

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA

GESSIANE DE JESUS LIMA SANCHES

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM EPICARPO DE COCO BABAÇU PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOCATALISADOR**

São Luís – MA

2021

GESSIANE DE JESUS LIMA SANCHES

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM EPICARPO DE COCO BABAÇU PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOCATALISADOR**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Grau de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel

São Luís – MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Sanches, Gessiane de Jesus Lima.

Imobilização de Lipase em epicarpo de coco babaçu para aplicação como biocatalisador / Gessiane de Jesus Lima Sanches. - 2021.

65 p.

Orientador(a): Adeilton Pereira Maciel.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - Ma, 2021.

1. Babaçu. 2. Imobilização. 3. Lipase. I. Maciel, Adeilton Pereira. II. Título.

GESSIANE DE JESUS LIMA SANCHES

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM EPICARPO DE COCO BABAÇU PARA  
APLICAÇÃO COMO BIOCATALISADOR**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Química Licenciatura da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Grau de Licenciado em Química.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilza Maria Piedade Prazeres - DEQUI/UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sergiane de Jesus Rocha Mendonça - DEQUI/UFMA

À Deus, o Dono dos meus dias.

Aos meus pais, Rosa e Antônio, e à minha irmã,  
Ana Gerssia, que sempre acreditaram em mim.

Eu os amo sem medidas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por Sua doce companhia, por tão admirável e indescritível provisão. Sua presença em mim dá sentido à minha existência.

Agradeço aos meus pais, Rosa e Antônio, e à minha irmã, Ana Gerssia, pelo incentivo, cuidado, dedicação, amor e orações a mim direcionados durante toda a vida, assim como ao longo dessa trajetória para a realização de um grande sonho. Sou grata também ao meu companheiro Alexandre pelo apoio, compreensão, atenção e carinho dados a mim e a meus planos.

Agradeço à minha querida prima Rosilene e ao meu tio José Vital por terem me hospedado com tanta empatia ao longo desses anos de graduação, não medindo esforços para me acolher e ajudar no que fosse necessário. Nesse sentido, agradeço também à tia Maria José e ao tio Vital Patrício.

Agradeço, pela amizade tão sincera e altruísta de Karen Caroline, Thaynara Thereza, Alana Ohana, Sabrina Sandyele, Juliana Muniz, Iasmine Trovão e Larissa Silva, que me fortaleceu e deu ânimo em momentos desafiadores dessa jornada.

Agradeço ao professor Adeilton Pereira Maciel pela disponibilidade em orientar-me com zelo, empenho e atenção.

Minha gratidão se estende, ainda, àqueles que fazem parte do Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental (NCCA), em especial aos alunos Karen Caroline, Fabiana Frazão, Ricardo Frazão, Luciano Yves e Thonny Yuri; às professoras Cáritas Mendonça e Gilza Prazeres e, ao nosso querido amigo e funcionário, Sandro. Todos vocês foram fundamentais na realização desse trabalho desde os que contribuíram diretamente aos que aconselharam, estimularam e encorajaram.

## RESUMO

O uso de biocatalisadores na indústria vem crescendo nos últimos anos em razão das inúmeras vantagens. No entanto, a possibilidade de seu reaproveitamento em determinados processos industriais tem levado a muitas pesquisas sobre sua imobilização em suportes de baixo custo e com características adequadas para cada aplicação. Com esse foco, o presente trabalho apresenta a proposta de imobilização da enzima Lipase de *Candida rugosa* Tipo VII no suporte lignocelulósico de fibra de epicarpo de coco babaçu para a obtenção de um futuro biocatalisador com emprego em reações que envolvem catálise de triglicerídeos. A fibra do epicarpo do coco babaçu foi tratada utilizando-se oxidação por peróxido de hidrogênio em meio alcalino e caracterizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. A lipase foi imobilizada por adsorção física ao suporte em dois momentos distintos e sob algumas mudanças experimentais. As atividades hidrolíticas da enzima livre e dos derivados imobilizados foram calculadas, assim como o Rendimento de Imobilização (RI%), a Atividade Teórica ( $At_{teórica}$ ) e a Atividade Recuperada ( $At_{recuperada}$ ) de cada um deles. As condições reacionais para a determinação de todos esses parâmetros foram as temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50 e 55°C, pH 7 e concentração de solução enzimática de 10mg/mL. A atividade hidrolítica da enzima livre teve seu maior valor na região de 35- 40°C, enquanto que para os derivados da primeira e segunda imobilização foram 30°C e 50°C, respectivamente. Os mais altos valores de Rendimento de Imobilização e Atividade Recuperada para ambos os derivados também foram, respectivamente, em  $T = 30^{\circ}\text{C}$  e  $T = 50^{\circ}\text{C}$ . As Atividades teóricas para os dois derivados seguiram a tendência esperada de  $T = 35^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$ . A primeira imobilização da lipase gerou derivados que conservaram regularidade nos valores de atividade hidrolítica e demais parâmetros ao longo do procedimento, enquanto que a segunda, não; sugerindo que a imobilização de lipase em epicarpo de coco babaçu por adsorção e as condições mais favoráveis de operação dos derivados obtidos encontram-se passíveis de maiores estudos em trabalhos futuros.

**Palavras-chaves:** Imobilização.Lipase.Babaçu.

## ABSTRACT

The use of biocatalysts for the industry it grows on recently years due to the numerous advantages. However, the possibility of rehabilitation at certain industrial processes has led to a lot of research on its immobilization on low-cost supports with adequate characteristics for each other application. In focus, this present work aims the proposal of immobilization of the Lipase's enzyme from *Candida rugosa* Type VII on the babassu's coconut in epicarp fiber lignocellulosic support to obtain a future biocatalyst with use in reactions involved by triglyceride catalysis. This fiber from babassu's coconut epicarp has treated and used hydrogen peroxide oxidation in an alkaline solution and characterized by infrared spectroscopy with Fourier transform. By the way the lipase was immobilized by physical adsorption to the support at two different times and under some experimental changes. But, the hydrolytic activities of the free enzyme and immobilized related products were calculated, as well as the Immobilization Fixed (IF%), Theoretical Activity ( $A_{\text{theoretical}}$ ) and The Recovered Activity ( $A_{\text{Recovered}}$ ) of each of them. Even though, the reaction conditions for the determination of all these parameters were temperatures of 30, 35, 40, 45, 50 and 55 ° C, pH 7 and enzyme solution concentration of 10mg / mL. So, the hydrolytic activity of the free enzyme had its greatest value in the region of 35-40 ° C, while for the derivatives of the first and second immobilization they were 30 ° C and 50 ° C, respectively. Also, highest values of Immobilization Fixed and Recovered Activity for both related products were also, respectively, at  $T = 30$  ° C and  $T = 50$  ° C. Theoretical activities for the two derivatives followed the expected trend of  $T = 35$  ° C - 40 ° C. Therefore, the first immobilization of the lipase generated and related that maintained regularity in the values of hydrolytic activity and other parameters throughout the procedure, while the second did not. It's suggesting that the immobilization of lipase in babassu's coconut epicarp by adsorption and the more favorable conditions than operation of the related products obtained are subject to further studies in future works.

**Keywords:** Immobilization.Lipase.Babassu.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<a href="#"><u>Figura 1: Representação ilustrativa do sítio catalítico da lipase.</u></a>	11
<a href="#"><u>Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase nas conformações fechada (a) e aberta (b).</u></a>	11
<a href="#"><u>Figura 3: Mecanismo de ativação interfacial da lipase.</u></a>	12
<a href="#"><u>Figura 4: Mecanismo de reação de hidrólise de Lipase.</u></a>	13
<a href="#"><u>Figura 5: Reações catalisadas por lipase.</u></a>	15
<a href="#"><u>Figura 6: Especificidade das lipases.</u></a>	16
<a href="#"><u>Figura 7: Principais métodos de imobilização de enzimas.</u></a>	18
<a href="#"><u>Figura 8: Estrutura da celulose.</u></a>	21
<a href="#"><u>Figura 9: Monossacarídeos presentes na hemicelulose.</u></a>	22
<a href="#"><u>Figura 10: Alcóois precursores das unidades de fenilpropano.</u></a>	23
<a href="#"><u>Figura 11: Representação esquemática da molécula de lignina de eucalipto (<i>Eucalyptus</i>).</u></a>	23
<a href="#"><u>Figura 12: Palmeira Babaçu e seus cachos.</u></a>	26
<a href="#"><u>Figura 13: Frações do coco babaçu.</u></a>	27
<a href="#"><u>Figura 14: Estrutura usada no tratamento da fibra com peróxido de hidrogênio.</u></a>	33
<a href="#"><u>Figura 15: Incubadora adaptada</u></a>	35
<a href="#"><u>Figura 16: Coco babaçu antes e após a retirada da matéria orgânica.</u></a>	39
<a href="#"><u>Figura 17: Fibra antes (a) e após (b) o tratamento com peróxido de hidrogênio.</u></a>	39
<a href="#"><u>Figura 18: Espectros de IV de fibras de epicarpo de coco babaçu antes e depois do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.</u></a>	40
<a href="#"><u>Figura 19: Imobilização de enzimas e derivados.</u></a>	41
<a href="#"><u>Figura 20: Comparação entre as atividades relativas das enzimas livre e imobilizada (“Imobilização 1”) no epicarpo de coco babaçu.</u></a>	44
<a href="#"><u>Figura 21: Rendimento de imobilização da lipase (“Imobilização 1”).</u></a>	46
<a href="#"><u>Figura 22: Atividade recuperada da lipase na “Imobilização 1”.</u></a>	48
<a href="#"><u>Figura 23: Comparação entre as atividades relativas das enzimas livre e imobilizada (“Imobilização 2”) em epicarpo de coco babaçu.</u></a>	50
<a href="#"><u>Figura 24: Rendimento de Imobilização da lipase (“Imobilização 2”).</u></a>	51
<a href="#"><u>Figura 25: Atividade Recuperada da lipase na “Imobilização 2”.</u></a>	53

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1: Valores de materiais de suporte geralmente empregados na imobilização de enzimas</u>	20
<u>Tabela 2: Alterações das condições da "Imobilização 1" para a "Imobilização 2"</u>	36
<u>Tabela 3: Valores da atividade hidrolítica e a atividade relativa para a lipase livre.</u>	42
<u>Tabela 4: Valores da atividade hidrolítica e atividade hidrolítica relativa para a lipase imobilizada na " Imobilização 1".</u>	43
<u>Tabela 5: Rendimento da "Imobilização 1" da lipase de <i>Candida rugosa</i>.</u>	45
<u>Tabela 6: Valores obtidos da Atividade teórica ("Imobilização 1").</u>	46
<u>Tabela 7: Valores da atividade recuperada para a "Imobilização 1".</u>	47
<u>Tabela 8: Valores da atividade hidrolítica e atividade hidrolítica relativa para a lipase imobilizada na "Imobilização 2".</u>	49
<u>Tabela 9: Rendimento da "Imobilização 2" da lipase de <i>Candida rugosa</i>.</u>	51
<u>Tabela 10: Valores obtidos da Atividade teórica ("Imobilização 2").</u>	52
<u>Tabela 11: Valores da atividade recuperada para a "Imobilização 2".</u>	52

## SUMÁRIO

<b><u>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b>	10
<b><u>1.1 Lipases</u></b>	10
<u>1.1.1 Estrutura e mecanismo de atuação</u>	10
<u>1.1.2 Reações catalisadas por lipases</u>	14
<u>1.1.3 Especificidade das lipases</u>	15
<b><u>1.2 Imobilização de enzimas</u></b>	17
<u>1.2.1 Imobilização de enzimas por adsorção física</u>	18
<b><u>1.3 Suportes na imobilização de enzimas</u></b>	19
<b><u>1.4 Materiais lignocelulósicos: definição e constituição</u></b>	20
<u>1.4.1 Tratamentos de materiais lignocelulósicos para uso na imobilização de enzimas</u>	24
<b><u>1.5 Babaçu: uma proposta de suporte na imobilização de enzimas</u></b>	26
<b><u>1.6 Imobilização de Enzimas, Babaçu e ensino de Química</u></b>	29
<b><u>2 OBJETIVOS</u></b>	31
<b><u>2.1 Objetivo geral:</u></b>	31
<b><u>2.2 Objetivos específicos:</u></b>	31
<b><u>3 METODOLOGIA</u></b>	32
<b><u>3.1 Materiais e reagentes</u></b>	32
<b><u>3.2 Procedimento Experimental</u></b>	32
<u>3.2.1 Coleta e tratamentos do epicarpo do coco babaçu</u>	32
<u>3.2.2 Imobilização da Lipase de <i>Candida rugosa</i> no epicarpo do coco babaçu</u>	34
<u>3.2.3 Determinação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada</u>	36
<u>3.2.4 Cálculos dos parâmetros do derivado imobilizado: Rendimento de Imobilização, Atividade Teórica e Atividade Recuperada</u>	37
<b><u>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</u></b>	39
<b><u>4.1 Preparação das fibras do coco babaçu</u></b>	39
<b><u>4.2 Imobilizações da lipase de <i>Candida rugosa</i> tipo VII</u></b>	41
<b><u>4.3 Determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e do derivado imobilizado da “Imobilização 1”.</u></b>	42
<b><u>4.4 Cálculo dos parâmetros de imobilização para a “Imobilização1”</u></b>	45
<u>4.4.1 Cálculo do Rendimento de Imobilização (RI%)</u>	45

<u>4.4.2 Cálculo da Atividade Teórica (<math>A_{t_{teórica}}</math>)</u>	46
<u>4.4.3 Atividade Recuperada (<math>A_{t_{recuperada}}</math>)</u>	47
<b><u>4.5 Determinação da Atividade Hidrolítica do derivado imobilizado da “Imobilização 2”</u></b>	48
<b><u>4.6 Cálculo dos parâmetros de imobilização para a “Imobilização 2”</u></b>	51
<u>4.6.1 Cálculo do Rendimento de Imobilização (RI%)</u>	51
<u>4.6.2 Cálculo da Atividade Teórica (<math>A_{t_{teórica}}</math>)</u>	52
<u>4.6.3 Atividade Recuperada (<math>A_{t_{recuperada}}</math>)</u>	52
<b><u>5 CONCLUSÕES</u></b>	54
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	56
<b><u>ANEXOS</u></b>	61

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Lipases

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC. 3.1.1.3) são as enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster de acilgliceróis (preferencialmente os triacilgliceróis) de cadeia longa (geralmente com número  $\geq$  a 10 átomos de C), liberando consecutivamente ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; RODRIGUES, 2009; MENDES, 2009). Ocorrem comumente na natureza e sua origem pode ser animal, vegetal e microbiana (CASTRO et al., 2004).

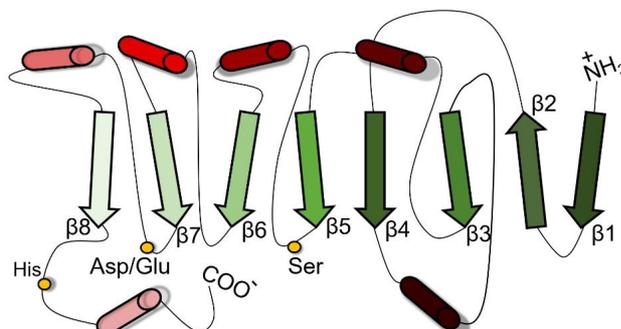
Castro et al. (2004) enfatiza que a origem das lipases está intimamente relacionada com seu peso molecular, estabilidade a variações de pH e a sua termoestabilidade:

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 KDa, a atividade em pH na faixa entre 4 e 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO et al., 2004, p. 148).

#### 1.1.1 Estrutura e mecanismo de atuação

As lipases são enzimas do grupo das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, as quais possuem um núcleo hidrofóbico composto de uma folha  $\beta$  central que, por sua vez, é formada por oito fitas  $\beta$  paralelas que se encontram conectadas por 6  $\alpha$ -hélice (CASTRO et al., 2004; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017). O sítio catalítico é composto por uma tríade catalítica dos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Conforme mostra a Figura 1.

