



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JULIANA MARIA RABEILO BESSA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LIPASE AMANO DE *Pseudomonas fluorescens***  
**IMOBILIZADA EM OCTIL-AGAROSE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES**  
**INDUSTRIAIS RICOS EM LIPÍDIOS**

**FORTALEZA**

**2024**

JULIANA MARIA RABEILLO BESSA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LIPASE AMANO DE *Pseudomonas fluorescens*  
IMOBILIZADA EM OCTIL-AGAROSE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES  
INDUSTRIAIS RICOS EM LIPÍDIOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B465a Bessa, Juliana Maria Rabeilo.  
Avaliação do potencial da lipase amano de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Octil-agarose no tratamento de Efluentes Industriais ricos em lipídios / Juliana Maria Rabeilo Bessa. – 2024.  
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.  
Coorientação: Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França.
1. Enzimas hidrolíticas. 2. Degradação de lipídios. 3. Reutilização de enzimas. 4. Laticínios. I. Título.  
CDD 660
-

JULIANA MARIA RABEILLO BESSA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPASE AMANO DE *Pseudomonas fluorescens*  
IMOBILIZADA EM OCTIL-AGAROSE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES  
INDUSTRIAIS RICOS EM LIPÍDIOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 03/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Maisa Pessoa Pinheiro  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Ceará)

---

Dr<sup>a</sup>. Ravena Casemiro Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e Nossa Senhora.

Aos meus pais, Francisca Rosa e Hugo Junior.

Aos meus demais familiares.

Ao meu parceiro de vida, Marcos Vinícius.

Ao meu eu do futuro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Santíssima, pelo milagre da vida, por todas as bênçãos e força espiritual concedidas nessa jornada.

Aos meus pais, Rosa e Hugo, por todo suporte e apoio incondicional. Meus exemplos de responsabilidade e coragem. Não existem palavras que possam expressar minha imensa gratidão a ambos, mas tentarei compensar em atos que os orgulhem.

Ao meu parceiro e melhor amigo, Marcos Vinícius, que me fortalece todos os dias com sua presença e suas atitudes de responsabilidade e afeto, e à sua mãe, Elizeuda, que tem rezado por mim e me tratado com tanta gentileza.

Aos meus demais familiares, que, apesar da minha ausência devido à dedicação a esse trabalho, estiveram torcendo pelo meu sucesso e me ajudado em momentos difíceis.

Ao meu avô materno, Ailton (*in memoriam*), por sua influência na minha vida acadêmica e por sempre incentivar o desejo do saber em mim.

À minha terapeuta, Dra. Thays, por me permitir enxergar além da imagem que as pessoas haviam formado para mim.

À professora Luciana Rocha Barros Gonçalves, por me aceitar como orientanda e me acolher quando precisei, sempre dedicada a ajudar mesmo em momentos difíceis, além de ser um exemplo de profissional.

Ao professor Ítalo Waldimiro Lima de França, que além de um coorientador preocupado e acolhedor, tem sido um bom amigo, que talvez não faça ideia de sua importância em minha vida profissional.

Aos caríssimos colegas do grupo GPBIO, por todos os conselhos, sorrisos e acolhimento, em especial Allison, Ravena, Guilherme, Paulinha, Paula Maria, Laiza, Carlinha e Eddie. Sou imensamente grata por todas as vezes que me cederam balanças, shakers, centrífugas e seu valioso conhecimento.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, por me receber em seu programa de pós-Graduação e me contemplar com experiências e conhecimentos que nunca serão esquecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa da qual me beneficiei.

“Embora a Bioquímica proporcione esclarecimentos importantes e aplicações práticas na Medicina, na Agricultura, na Nutrição e na indústria, a sua preocupação primordial é com o milagre da vida em si.”  
(NELSON e COX, 2013, p. 2).

## RESUMO

Os efluentes da indústria de laticínios são ricos em lipídios, que contribuem para altas demandas bioquímica e química de oxigênio, responsáveis pela eutrofização dos ecossistemas aquáticos. Nesse sentido, lipases (EC 3.1.1.3) microbianas apresentam alta versatilidade, disponibilidade e têm sido empregadas na biorremediação por requererem condições de processo brandas, como temperatura ambiente e pH neutro. Contudo, sua estabilidade é limitada e para melhorá-la, é possível imobilizá-las em octil-agarose por adsorção, sendo um benefício desse suporte sua capacidade de hiperativar a lipase por ativação interfacial. Além disso, é possível incrementar a estabilidade através da reticulação com glutaraldeído, contudo, a toxicidade desse aldeído estimula a sua comparação a alternativas, como a dextrana aldeído. Assim, esse trabalho teve como objetivo o estudo de biocatalisadores produzidos por adsorção da lipase amano de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) em octil-agarose, reticulados ou não com aldeídos, visando seu emprego na hidrólise de efluentes industriais ricos em lipídios, com ênfase em laticínios. Inicialmente, a PFL foi imobilizada por adsorção em octil-agarose em pH 7,0 por 1 h a 25 °C sob agitação constante para obtenção de O-P (octil-agarose-PFL). Para os demais biocatalisadores esse processo foi seguido pela reticulação por glutaraldeído 1% ou dextrana aldeído 33% (1:5 m/v) e, em sequência, uma segunda camada de PFL foi imobilizada, obtendo-se O-P-G-P e O-P-D-P, respectivamente. Posteriormente, os biocatalisadores foram caracterizados por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), estabilidade térmica (60 °C e 70 °C) e de pH's (5,0 e 7,0), e resistência à dessorção em Triton X-100 4%. A atividade hidrolítica foi estudada frente a diferentes efluentes formulados à base de azeite, óleo de soja e leite. A estabilidade operacional foi avaliada através da hidrólise do efluente formulado de leite. A análise de FTIR sugeriu a presença de ligações covalentes em O-P-D-P, esse resultado refletiu no maior tempo meia-vida à 70 °C e pH 7,0 para O-P-D-P. Além disso, O-P-G-P e O-P-D-P resistiram à dessorção total em Triton X-100 4% por 2 h. O tamanho das cadeias de entrecruzamento interferiu na interação de O-P-G-P e O-P-D-P com os substratos. Entretanto, o biocatalisador O-P-D-P apresentou atividade de cerca de 70% até dois ciclos reacionais. Assim, os biocatalisadores mostraram-se resistentes termicamente e apresentaram potencial para o tratamento de efluentes ricos em lipídios, além de demonstrarem a utilidade da dextrana aldeído como alternativa atóxica ao uso do glutaraldeído para reticulação.

**Palavras-chave:** Enzimas hidrolíticas; Degradação de lipídios; Reutilização de enzimas; Laticínios.



## ABSTRACT

Effluents from the dairy industry are rich in lipids, which contribute to high biochemical and chemical oxygen demands, which are responsible for eutrophication of aquatic ecosystems. In this sense, microbial lipases (EC 3.1.1.3) have high versatility, availability and have been used in bioremediation because they require mild process conditions, such as room temperature and neutral pH. However, their stability is limited and to improve it, it is possible to immobilize them in octyl-agarose by adsorption, and a benefit of this support is its ability to hyperactivate lipase by interfacial activation. In addition, it is possible to increase stability through cross-linking with glutaraldehyde, however, the toxicity of this aldehyde encourages its comparison to alternatives, such as dextran aldehyde. Thus, this work aimed to study biocatalysts produced by adsorption of *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) lipase on octyl agarose, cross-linked or not with aldehydes, aiming at their use in the hydrolysis of lipid-rich industrial effluents, with emphasis on dairy products. Initially, PFL was immobilized by adsorption in octyl-agarose at pH 7.0 for 1 h at 25 °C under constant agitation to obtain O-P (octyl-agarose-PFL). For the other biocatalysts, this process was followed by cross-linking by 1% glutaraldehyde or 33% dextran aldehyde (1:5 m/v) and, subsequently, a second layer of PFL was immobilized, obtaining O-P-G-P and O-P-D-P, respectively. Subsequently, the biocatalysts were characterized by Fourier Transform Infrared Spectrophotometry (FTIR), thermal stability (60 °C and 70 °C) and pH's (5.0 and 7.0), and desorption resistance at Triton X-100 4%. The hydrolytic activity was studied against different effluents formulated from olive oil, soybean oil and milk. The operational stability was evaluated through the hydrolysis of the formulated milk effluent. The FTIR analysis suggested the presence of covalent bonds in O-P-D-P, this result reflected in the longer half-life at 70 °C and pH 7.0 for O-P-D-P. In addition, O-P-G-P and O-P-D-P resisted total desorption in Triton X-100 4% for 2 h. The size of the interbreeding chains interfered with the interaction of O-P-G-P and O-P-D-P with the substrates. However, the biocatalyst O-P-D-P showed activity of about 70% up to two reaction cycles. Thus, the biocatalysts proved to be thermally resistant and showed potential for the treatment of lipid-rich effluents, in addition to demonstrating the usefulness of dextran aldehyde as a non-toxic alternative to the use of glutaraldehyde for crosslinking.

**Keywords:** Hydrolytic enzymes; Lipid degradation; Reuse of enzymes; Dairy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Reações catalisadas por lipases (EC 3.1.1.3).....	17
Figura 2	– Ilustração do mecanismo de ativação interfacial exibido por lipases expostas a interface orgânica/aquosa.....	18
Figura 3	– Ilustração do mecanismo catalítico da esterificação realizada por lipase.....	19
Figura 4	– Representação da atuação de lipases não-específicas ou específicas frente aos triacilgliceróis.....	21
Figura 5	– Sequência de tratamentos físico-químicos convencionais aplicados a efluentes da indústria de laticínios, com exemplos de substâncias utilizadas na coagulação e na floculação.....	22
Figura 6	– Estrutura tridimensional da Lipase de <i>Pseudomonas</i> sp. com a tampa aberta, obtida no banco de dados Protein Data Bank: 2LIP. Os resíduos de Serina estão marcados em vermelhos e os de Histidina em azul (sítio ativo: Ser87 e His286).....	24
Figura 7	– Métodos de imobilização enzimática.....	27
Figura 8	– Estrutura química do suporte hidrofóbico Octil-agarose.....	28
Figura 9	– Superfície da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp. (Protein Data Bank: 2LIP) com a tampa aberta (A) e superfície oposta ao sítio ativo (B) com grupos amino destacados na cor vermelha.....	30
Figura 10	– Estruturas finais possíveis a partir da oxidação da molécula de dextrana.....	32
Figura 11	– Ilustração da reação para formação de ligação covalente entre aldeído e grupamentos amina, formando base de Schiff com liberação de uma molécula de água.....	32
Figura 12	– Comparativo entre as moléculas de glutaraldeído (A) e dextrana (B).....	33
Figura 13	– Ilustração da imobilização de lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> no suporte poroso de octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P).....	37

