-233, 2013.