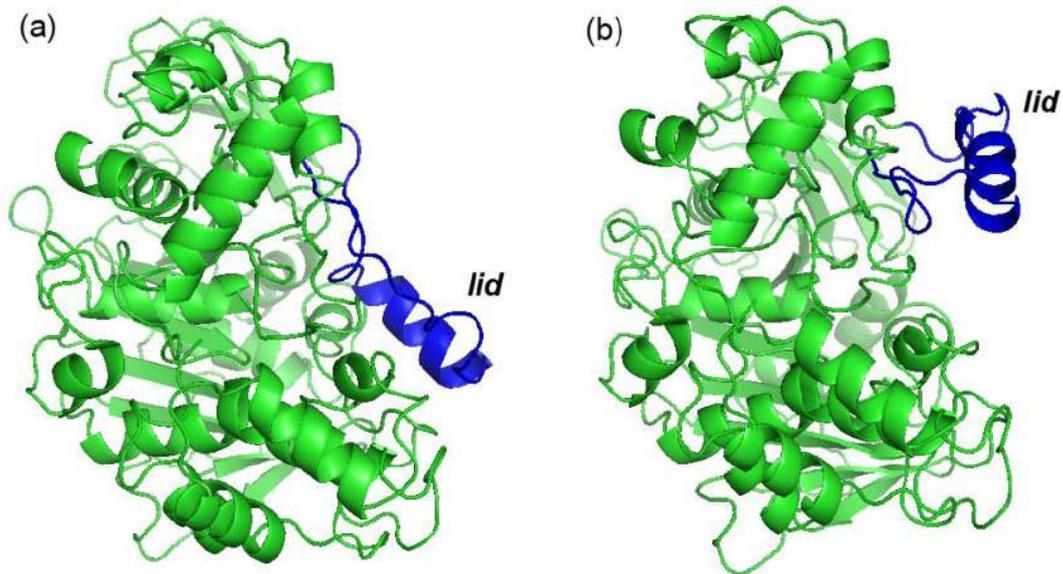
**Figura 1:** Representação ilustrativa do sítio catalítico da lipase.



Fonte: GONÇALVES, 2018.

Essa tríada catalítica é protegida por uma tampa peptídica anfifílica, também chamada de “lid” que possui formato de laço ou de  $\alpha$ -hélice (DALLA-VECHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; OZTURK,2001) (Figura 2).

**Figura 2:** Estrutura tridimensional da lipase nas conformações fechada (a) e aberta (b).

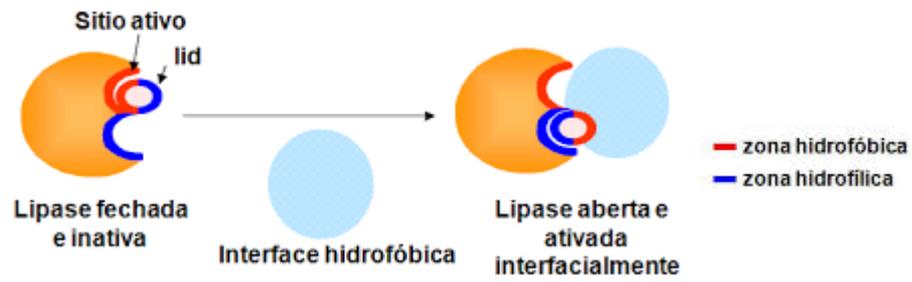


Fonte: RODRIGUES, 2009.

Quando a enzima interage com uma interface água/lipídio ou um inibidor, a tampa sofre uma modificação de conformação expondo o sítio ativo ao substrato, isto é, a lipase passa da conformação fechada (inativa) para a aberta (ativa) e, simultaneamente, a interação entre interface e enzima torna-se ainda mais facilitada, devido a elevada região hidrofóbica do sítio ativo que ficou exposta. (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; DALLA-VECHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Esse mecanismo é denominado de ativação interfacial.

Conforme mostrado na Figura 3, a parte externa da “tampa” possui um caráter um tanto quanto hidrofílico, já a interna possui o caráter hidrofóbico (OZTURK,2001). Assim que a tampa interage com a interface, o substrato passa a ter livre acesso à região hidrofóbica interna do sítio ativo, em razão da modificação conformacional sofrida pela “lid”.

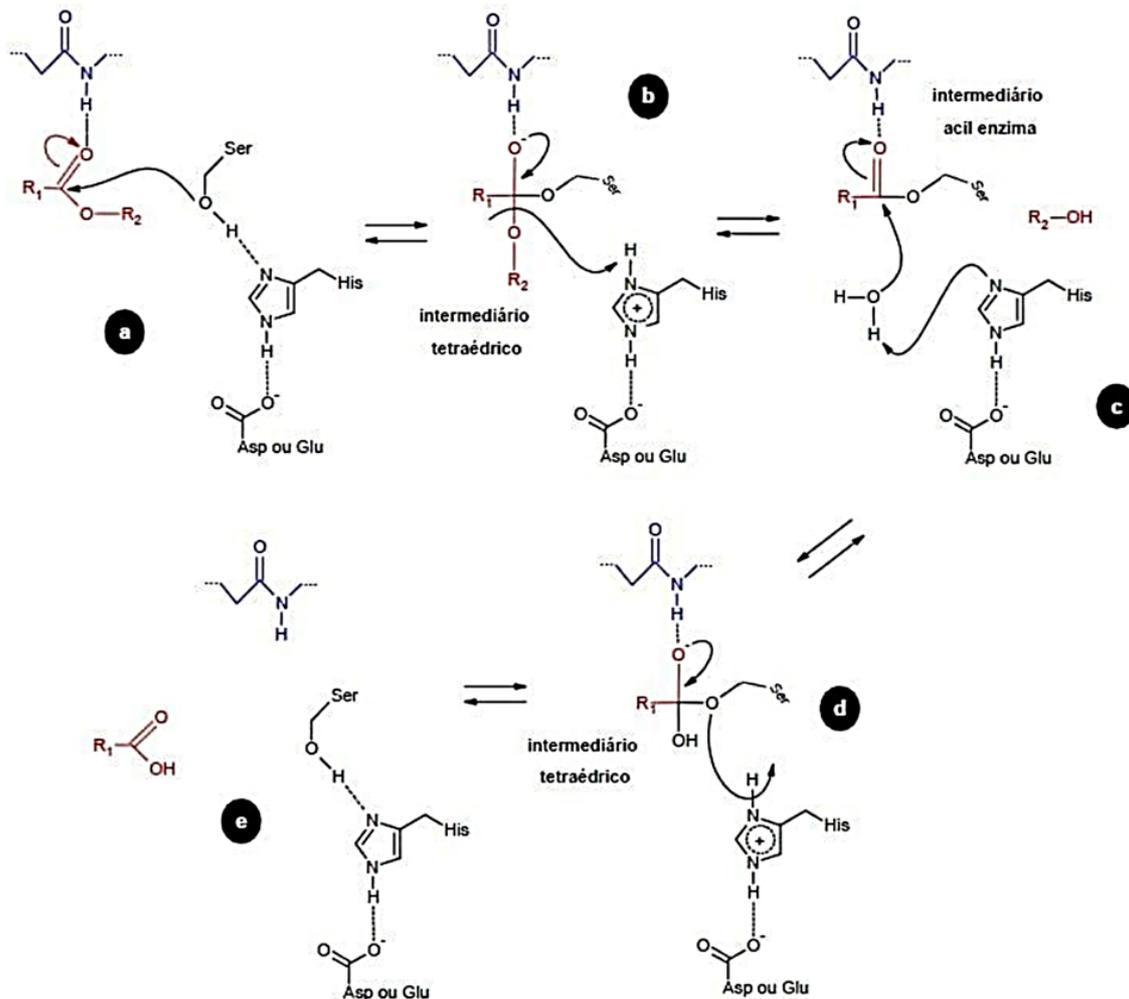
**Figura 3:** Mecanismo de ativação interfacial da lipase.



Fonte: RODRIGUES, 2009

A ação da enzima sobre o substrato ou, mais precisamente, a hidrólise do substrato ocorre em etapas (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; CASTRO, et al., 2004; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999) como ilustrado na Figura 4.

**Figura 4:** Mecanismo de reação de hidrólise de Lipase.



Fonte: Adaptado de VAZ e CHOUPINA (2012).

- “a”: O resíduo de serina é ativado pela histidina adjacente de modo que o oxigênio da hidroxila da serina faz o ataque nucleófilo ao átomo de carbono da carbonila na ligação éster do substrato e ocorre a formação de um intermediário tetraédrico. A estabilização desse intermediário se dá por meio de ligações de hidrogênio realizadas com os átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal;
- “b”: O resíduo de histidina doa um próton e há a clivagem do intermediário tetraédrico com a liberação de álcool e um complexo acil-lipase é formado;

- “**c**”: O nitrogênio nucleofílico da serina captura um próton da molécula de água presente no sistema reacional e o grupo –OH formado ataca o carbono da carbonila do intermediário acil enzima, originando um novo intermediário tetraédrico;
- “**d**”: O resíduo de histidina doa um próton ao oxigênio da serina do intermediário tetraédrico e há o rompimento da ligação da serina com grupamento acila.
- “**e**”: O ácido carboxílico é obtido e o biocatalisador é restaurado.

### 1.1.2 Reações catalisadas por lipases

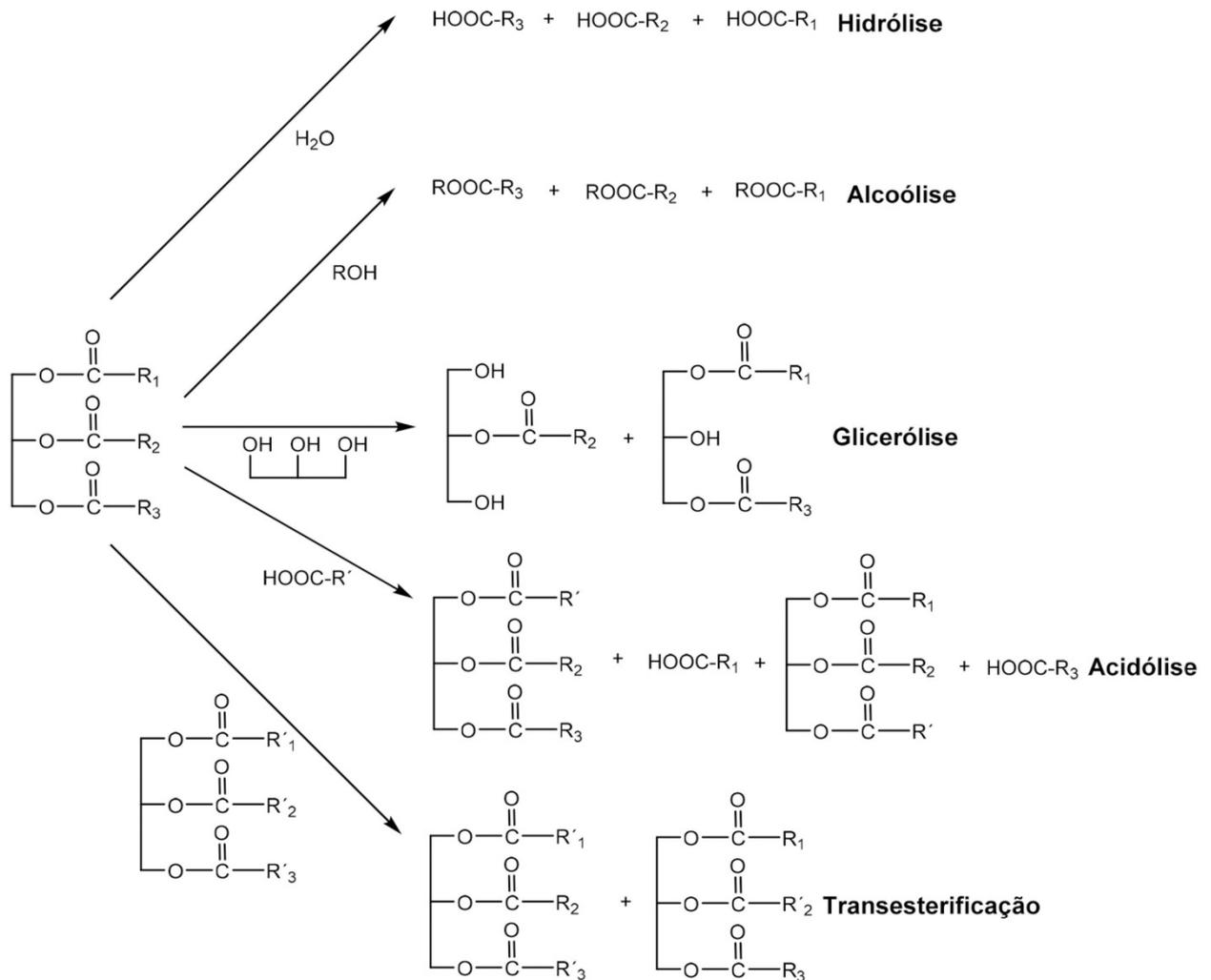
As lipases, além da reação de hidrólise de triacilglicerídeos, em que os mesmos são convertidos em ácidos carboxílicos através do consumo de moléculas de H<sub>2</sub>O, também catalisam a reação inversa em condições mínimas de água: esterificação por meio da reação de um ácido carboxílico com um álcool (CASTRO et al., 2004).

De acordo com Cortez, Castro e Andrade (2017), ambos os mecanismos podem ser combinados logicamente de forma que outras reações (além de hidrólise e esterificação) também se processem:

(...) Os processos básicos de hidrólise e formação de ésteres (esterificação) podem ser combinados em uma sequência lógica para resultar em reações denominadas *interesterificações*. Dependendo dos materiais de partida, pode ocorrer uma reação de *acidólise*, na qual ocorre a transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. Ainda pode ocorrer uma *alcóolise*, na qual o grupamento acila é transferido entre um acilglicerol e um álcool. Outra reação também possível é a *transesterificação*, caracterizada pela troca de grupamentos acila entre dois acilgliceróis (...). As lipases também catalisam a reação de *glicerólise*. Neste caso, ocorre a interesterificação do triacilglicerol com glicerol. (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017, p.86).

A Figura 5 apresenta o esquema com essas reações.

**Figura 5:** Reações catalisadas por lipase.



Fonte: CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017

### 1.1.3 Especificidade das lipases

Embora as lipases catalisem as reações citadas anteriormente, elas o fazem de maneira específica, a depender da molécula alcóolica ou ácida do substrato (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017). Logo, podem catalisar o acilglicerol em diferentes regiões. Em razão disso, são classificadas em Lipases não específicas, Lipases 1,3 específicas e Lipases ácidos graxos específicos (CASTRO et al., 2004).

As Lipases não específicas catalisam os triacilgliceróis em posição aleatória, ocasionando na formação, desse modo, de ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. Um exemplo desse tipo de lipase é a obtida da levedura *Candida rugosa*. Enzimas microbianas desse gênero têm recebido atenção especial quanto a maiores estudos para sua aplicação biotecnológica, segundo Gonçalves Filho, Silva e Guidini (2019), “devido à sua estabilidade, especificidade e facilidade de produção”.



Imobilizar enzimas é definido como o procedimento segundo o qual a enzima é delimitada ou confinada por meio de métodos físicos e/ou químicos a um suporte (ou matriz) sólido que seja insolúvel em meio aquoso, assim como em solvente orgânico (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; SOUZA et al., 2017).

A imobilização de enzimas surge como uma alternativa para contornar as desvantagens que, segundo Souza et al., (2017), são trazidas pelo uso da enzima solúvel:

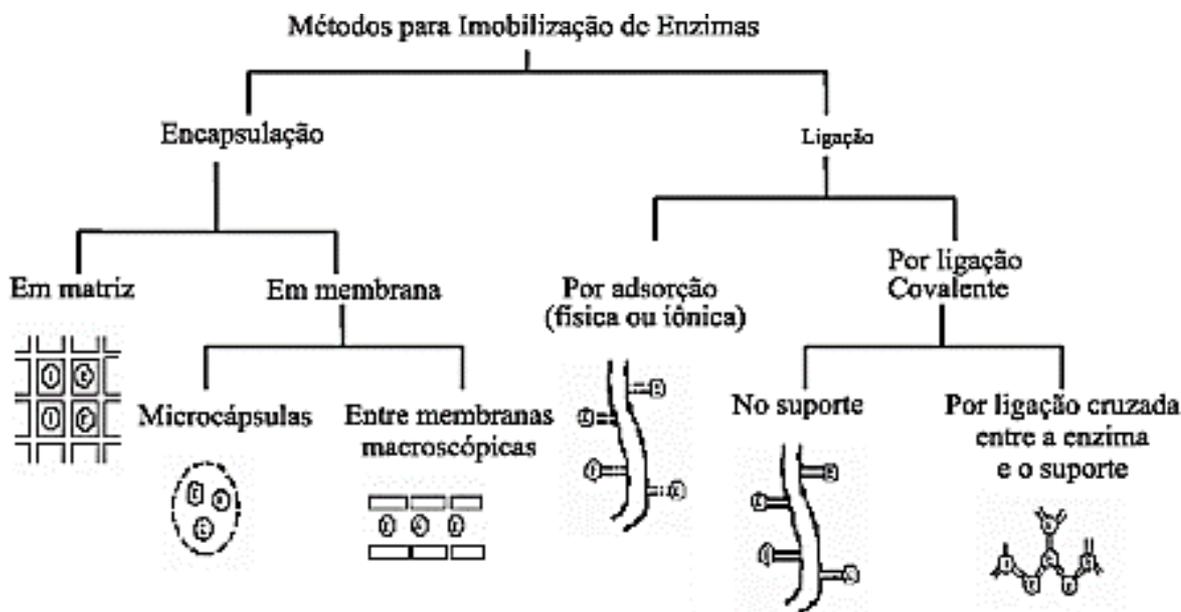
Os principais problemas da utilização de enzimas solúveis são: alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Isto resulta em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado. Além disso, muitas enzimas atuam na forma solúvel em meio aquoso (catálise homogênea), na qual contaminam o produto desejado e não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa. (SOUZA et al., 2017, p. 531-532).