- Figura 14 – Eletroforese SDS-PAGE indicando monômero e dímero (vermelho) de lipase de *Pseudomonas fluorescens* com tamanhos de 33 kDa e 66 kDa, respectivamente, identificados na solução enzimática, sobrenadantes remanescentes e derivados da imobilização em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P). 50
- Figura 15 – Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) na faixa de 650 – 4000 cm<sup>-1</sup> com indicação (linha pontilhada) de números de onda representativos de octil-agarose (—) e de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem, O-P (—), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (—), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (—)..... 52
- Figura 16 – Estabilidade térmica de lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (AI de 2,5 U/mL, ▼) e imobilizada em octil-agarose sem (AI de 37,4 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (AI de 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (AI de 51,8 U/g, ▲) incubada nas seguintes condições: 60 °C e pH 7,0 (A), 60 °C e pH 5,0 (B) e 70 °C e pH 7,0 (C), dados em média de atividade residual com desvio-padrão..... 54
- Figura 17 – Estabilidade térmica a 70°C e pH 7,0 de lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (AI de 2,5 U/mL, ▼), ajuste ( $R^2$ ) 0,9215, e imobilizada em octil-agarose sem (AI de 37,4 U/g, ■), ajuste ( $R^2$ ) de 0,6995, e com reticulação por glutaraldeído (AI de 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (AI de 51,8 U/g, ▲)..... 56
- Figura 18 – Dessorção em Triton X-100 4%, com dados apresentados como média de atividade residual com desvio-médio lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem (atividade inicial 37,4 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (atividade inicial 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (atividade inicial 51,8 U/g, ▲)..... 58

Figura 19 – Atividade específica (A), U/mg de proteína, e atividade enzimática (B), U/mL de solução enzimática ou g de biocatalisador, para hidrólise à 37 °C por 20 minutos com lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> solúvel (amarelo) e imobilizada em octil-agarose, O-P (verde), frente a azeite, óleo de soja e leite.....	61
Figura 20 – Emulsões preparadas com leite (A), óleo de soja (B) e azeite (C) para ensaio de atividade hidrolítica.....	62
Figura 21 – Conversão de lipídios em ácidos graxos para a hidrólise realizada à 37 °C por 20 min com lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> solúvel (amarelo) e imobilizada em octil-agarose, O-P (verde), frente a azeite, óleo de soja e leite.....	63
Figura 22 – Atividade específica (A), U/mg de proteína, e atividade enzimática (B), U/g de biocatalisador, para hidrólise à 37 °C por 20 minutos com lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose sem, O-P (amarelo), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (verde), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (lilás), frente a azeite e leite.....	64
Figura 23 – Conversão de lipídios em ácidos graxos para a hidrólise realizada à 37 °C por 20 min com lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose sem, O-P (amarelo), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (verde), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (lilás) frente a azeite e leite.....	66
Figura 24 – Atividade residual com desvio-médio da hidrólise do leite à 37°C por 20 minutos em ciclos reacionais para lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose sem (atividade inicial 129,44 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (atividade inicial 97,85 U/g, ●) ou dextrana aldeído (atividade inicial 92,46 U/g, ▲).....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades específicas (AE) das lipases <i>Mucor miehei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Candida rugosa</i> frente à fosfolipídio e gordura do leite, hidrolisados a 30 °C e pH 7,0.....	25
Tabela 2 – Rendimento de imobilização de lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P) e concentração de aldeídos das soluções utilizadas na reticulação.....	46
Tabela 3 – Parâmetros de imobilização, à 25°C e pH 7,0, de PFL em octil-agarose com atividade oferecida ( $A_{to}$ ) de 30,0 U/g a cada imobilização: O-P (imobilização em octil-agarose sem reticulação), O-P-G-P (imobilização em octil-agarose com reticulação por glutaraldeído) e O-P-D-P (imobilização em octil-agarose com reticulação por dextrana aldeído).....	48
Tabela 4 – Parâmetros de inativação térmica de lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana (O-P-D-P), constante de desativação térmica ( $k_D$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), comparados aos $t_{1/2}$ encontrados na literatura para PFL imobilizada em outros suportes.....	55
Tabela 5 – Características dos efluentes formulados utilizados no ensaio de hidrólise à 37°C por 20 min com a lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> solúvel e imobilizada.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análises de Variância
At <sub>D</sub>	Atividade do derivado
At <sub>O</sub>	Atividade oferecida
At <sub>R</sub>	Atividade recuperada
At <sub>T</sub>	Atividade teórica
DNS	Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
k <sub>D</sub>	Constante de desativação térmica
O-P	Lipase amano de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose e sem reticulação
O-P-D-P	Lipase amano de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose e com reticulação por dextrana aldeído
O-P-G-P	Lipase amano de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em octil-agarose e com reticulação por glutaraldeído
PEI	Polietilenimina
PFL	Amano lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
p-NPB	p-nitrofenil butirado
R	Rendimento de imobilização
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Lipases .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.1</b>	<i>Emprego de lipases no tratamento de efluentes da indústria de laticínios .....</i>	<b>21</b>
<b>3.1.2</b>	<i>Lipase amano de Pseudomonas fluorescens .....</i>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Imobilização de enzimas .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Imobilização em Octil-agarose .....</i>	<b>28</b>
<b>3.2.1.1</b>	<i>Glutaraldeído como agente de entrecruzamento .....</i>	<b>29</b>
<b>3.2.1.2</b>	<i>Dextrana aldeído como substituinte do Glutaraldeído .....</i>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Preparo da solução enzimática de amano lipase de Pseudomonas fluorescens .....</i>	<b>35</b>
<b>4.2.2</b>	<i>Imobilização de PFL em octil-agarose .....</i>	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<i>Imobilização de segunda camada de PFL após reticulação com os agentes de entrecruzamento Glutaraldeído e Dextrana aldeído .....</i>	<b>36</b>
<b>4.2.3.1</b>	<i>Reticulação com Glutaraldeído 1% .....</i>	<b>36</b>
<b>4.2.3.2</b>	<i>Reticulação com Dextrana aldeído 33,3% .....</i>	<b>36</b>
<b>4.2.3.3</b>	<i>Imobilização de segunda camada de PFL após reticulação .....</i>	<b>36</b>
<b>4.2.3.4</b>	<i>Quantificação de aldeídos em solução de reticulação de dextrana aldeído através de análise quantitativa de açúcares redutores totais pelo método DNS. ....</i>	<b>34</b>
<b>4.2.4</b>	<i>Determinação da atividade hidrolítica frente ao substrato sintético.....</i>	<b>38</b>
<b>4.2.5</b>	<i>Determinação da concentração de proteína .....</i>	<b>39</b>
<b>4.2.6</b>	<i>Parâmetros de imobilização .....</i>	<b>39</b>
<b>4.2.7</b>	<i>Caracterização dos catalisadores heterogêneos a base de octil-agarose .....</i>	<b>40</b>

4.2.7.1	<i>Avaliação da interação enzima-suporte através da análise qualitativa de proteínas por Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrilamide Gel).....</i>	40
4.2.7.2	<i>Avaliação da estrutura química dos biocatalisadores através de Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....</i>	40
4.2.8	<b>Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores heterogêneos de octil-agarose ..</b>	<b>41</b>
4.2.9	<b>Ensaio de dessorção em Triton X-100 .....</b>	<b>41</b>
4.2.10	<b>Determinação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores frente a diferentes efluentes formulados .....</b>	<b>41</b>
4.2.10.1	<i>Determinação da atividade específica .....</i>	43
4.2.10.2	<i>Estimativa da conversão de lipídios em ácidos graxos .....</i>	43
4.2.11	<b>Estabilidade operacional frente à hidrólise de efluente formulado de leite ....</b>	<b>44</b>
4.2.12	<b>Análise de dados e tratamento estatístico .....</b>	<b>45</b>
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1	<b>Imobilização de lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....</b>	<b>46</b>
5.2	<b>Caracterização dos biocatalisadores .....</b>	<b>49</b>
5.2.1	<i>Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE .....</i>	49
5.2.2	<i>Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
5.3	<b>Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores .....</b>	<b>53</b>
5.4	<b>Ensaio de dessorção em Triton X-100 .....</b>	<b>58</b>
5.5	<b>Atividade hidrolítica frente a diferentes efluentes formulados .....</b>	<b>60</b>
5.6	<b>Ciclos de hidrólise do efluente formulado de leite .....</b>	<b>67</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O despejo inadequado de poluentes de estações de tratamento de efluentes industriais tem gerado poluição dos corpos hídricos, prejudicando a disponibilidade de água (AL-MAQDI *et al.*, 2021). Nesse sentido, os efluentes da indústria de laticínios contêm alta concentração de materiais orgânicos, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas, que contribuem para altas demandas biológicas (DBO) e químicas de oxigênio (DQO), responsáveis pela eutrofização das águas, favorecendo o rápido crescimento de algas e bactérias, que consomem o oxigênio, matando plantas e animais aquáticos (WANG; SERVENTI, 2019).

As propriedades dos efluentes da indústria de laticínios dependem do alimento produzido e das tecnologias de produção, sendo, geralmente, tratados com coagulação e flotação convencionais, gerando poluição secundária devido ao uso de reagentes químicos, como sulfato de alumínio (MELCHORS *et al.*, 2016), além de tanque de desnatação e caixa de gordura, que podem apresentar baixa eficiência (NIMKANDE; BAFANA, 2022). Esses métodos convencionais de tratamento falham quando altas quantidades de proteínas e lipídios estão presentes, resultando em uma série de problemas, como pH alcalino, coloração escurecida e altos níveis de DBO e DQO (MELCHORS *et al.*, 2016).

Nesse contexto, lipases têm sido buscadas para biorremediação, visto que consomem pouca energia, não requerem condições excessivas e químicos, apresentando tolerância à temperaturas variadas (NIMKANDE; BAFANA, 2022). As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolases, capazes de hidrolisar a ligação éster de triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (REMONATTO *et al.*, 2022). Devido especialmente à sua estabilidade e disponibilidade, as lipases microbianas têm sido muito utilizadas (ONYINYECHUKWU *et al.*, 2018), apresentando aplicações diversificadas, como processamento de óleos e gorduras, cosméticos, aromatizantes e tratamento de efluentes (CHANDRA *et al.*, 2020). Em geral, lipases apresentam alta especificidade ao hidrolisar óleo de peixe e gordura do leite (ARAVINDAN *et al.*, 2007). A lipase amano de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) apresenta atividade hidrolítica frente à gordura do leite comparável à enzimas de alta performance, como a lipase de *Mucor miehei* (BOURLIEU *et al.*, 2012).

Contudo, um dos principais desafios para o uso de enzimas no tratamento de efluentes é referente à sua estabilidade diante das condições de processo, o que tem sido contornado através da imobilização (AL-MAQDI *et al.*, 2021). Existem diversos métodos para a imobilização enzimática, podendo ser divididos em: métodos físicos e métodos químicos, nos primeiros estão incluídos: adsorção, aprisionamento e encapsulação, enquanto os últimos

abrangem o entrecruzamento e a ligação covalente (RAFIEE; REZAE, 2021). No método de adsorção, as enzimas são imobilizadas no suporte através de interações fracas, como a adsorção hidrofóbica, em que as enzimas são imobilizadas pela ativação interfacial, entretanto, esse método apresenta como desvantagem a dessorção de enzimas do suporte, o que pode ser reduzido com o incremento da hidrofobicidade das interações, a partir do suporte ou da enzima (RAFIEE; REZAE, 2021; ZHONG *et al.*, 2020).