Considerando essas (dentre outras) limitações, quanto ao uso de enzima solúvel, é que a imobilização de enzimas tem como foco principal a possibilidade da reutilização do biocatalisador. Entretanto, ainda que este se encontre limitado a um determinado espaço, espera-se que ele no modo imobilizado tenha um desempenho similar ou melhor em comparação à sua forma livre, ou seja, que tenham aumentadas sua atividade catalítica e estabilidade (ausência de modificações em sua estrutura ou sítio ativo que podem ocasionar sua desnaturação) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização visa, entre outros benefícios, a geração de um derivado imobilizado com robustez de modo que não seja afetado facilmente por variações ocasionais das condições reacionais, como temperatura, pH e presença de solventes orgânicos (SOUZA, et al., 2017). Esse comportamento almejado, todavia, se apresenta como uma idealidade do processo de imobilização, visto que este pode chegar até a causar a inibição da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os tipos mais comuns de imobilização de enzimas são mostrados na Figura 7. Dentre esses métodos, um dos mais utilizados e também considerado o mais simples é a adsorção física (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

**Figura 7:** Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004

### 1.2.1 Imobilização de enzimas por adsorção física

Como o próprio nome sugere, a imobilização por adsorção física acontece pelo contato físico (direto) entre enzima e a superfície do suporte. Essa relação enzima-suporte é mantida, de acordo com Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004, p.625), “por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbica, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras.” A simplicidade de sua execução o torna atrativo para diversas aplicações, no entanto, considerações sobre vantagens e contrapontos de seu uso devem ser analisadas antes de se adotá-lo como método de imobilização.

A imobilização por adsorção física possui vantagens como: facilidade de execução, baixo custo e modificação mínima da estrutura enzimática. O benefício de seu baixo custo é referente a inexistente necessidade do uso de reagentes químicos para ativar o suporte e pela possibilidade de seu reaproveitamento após usos consecutivos; já a reduzida alteração na estrutura do biocatalisador é resultado de sua ligação ao suporte ocorrer de forma espontânea, isto é, em uma posição que lhe seja energeticamente favorável (SOUZA et al., 2017).

Como desvantagem, pode-se mencionar a possibilidade de a enzima sofrer lixiviação da matriz, pois como a interação enzima-suporte é de caráter físico, encontra-se mais suscetível a variações de temperatura, pH, força iônica, por exemplo, as quais podem levar à sua dessorção (GONÇALVES FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Mesmo com essa desvantagem, a imobilização por adsorção física pode ser bem sucedida e, de acordo com Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004), a eficiência desse processo depende de diversos parâmetros, entre os quais estão: “(...) tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros”. Além desses requisitos necessários ao suporte, há, ainda, a necessidade de verificação de sua natureza hidrofóbica ou hidrofílica (BRITO, 2016), pois essa característica é determinante para se ter noção do tipo de interação que será estabelecida entre o suporte e o biocatalisador bem como se esta interação é a objetivada com o processo de imobilização.

### **1.3 Suportes na imobilização de enzimas**

Os materiais de suporte são indispensáveis no processo de imobilização de enzimas e no que se refere à seleção do material de suporte, deve-se levar em consideração que a matriz assume grande contribuição no desempenho da atividade do biocatalisador imobilizado, logo, essa escolha dependerá das características peculiares da enzima, assim como das condições em que esta será utilizada (SOUZA et al., 2017), visto que quando a relação entre biocatalisador e suporte for estabelecida, a ação catalítica do derivado imobilizado não seja limitada ou mesmo inviabilizada.

Os suportes são normalmente classificados quanto à sua origem em orgânicos ou inorgânicos. Os orgânicos são divididos em naturais e poliméricos; os inorgânicos em minerais e fabricados. Quanto à sua morfologia podem ser classificados como porosos, não porosos e estrutura em gel (MENDES, 2009; FERRAZ et al., 2018).

Segundo Souza et al., (2017), um material pode ser considerado uma matriz adequada para imobilização se admitir algumas características, como:

(...) elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras. (SOUZA et al., 2017, p.544).

A imobilização química ou física de enzimas proporciona menores gastos em decorrência de possibilitar a reutilização do biocatalisador e, quando o suporte atende ao requisito do baixo custo, esse processo se torna ainda mais atrativo para aplicações industriais. E nesse cenário os resíduos agroindustriais, isto é, resíduos oriundos do processamento de frutas, vegetais, laticínios, aves pela indústria e agricultura (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020), emergem como uma alternativa de substituir suportes que, mesmo possuindo alta

estabilidade, trazem consigo tanto a limitação do custo elevado quanto a da fácil acessibilidade (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de materiais de suporte geralmente empregados na imobilização de enzimas

<b>Material de suporte</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor</b>
Quitosana	100 g	224 euros
Acetato de celulose	250 g	64 euros
Nanotubos de Carbono	10 g	339 euros
Nanopartículas de ouro	100 mL	300 euros
Vidros de porosidade controlada	100 mg	182 euros

Fonte: GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020.

Os suportes oriundos de resíduos agroindustriais além de apresentarem a vantagem da ampla disponibilidade, atendem às demandas exigidas pela indústria de enzimas a respeito do uso de metodologias sustentáveis ao proporcionar a minimização dos efeitos causados pelo descarte ou armazenamento inadequado desses materiais, o qual, dentre outros danos ambientais, provoca produção de gases de efeito estufa como metano e amônia (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

Os resíduos agroindustriais possuem, ainda, a vantagem de dispor de características físicas e químicas que reforçam seu uso na imobilização enzimática: porosidade e área superficial elevadas e a presença de grupos químicos, tais como hidroxila, amino, carbonila, tiol e fosfato que favorecem a ocorrência de sistemas de adsorção de superfície, troca iônica, complexação-quelação, coordenação e micro precipitação (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020).

#### **1.4 Materiais lignocelulósicos: definição e constituição**

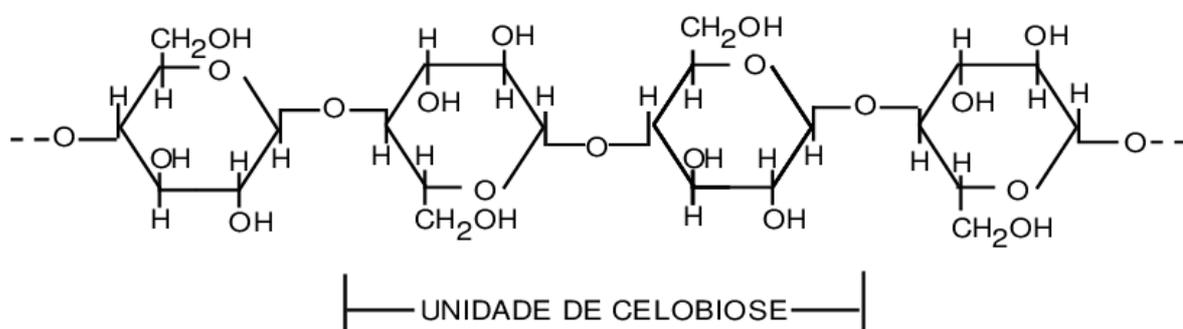
Os resíduos agroindustriais podem ser considerados como uma classe segundo a qual pertencem os rejeitos produzidos por atividades da agroindústria. Dentre essa categoria de materiais encontram-se aqueles chamados lignocelulósicos, isto é, que são formados majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina.

**Celulose:** é um homopolissacarídeo de ocorrência natural constituído por unidades repetidas de celobiose, que, por sua vez, é formada pela junção de anéis de  $\beta$ - D glicopiranoses que se unem através de ligações  $\beta$ - D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas (SOUSA, 2016; COSTA, 2015; PEREIRA, 2019), levando à celulose a ter um elevado grau de polimerização e crescimento linear que lhe conferem rigidez em sua estrutura (SOUSA, 2016; COSTA, 2015).

Devido às ligações inter e intramoleculares realizadas pelas hidroxilas das unidades de glicose ( $\beta$ - D glicopiranoses), a celulose assume elevado grau de cristalinidade, insolubilidade em água e em grande parte dos solventes orgânicos (SOUSA, 2016).

A estrutura da celulose é mostrada na Figura 8.

**Figura 8:** Estrutura da celulose.



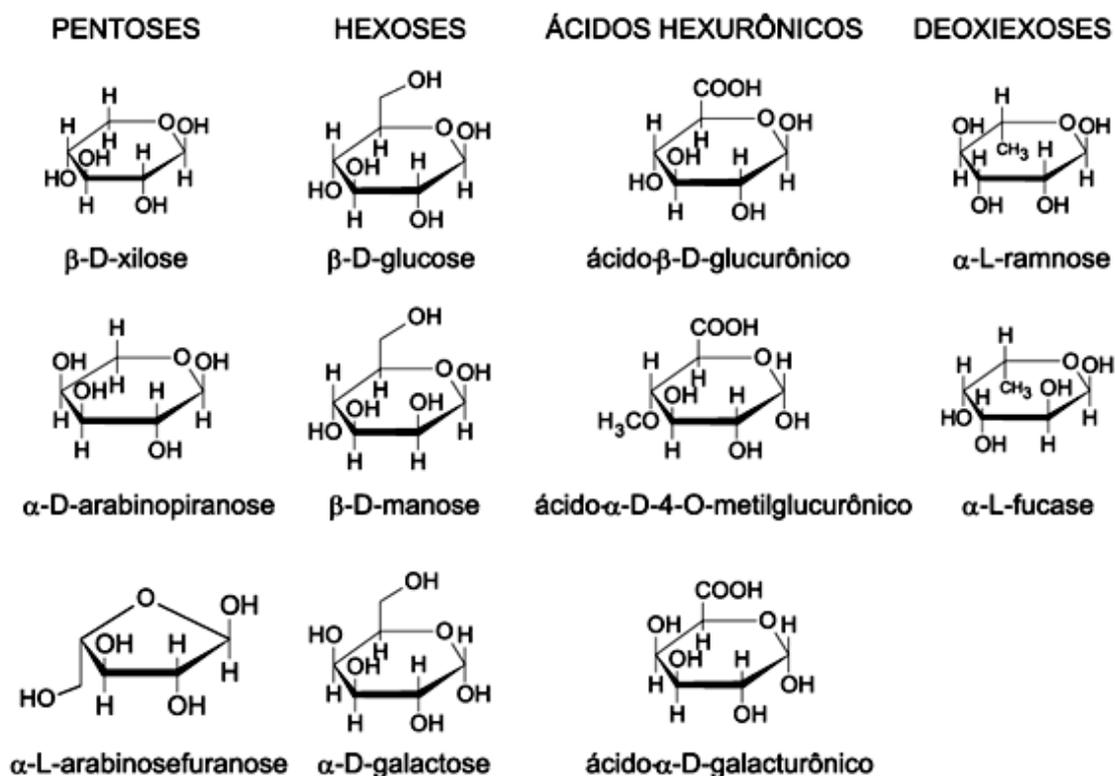
Fonte: SANTOS; PAIVA; SILVA, 2015.

**Hemicelulose:** Hemicelulose é o termo utilizado para designar heteropolissacarídeos de baixo peso molecular que, juntamente com a celulose, constitui a parede celular dos materiais lignocelulósicos estabilizando-a por meio de suas interações de hidrogênio com a celulose e das ligações covalentes com a lignina (SOUSA, 2016; COSTA, 2015; PEREIRA, 2019).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose possui a característica do amorfismo justamente por formar cadeias curtas e ramificadas, deixando-as, desse modo, mais susceptível de serem degradadas (se comparada à celulose); além de ter fácil solubilidade em água por ser formada pela união de diferentes açúcares (PEREIRA, 2019; COSTA, 2015).

As unidades de açúcares que compõem a hemicelulose estão organizadas em grupo, são eles: pentose (arabinose, xilose e ramnose), hexose (galactose, glicose e manose), deoihexoses e ácidos hexurônicos, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 9 (PEREIRA, 2019).

**Figura 9:** Monossacarídeos presentes na hemicelulose.

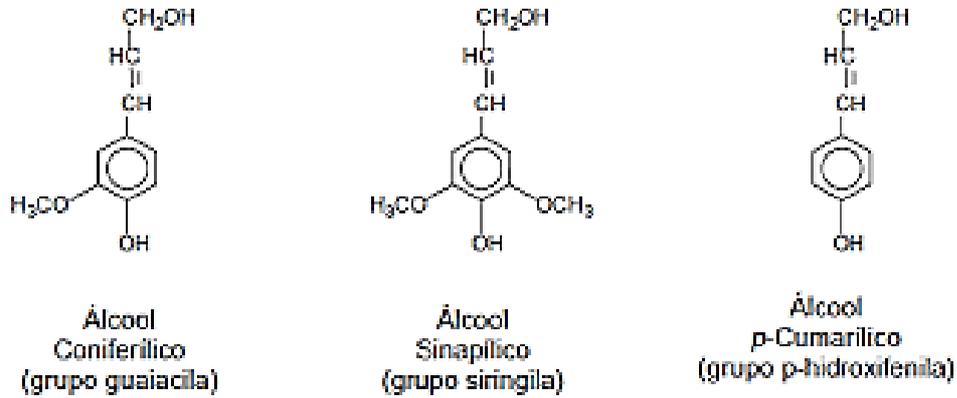


Fonte: MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005

**Lignina:** É o terceiro componente constituinte dos materiais lignocelulósicos, porém, o segundo em quantidade mássica. É uma molécula altamente ramificada, com estrutura tridimensional, hidrofóbica, amorfa e com elevada massa molecular (SOUSA, 2016; COSTA, 2015; PEREIRA, 2019). Atua como agente enrijecedor no interior das fibras e a sua adesão à estrutura da celulose e da hemicelulose se dá por ligação covalente (SOUSA, 2016). Sua formação se processa através do arranjo irregular de três unidades fenílicas que são obtidas de três precursores monoméricos, os álcoois cumarílicos, que se distinguem por suas substituições no anel aromático (SOUSA, 2016; PEREIRA, 2019).

O álcool coniferílico (grupo metóxi na posição 3 do anel aromático) é precursor da unidade de guaiacil (G); o álcool sinapílico (grupo metóxi nas posições 3 e 5 do anel) é precursor da unidade de siringilo (S) e o álcool p-cumarílico (sem grupo substituinte no anel) é precursor da unidade de p-hidroxifenílicas (H) (PEREIRA, 2019). As moléculas dos álcoois cumarílicos estão apresentadas na Figura 10.

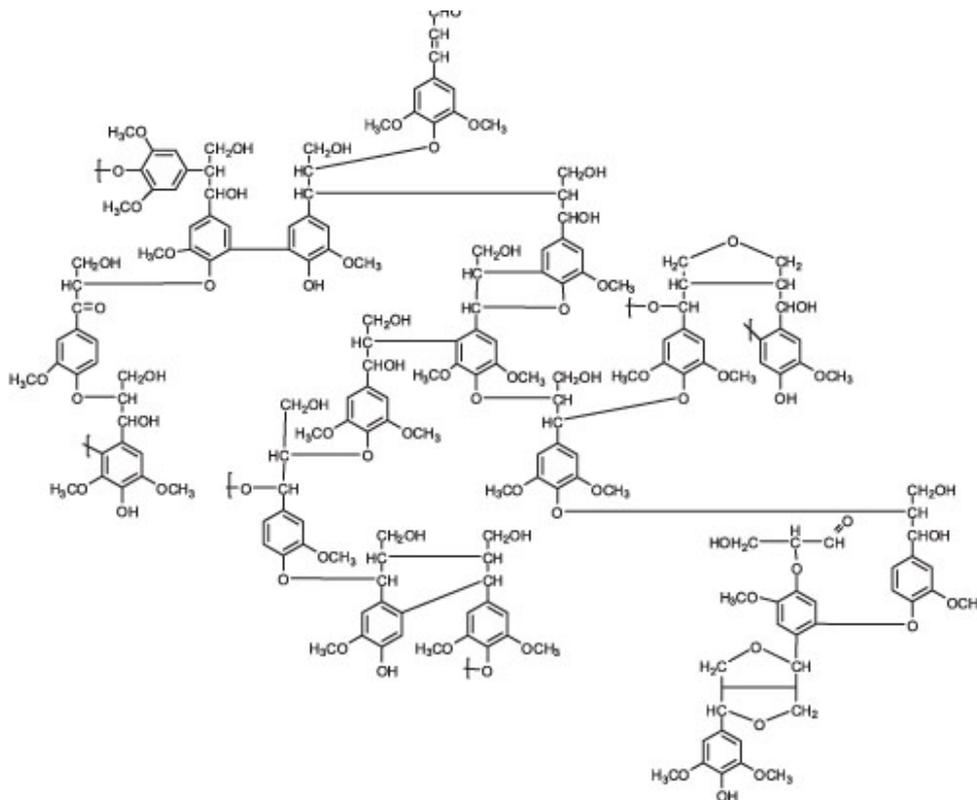
**Figura 10:** Alcóois precursores das unidades de fenilpropano.



Fonte: PITARELO, 2013.

Em razão desses precursores se combinarem de formas diferentes e, assim, possuírem constituição diferente de um material lignocelulósico para outro, é que a lignina não é considerada como uma espécie química, mas uma classe de polímeros (PEREIRA, 2019). Um exemplo de estrutura da lignina pode ser visto na Figura 11.

**Figura 11:** Representação esquemática da molécula de lignina de eucalipto (*Eucalyptus*).



Fonte: Santos et al. 2012

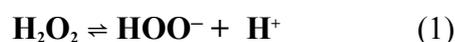
Considerando-se as vantagens de utilização de materiais lignocelulósicos com suporte para a imobilização de enzimas, e a constituição básica dos mesmos, é notória a necessidade da realização de tratamentos químicos e/ou térmicos às frações lignocelulósicas de modo que o suporte tenha sua qualidade mantida e o processo de imobilização seja eficiente. (COSTA, 2015).

#### 1.4.1 Tratamentos de materiais lignocelulósicos para uso na imobilização de enzimas

Os tratamentos tem a função de provocar a separação dos constituintes dos materiais lignocelulósicos (fracionamento) a fim de que sua área superficial interna aumente e modificações químicas e/ou físicas na sua superfície aconteçam, de forma que esta se torne propícia para alcançar um elevado grau de imobilização. No entanto, o tratamento pode não só realizar a solubilização e/ou a degradação parcial da hemicelulose e da lignina, mas também de outros constituintes. Com isso, o tratamento deve respeitar os critérios referentes ao tipo e natureza da fibra a ser usada como suporte, o tipo de imobilização e a reação de catálise na qual o derivado imobilizado será aplicado (COSTA, 2015).

A oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino consiste em um tratamento aplicado à biomassa lignocelulósica, o qual consiste na oxidação dos componentes lignocelulósicos, contribuindo de forma significativa para a redução da lignina em fibras lignocelulósicas.

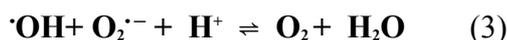
De acordo com Rego (2017) o mecanismo de dissociação do peróxido de hidrogênio em meio alcalino contribui para a deslignificação de biomassa lignocelulósica. A princípio, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) precisa estar em meio alcalino (aproximadamente pH 11,5) para sofrer dissociação e gerar os íons hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), conforme mostrado na equação 1:



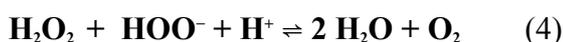
Em pH 11,5, existe a possibilidade de reação entre o íon hidroperóxido e o peróxido de hidrogênio que não sofreu dissociação, de modo que haja a formação de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), de acordo com a equação 2:



Formados os radicais hidroxila e superóxido e, não estando no meio reacional nenhum outro reagente, estes reagem entre si produzindo  $O_2$  e água (equação 3):



A reação global de decomposição de peróxido de hidrogênio fica, então, como apresentado na equação 4:



Ou, pode, ainda, ser representada de maneira simples pela reação de formação de água e oxigênio:



De acordo com Rego (2017), ao se observar a reação global 5, conclui-se, pelo balanço de massa, que para cada mol de  $H_2O_2$  (peróxido), 0,5 mol de  $O_2$  são formados, isto é, a produção de oxigênio atinge o seu máximo. Contudo, quando outro composto reagente, como no caso da biomassa lignocelulósica, se encontra na reação de decomposição de peróxido em meio alcalino (que acaba por produzir os radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), nota-se que a produção final de  $O_2$  é diminuída. Do mesmo modo, o valor de pH ótimo para a deslignação se encontra próximo ao pH 11,5.

Segundo Rego (2017), essas observações indicam que são os intermediários radicais hidroxila e superóxido, as espécies mais prováveis de estarem envolvidas na reação de oxidação da lignina quando os mesmos entram em contato com a biomassa lignocelulósica no tratamento.

Todavia, a oxidação por peróxido de hidrogênio em meio alcalino, além de favorecer a deslignação de biomassa lignocelulósica, pode também proporcionar a limpeza da superfície de fibras desses materiais. Estudos realizados por Brígida (2010) mostram resultados sobre o tratamento de fibra de coco verde por esse método, que resultou na eficiente remoção de impurezas, tais como a retirada de ácidos graxos e resíduos de cera, presentes na superfície da fibra.

Ambos os efeitos causados por esse tratamento contribuem para a preparação da superfície de materiais lignocelulósicos e, no caso do presente trabalho, da superfície de fibras lignocelulósicas, para que estas sejam matrizes de imobilização de enzimas por adsorção

física: a designação, por permitir que a enzima tenha acesso aos outros constituintes da fibra para se adsorver, desfará a impermeabilidade e rigidez que a lignina causa na parede celular da fibra; e a retirada de impurezas, por proporcionar a limpeza da superfície da fibra, garantindo que a relação enzima-suporte seja bem estabelecida e a imobilização seja, portanto, eficiente; visto que como a interação entre biocatalisador e suporte se dá pelo contato direto, esta deve ser o mais livre possível de interferentes.

### 1.5 Babaçu: uma proposta de suporte na imobilização de enzimas

A planta Babaçu (ou simplesmente Babaçu, como é popularmente chamada) é uma árvore da família *Arecaceae*, conhecida como Palmeiras. Cientificamente nomeada de *Attalea speciosa*, possui grande ocorrência no Meio Norte brasileiro, onde a característica de transição entre os climas semiárido do Nordeste e sub-úmido da Amazônia proporcionam condições consideravelmente adequadas para o crescimento dessa vegetação em grande parte do nordeste do Maranhão e do noroeste do Piauí (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2016).

A Figura 12 apresenta a palmeira Babaçu, a qual geralmente possui altura entre 2,5 a 22 m, assim como folhas localizadas em seu ápice que podem atingir de 4 a 9 m de comprimento e de 2 a 13 m de largura. Um cacho de Babaçu pode produzir até 400 frutos, os quais possuem formato oval alongado de cor marrom, casca rígida, com dimensões de 9-13,5 x 6-10 cm e abrigo de 2 a 6 sementes (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2016).

**Figura 12:** Palmeira Babaçu e seus cachos.

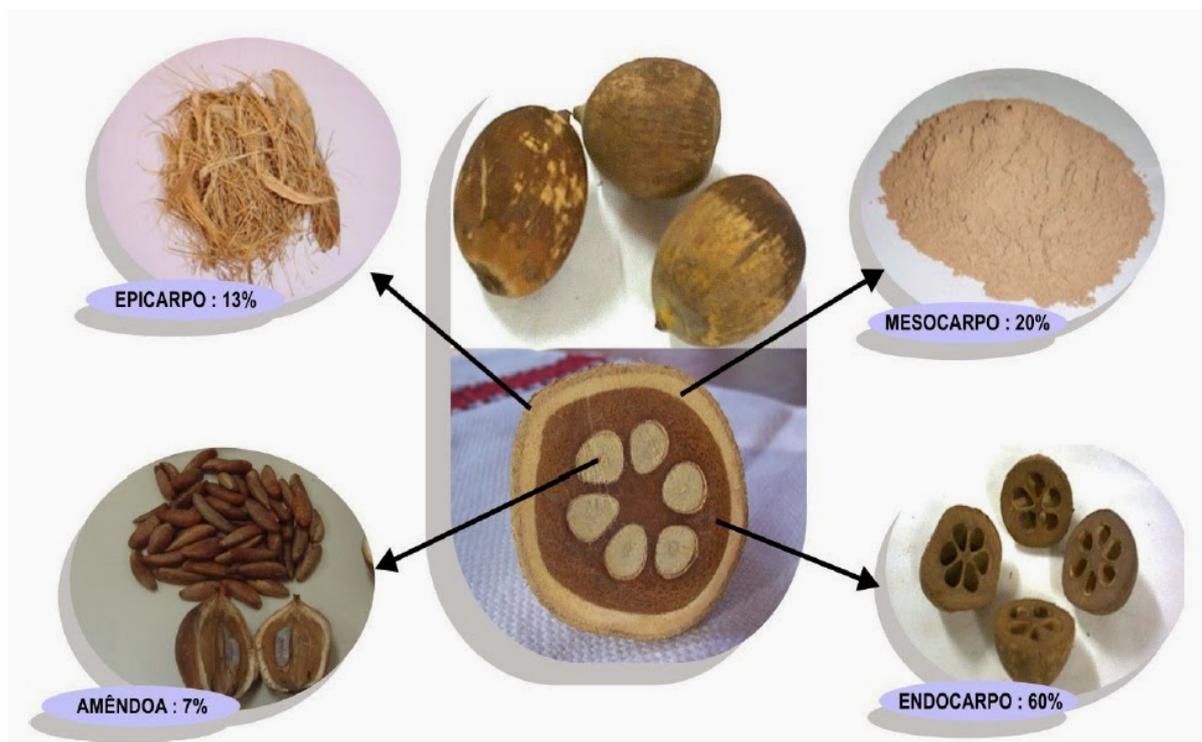


Fonte: Próprio autor

A cultura do uso dos componentes da palmeira babaçu como modo de sobrevivência é considerada remota, acreditando-se ser, inclusive, utilizada por povos indígenas antes mesmo da descoberta do Brasil. Entretanto, essa cultura continuou a se perpetuar no meio dessa população, assim como em comunidades quilombolas e, ainda hoje, garante a subsistência de indivíduos pobres que se encontram localizados em regiões de maior incidência dessa vegetação, como é caso dos estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2016).

O uso da palmeira Babaçu por essas comunidades acontece através do extrativismo, com maior destaque para o seu fruto, chamado de coco babaçu que é dividido nas seguintes frações (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2016) : epicarpo (parte externa e material fibroso e lignocelulósico, correspondente a 13% em quantidade do coco), o mesocarpo (parte abaixo do epicarpo e com alta concentração de amido corresponde a 20% de constituição), o endocarpo (a fração com maior dureza correspondendo a 60 %) e a amêndoa (representa apenas 7% da sua constituição), conforme pode ser visto na Figura 13 (SOUSA, 2016).

**Figura 13:** Frações do coco babaçu.



Fonte: Site do projeto BABCOALL.

Esses componentes são utilizados de diferentes maneiras pelas comunidades extrativistas para a comercialização ou o próprio consumo. As amêndoas, quando não vendidas, são normalmente empregadas na obtenção de leite e óleo, sendo o primeiro usado para tempero de carnes e peixes; e o segundo, para cozinhar, produzir sabões ou mesmo substituir o querosene em lâmpadas. O mesocarpo, por seu turno, é utilizado na produção de bolos, mingau e remédios caseiros; já o endocarpo, é normalmente empregado para se produzir carvão, que serve como combustível (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2016) enquanto o epicarpo geralmente é descartado.

Na indústria, as partes do coco babaçu têm apresentado significativa relevância: das amêndoas, extraem-se o óleo (rico em ácido láurico), o qual é empregado nas áreas oleoquímicas, alimentícias, cosmética, de biocombustíveis e de alimentos; o mesocarpo, devido ao seu alto teor de amido, é aplicado na produção de farinha, ração animal, de pós faciais e, ainda, pode ser convertido em etanol biocombustível; o uso do endocarpo é comum na fabricação de carvão ativado, assim como combustível em caldeiras e em fornos de cozimento; o epicarpo, por fim, é normalmente empregado para fins energéticos (SOUSA, 2016; FRANCO, 2010; PRAZERES; SANTOS; CARDOSO, 2016).

Diante do apresentado, observa-se que a parte do coco babaçu com menor aplicação é o epicarpo, que entre suas possíveis formas de aproveitamento, estão sua conversão em briquetes para alimento de caldeiras e fornos industriais, uso como matéria prima para a produção de um carvão com qualidades similares àquele derivado do endocarpo (PRAZERES; SANTOS; CARDOSO, 2016), aplicação como reforço de biocompósitos (SOUSA, 2016) e utilização como biomassa para a remoção de corantes têxteis de soluções aquosas (VIEIRA et al., 2011).

O epicarpo é formado de material fibroso, rígido e, segundo Franco (2010) com a seguinte constituição lignocelulósica: 17,8 % de lignina, 62,0% de celulose e 13,0 % de hemicelulose. Como os materiais fibrosos lignocelulósicos, possui, entre outras propriedades, ampla disponibilidade, baixo custo, não toxicidade, biodegradabilidade, etc. (FRANCO, 2010; PRAZERES; SANTOS; CARDOSO, 2016), as quais se configuram como características propícias de materiais que podem servir de suporte para a imobilização de enzimas. Considerando, portanto, esses atributos e que a fração de menor aplicação industrial ainda é o epicarpo, é que o presente trabalho se faz relevante para o desenvolvimento de estudos que visem a valorização de materiais de origem vegetal, ambientalmente amigáveis e com propriedades químicas e físicas potenciais para uso como matéria prima de processos

industriais, como as que envolvem o emprego de biocatalisadores para a otimização de procedimentos catalíticos.

### **1.6 Imobilização de Enzimas, Babaçu e ensino de Química**

As enzimas são as responsáveis por catalisar as diversas reações bioquímicas que se processam em organismos vivos. Quando, comparadas aos catalisadores químicos, por exemplo, são consideradas exímios catalisadores, pois admitem características como acentuada atividade catalítica e especificidade, possibilidade de operação sob condições reacionais brandas, entre outras. (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Isso, por sua vez, tem levado a estudos e pesquisas que aperfeiçoam e estimulam sua aplicação em indústrias, como é o caso da imobilização.

Todavia, não se deve dar lugar a visão equivocada de que a importância dos estudos na área de enzimas limita-se à sua mera aplicação industrial, pois conteúdos com temática biotecnológica podem abrir um leque de possibilidades para abordagens diversas, inclusive no ensino de Química. Como é o caso do trabalho de Marcelino e Marques (2017), que se propôs a levantar questionamentos sobre a relação que professores de química do ensino médio da zona urbana e rural do estado do Mato Grosso do Sul estabeleciam entre a biotecnologia e o ensino de química, indagando como era feita essa abordagem nas aulas e revelando ao mesmo tempo as perspectivas e dificuldades que os educadores possuíam ao realizar essa associação.

Nessa mesma linha, campos de estudo da biotecnologia, como a aplicação de enzimas em processos químicos, podem ser abordadas no ensino de química ao se trabalhar conteúdos como: funções biológicas dos ácidos carboxílicos e das aminas, tipos de aminoácidos e sua ocorrência nos alimentos e presença nos seres vivos, a constituição das proteínas, etc. Assim a temática “Enzimas” possibilita discussões que vão além do ensino puramente químico e estende-se, a pontos referentes à alimentação e às questões socioeconômicas e culturais que dela decorrem.

De modo similar, o conteúdo “Imobilização de enzimas”, com o enfoque no uso de suportes naturais, acessíveis, renováveis, pode também ser debatido em sala de aula, explorando-se de que maneira essa prática se configura como sustentável, tanto pelas características desses suportes, quanto por permitir que um mesmo recurso seja aproveitado de formas distintas e para fins que podem se relacionar. A título de exemplo, tem-se o coco babaçu, no qual a fibra de seu epicarpo se mostra como uma proposta de suporte para se imobilizar a enzima lipase a qual, por sua vez, encontrando-se “presa” contribuirá para a

catálise de reações de esterificação ou, também, de transesterificação para a produção de biodiesel a partir do óleo oriundo de sua amêndoa.

Nota-se, com isso, que temas tais como “Enzimas” ou “Imobilização de enzimas” representam não somente assuntos de cunho técnico ou que sugerem sua redução à ideia de aplicabilidade, mas também caminhos para se exercer a prática da interdisciplinaridade no ensino de química proporcionando a ampliação e aperfeiçoamento da aprendizagem ao permitir que os conhecimentos não fiquem restritos à uma área de conhecimento, mas dialogue com várias outras (BRAVO, 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Imobilizar a Lipase tipo VII de *Candida rugosa* por adsorção física em epicarpo de coco babaçu para obtenção de um futuro biocatalisador.