A resina octil-agarose é um suporte hidrofóbico, que imobiliza lipases com versatilidade de modificações e hiperativação, permitindo altas atividades (WAHAB *et al.*, 2020). A redução da dessorção de enzimas do suporte de octil-agarose tem sido realizada com a modificação por reticulação com o aldeído bifuncional, glutaraldeído, que também tem sido útil ao aumento da estabilidade dos biocatalisadores (ABELLANAS-PEREZ *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2022a). Contudo, o uso do glutaraldeído apresenta algumas desvantagens, tais como a redução da atividade enzimática e entrecruzamento excessivo entre as enzimas, prejudicando sua interação com seus substratos (ZHOU *et al.*, 2023), sendo a principal delas a sua toxicidade, que tem motivado a busca por substâncias alternativas ao seu uso (SANTOS *et al.*, 2022b). A dextrana aldeído, resultado da oxidação da dextrana por periodato, se apresenta como uma alternativa não-tóxica ao glutaraldeído com importantes modificações estruturais em relação a ele, sendo uma molécula maior e capaz de influenciar a hidrofobicidade do biocatalisador (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2019), mantendo a capacidade de realizar entrecruzamento de enzimas (MARTINS *et al.*, 2022; CEJUDO-SANCHES *et al.*, 2020).

Apesar de aumentar a resistência à dessorção, a camada de reticulação pode dificultar o acesso dos substratos às lipases devido às limitações difusionais. Uma solução que tem sido estudada para esse problema é a imobilização de camadas de lipase externas à camada de reticulação (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020c). Esse processo pode ser realizado de forma simplificada através de interações lipase-lipase, entre a camada de lipase sob e sobre a reticulação (PALOMO *et al.*, 2004).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo o estudo de biocatalisadores baseados na adsorção de lipase de *Pseudomonas fluorescens* em octil-agarose, reticulados ou não com glutaraldeído ou dextrana aldeído, avaliando-se estabilidade térmica, estabilidade de pH, dessorção em detergente e eficiência hidrolítica frente a diferentes efluentes formulados, características consideradas importantes para seu emprego na hidrólise de efluentes industriais ricos em lipídios, com ênfase na indústria de laticínios.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo imobilizar a lipase amano de *Pseudomonas fluorescens* em suporte de octil-agarose, com e sem reticulação para adsorção de nova camada de lipase, visando a obtenção de biocatalisadores estáveis e resistentes à dessorção enzimática para aplicação na hidrólise de efluentes industriais ricos em lipídios.

### 2.2 Objetivos específicos

- Imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em octil-agarose por adsorção;
- Avaliar a influência da reticulação pelos agentes de entrecruzamento glutaraldeído ou dextrana aldeído;
- Caracterizar os biocatalisadores obtidos por meio de:
  - Análise qualitativa por Eletroforese SDS-PAGE;
  - Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
  - Ensaio de estabilidade térmica, frente à diferentes temperaturas e pH's;
  - Ensaio de resistência à dessorção em Triton X-100;
- Verificar a eficiência hidrolítica dos biocatalisadores e da enzima livre com relação a diferentes efluentes formulados a base de: azeite, óleo de soja e leite;
- Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores através da sua aplicação em ciclos de hidrólise do efluente formulado de leite.

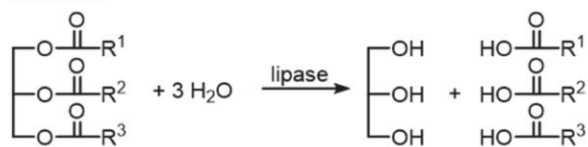
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3), conhecidas como triacilglicerol acil-hidrolases, são enzimas capazes de hidrolisar em meio aquoso e sintetizar em condições de restrição de teor de água as ligações do tipo éster carboxílico (CHANDRA *et al.*, 2020), além de catalisar outras biotransformações como acidólise, alcoólise e aminólise (Figura 1), podendo ser de origem animal, vegetal e microbiana (REMONATTO *et al.*, 2022; RABBANI *et al.*, 2023).

Figura 1 - Reações catalisadas por lipases (EC 3.1.1.3).

##### Hidrólise



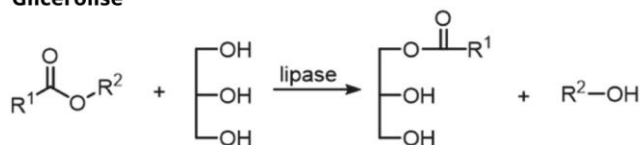
##### Esterificação



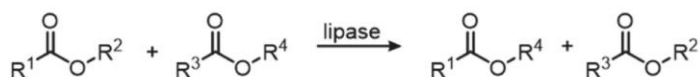
##### Transesterificação



##### Glicerólise



##### Interesterificação



##### Acidólise



##### Aminólise

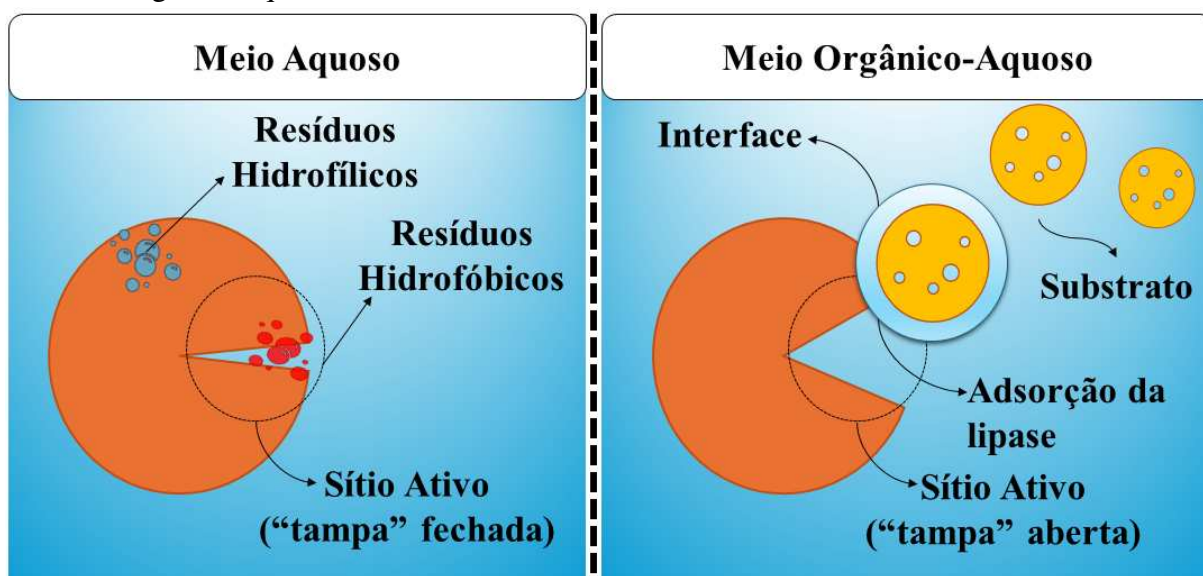


FONTE: adaptado de Salgado, Santos e Vanetti (2022).

As lipases microbianas são reconhecidas por seu crescente potencial de aplicação devido à sua disponibilidade, versatilidade, altas conversões de substratos em produtos e estabilidade em meios orgânicos, além de propiciar reações mais próximas de rotas metabólicas naturais e, por consequência, processos *eco-friendly* (ONYINYECHUKWU *et al.*, 2018; RABBANI *et al.*, 2023; REMONATTO *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Quando comparadas as demais enzimas, as lipases possuem um mecanismo conformacional peculiar chamado de ativação interfacial (Figura 2), em que seu sítio ativo é coberto por uma cadeia de polipeptídio, usualmente chamada de “tampa”, que é capaz de isolá-lo do meio reacional em sua forma fechada, abrindo-se na presença de uma superfície hidrofóbica e expondo o sítio ativo para interação com os substratos (RABBANI *et al.*, 2023, DONG *et al.*, 2024).

Figura 2 – Ilustração do mecanismo de ativação interfacial exibido por lipases expostas a interface orgânica/aquosa.



FONTE: Elaborada pela autora.

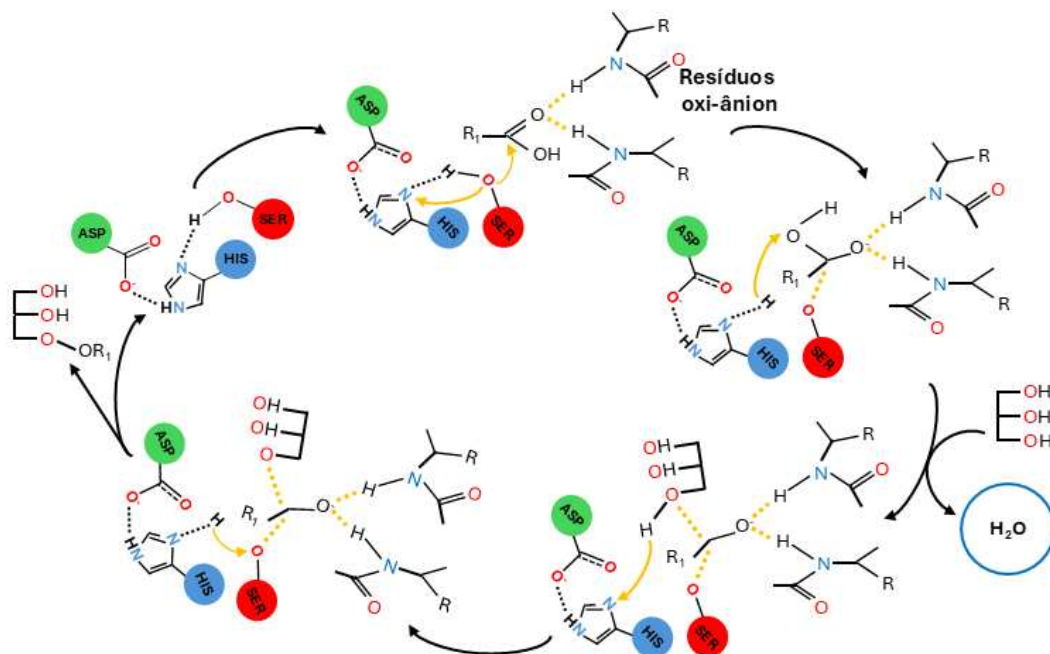
O sítio ativo das hidrolases  $\alpha/\beta$  possuem três resíduos catalíticos: um resíduo nucleofílico, composto por serina, cisteína ou aspartato, um resíduo ácido catalítico, de aspartato ou glutamato, e um resíduo de histidina. Em lipases o aminoácido nucleofílico é sempre serina, enquanto os resíduos catalíticos podem ser tanto aspartato quanto glutamato, contanto com raras exceções (RABBANI *et al.*, 2023).