### 2.2 Objetivos específicos:

Coletar, fracionar e tratar biomassa lignocelulósica do coco babaçu;

Caracterizar as fibras tratadas e não tratadas do epicarpo de coco babaçu pela análise em espectroscopia de infravermelho e compará-las;

Comparar a atividade hidrolítica da Lipase tipo VII de *Candida rugosa* imobilizada em epicarpo do coco babaçu em momentos distintos e sob algumas modificações experimentais, com a sua atividade hidrolítica quando livre;

Verificar como essas alterações circunstanciais de tempo e condições experimentais afetam a atividade hidrolítica da lipase imobilizada;

Determinar os parâmetros de eficiência de imobilização para os derivados imobilizados.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais e reagentes

Equipamentos/acessórios	Reagentes e outros materiais
Prensa hidráulica 10 Toneladas P 10000 com Manômetro - BOVENAU	Lipase tipo VII obtida de <i>Candida rugosa</i> em pó com atividade $\geq 700$ U/mg (SIGMA-ALDRICH®)
FORAGEIRA da marca Trapp® (Trf 400 Super)	Peróxido de hidrogênio 30% (v/v) - ISO FAR
Moinho FRITSCH - Pulverisette 14	Hidróxido de Sódio, P.A. (Micropérolas) – ISO FAR
Estufa para secagem com circulação mecânica de ar – linha 520 (FANEM®) com controlador de temperatura analógico modelo A- HT	Azeite de Oliva clássico extravirgem, 250 mL (GALLO)
Banho Maria Analógico - Inox - Modelo SP-02/200IA (SP Labor®: equipamentos para laboratório).	Goma Arábica em Pó Puríssima (ISO FAR)
Agitador IKA® - RW20 digital	Tampão fosfato de potássio monobásico 1 M
Banho Maria Analógico FANEM® - Modelo100	Acetona (MERCK)
Incubadora made home.	Álcool Etilico Absoluto, P.A (ISO FAR)
Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier modelo IRPrestige-21 –SHIMADZU.	Fenolftaleína 1%
Tubos cônicos – tipo Falcon (15 mL)	Coco babaçu

#### 3.2 Procedimento Experimental

##### 3.2.1 Coleta e tratamentos do epicarpo do coco babaçu

O procedimento iniciou-se com a coleta do coco da palmeira Babaçu na Cidade Universitária Dom Delgado, na Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão. De posse dos cocos, com o auxílio de uma faca, fez-se a raspagem de uma fina camada superficial para se remover impurezas adsorvidas/impregnadas, como poeira e outros poluentes.

Após raspagem, os cocos foram quebrados por prensagem e as suas frações foram separadas como segue: o endocarpo e o mesocarpo foram reservados e o epicarpo fora

triturado numa forrageira em malhas de 0,8 e 3,0 mm, seguido de passagem no moinho a fim de adquirir uma granulometria ainda menor. Isso feito, lavou-se as fibras com água destilada até o desaparecimento da tonalidade escura da água de lavagem e, em seguida, foram levadas para a estufa para secagem a uma temperatura de 75 °C por 24 horas.

Com as fibras do epicarpo do babaçu devidamente trituradas, lavadas e secas, passou-se para a fase do tratamento químico, o qual se deu através de oxidação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino com base no que fora descrito por Brígida (2010) com adaptações.

A solução de peróxido utilizada no tratamento oxidativo da fibra foi preparada pesando-se, inicialmente, 0,125 g de Hidróxido de Sódio, P.A. (Micropérolas) e adicionando-se essa massa a um volume de 45 mL de uma solução de Peróxido de Hidrogênio 30 % (v/v). Por fim, o volume foi aferido para 250 mL de solução.

Com a solução de peróxido preparada, adicionou-se a 10 g de fibras do epicarpo do babaçu lavadas e secas em 200 mL dessa solução. A mistura ficou sob agitação por 2 horas em banho-maria a temperatura de 85°C (Figura 14).

**Figura 14:** Estrutura usada no tratamento da fibra com peróxido de hidrogênio.



Fonte: O próprio autor

Logo após, as fibras foram filtradas e lavadas de forma consecutiva com 500 mL de água a 90 °C e 2 L de água a temperatura ambiente (~ 25 °C). Levou-se, então, as fibras para secagem *overnight* em estufa a temperatura de 60 °C. Em seguida, realizou-se a caracterização

dessas fibras por análise de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, assim das fibras que foram somente trituradas e lavadas.

### 3.2.2 Imobilização da Lipase de *Candida rugosa* no epicarpo do coco babaçu

A imobilização da lipase de *Candida rugosa* em epicarpo de coco babaçu foi realizada em dois momentos distintos: o primeiro momento ocorreu em setembro de 2020 (chamado de “Imobilização 1” e, o segundo, de janeiro a fevereiro de 2021 (intitulado “Imobilização 2”).

#### 3.2.2.1 “Imobilização 1” da Lipase de *Candida rugosa* em epicarpo de coco babaçu

Com o epicarpo já tratado, a etapa seguinte consistiu em preparar as soluções-mães de concentração de 10 mg/mL da Lipase tipo VII de *Candida rugosa* e realizar a imobilização.

A imobilização da Lipase tipo VII de *Candida rugosa* na fibra do epicarpo do coco babaçu foi realizada com base na metodologia empregada por Cea e colaboradores (2019) e por Binhayeeding (2020), com adaptações. Para a imobilização pesou-se 0,1 g de epicarpo tratado com peróxido de hidrogênio e adicionou-se em quatro tubos ( sendo três amostras e um branco) Falcon (de 15 mL), juntamente com 2,0 mL de uma suspensão enzimática de concentração de 10 mg/mL e 2,0 mL de solução tampão fosfato de potássio monobásico pH 7. A mistura reacional foi, então, levada à incubadora *home mare* ( Figura 15) e a imobilização ocorreu por 1h, sob a agitação a cerca de 250 rpm, nas temperaturas pré-estabelecidas de 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C.

**Figura 15:** Incubadora adaptada

Fonte: O próprio autor

Ao término da imobilização para cada temperatura, o sobrenadante obtido foi retirado e reservado; o derivado (enzima + suporte) foi filtrado a vácuo e lavado com 20 mL de solução tampão fosfato de potássio monobásico, pH 7 e acondicionado num dessecador a vácuo, *overnight*.

O derivado imobilizado e o sobrenadante, obtidos do processo de imobilização, foram submetidos ao procedimento de determinação de suas atividades hidrolíticas.

### 3.2.2.2 “Imobilização 2” da Lipase de *Candida rugosa* em epicarpo de coco babaçu

No que diz respeito à execução das imobilizações, os procedimentos foram os mesmos para ambas. Entretanto, algumas condições foram alteradas para a “Imobilização 2” em relação à “Imobilização 1”, conforme mostra a tabela 2:

**Tabela 2:** Alterações das condições da "Imobilização 1" para a "Imobilização 2"

“Imobilização 1”	“Imobilização 2”
Fibras tratadas no mesmo período da imobilização.	Fibras tratadas no período da “Imobilização 1”.
Soluções enzimáticas do período da imobilização.	Soluções enzimáticas do período “Imobilização 1”.
Fibras utilizadas possuíam aspecto de pó.	Fibras utilizadas com tamanho em cerca de 2mm

### 3.2.3 Determinação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada

O procedimento para a determinação da atividade hidrolítica foi o mesmo nos dois processos de imobilização.

A atividade hidrolítica foi estabelecida tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada nos mesmos valores de temperaturas utilizados nas imobilizações 1 e 2, ou seja, em 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C.

O método utilizado para a determinação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada consiste na hidrólise do azeite de oliva, ocasionando a liberação de ácidos graxos livres que são quantificados por titulometria. O procedimento realizado foi baseado no trabalho de Barancelli (2019) com algumas adaptações. A princípio, em quatro tubos (três amostras e um branco) Falcon de 15 mL, adicionou-se 2,5 mL de substrato (constituído de uma emulsão de azeite de Oliva e solução de goma arábica 7% (m/v) preparados em uma proporção 1:2), 2,45 mL de tampão fosfato de potássio monobásico pH 7 de molaridade 1 mol. L<sup>-1</sup>. Para a enzima livre, o volume adicionado ao meio reacional foi de 0,1 mL; para a imobilizada a massa do derivado foi de 0,1 g.

Após a adição da enzima (livre ou imobilizada) nos tubos, a mistura reacional foi levada para a incubadora *home mare* sob a agitação a cerca de 250 rpm, nas respectivas temperaturas estabelecidas, por um tempo de 5 min. Ao fim da reação, adicionou-se 5 mL de uma solução acetona e etanol (1:2) em cada tubo a fim de se interromper a ação enzimática e, os mesmos, levados para a titulação com solução de NaOH 0,025 mol.L<sup>-1</sup>, utilizando fenolftaleína como indicador.

Os sobrenadantes gerados dos procedimentos de imobilização tiveram suas atividades hidrolíticas determinadas de acordo com o procedimento supracitado.

O cálculo utilizado para se determinar as atividades hidrolíticas foi também o empregado por Barancelli (2019):

$$\textit{Atividade (U.mL}^{-1} \text{ ou mg}^{-1}) = x \cdot 1000$$

Em que:  $V_a$  = Volume gasto na titulação da amostra;  $V_b$  = Volume gasto na titulação do branco ;  $M$  = concentração molar da solução de NaOH utilizada na titulação (0,025 M);  $t$  = tempo de reação;  $V_e$  = Volume da solução enzimática adicionada ao substrato (usado no cálculo da atividade hidrolítica da enzima livre) ;  $mdi$  = massa do derivado imobilizado adicionada ao substrato (usado no cálculo da atividade hidrolítica do derivado imobilizado).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo livre por minuto nas condições estabelecidas para o experimento.

### 3.2.4 Cálculos dos parâmetros do derivado imobilizado: Rendimento de Imobilização, Atividade Teórica e Atividade Recuperada

Dois parâmetros foram selecionados a fim de se caracterizar os derivados imobilizados no sentido de se verificar a efetividade das imobilizações: Rendimento de Imobilização e Atividade Recuperada. A atividade teórica também foi determinada.

#### 3.2.4.1 Rendimento de Imobilização (RI %)

O Rendimento de Imobilização pode ser definido como a quantidade de enzima que, teoricamente, foi imobilizada no suporte (FARIA; MESQUITA; BRÍGIDA, 2016). E foi calculado a partir da atividade hidrolítica da enzima livre e a atividade do derivado imobilizado, com base na equação descrita por Souza et al., (2017):

$$\text{RI (\%)} = ( \quad ) \times 100$$

Onde: RI (%) = Rendimento de imobilização (%);  $U_{\text{imob.}}$  = Atividade hidrolítica da lipase imobilizada ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ );  $U_0$  = Atividade hidrolítica oferecida pela enzima ao suporte no início da imobilização, ou mais precisamente, a atividade da enzima livre ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### 3.2.4.2 Atividade Teórica ( $At_{\text{teórica}}$ )

A atividade Teórica ( $At_{teórica}$ ) foi determinada através da equação empregada no trabalho de Carneiro (2007) que se dá pelo cálculo da diferença entre as atividades hidrolíticas da enzima livre e do sobrenadante obtido da imobilização. Esse resultado, por sua vez, é dividido pela massa do suporte usada na imobilização e, por fim, o volume de enzima que foi utilizada no processo de imobilização é multiplicada pelo quociente dessa razão.

$$At_{teórica} = \frac{At_0 - At_r}{m_{suporte}} \times V_{enzima}$$

Onde:  $At_0$  = Atividade hidrolítica da enzima livre ( $U.mL^{-1}$ );  $At_r$  = Atividade hidrolítica do sobrenadante ( $U.mL^{-1}$ );  $m_{suporte}$  = massa do suporte utilizada na imobilização (g);  $V_{enzima}$  = volume da solução enzimática usada na imobilização (mL) <sup>1</sup>.

#### 3.2.4.3 Atividade Recuperada ( $At_{recuperada}$ )

A Atividade Recuperada (ou retenção da atividade) foi estabelecida pela razão entre a atividade hidrolítica do derivado imobilizado e a atividade teórica multiplicada por 100, de acordo com equação utilizada por Carneiro (2007):

$$At_{recuperada} = \frac{At_{derivado}}{At_{teórica}} \times 100$$

Em que:  $At_{recuperada}$  = Atividade recuperada (%);  $At_{derivado}$  = Atividade hidrolítica do derivado imobilizado ( $U.g^{-1}$ );  $At_{teórica}$  = Atividade teórica ( $U.g^{-1}$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Preparação das fibras do coco babaçu

---

<sup>1</sup> Para ajustes dos cálculos de atividade teórica, o valor de 0,1 mL foi considerado em lugar de 2,00 mL usados na imobilização.

A Figura 16 mostra o coco babaçu antes e depois da raspagem da superfície:

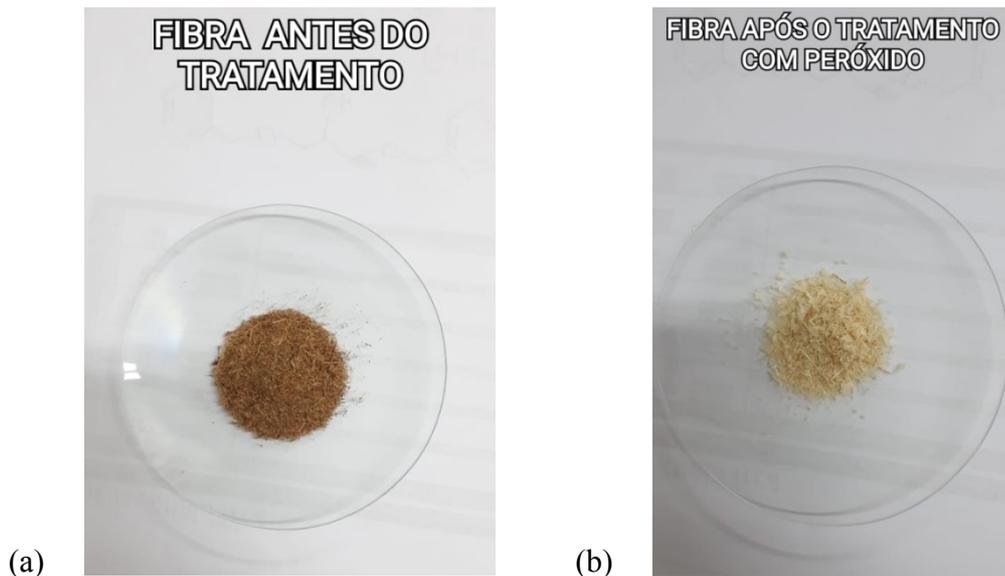
**Figura 16:** Coco babaçu antes e após a retirada da matéria orgânica.



Fonte: O próprio autor

Na Figura 17, estão ilustradas as fibras antes e após o tratamento com o peróxido de hidrogênio.

**Figura 17:** Fibra antes (a) e após (b) o tratamento com peróxido de hidrogênio.

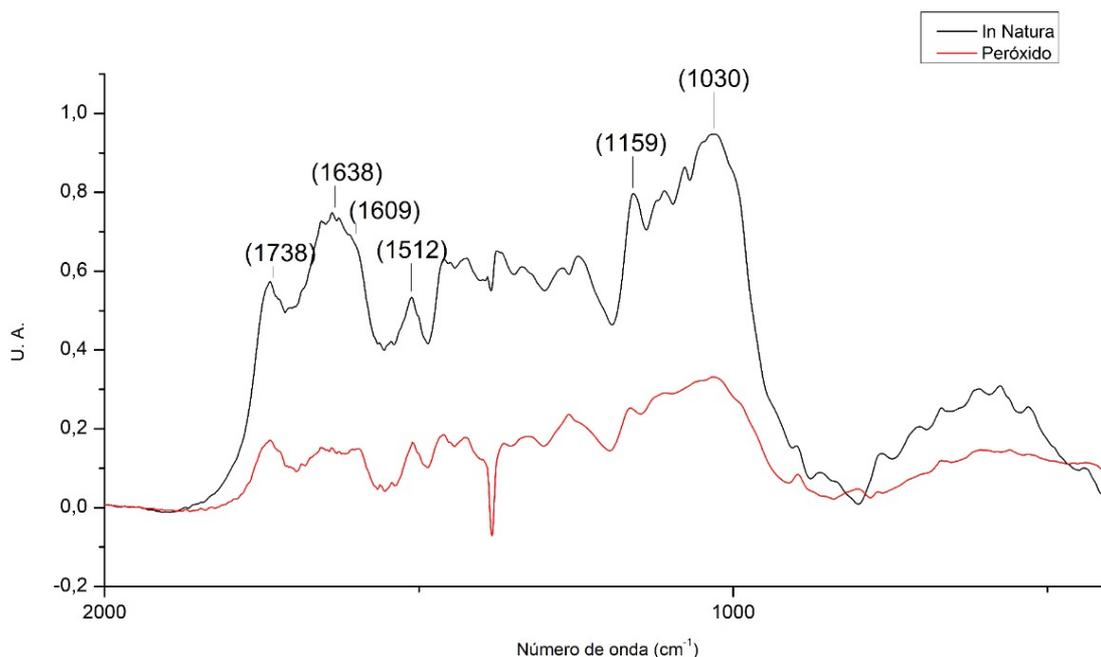


Fonte: O próprio autor

A mudança na coloração da fibra de marrom para amarelo no tom mais claro indica que houve alteração em sua estrutura lignocelulósica. Mudança essa que diz respeito a uma

significativa retirada de componentes, principalmente da lignina, responsável pela coloração marrom escurecida. Os espectros de FTIR (Figura 18) permitem comparar os grupos presentes nas fibras antes e depois do tratamento com  $H_2O_2$ .

**Figura 18:** Espectros de IV de fibras de epicarpo de coco babaçu antes e depois do tratamento com  $H_2O_2$ .



A análise foi realizada no intervalo de número de onda de 400 a 2000  $cm^{-1}$ . Ao se fazer a comparação entre os espectros, verifica-se no espectro da fibra antes do tratamento um pico em 1609  $cm^{-1}$  que é característico da lignina, pois é correspondente às vibrações nos anéis aromáticos da cadeia polimérica, as quais são influenciadas pelo estiramento da ligação C=O (QUINELATO, 2016; XU e WANG,2015). Assim como o que aparece em 1512  $cm^{-1}$ , que também diz respeito à vibração do esqueleto aromático da lignina (QUINELATO, 2016; XU e WANG,2015).

Um outro pico está em 1638  $cm^{-1}$ , aparentando ser uma convolução das bandas 1609  $cm^{-1}$  e 1647  $cm^{-1}$  (não mostrada). Esta última, por sua vez, pode também indicar o estiramento da ligação C=O que é característica dessa região (LOPES e FASCIO,2004).

Pode-se observar no espectro da fibra tratada que todos os picos supracitados não são fortes, apresentam significativa redução, levando à conclusão que o tratamento com peróxido está atuando na retirada da lignina da fibra.

O pico em 1738  $cm^{-1}$  indica o estiramento do grupo carbonila de cetonas e/ou aldeídos que são indícios da presença de celulose e hemicelulose (SILLS e GOSSETT,2011);

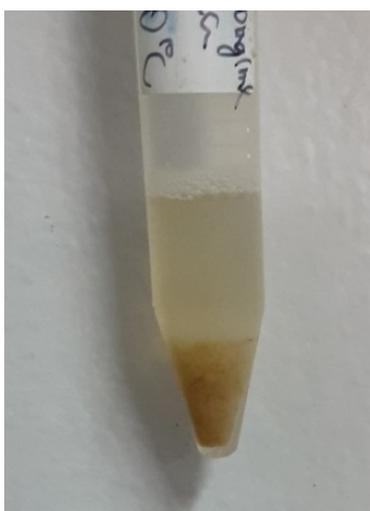
o que se encontra em  $1159\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento assimétrico C–O–C característicos da celulose e hemicelulose (XU e WANG,2015). Ambos têm expressiva redução no espectro da fibra após tratamento.

Há, ainda, um pico em  $1030\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à deformação no plano da ligação C–H aromática da lignina; da ligação C–O em álcool primário e ao estiramento da ligação C=O não conjugado típico de lignina e hemicelulose (QUINELATO, 2016; SHARMA, SHARMA, KUILA,2016). Na fibra tratada com peróxido esse pico é significativamente reduzido.

#### 4.2 Imobilizações da lipase de *Candida rugosa* tipo VII

Tanto na “Imobilização 1” quanto na “Imobilização 2”, os resultados da enzima após o procedimento de imobilização ocasionaram a formação de duas fases, o sobrenadante e o derivado (Figura 19 (a)). Assim como os derivados imobilizados após passagem no dessecador, conforme mostra a Figura 19 (b).

**Figura 19:** Imobilização de enzimas e derivados.



(a) Sobrenadante + derivado



(b) Derivados após a imobilização

Fonte: O próprio autor

#### 4.3 Determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e do derivado imobilizado da “Imobilização 1”.

A atividade hidrolítica da lipase foi avaliada dosando-se o teor de ácidos graxos livres por titulação com solução de NaOH. O procedimento foi realizado para a enzima livre e para a enzima imobilizada. Os valores da atividade hidrolítica e suas respectivas atividades relativas são mostradas nas Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

**Tabela 3:** Valores da atividade hidrolítica e a atividade relativa para a lipase livre.

Temperatura (°C)	Enzima livre*	
	Atividade hidrolítica (U.mL <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
30	196,67 (± 9,53)	50 (±2,43)
35	288,33 (±16,56)	74 (± 4,23)
40	391,67 (± 5,93)	100 (± 1,51)
45	243,33 (± 9,81)	62 (± 2,51)
50	226,67 (± 1,36)	58 (± 0,35)
55	126,67 (± 15,34)	32 (±3,92)
<b>Desvio médio</b>	16,89	4,31

\*Condições reacionais: Concentração de solução enzimática de 10 mg/mL e solução tampão de fosfato de potássio a pH = 7.

Verificando-se a Tabela 3, pode-se constatar que a lipase livre de *Candida rugosa* tipo VII tem a sua atividade hidrolítica crescendo de forma linear com a temperatura até o ponto em que esta última assume a faixa de valor entre 35 e 40 °C (ponto máximo mostrado na Tabela 3), e iniciando um decaimento no valor de sua atividade à medida que a temperatura se eleva.

Esse comportamento está em concordância com o esperado, segundo a descrição da própria ficha da enzima (ver anexo), que assegura ser 37 °C a temperatura ótima para a ação catalítica da enzima livre em pH 7,2 na hidrólise de azeite de oliva ; assim como relatado por Cabrera-Padilha et. al (2012) e Babaei et al ( 2014), ao afirmarem que em temperatura próxima a 37 °C e na região de 35 – 40 °C, respectivamente, a Lipase livre de *Candida rugosa* tipo VII assume melhor desempenho catalítico na reação de hidrólise de azeite de oliva a pH 7 . Em outras palavras, a temperatura na qual a lipase livre de *Candida rugosa* tipo VII possui melhor ação catalítica, se encontra justamente na faixa de temperatura em que a enzima também apresentou maior ação catalítica no experimento.

A Tabela 4 apresenta os valores de atividade hidrolítica para o derivado imobilizado.

**Tabela 4:** Valores da atividade hidrolítica e atividade hidrolítica relativa para a lipase imobilizada na " Imobilização 1".

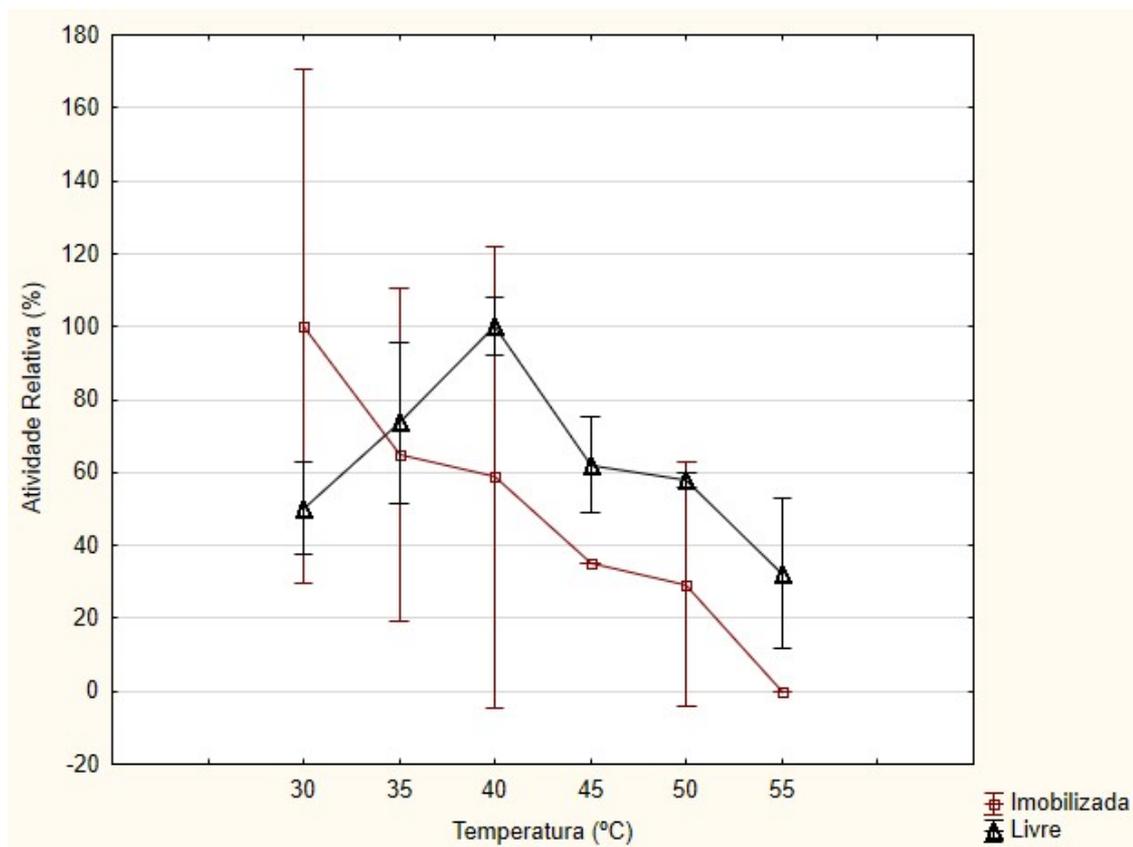
Temperatura	Enzima imobilizada*	
	Atividade hidrolítica (U.mg <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
30	56,67 (±7,58)	100 (± 0,13)
35	36,67 (± 4,91)	65 (± 0,09)
40	33,33 (± 6,80)	59 (± 0,12)
45	20,00 (± 0,00)	35 (± 0,00)
50	16,67 (± 3,60)	29 (± 0,06)
55	0,00 (± 0,00)	0 (± 0,00)
<b>Desvio médio</b>	6,61	0,12

\*Condições reacionais: Concentração da solução enzimática de 10 mg/mL e solução tampão fosfato de potássio a pH= 7.

Como é possível observar, o derivado imobilizado, diferentemente da lipase livre, possui sua maior atividade hidrolítica na temperatura de 30 °C e, à medida que os valores de temperatura crescem, a sua atividade hidrolítica diminui, de modo que quando a temperatura atinge o valor de 55 °C sua ação catalítica é nula.

A Figura 20 apresenta a comparação entre ambas as enzimas - livre e imobilizada:

**Figura 20:** Comparação entre as atividades relativas das enzimas livre e imobilizada ("Imobilização 1") no epicarpo de coco babaçu.



O gráfico traz o comportamento semelhante para a lipase: a atividade relativa atinge um pico a determinada temperatura e, com a elevação da mesma, o valor da atividade cai com a tendência para a desnaturação da enzima. Entretanto, a temperatura em que esse máximo ocorre é menor para a lipase imobilizada que para a lipase livre, fato não esperado para uma imobilização, já que se pretende com esse procedimento (dentre outros benefícios) ampliar a faixa de temperatura do biocatalisador obtido de modo que este assuma maior resistência térmica. De modo semelhante, há a ocorrência de uma diminuição nos valores das atividades hidrolíticas da enzima imobilizada em relação à enzima livre.

Embora se espere um comportamento ideal da enzima após sua imobilização, como o aumento de sua estabilidade e de sua ação catalítica, pode haver situações em que acontece o contrário (DALLA-VECCHIA,2004).

Tal situação pode ter ocorrido na “Imobilização 1”, em que a interação da lipase com o suporte por ocasião da adsorção pode ter gerado uma mudança conformacional na estrutura enzimática, como exposição de seu sítio ativo, levando a lipase a uma maior suscetibilidade à desnaturação quando a temperatura se eleva, gerando então, como resultado: a temperatura de 30°C como a que o derivado possui a maior atividade lipolítica e a diminuição das atividades do derivado imobilizado com o aumento da temperatura.

Contudo, mesmo com a diminuição da temperatura ótima para a lipase imobilizada este valor ainda se enquadra na faixa de temperatura esperada para essa classe de enzimas (CASTRO et al., 2004).

#### 4.4 Cálculo dos parâmetros de imobilização para a “Imobilização1”

##### 4.4.1 Cálculo do Rendimento de Imobilização (RI%)

Os valores obtidos no cálculo do Rendimento estão mostrados na tabela 5:

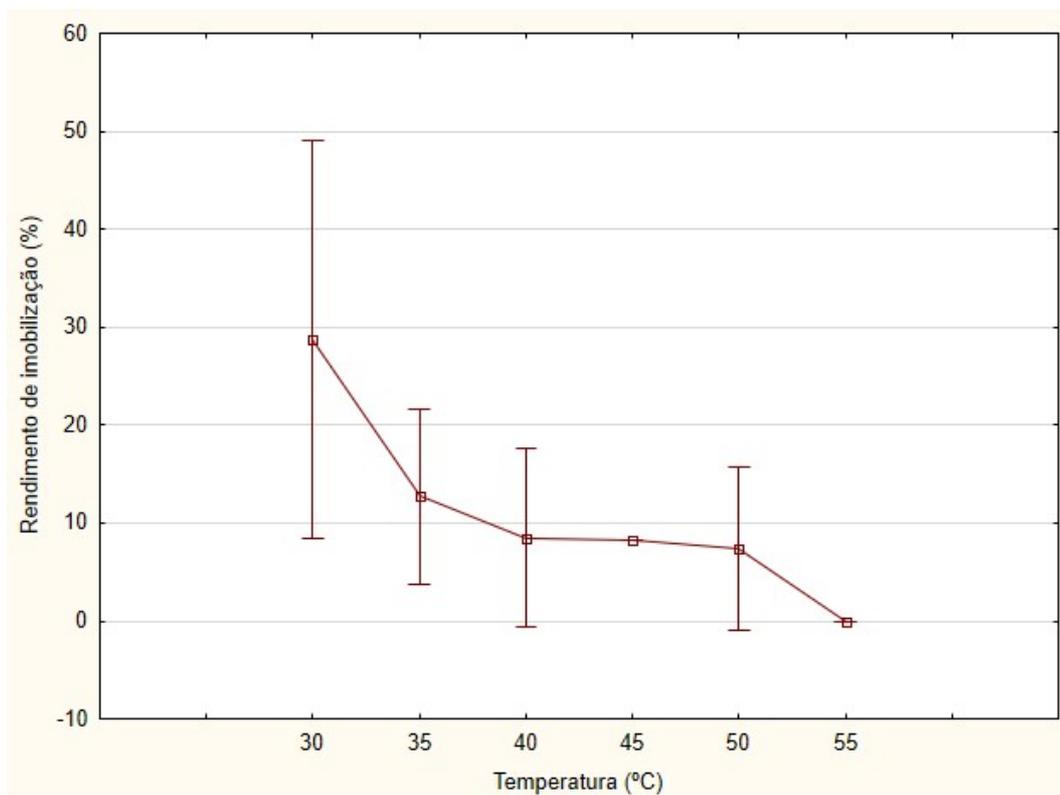
**Tabela 5:** Rendimento da "Imobilização 1" da lipase de *Candida rugosa*.

Temperatura (°C)	Rendimento de Imobilização (%)
30	28,82 (± 3,59)
35	12,63 (± 1,42)
40	8,44 (± 1,59)
45	8,26 (± 0,35)
50	7,33 (± 1,54)
55	0,00 (± 0,00)
<b>Desvio Médio</b>	2,45

Considerando o Rendimento de Imobilização (RI%) como um parâmetro que se pode avaliar a eficiência do processo de imobilização (GAIO et al., 2016), percebe-se, com base nos dados da Tabela 5, que a temperatura de 30°C favoreceu uma maior quantidade de lipase imobilizada. É, interessante notar, ainda, que à medida que a temperatura se eleva, o rendimento de imobilização diminui, pois a lipase, de fato, desnatura com o aumento da temperatura e, está condizente com o comportamento da enzima quando tal se encontra imobilizada.