A cinética da lipólise pode ser descrita por um modelo simplificado composto por dois equilíbrios sucessivos, no primeiro ocorre a adsorção reversível da enzima à interface aquosa/orgânica, enquanto no segundo, a enzima adsorvida se liga a uma única molécula de

substrato, resultando na formação do complexo enzima-substrato e subseqüentes etapas catalíticas que culminam na liberação de produtos e regeneração da enzima (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). De acordo com este modelo, a enzima regenerada permanece adsorvida à interface e é liberada somente após vários ciclos catalíticos (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

De acordo com o detalhamento oferecido por Zou *et al.* (2024), a obtenção do triacilglicerol (Figura 3) inicia com a ação catalítica da hidroxila da serina da tríade catalítica, causando um ataque nucleofílico no carbonil de um ácido graxo livre, junto a resíduos de poro oxi-aniônicos (formados por glutamina e treonina). Essa interação resulta em um intermediário de enzima acilada. Então, uma molécula de glicerol entra no sítio ativo, sendo desprotonada pela histidina e agindo como um agente nucleofílico sobre o grupo acila. Isso forma um segundo intermediário da enzima, que colapsa, produzindo monoacilglicerol e regenerando os resíduos catalíticos. O monoacilglicerol gerado apresenta propriedades nucleofílicas, permitindo seu envolvimento com as reações subseqüentes, culminando na produção de diacilgliceróis, que possui atributos nucleofílicos similares e participa das reações que levam ao triacilglicerol.

Figura 3 - Ilustração do mecanismo catalítico da esterificação realizada por lipase.



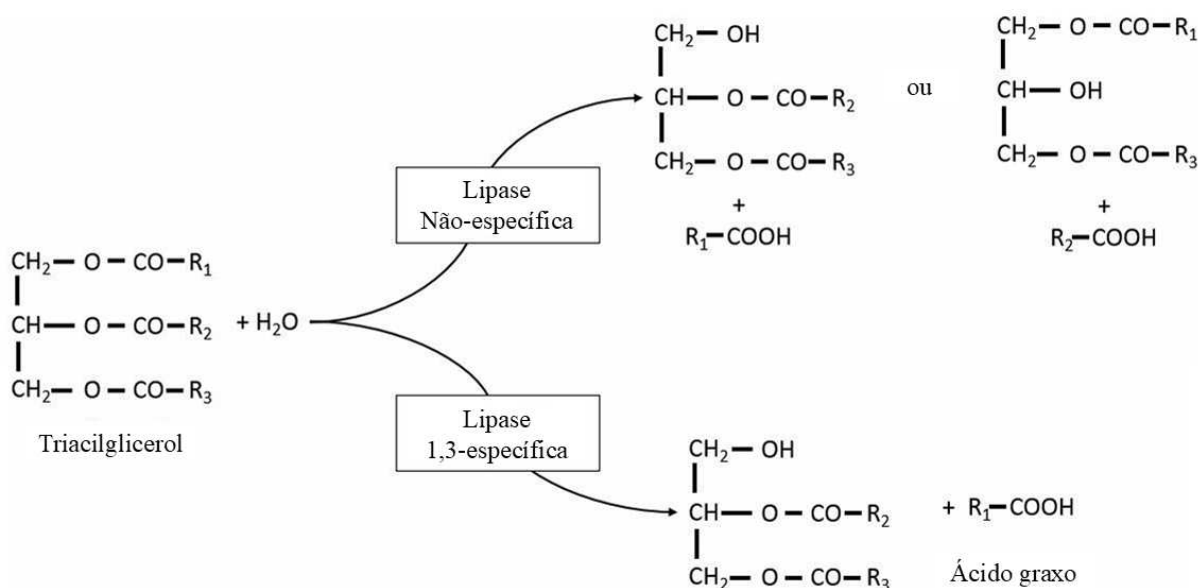
FONTE: adaptado de Zou *et al.* (2024).

A atividade das lipases é muito influenciada pelo pH e temperatura, algumas delas são estáveis em uma ampla faixa de pH, mas mantêm atividade entre os valores de 4 e 9, geralmente tendo atividade ótima próximo à neutralidade (RIBEIRO *et al.*, 2011). Além disso,

apresentam temperaturas ótimas próximas à temperatura ambiente, entre 30°C e 40°C (ARAVINDAN *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Essas enzimas podem ser classificadas quanto à sua regioespecificidade em dois grupos (Figura 4): não específicas e específicas, as que compõem o primeiro grupo são capazes de catalisar a hidrólise completa dos triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres, tendo como intermediários da reação os diacilgliceróis e monoacilgliceróis, enquanto as segundas liberam especificamente os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos acilgliceróis (RABBANI *et al.*, 2023; JAVED *et al.*, 2018).

Figura 4 – Representação da atuação de lipases não-específicas ou específicas frente aos triacilgliceróis.



FONTE: adaptado de Ali e Elozeiri (2017).

Apresentando múltiplas possibilidades de aplicação, as lipases microbianas têm sido amplamente empregadas na indústria de laticínios e processamento de alimentos ricos em lipídios, produção de biodiesel, cosméticos, biossensores, aromatizantes, biorremediação, biodegradação e tratamento de efluentes (CHANDRA *et al.*, 2020). Dentre essas aplicações, o tratamento de efluentes apresenta alta importância ambiental, especialmente para a disponibilidade de água, sendo cada vez mais discutido e empregado em diversos setores da sociedade, desde o doméstico ao industrial (ZHANG *et al.*, 2024; SINGH; CHAKRABORTY; SEHGAL, 2023).

### 3.1.1 Emprego de lipases no tratamento de efluentes da indústria de laticínios

A poluição de corpos hídricos tem atraído a atenção da comunidade científica, visto que seu acúmulo pode sobrepor suas taxas de remoção e transformação, sendo uma das principais fontes desse problema a eliminação inadequada de poluentes decorrentes de plantas de tratamento de efluentes (AL-MAQDI *et al.*, 2021). Isso reduz a disponibilidade e possibilidades de uso da água (SINGH; CHAKRABORTY; SEHGAL, 2023).

Geralmente, os efluentes da indústria de laticínios contêm alta concentração de materiais orgânicos, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas, os quais contribuem para altas demandas biológicas (DBO) e químicas de oxigênio (DQO), responsáveis pela eutrofização das águas, favorecendo o rápido crescimento de algas e bactérias, que consomem o oxigênio, matando plantas e animais aquáticos devido às condições anaeróbicas (WANG; SERVENTI, 2019). As propriedades dos efluentes da indústria de laticínios dependem do alimento produzido e das tecnologias de produção, apresentando uma DQO em torno de 3000 mg/L (MELCHORS *et al.*, 2016) e DBO entre 500 e 2000 mg de O<sub>2</sub>/L (PESTA; MEYER-PITTROFF; RUSS, 2007), mas já reportada em cerca de 3280 mg de O<sub>2</sub>/L (NEVES *et al.*, 2024).

Esses efluentes são, normalmente, tratados com coagulação e flotação convencionais, gerando poluição secundária devido ao uso de reagentes químicos (Figura 5), como sulfato de alumínio (MELCHORS *et al.*, 2016), além de tanque de desnatação e caixa de gordura, que podem apresentar baixa eficiência (NIMKANDE; BAFANA, 2022). Diversos pré-tratamentos como esses, além de separadores e sistemas de flotação com ar dissolvido, são empregados para remover lipídios dos efluentes antes do tratamento principal, o qual comumente é o biológico, contudo, esses tratamentos são de alto custo e produzem lodo extremamente problemático (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

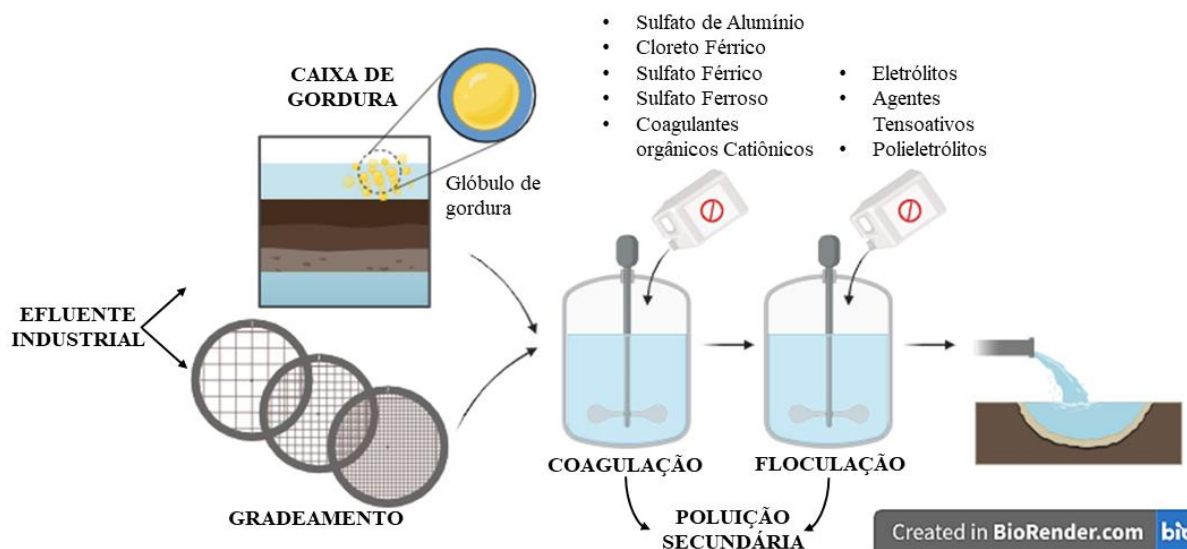
Ademais, esses métodos convencionais de tratamento falham quando altas quantidades de proteínas e lipídios estão presentes, principalmente com lipídios dissolvidos ou emulsificados (CAMMAROTA; FREIRE, 2006), o que pode ser observado na fabricação de produtos lácteos, em que os emulsificantes são utilizados para estabilizar a mistura coloidal e reduzir a tensão superficial, especialmente em bebidas e iogurtes (LAL; OCONNOR; EYRES, 2006). Isso resulta em uma série de problemas, como pH alcalino, coloração escurecida e altos níveis de DBO e DQO (DROGUI *et al.*, 2008, MELCHORS *et al.*, 2016).

Uma vez que os processos convencionais de tratamento de efluentes de laticínios podem ser ineficazes no atendimento aos padrões de lançamento nos corpos receptores de água,



tecnologias alternativas são uma opção para a obtenção de efluentes tratados com qualidade superior (TABELINI *et al.*, 2023).

Figura 5 – Sequência de tratamentos físico-químicos convencionais aplicados a efluentes da indústria de laticínios, com exemplos de substâncias utilizadas na coagulação e na floculação.



FONTE: Elaborada pela autora.

Nesse sentido, lipases têm sido buscadas para biorremediação, visto que o seu uso consome pouca energia e não requer condições excessivas e químicos, além de possuírem especificidade de substrato variada, tolerância à solventes e temperaturas variadas (NIMKANDE; BAFANA, 2022), sendo importante a caracterização dessas enzimas quanto à sua estabilidade frente à diversas condições e substâncias, como solventes, detergentes, íons metálicos, pH e temperatura para seleção do catalisador adequado (NIMKANDE; BAFANA, 2022).

As lipases convertem triglicerídeos em ácidos graxos, dentro das células microbianas, os ácidos graxos são incorporados a complexos lipídicos, como a membrana plasmática ou metabolizados para a formação de compostos de baixa massa molar, quando degradados através do mecanismo de  $\beta$ -oxidação, resultam na liberação de hidrogênio, que pode ser utilizado por microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos para a formação de metano (MENDES *et al.*, 2005). Esse processo tem sido associado inclusive à obtenção de biogás (SILVA *et al.*, 2024; CHANDRA *et al.*, 2018), demonstrando o potencial sustentável desse tipo de tratamento de águas residuárias.

Além disso, apesar de não requererem cofatores para se manterem ativas, as lipases podem apresentar atividade aumentada na presença de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e outros cátions divalentes

(ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021), tornando o leite, rico em cálcio (WOŰNIAK *et al.*, 2022), um substrato em potencial para atuação dessas enzimas.

No Brasil, diversos estudos têm explorado o tratamento de efluentes com o uso de lipases em escala de bancada (TABELINI *et al.*, 2023; MATIAS *et al.*, 2023). Em um dos primeiros estudos, Mendes *et al.* (2010) realizaram a hidrólise de efluentes da indústria de laticínios com lipase, aumentando a biodegradabilidade para tratamento biológico anaeróbico e alcançando até 76,4% de remoção de DQO. De acordo com Ferreira *et al.* (2021) hidrólise de efluentes da indústria de laticínios com pH 7,0 e DQO entre 11910 – 16060 mg de O<sub>2</sub>/L realizada com lipase de *Pseudomonas citrinum* junto à biodigestão anaeróbica, promoveu a remoção de DQO entre 42-57%. Esses dados sugerem que o desenvolvimento desse tratamento de efluente alternativo tem avançado no país, o que instiga cada vez mais investigação.

### 3.1.2 Lipase amano de *Pseudomonas fluorescens*

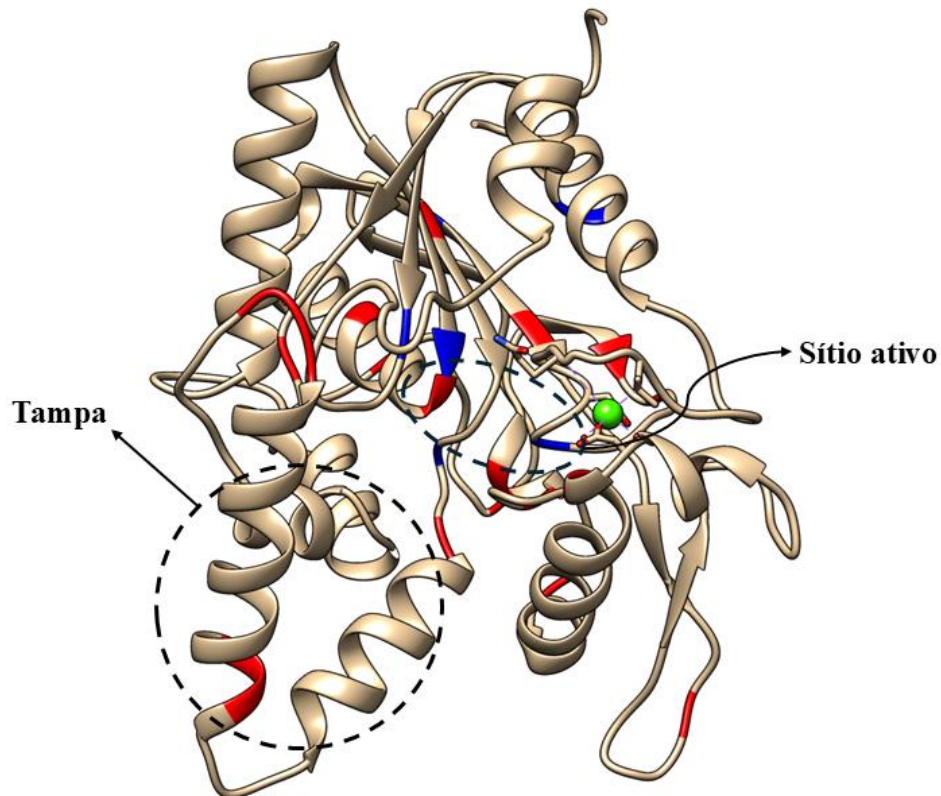
A lipase utilizada nesse trabalho (Figura 6) é originária da *Pseudomonas fluorescens*, um tipo comum de bactéria gram-negativa psicrófila, que habita o solo e ambientes aquáticos, prosperando em condições aeróbicas e de baixas temperaturas, produzindo proteases, lipases e outras enzimas capazes de metabolizar nutrientes em alimentos e levar à degradação desses, caracterizando-a como a espécie degradante dominante em alimentos de origem aquática, vegetais, carnes e lácteos (LIU *et al.*, 2022). Esse fato contribui para a utilização de resíduos agroindustriais para o cultivo dessa espécie e subsequentes extração e purificação de suas enzimas.

A lipase de *P. fluorescens* apresenta atividade em temperaturas entre 35 °C e 50°C e faixa de pH de 6,17 a 9,0. Avaliando sua atividade, Christen e Marshall (1985) verificaram maior termoestabilidade entre 35 °C e 50 °C com pH entre 6,17 e 7,45 e menor estabilidade entre as temperaturas de 55 °C e 85 °C com pH de 6,17. Em outro estudo observou-se atividade hidrolítica em Tributirina com temperatura ótima a 40 °C, próxima da faixa de 35 – 45 °C estimada para lipases de *Pseudomonas* sp., e pH ótimo de 8,5, dentro de uma faixa de 7,0 a 9,0 (MAKHZOOM; OWUSU-APENTEN; KNAPP, 1996).

A lipase de *P. fluorescens* apresenta atividade em temperaturas entre 35 °C e 50°C e faixa de pH de 6,17 a 9,0. Avaliando sua atividade, Christen e Marshall (1985) verificaram maior termoestabilidade entre 35 °C e 50 °C com pH entre 6,17 e 7,45 e menor estabilidade entre as temperaturas de 55 °C e 85 °C com pH de 6,17. Em outro estudo observou-se atividade hidrolítica em Tributirina com temperatura ótima a 40 °C, próxima da faixa de 35 – 45 °C

estimada para lipases de *Pseudomonas* sp., e pH ótimo de 8,5, dentro de uma faixa de 7,0 a 9,0 (MAKHZOUM; OWUSU-APENTEN; KNAPP, 1996).

Figura 6 – Estrutura tridimensional da Lipase de *Pseudomonas* sp. com a tampa aberta, obtida no banco de dados Protein Data Bank: 2LIP. Os resíduos de Serina estão marcados em vermelhos e os de Histidina em azul (sítio ativo: Ser87 e His286).



FONTE: adaptado de Schrag *et al.* (1997).

Ao estudar a hidrólise de azeite em concentrações entre 0,5% e 2,5% em temperatura ambiente por lipase de *P. fluorescens* purificada, Popoola e Olateru (2020) obtiveram valores de 0,702  $\mu\text{g/s}$  e 1,25 mg/mL para a velocidade máxima da reação e constante de Michaelis, respectivamente, sendo esse último considerado um valor baixo, indicando que a enzima possui afinidade por seu substrato. Além disso, a taxa de reação foi diretamente proporcional a concentração de substrato e a linearidade dessa correlação sugeriu que a reação seguiu a cinética de Michaelis-Menten.

Em geral, lipases apresentam baixa especificidade quando em contato com óleos e gorduras naturais, e alta especificidade ao hidrolisar óleo de peixe e gordura do leite (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007), então, no caso dessas fontes de lipídios, é importante fazer a escolha certa de lipase. A lipase amano de *Pseudomonas*

*fluorescens* (PFL) apresentou atividade hidrolítica frente à gordura do leite comparável a enzimas de alta performance (Tabela 1), como a *Mucor miehei*, que é muito utilizada na produção de derivados de leite, tendo como diferencial a atividade fosfolipase, que mesmo baixa (0,8 U/mg) representa uma redução da taxa inicial da hidrólise de gordura do leite, ou seja, uma fase que atrasa o início da hidrólise (BOURLIEU *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Atividades específicas (AE) das lipases *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida rugosa* frente à fosfolipídio e gordura do leite, hidrolisados a 30 °C e pH 7,0.

Substrato	AE <i>M. miehei</i> (U/mg)**	AE <i>P. fluorescens</i> (U/mg)**	AE <i>C. rugosa</i> (U/mg)**
Dispersão de lipídios polares*	1,6	0,8	0,0
Emulsão modelo de gordura do leite anidra (lipídios apolares)	16,8	165,1	0,5
Fase lag (min)	0	4	13

FONTE: adaptado de Bourlieu *et al.* (2012).

\*1- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (fosfolipídio).

\*\*1U = 1  $\mu$ mol de ácidos graxos livres/min.

A lipase de *P. fluorescens* também já apresentou estabilidade relevante frente a íons metálicos e surfactantes, com sua atividade sendo beneficiada quando incubada na presença dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Ba<sup>2+</sup> e dos surfactantes NP-40, Triton X-100 e os Tweens 20, 40 e 80 (LIU; LI; YAN, 2017). Esse dado torna-se importante ao levar em conta que as principais impurezas inorgânicas encontradas nas águas residuais de indústrias de laticínios são compostas por íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Cl<sup>-</sup>, além de surfactantes provenientes do processamento e produtos de limpeza (SLAVOV *et al.*, 2017).

Contudo, poucos estudos utilizam a lipase de *P. fluorescens* para a hidrólise da gordura do leite, sendo mais voltados à deterioração do leite (ZHANG *et al.*, 2021) ou purificação de enzimas de *P. fluorescens* a partir do leite (MARTINS *et al.*, 2015), com nenhum deles, até o momento, voltado ao tratamento de efluentes da indústria de laticínios o que representa um potencial inexplorado para essa lipase.

No histórico de uso do microorganismo *P. fluorescens* no tratamento de efluentes está a indústria de celulose e papel (CHAUHAN; THAKUR, 2002), gerando 75% da redução da cor e 79% de redução da DQO, e é componente de um biossistema empregado na degradação de efluentes ricos em gorduras, óleos e graxas (TANG; XIE; CHEN, 2012), reduzindo de 40% da DQO. Enquanto a lipase comercial de *P. fluorescens* foi utilizada na composição de lodo

ativado para degradação de efluentes ricos parabenos (WANG *et al.*, 2018), sendo capaz de realizar hidrólise e transesterificação de parabenos.