A Figura 21 mostra o rendimento de imobilização da lipase:

**Figura 21:** Rendimento de imobilização da lipase (“Imobilização 1”).



A Figura 21 mostra que o comportamento do rendimento do derivado imobilizado é semelhante ao da atividade hidrolítica da lipase imobilizada.

#### 4.4.2 Cálculo da Atividade Teórica ( $At_{teórica}$ )

A atividade Teórica para a lipase imobilizada também foi calculada e os seus valores correspondentes às respectivas temperaturas estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores obtidos da Atividade teórica ("Imobilização 1").

Temperatura (°C)	Atividade teórica (U.g <sup>-1</sup> )
30	160 (± 10,89)
35	195 (±19,75)
40	340 (± 13,61)
45	180 (± 1,36)
50	190 (± 7,20)
55	115 (± 5,44)
<b>Desvio médio</b>	<b>16,82</b>

A atividade hidrolítica esperada da enzima imobilizada caso estivesse livre (atividade teórica) se assemelha a tendência que esta se encontra quando livre. No entanto, uma elevação inesperada é verificada na temperatura de 50 °C.

#### 4.4.3 Atividade Recuperada ( $At_{recuperada}$ )

A Atividade Recuperada (ou retenção da atividade) relaciona a quantidade de enzima que teoricamente foi imobilizada e se mantém ativa (FARIA; MESQUITA; BRÍGIDA, 2016).

Para a “Imobilização 1”, os valores de atividade recuperada são exibidos na Tabela 7 e Figura 22.

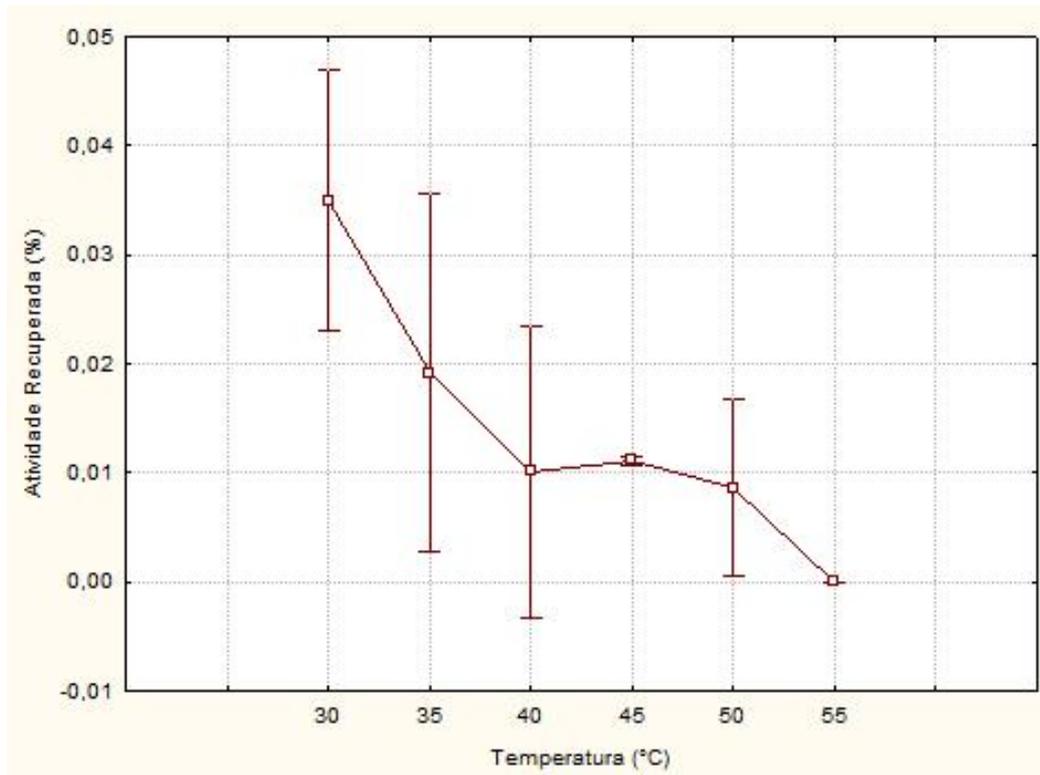
**Tabela 7:** Valores da atividade recuperada para a "Imobilização 1".

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Atividade Recuperada (%)</b>
30	0,03498 ( $\pm$ 0,00227)
35	0,01920 ( $\pm$ 0,00311)
40	0,01011 ( $\pm$ 0,00253)
45	0,01111 ( $\pm$ 0,00008)
50	0,00860 ( $\pm$ 0,00153)
55	0,00000 ( $\pm$ 0,00000)
<b>Desvio médio</b>	0,00275

De acordo os valores apresentados na Tabela 7, a temperatura adequada para que a lipase não sofra perda de ação catalítica após ser imobilizada foi 30°C, observando-se que o aumento da temperatura contribuiu para a diminuição da atividade recuperada, sugerindo, assim, a ocorrência de sua desnaturação e, conseqüentemente, inativação.

A Figura 22 mostra graficamente como a relação Atividade Recuperada (%) e Temperatura se dá.

**Figura 22:** Atividade recuperada da lipase na “Imobilização 1”.



Em razão da atividade recuperada depender da atividade hidrolítica do derivado imobilizado, é esperado o fato de que a temperatura em que a atividade recuperada do derivado imobilizado teve seu maior valor esteja em concordância com aquela na qual a lipase imobilizada teve o seu valor mais elevado de atividade: 30 °C.

#### 4.5 Determinação da Atividade Hidrolítica do derivado imobilizado da “Imobilização 2”

A determinação da atividade hidrolítica para o procedimento de imobilização no segundo momento teve como resultado os dados que se encontram na Tabela 8.

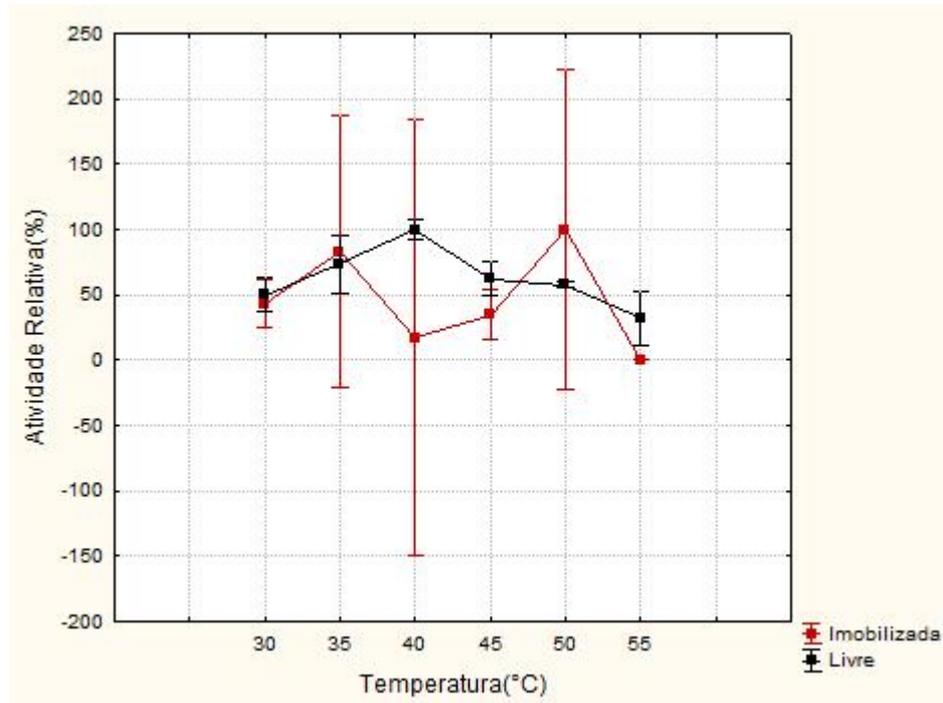
**Tabela 8:** Valores da atividade hidrolítica e atividade hidrolítica relativa para a lipase imobilizada na "Imobilização 2".

Temperatura	Enzima imobilizada*	
	Atividade hidrolítica (U.mg <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
30	16,67 (± 1,36)	43 (± 3,55)
35	31,67 (± 7,58)	83 (± 19,77)
40	6,67 (± 12,10)	17 (± 31,55)
45	13,67 (± 1,36)	35 (± 3,55)
50	38,33 (± 8,92)	100 (± 23,28)
55	0,00 (± 0,00)	0 (± 0,00)
<b>Desvio médio</b>	9,04	0,24

De acordo com os dados da Tabela 8, nota-se que os derivados da segunda imobilização não mostraram valores regulares de atividade hidrolítica com a elevação da temperatura.

Quando comparado à lipase livre (ver Figura 23), observa-se que o derivado atinge maior ação catalítica na temperatura de 50°C. Isso, por sua vez, sugere que uma resistência térmica poderia estar surgindo como resultado da rigidez adquirida pelo biocatalisador ao se adsorver no suporte (CABREA-PADILHA et al., 2012). Entretanto, o aumento da atividade catalítica até determinada temperatura e a manutenção da constância desses valores até atingir a temperatura ótima não ocorre para o derivado imobilizado da “Imobilização 2”, visto que na região de temperatura de 40 e 45°C a atividade hidrolítica sofre uma diminuição e assume valor crescente novamente em 50°C, ponto de atividade ótima, segundo os resultados.

**Figura 23:** Comparação entre as atividades relativas das enzimas livre e imobilizada (“Imobilização 2”) em epicarpo de coco babaçu.



Esses valores inesperados de atividade hidrolítica para essa faixa de temperatura podem ter como fator contribuinte a modificação do tamanho da fibra usada na imobilização: com a diminuição da área de superfície do suporte e em razão do formato do recipiente ser cônico, a sua agitação durante o procedimento de determinação da atividade hidrolítica levou o derivado imobilizado a decantar de forma que seu contato com a emulsão goma-azeite (substrato) se tornou limitado, o que pôde ter causado, portanto, valores errôneos de atividade.

Outro fator que também pode ter favorecido esses resultados é o de que a imobilização pode ter conduzido a lipase a se adsorver no suporte numa posição em que o seu núcleo catalítico não se encontrasse disponível para a catálise.

Quanto às soluções enzimáticas preparadas na época da Imobilização 1, estas foram submetidas a teste que comprovou a manutenção de sua eficiência catalítica; quanto às fibras tratadas nesse mesmo período, as mesmas foram levadas à secagem na estufa para a retirada de umidade que pudesse interferir no processo de imobilização.

#### 4.6 Cálculo dos parâmetros de imobilização para a “Imobilização 2”

##### 4.6.1 Cálculo do Rendimento de Imobilização (RI%)

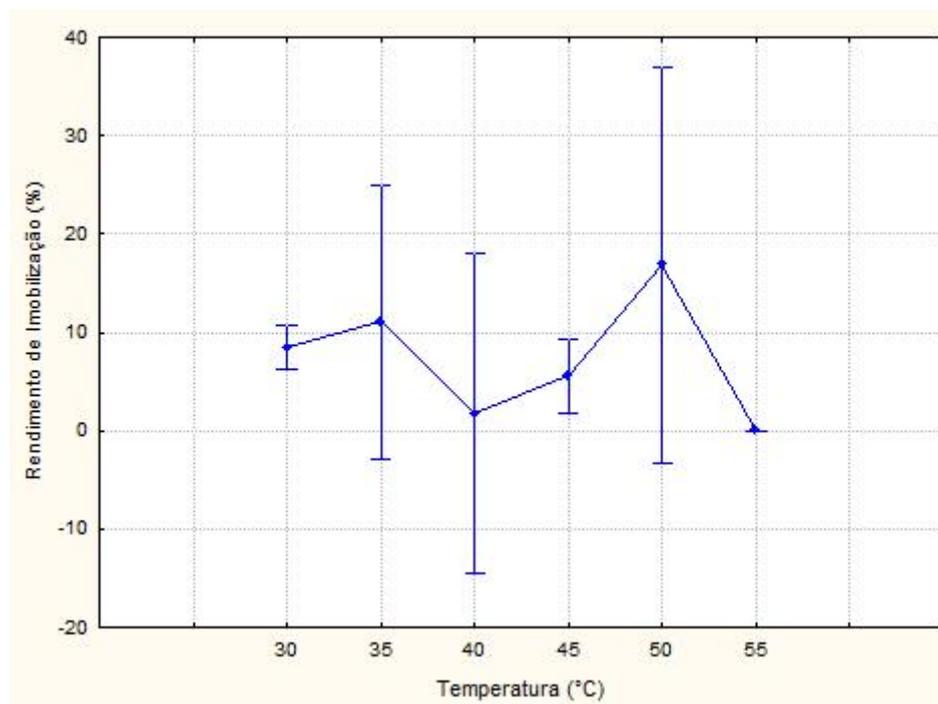
Os resultados para o Rendimento de Imobilização para o derivado imobilizado na “Imobilização 2” são apresentados na Tabela 9:

**Tabela 9:** Rendimento da "Imobilização 2" da lipase de *Candida rugosa*.

Temperatura (°C)	Rendimento de Imobilização (%)
30	8,46 (± 0,43)
35	11,03 (± 2,66)
40	1,76 (± 3,07)
45	5,55 (± 0,72)
50	16,84 (± 3,81)
55	0,00 (± 0,00)
<b>Desvio Médio</b>	<b>3,09</b>

De acordo com valores de rendimento apresentados na Tabela 9, verifica-se que, para a “Imobilização 2”, 50°C foi a temperatura em que, teoricamente, se obteve maior quantidade de enzima imobilizada; para as demais, o comportamento do rendimento é aquele similar à atividade hidrolítica do derivado, conforme mostra a Figura 24:

**Figura 24:** Rendimento de Imobilização da lipase (“Imobilização 2”).



4.6.2  
Cálculo da  
Atividade  
Teórica

( $A_{t_{teórica}}$ )

O cálculo da Atividade Teórica também fora realizado para o derivado imobilizado na segunda imobilização, obtendo-se os valores exibidos na Tabela 10:

**Tabela 10:** Valores obtidos da Atividade teórica ("Imobilização 2").

Temperatura (°C)	Atividade teórica (U.g <sup>-1</sup> )
30	182 (± 4,71)
35	235 (± 7,58)
40	365 (± 7,20)
45	218 (± 7,07)
50	220 (± 1,36)
55	147 (± 2,36)
<b>Desvio médio</b>	<b>8,74</b>

A Atividade Teórica para a lipase imobilizada assume um caráter semelhante à enzima quando é encontrada em sua forma solúvel (maior atividade na região de 35 – 40° C ), embora em 50°C um aumento imprevisto de atividade catalítica ocorra.

#### 4.6.3 Atividade Recuperada ( $A_{t_{recuperada}}$ )

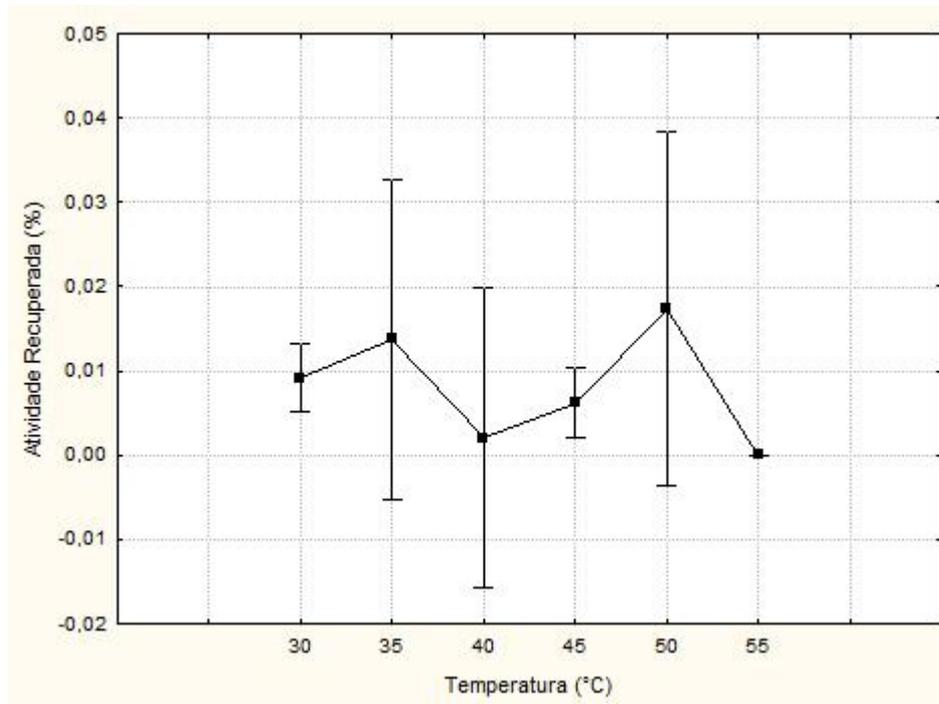
As Atividades teoricamente mantidas no derivado após a “Imobilização 2”, são trazidas na Tabela 11:

**Tabela 11:** Valores da atividade recuperada para a "Imobilização 2".

Temperatura (°C)	Atividade Recuperada (%)
30	0,00919 (± 0,00077)
35	0,01374 (± 0,00360)
40	0,00201 (± 0,00337)
45	0,00618 (± 0,00078)
50	0,01738 (± 0,00398)
55	0,00000 (± 0,00000)
<b>Desvio médio</b>	<b>0,00361</b>

Da mesma maneira que o Rendimento de Imobilização, o maior valor de Atividade Recuperada se dá na temperatura de 50°C, pois como ambos os parâmetros envolvem a atividade hidrolítica da enzima imobilizada, o perfil resultante destes será, portanto, similar, conforme mostrado na Figura 25.