Apesar do interesse em aprofundar-se no potencial pouco explorado frente a hidrólise dos lipídios do leite, a lipase de *P. fluorescens*, assim como a maioria das lipases, está suscetível às mudanças conformacionais causadas pelas condições do meio reacional, resultando na perda de estabilidade e atividade (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021). Ademais, o emprego de enzimas livres no tratamento de efluentes torna o processo oneroso e está limitado pela necessidade da recuperação dos biocatalisadores após a reação para torná-lo viável (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). Portanto, é imprescindível empregar a técnica de imobilização para viabilizar o aprisionamento das lipases em uma matriz sólida e sua recuperação para reuso no tratamento de águas residuárias.

### 3.2 Imobilização de enzimas

Enzimas solúveis (livres) são sensíveis às mudanças de temperatura e pH e sua separação do meio reacional pode ser complexa, causando contaminação de produto e aumento dos custos de processo, tornando sua reutilização dificultada, por essa razão, a imobilização de enzimas surge como alternativa viável para utilização de enzimas em escala industrial (REMONATTO *et al.*, 2022).

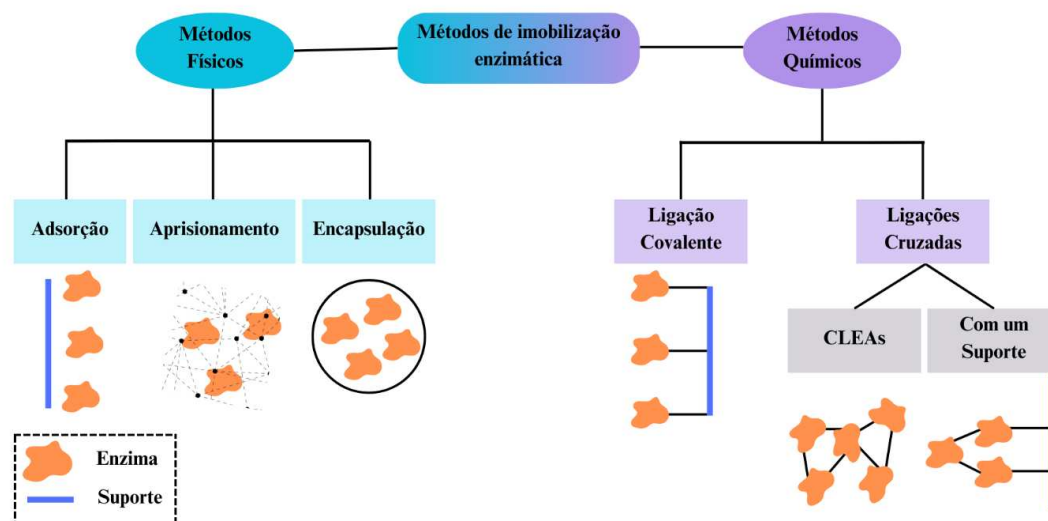
Devido ao seu alto custo, sua reutilização se faz necessária para tornar o processo viável economicamente. A recuperação é uma vantagem que a imobilização torna possível ao facilitar o processo de separação entre o catalisador e o meio reacional, além de apresentar como benefícios adicionais a possibilidade de melhoramento de características das enzimas como estabilidade, especificidade, atividade e parâmetros cinéticos (REMONATTO *et al.*, 2022).

Existem diversos métodos para a imobilização enzimática (Figura 7), podendo ser divididos em duas categorias: métodos físicos e métodos químicos, nos primeiros estão incluídos: adsorção, aprisionamento e encapsulação, enquanto os últimos abrangem os processos de entrecruzamento e ligação covalente (RAFIEE; REZAEE, 2021).

No método de adsorção as enzimas são imobilizadas no suporte através de interações fracas como forças de “van der Waals”, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (RAFIEE; REZAEE, 2021; ZHONG *et al.*, 2020). A imobilização por adsorção hidrofóbica é rápida e forte no caso das lipases, que são efetivamente imobilizadas em uma forma monomérica aberta na superfície hidrofóbica pela ativação interfacial (ZHONG *et al.*, 2020).

O uso de suportes de caráter hidrofóbico para adsorção, além de promover seletividade de lipases durante a imobilização e permitir a imobilização em uma única etapa, facilita a interação do catalisador com seus substratos (REMONATTO *et al.*, 2022; RABBANI *et al.*, 2023).

Figura 7 – Principais métodos de imobilização enzimática reportados na literatura.



FONTE: adaptado de Rafiee e Rezaee (2021).

Os CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*) são produzidos através do entrecruzamento de agregados enzimáticos a partir da mistura de proteínas com solventes orgânicos, polímeros ou sais aniônicos, seguida pelo entrecruzamento com um reagente bifuncional (REIS *et al.*, 2019). Em relação ao aprisionamento ou encapsulação de enzimas é baseado no aprisionamento da enzima em uma rede polimérica, que pode ser composta de polímeros orgânicos ou uma membrana (REIS *et al.*, 2019).

A ligação covalente promove uma interação química forte entre a enzima e o suporte, sendo um método geralmente utilizado em suportes ativados com aldeídos para promoção de ligações cruzadas (REIS *et al.*, 2019). A formação de ligações covalentes múltiplas mantém as posições relativas dos grupos químicos envolvidos na imobilização inalteradas durante as mudanças conformacionais causadas por agentes de distorção, como solventes orgânicos, calor e pH extremos (REIS *et al.*, 2019).

O método de imobilização selecionado se baseia nas propriedades de grupos funcionais dos aminoácidos presentes nas enzimas, que interagem com o suporte de diversas maneiras, sendo as características dos suportes importantes para o desenvolvimento de

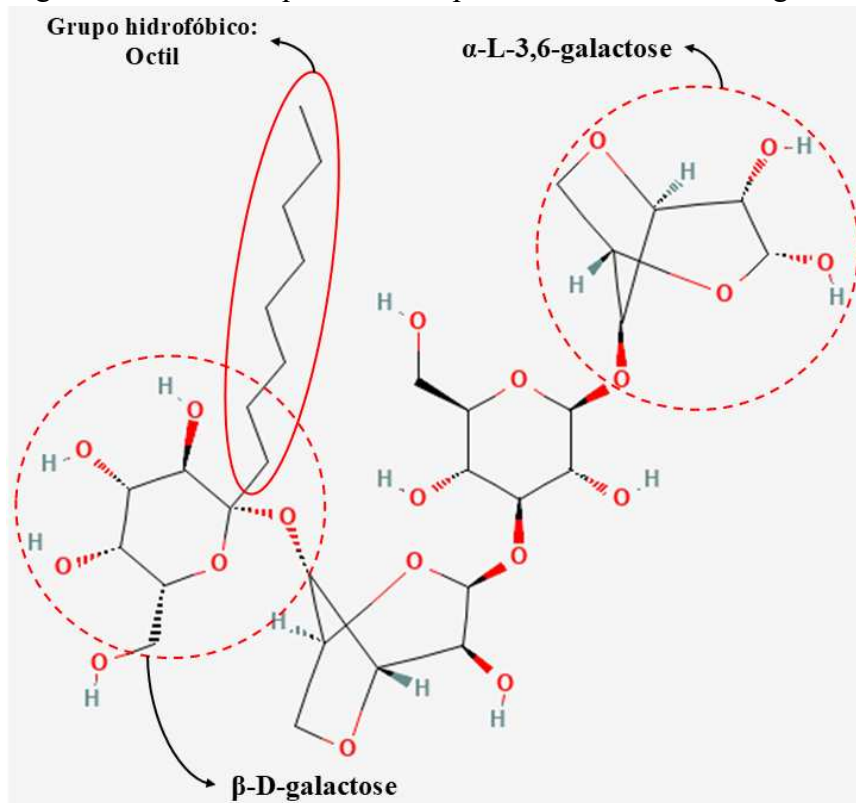
protocolos de imobilização para obtenção de biocatalisadores com atributos desejáveis (ANDRADES *et al.*, 2019).

### 3.2.1 Imobilização em Octil-agarose

A agarose é um polissacarídeo natural, formado de dissacarídeos que incluem  $\beta$ -D-galactoses conectadas por ligações  $1 \rightarrow 3$  e  $\alpha$ -L-3,6-galactoses desidratadas com ligações  $1 \rightarrow 4$ , sendo amplamente utilizada em biomedicina e bioengenharia por possuir propriedades singulares, como hidrofilicidade, estabilidade a longo prazo, não toxicidade e porosidade (RUAN *et al.*, 2022).

A partir da funcionalização química desse polímero com o grupamento octil, obtém-se a octil-agarose (Figura 8), que é uma resina hidrofóbica comercial (LOKHA *et al.*, 2020). A octil-agarose é um dos suportes mais utilizados na imobilização de proteínas, especialmente lipases, visto que o grupo octil permite a ativação interfacial dessa enzima, possibilitando a imobilização, a purificação e a estabilização das lipases em uma única etapa (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Figura 8 – Estrutura química do suporte hidrofóbico Octil-agarose.



FONTE: adaptado de National Library of Medicine (2024a).

A imobilização de lipases em octil-agarose tem apresentado uma série de benefícios, desde a simplicidade com relação aos protocolos de imobilização, que contemplam condições brandas e processos rápidos (RIOS *et al.*, 2019c; ARANA-PEÑA *et al.*, 2020b), até aumento de atividade por hiperativação e estabilização superior ao método de imobilização por ligações covalentes multipontuais (RODRIGUES *et al.*, 2019). Além disso, pode-se ressaltar a sua versatilidade frente as possibilidades de combinação com agentes químicos (WAHAB *et al.*, 2020; ABELLANAS-PEREZ *et al.*, 2023; ARANA-PEÑA *et al.*, 2019).

Um outro aspecto importante do uso de octil-agarose é a baixa limitação difusional desse material poroso, mesmo com a alta carga de enzimas imobilizadas de 20 mg de proteína por g de suporte (SANTOS *et al.*, 2022a), característica que se torna ainda mais significativa quando a reação de hidrólise envolve macromoléculas como a gordura do leite. Ademais o uso de um suporte comercial apresenta as vantagens de praticidade e características padronizadas desejáveis para a uniformização da imobilização, como porosidade, tamanho de partícula e composição (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012).

Contudo, apesar do incremento de hidrofobicidade reduzir a dessorção da enzima do carreador (ZHONG *et al.*, 2020), a imobilização por adsorção em suportes hidrofóbicos ainda está sujeita ao processo de dessorção quando o biocatalisador entra em contato com substâncias hidrofóbicas que enfraquecem as interações entre a lipase e seu suporte (RODRIGUES *et al.*, 2019). Esse problema pode ser contornado através do processo de reticulação ou entrecruzamento, o qual adiciona ligações covalentes às interações suporte-enzima e/ou enzima-enzima (RODRIGUES *et al.*, 2019). Nesse caso, é possível associar os benefícios da adsorção às vantagens do entrecruzamento covalente, ao imobilizar a lipase em suporte hidrofóbico e recobri-la com o agente de entrecruzamento.