**Figura 25:** Atividade Recuperada da lipase na “Imobilização 2”.



## 5 CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que a raspagem da superfície e a separação das frações dos cocos babaçu coletados são etapas indispensáveis no processo de preparação das fibras para a imobilização, pois deixam a fibra do epicarpo em condições propícias para recebimento do tratamento que visa uma adsorção eficaz da enzima no suporte.

A análise de FTIR mostrou que picos correspondentes à lignina, hemicelulose e celulose presentes no espectro da fibra antes do tratamento aparecem com grande redução no espectro da fibra após esta ser tratada, indicando que o tratamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino apresentou elevada eficácia no desmembramento desses constituintes favorecendo o aumento da área superficial da fibra e, desse modo, a imobilização.

A atividade hidrolítica do derivado imobilizado no primeiro procedimento de imobilização assumiu valores mais baixos e temperatura ótima diminuída ( $T = 30^{\circ}\text{C}$ ), quando comparada à enzima, o que pode estar relacionado principalmente aos efeitos da interação enzima-suporte. Essa, ainda, é notada no segundo momento de imobilização ao se obter, também, atividades hidrolíticas baixas para a lipase imobilizada. Todavia, uma suposta estabilidade térmica é verificada para esse derivado quando o mesmo alcança a mais alta atividade hidrolítica em uma temperatura superior à lipase livre. Entretanto, uma instabilidade nos valores de atividade hidrolítica para temperaturas mais baixas que esta revela a necessidade de investigações minuciosas a respeito dos efeitos que modificações de certas condições experimentais causam no procedimento de imobilização aqui estudado.

As alterações experimentais referentes ao tempo de preparação das soluções enzimáticas e das fibras tratadas não foram consideradas como fortes contribuintes para resultados inesperados de atividade hidrolítica dos derivados oriundos da “Imobilização 2”, uma vez que, procedimentos testes foram realizados para que seus supostos efeitos pudessem ser minimizados e/ou evitados. Por outro lado, a diferença no formato da fibra usada na imobilização mostrou-se como possível interferente por, durante o procedimento, ocasionar dificuldade de contato entre enzima imobilizada e substrato, sugerindo, com isso, que o formato em pó da fibra seria o mais adequado para se imobilizar a lipase.

Os parâmetros que medem a eficiência de imobilização dos derivados imobilizados, isto é, o rendimento de imobilização e a atividade recuperada, mostraram melhores resultados para a “Imobilização 1” quando a temperatura assumiu o valor de  $30^{\circ}\text{C}$ . E para a “Imobilização 2”, a temperatura em que ambos os parâmetros se apresentaram como

maiores foi a de 50°C, indicando que, por estarem relacionados com a atividade hidrolítica da enzima imobilizada, estes terão valores mais elevados em condições (nesse caso a temperatura) iguais àquelas nas quais os derivados imobilizados alcançaram os melhores desempenhos de atividade hidrolítica.

Embora seja necessário estudos mais profundos para ajustes de melhores condições experimentais, a imobilização por adsorção física de Lipase tipo VII de *Candida rugosa* em epicarpo de coco babaçu para a obtenção de futuro biocatalisador se apresenta como uma proposta promissora de aplicação em setores industriais que lidam com reações de acilgliceróis de cadeia longa e almejam minimizar custos ao passo que atendem demandas de preservação ambiental.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JR, Eduardo Bezerra de. *et al.* In: MACIEL, Adeilton Pereira (org.). **Biocombustíveis de Babaçu: Ensaio técnico sobre oportunidades de produção de Biocombustíveis a partir do Coco Babaçu.** São Luís: EDUFMA, 2016. p. 41-60.
- ALMEIDA JR, Eduardo Bezerra de. *et al.* In: MACIEL, Adeilton Pereira (org.). **Biocombustíveis de Babaçu: Ensaio técnico sobre oportunidades de produção de Biocombustíveis a partir do Coco Babaçu.** São Luís: EDUFMA, 2016.p. 61-83.
- BABAEI, Mahsa; KARIMI, Afzal; HEJAZI, Mohammad Amin. Use of Mesoporous MnO<sub>2</sub> as a support for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, Sérvia, v.20, n. 3, p. 371-378, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2298/CICEQ121009019B>> . Acesso em: 14 jan. 2021.
- BARANCELLI, Renata Deda Ferreira. **Estudo de adsorção de lipase de *Candida Rugosa* em palha de milho e óxido de nióbio para aplicação em reação de hidrólise.** 2019.139 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019. Disponível em: <[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4065/1/PB\\_PPGTP\\_M\\_Barancelli%2c%20Renata%20Deda%20Ferreira\\_2019.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4065/1/PB_PPGTP_M_Barancelli%2c%20Renata%20Deda%20Ferreira_2019.pdf)>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- BINHAYEEDING, Narisa. *et al.* Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, United Kingdom, v.95, p.174-185, aug. 2020. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- BRÍGIDA, Ana Iraidy Santa. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais.** 2010.193 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://186.202.79.107/download/imobilizacao-de-lipases-utilizando-fibra-de-coco-verde.pdf>> Acesso em: 13 fev. 2020.
- BRITO, Mylena Junqueira Pinto. **Imobilização de lipase em carvão ativado produzido a partir do caroço de cajá.** 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016. Disponível em:< [http://www2.uesb.br/ppg/ppgecal/wp-content/uploads/2017/04/Disserta%C3%A7%C3%A3o\\_Mylena-Junqueira\\_-Final-P%C3%B3s-defesa.pdf](http://www2.uesb.br/ppg/ppgecal/wp-content/uploads/2017/04/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Mylena-Junqueira_-Final-P%C3%B3s-defesa.pdf)> . Acesso em: 04 fev.2020.
- CABRERA-PADILHA, Rebeca .Y. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.39, p.289-298, aug. 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1027-3>> . Acesso em: 09 fev. 2021.
- CARNEIRO, Elizabete Araújo. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B em toyopearl.** 2007.107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15767/1/2007\\_dis\\_eacarneiro.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15767/1/2007_dis_eacarneiro.pdf)>. Acesso em: 25 ago.2020.

CASTRO, Heizir F. de et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.1, p.146-156, jan- fev. 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/qn/v27n1/18823.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

CEA, Mara et al. Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. **Journal of Environmental Management**, United States, v.242, p.171-177, July. 2019. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.013>>. Acesso em: 17 jul. 2020.

COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andrea Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

CORTEZ, Daniela V.; CASTRO, Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v.40, n.1, p.85-96, fev. 2017. Disponível em:<<https://www.scielo.br/pdf/qn/v40n1/0100-4042-qn-40-01-0085.pdf>> Acesso em: 18 fev.2020.

COSTA, Diego Melo. **Sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase**. 2015.157 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2015. Disponível em: <<https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/bitstream/handle/set/1127/SABUGO-DE-MILHO-COMO-SUPORTE-PARA-IMOBILIZA%c3%87%c3%83O-DE-LIPASE.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 ago. 2020.

DALLA- VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.4, p.623-630, jul- ago.2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/qn/v27n4/20804.pdf>>. Acesso em: 03 mar.2020.

FARIA, L.R.F.; MESQUITA, M.F.S.M.; BRÍGIDA, A.I.S. Imobilização de acalase em deae sepharose e aplicação na hidrólise de gelatina. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.,25, 2016, Gramado. **Anais eletrônicos...** Gramado, 2016.p.1-6. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1057911> > . Acesso em: 02 mar. 2021.

FERRAZ, José Lucas de Almeida Antunes et al. Obtenção de lipases microbianas: uma breve revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Paraná, v.20, n.1, p.30-53, jan- jun. 2018. Disponível em:<<https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/4579/pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2020.

FRANCO, Francisco José Patrício. **Aproveitamento da fibra do epicarpo do coco babaçu em compósito com matriz de epóxi: estudo do efeito do tratamento da fibra**. 2010.77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010. Disponível em: < <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/12697> > . Acesso em: 10 mar. 2021.

GAIO, Iloir et al. Rendimento de Imobilização de Pectinases Imobilizadas em Matriz Polimérica Inorgânica. *In*: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA-ENZITEC 2016, 12., 2016, Caxias do Sul. **Anais eletrônicos...** Caxias do Sul, 2016. p. 1-4.

Disponível em: < <https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4450-enzitec2016.pdf> >. Acesso em: 01 mar. 2021.

GIRELLE, Anna Maria; ASTOLF, Maria Luisa; SCUTO, Francesca Romana. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosfere**, Roma, Itália, v.244, p.1-12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>> . Acesso em: 13 jul. 2020.

GONÇALVES, Enrico Cerioni Spiropulos. **Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens celulares de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros**. 2018.186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em:< <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17131/tde-22072019-141431/publico/EnricoCerioniSpiropulosGoncalves.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2020.

GONÇALVES FILHO, Danielle; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v.103,p.7399-7423, aug. 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6> >. Acesso em: 18 fev.2020.

JAEGER, K.-E; DIJKSTRA, B.W; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, EUA, v. 53, n.1, p.315-351, oct.1999. Disponível em:< <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315> >. Acesso em: 23 set. 2020.

LOPES, Wilson Araújo e FASCIO, Miguel. Esquema para a interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p. 670-673, 2004. Disponível em:< <http://submission.quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2004/vol27n4/24-ED03198.pdf?agreq=.%20Esquema%20para%20a%20interpreta%C3%A7%C3%A3o%20de%20espectros%20de%20subst%C3%A2ncias%20org%C3%A2nicas%20na%20regi%C3%A3o%20do%20infravermelho&agrep=jbcs,qn,qnesc,qnint,rvq> >. Acesso em: 19 fev.2020.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**.2009.225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. Disponível em:< <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/3877/2620.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 04 fev.2020.

MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de; NASCIMENTO, Evandro Afonso do; MELO, Dárley Carrijo de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I - estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **R. Árvore**, Viçosa, v.29, n.3, p.461-470, mai -jun. 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rarv/v29n3/a14v29n3.pdf>> . Acesso em: 23 set. 2020.

ÖZTÜRK,Banu. **Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports**. 2001.118 f. Dissertação ( Mestrado em Ciência) – Instituto de Tecnologia de Izmir, Izmir, Turquia, 2001. Disponível em: < <https://core.ac.uk/download/pdf/324141353.pdf>> . Acesso em: 13 jul. 2020.

PEREIRA, Mariana Bisinotto. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1117486/1/DissertacaoMarianaBisimotoPereira2019.pdf>> Acesso em: 11 abr. 2020.

PITARELO, Ana Paula. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32102/R%20-%20T%20-%20ANA%20PAULA%20PITARELO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 23 set. 2020.

PRAZERES, Gilza Maria Piedade; SANTOS, Angela Maria Correa Mouzinho; CARDOSO, Ziel dos Santos. In: MACIEL, Adeilton Pereira (org.). **Biocombustíveis de Bagaço**: Ensaio técnico sobre oportunidades de produção de Biocombustíveis a partir do Coco Bagaço. São Luís: EDUFMA, 2016. p. 105-122.

PROJETO BABCOALL. **Produto/processo/serviço**. Disponível em: <<http://babcoall.blogspot.com/2014/09/produtoprocessoservic.html>>. Acesso em: 23 set. 2020.

QUINELATO, Cristiane. **Métodos de extração da lignina do bagaço de cana-de-açúcar da região noroeste do estado de São Paulo**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016. Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138898/quinelato\\_c\\_me\\_sjrp.pdf?sequence=3](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138898/quinelato_c_me_sjrp.pdf?sequence=3)>. Acesso em: 03 abr. 2021.

REGO, Artur Serpa de Carvalho. **Otimização dos parâmetros da deslignização do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino através de modelo neural**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/33950/33950.PDF>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

RODRIGUES, Rafael Costa. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15447/000681060.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

SANTOS, Fernando. A. et al, Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar Para Produção de Etanol. **Química Nova**, São Paulo, v.35,n.5,p. 1004-1010,2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>>. Acesso em: 03 mai. 2021.

SANTOS, L.F; PAIVA, T.C.B; SILVA, F.T. Tratamento de efluentes da fabricação de nitrocelulose - Scale Up. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2015, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** São Paulo: Blucher, 2015.p. 9313-9320.

Disponível em: < <https://www.proceedings.blucher.com.br/download-pdf/245/17802>>.  
Acesso em: 23 set.2020.

SHARMA, Shivani; SHARMA, Vinay; KIULA, Arindam. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. **3 Biotech**, Switzerland, v.6, p.1- 11, dec. 2016. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13205-016-0465-z> >. Acesso: 13 fev. 2020.

SILLS, Deborah L. e GOSSETT, James. M. Using FTIR to Predict Saccharification From Enzymatic Hydrolysis of Alkali-Pretreated Biomasses. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, vol.109, n.2, p. 353 – 362, aug.2011. Disponível : < <https://doi.org/10.1002/bit.23314> >. Acesso em: 03 abr. 2021.

SOUSA, Douglas da Cruz. **Compósitos com matriz de amido do mesocarpo do coco babaçu reforçados com fibras do epicarpo do coco babaçu**. 2016.86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2016. Disponível em:< [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=4547430#](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4547430#) >. Acesso em: 13 set. 2019.

SOUZA, Livia Tereza de Andrade et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. (Org.). **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. cap.15, p. 529-568. Disponível em: <<https://openaccess.blucher.com.br/download-pdf/326/20266>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

VAZ, Madalena; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalysts of the Hydrolysis of triacylglycerols. **Revista Eletrônica de Biologia**. São Paulo, v.5, n.3,p.42-58, abril. 2012. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/315733992> >. Acesso em: 25 mar. 2021.

VIEIRA, Adriana P.; SANTANA, Sirlane A.A; BEZERRA, Cícero W.B.; SILVA, Hildo A.S.; CHAVES, José A.P.; MELO, Júlio C.P.; SILVA FILHO, AIROLDI, Claudio. Removal of textile dyes from aqueous solution by babassu coconut epicarp (*Orbignya speciosa*) **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, Switzerland, v.173, n.2, p. 334-340, set.2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.043> >. Acesso em: 25 mar. 2021.

XU, Feng; WANG, Donghai. Analysis of lignocellulosic biomass using infrared methodology. In: PANDEY, Ashok et al. (Ed.). **Pretreatment of biomass: processes and technologies**. United States: Elsevier, 2015. p.7- 25. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00002-5> >. Acesso em: 24 fev. 2020.

**ANEXOS**

ANEXO A - Ficha técnica da enzima Lipase Tipo VII de *Candida rugosa*.**SIGMA-ALDRICH**3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sigma.com Outside USA: eurtechserv@sigma.com**Certificate of Analysis**

**Product Name:** LIPASE CANDIDA RUGOSA  
Type VII, >= 700unit/mg solid

**Product Number:** L1754

**Batch Number:** BCCB6171

**Brand:** Sigma

**CAS Number:** 9001-82-1

**Formula:**

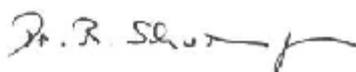
**Formula Weight:**

**Storage Temperature:** 2-8 C

**Quality Release Date:** 12 JUN 2019

**Recommended Retest Date:** JUN 2021

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	REPORT RESULT	LIGHT BROWN
APPEARANCE (FORM)	REPORT RESULT	POWDER
BIO-TESTS	ENZYMATIC ACTIVITY $\geq$ 700 U/MG; ONE UNIT WILL HYDROLYZE 1.0 MICROEQUIVALENT OF FATTY ACID FROM A TRIGLYCERIDE IN ONE HOUR AT PH 7.2 AT 37 DEG C USING OLIVE OIL (30 MIN INCUBATION).	1528 U/MG
EXTRANEIOUS ACTIVITIES	SUBSTANTIALLY FREE OF PROTEASE AND ALPHA-AMYLASE	CORRESPONDS



Dr. Reinhold Schwenninger  
Quality Assurance  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.