#### 3.2.1.1 Glutaraldeído como agente de entrecruzamento

O glutaraldeído é um dialdeído, que proporciona aldeídos para interação com grupos amino e formação de bases de Schiff, conferindo hidrofobicidade aos suportes que apresentam os grupos amino (RAFIEE; REZAEI, 2021; COSTA-SILVA *et al.*, 2021). As ligações entrecruzadas que esse agente estabelece entre o suporte e as lipases, também detentoras de grupos amino, possuem caráter covalente, protegendo o sítio ativo da enzima e aumentando sua afinidade pelo substrato através de interações hidrofóbicas (ZHOU *et al.*, 2023; COSTA-SILVA *et al.*, 2021). Essa imobilização é irreversível e resiste a altas temperaturas (MOREIRA *et al.*, 2022).

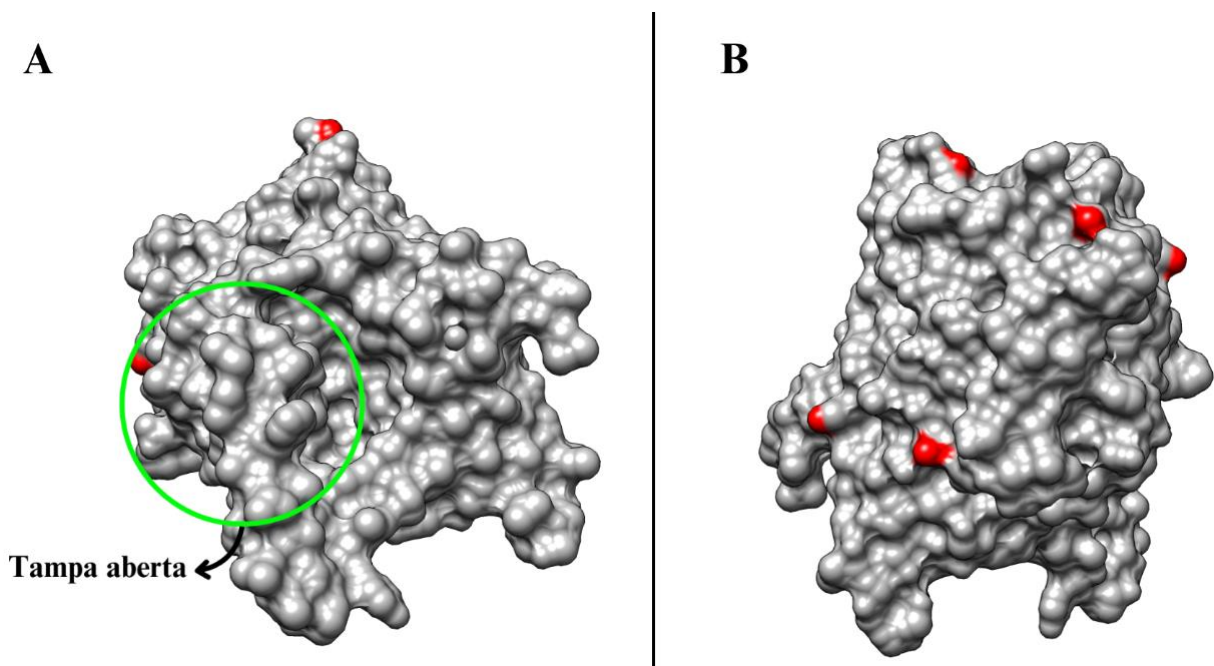


A aplicação de glutaraldeído em suportes aminados oferece caráter heterofuncional ao suporte, adicionando grupos funcionais que interagem com a lipase através de diferentes mecanismos, como: ligação covalente, interações iônicas, ligação de hidrogênio e ativação interfacial, beneficiando a enzima quanto à sua estabilidade, especificidade e atividade quando imobilizada com sua tampa aberta (COSTA-SILVA *et al.*, 2021).

O número de ligações químicas entre o suporte e a enzima é o que define o fator de estabilização da enzima imobilizada. A formação de ligações covalentes múltiplas mantém as posições relativas dos grupos químicos envolvidos na imobilização inalteradas durante as mudanças conformacionais causadas por agentes de distorção, como solventes orgânicos, calor e pH extremos (REIS *et al.*, 2019).

Entretanto, o uso do glutaraldeído não se limita a modificação do suporte de imobilização, ele se estende ao recobrimento de enzimas já imobilizadas, inclusive no caso da adsorção em octil-agarose, agindo na ligação enzima-enzima com o mesmo mecanismo da ligação suporte-enzima descrito (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020a; SANTOS *et al.*, 2022a). Esse método pode ser empregado na adsorção da PFL à octil-agarose, visto que a adsorção ocorre com a tampa aberta em contato com o suporte (Figura 9A), enquanto o agente de entrecruzamento age na superfície oposta ao sítio ativo da enzima (Figura 9B), sem afetar o acesso dos substratos (PALOMO *et al.*, 2005).

Figura 9 – Superfície da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp. (Protein Data Bank: 2LIP) com a tampa aberta (A) e superfície oposta ao sítio ativo (B) com grupos amino destacados na cor vermelha.



FONTE: adaptado de Schrag *et al.* (1997).

Apesar de proporcionar alta estabilidade de imobilização, dentre as desvantagens do uso do glutaraldeído está a redução da atividade enzimática, causada pela polimerização do glutaraldeído, que ocorre ao adicionar um excesso desse reagente na ativação do suporte de imobilização, também podendo gerar o entrecruzamento excessivo entre as enzimas, prejudicando sua interação com seus substratos (ZHOU *et al.*, 2023). Contudo, a principal desvantagem é a sua toxicidade, que tem motivado a busca por substâncias alternativas ao seu uso (SANTOS *et al.*, 2022b).

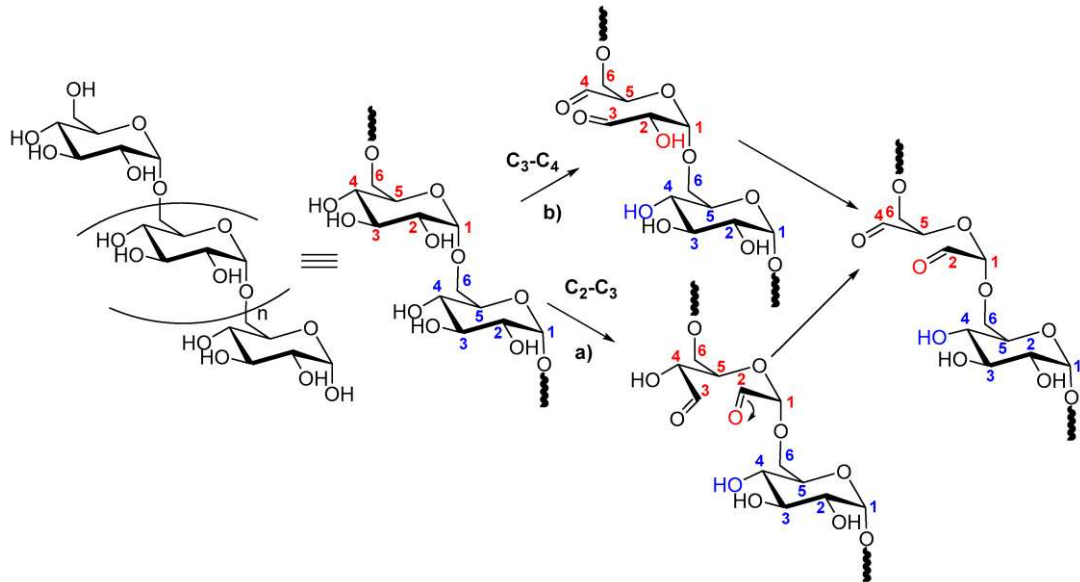
Essa busca está associada ao fato de que existem aspectos que devem ser considerados em termos de vantagem ecológica e tendências mundiais no desenvolvimento de biocatalisadores, assim a adoção de metodologias mais seguras e minimização do uso de substâncias que representem risco a saúde e ao meio ambiente são relevantes (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2017).

### 3.2.1.2 Dextrana aldeído como substituinte do Glutaraldeído

A dextrana é um polissacarídeo bacteriano extracelular produzido por bactérias do ácido láctico através da fermentação da sacarose, compreendendo unidades de glicose ligadas entre si por meio da ligação glicosídica  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6) e  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3), produzindo cadeias lineares e ramificações, apresentando diversas propriedades desejáveis, como atoxicidade e capacidade de realizar reticulação (PRIYA *et al.*, 2024).

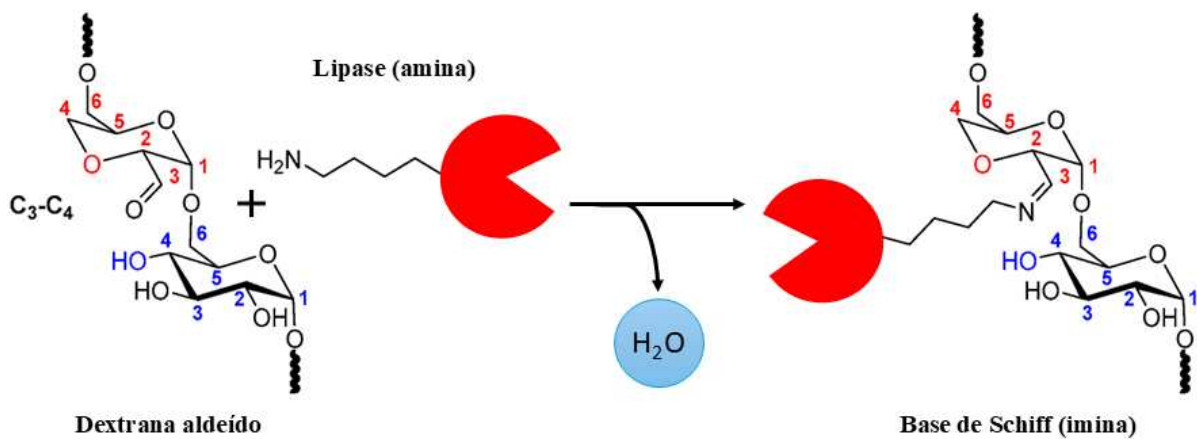
Para obtenção da dextrana aldeído, a dextrana passa por um processo de quebra oxidativa pelo ânion de periodato (Figura 10), no qual os anéis glicopiranosídicos dos monômeros que compõem o polímero possuem um vicinal diol, gerando duas ligações oxidáveis, entre os carbonos C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> (Figura 10a) e C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> (Figura 10b), em qualquer um dos casos os produtos da oxidação contém um aldeído em C<sub>3</sub> e duas possíveis vias com um aldeído em C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>. Dessa forma são produzidos os grupos aldeídos, que, assim como os aldeídos do glutaraldeído, reagem com resíduos nucleofílicos da enzima, especialmente os grupos amina de resíduos de lisina, criando bases de Schiff (-C=N-), ligações iminas (Figura 11), liberando uma molécula de água por ligação (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2019).

Figura 10 – Estruturas finais possíveis a partir da oxidação da molécula de dextrana.



FONTE: TACIAS-PASCACIO *et al.* (2019).

Figura 11 – Ilustração da reação para formação de ligação covalente entre aldeído e grupamentos amina, formando base de Schiff com liberação de uma molécula de água.

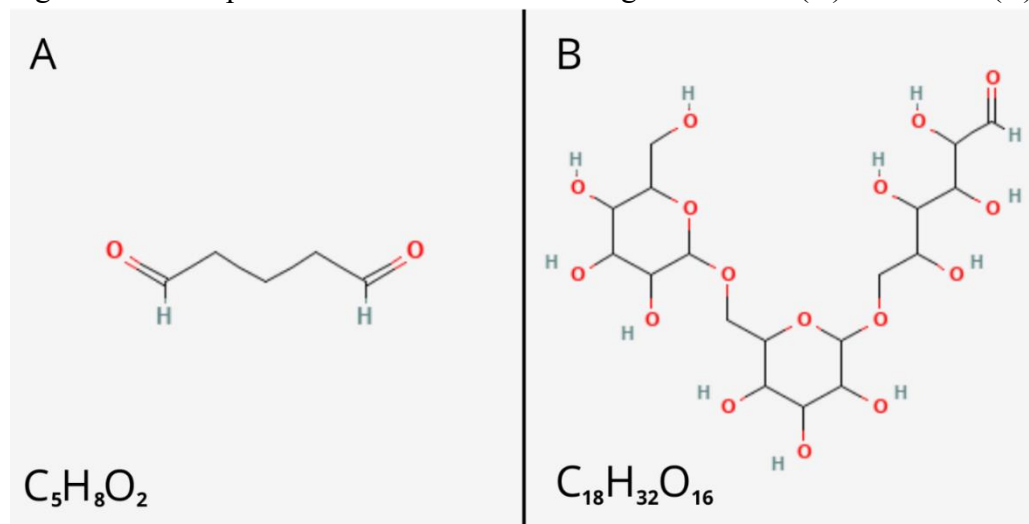


FONTE: adaptado de TACIAS-PASCACIO *et al.* (2019).

Enquanto a molécula de glutaraldeído apresenta uma cadeia contendo apenas 5 carbonos, aproximando as moléculas que entrecruza através de seus dois grupos aldeídos, a dextrana pode apresentar 18 carbonos em sua cadeia (Figura 12), aumentando o espaço entre as moléculas e a hidrofobicidade das interações. Essas diferenças estruturais oferecem a oportunidade de se avaliar o impacto do uso de um agente reticulante menos hidrofóbico

(glutaraldeído) e mais hidrofóbico (dextrana aldeído) nas características do biocatalisador desenvolvido, como atividade e estabilidade.

Figura 12 – Comparativo entre as moléculas de glutaraldeído (A) e dextrana (B).



FONTE: adaptado de National Library of Medicine (2024b, 2004c).

O uso da dextrana aldeído já permitiu a reação de hidrólise sem dessorção de enzima e já foi reportado o aumento da termoestabilidade com sua utilização, mas, assim como o glutaraldeído, forma ligações irreversíveis e, dessa forma, tanto a enzima quanto o suporte acabam sendo descartados (RODRIGUES *et al.*, 2019). Essa estabilidade térmica geralmente resulta da rigidez molecular causada pela ligação covalente e criação de um microambiente protegido (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

Embora o entrecruzamento de lipases com aldeídos possibilite o aumento da estabilidade da imobilização, a adição dessas substâncias à composição do biocatalisador também proporciona uma barreira para o acesso dos substratos à enzima sob a camada de reticulação e isso é proporcional ao tamanho das moléculas de substrato, portanto, macromoléculas apresentam maiores limitações difusionais (MENDES *et al.*, 2012; PALOMO *et al.*, 2002).

Uma possibilidade para oferecer maior área de contato com as enzimas para os substratos é a imobilização de uma camada de lipases externa à camada de reticulação, de modo a não exceder a capacidade de difusão do substrato, uma consequência do excesso de camadas de enzimas (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020c).

Esse processo pode ser realizado com a adição de uma nova camada de agentes reticulantes para formação de ligações covalentes entre as camadas de lipases (RIOS *et al.*, 2019c; ARANA-PEÑA *et al.*, 2021), podendo ainda serem utilizadas outras substâncias para

fortificar essas conexões, como a polietilenimina (ZAAK *et al.*, 2017a). Dessa forma, a camada de enzima mais interna pode ter sua atividade protegida pela presença de uma camada extra externa (ARANA-PEÑA *et al.*, 2019).

Contudo, a adsorção hidrofóbica também pode ser utilizada para simplificação da obtenção do biocatalisador e viabilização da recuperação do suporte, visto que foi reportada a capacidade da PFL em adsorver outras enzimas através da interação lipase-lipase (PALOMO *et al.*, 2004).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

A enzima comercial lipase amano de *Pseudomonas fluorescens* ( $\geq 20.000$  U/g), dextrana de *Leuconostoc* spp. (450 kDa – 650 kDa) e glutaraldeído grau II, 25% em água, foram adquiridos da marca Sigma Aldrich®. A resina de octil-agarose, comercializada como Octyl Sepharose™, foi adquirida da marca GE Healthcare®. O metaperiodato de sódio foi adquirido da marca Vetec®. O leite em pó integral (Ninho®), óleo de soja tipo I (Soya®) e o azeite de oliva tipo único (Gallo®) foram adquiridos em comércio local. Demais materiais foram adquiridos de grau analítico de marcas diversificadas.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparo da solução enzimática de lipase amano de *Pseudomonas fluorescens*

A massa de 0,1 g do pó solúvel de amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) foi dissolvida em 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (proporção de 1:20 m/v), com força iônica de 5 mM e pH 7,0 (RIOS *et al.*, 2019c), apresentando concentração de  $1,82 \pm 0,06$  mg de proteína/mL, medida pelo método de Bradford (1976).

#### 4.2.2 Imobilização de PFL em octil-agarose

Para realizar a imobilização, a octil-agarose foi previamente lavada com água destilada e filtrada a vácuo. Em seguida, a PFL foi imobilizada no suporte úmido por adsorção com uma carga de proteína oferecida de 2 mg/g de octil-agarose sob agitação a  $(25 \pm 2)$  °C por 1 h (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020b). Então, realizou-se a centrifugação por 10 min a 6200 rpm e 4 °C para recolhimento de sobrenadante, seguida da lavagem do biocatalisador com excesso de água destilada e tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7,0), visando a remoção de enzimas não-imobilizadas, filtrando-se a vácuo para obtenção do biocatalisador O-P.

### ***4.2.3 Imobilização de segunda camada de PFL após reticulação com os agentes de entrecruzamento Glutaraldeído e Dextrana aldeído***

#### ***4.2.3.1 Reticulação com Glutaraldeído 1%***

Para a reticulação com glutaraldeído, adicionou-se 1,0 g do biocatalisador O-P a 10 mL de solução de glutaraldeído 1% (v/v) em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), mantendo-se sob agitação a  $(25 \pm 2)$  °C por 1 h (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020a).

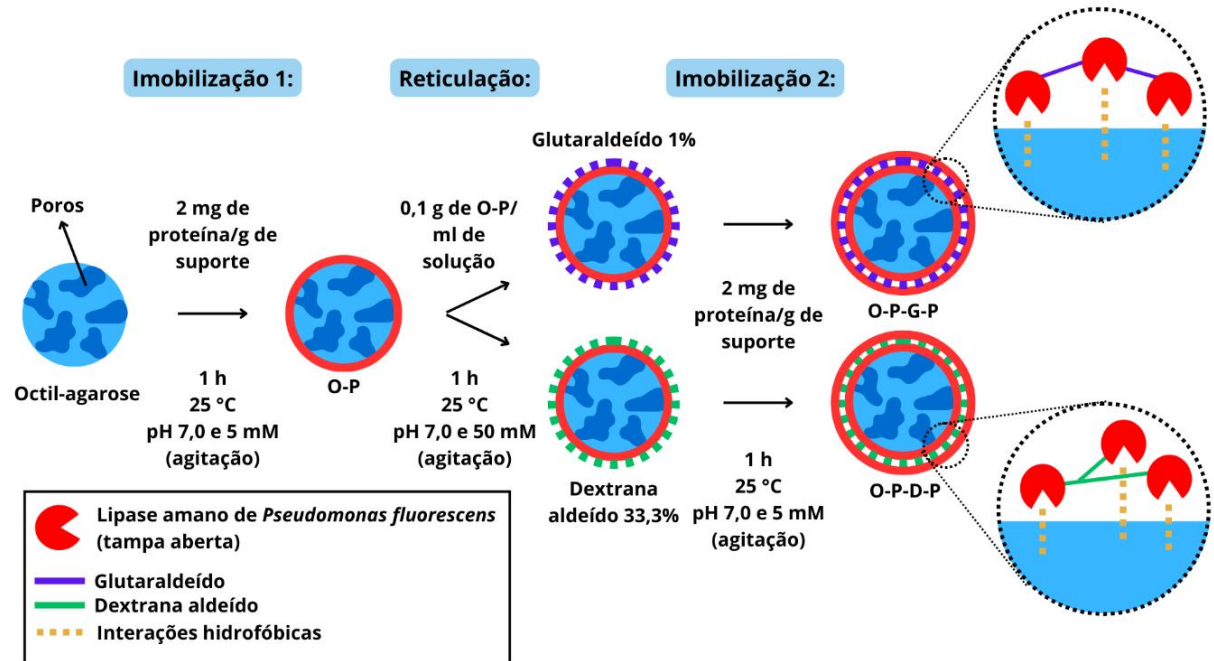
#### ***4.2.3.2 Reticulação com Dextrana aldeído 33,3%***

Ao realizar a reticulação com dextrana aldeído, esse agente de entrecruzamento foi produzido a partir da adaptação do método de Mateo *et al.* (2004). Inicialmente, solubilizou-se 1,65 g de dextrana em 50 mL de água deionizada, adicionando em seguida 3,85 g de periodato de sódio e mantendo a mistura sob agitação a  $(25 \pm 2)$  °C por 90 minutos. Então, procedeu-se a diálise da solução com membrana de celulose de corte de peso molecular de 10 kDa em 2 L de água destilada sob agitação por 2 h a  $(25 \pm 2)$  °C, repetindo-se o processo por um total de 5 vezes, obtendo-se a solução de dextrana aldeído. Para a reticulação, adicionou-se 1,0 g de O-P a 10 mL de tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) somadas a 5 mL de solução de dextrana aldeído na proporção de 1:5 (massa de O-P : volume de solução de dextrana aldeído), determinada através de testes preliminares, agitando-se a mistura a  $(25 \pm 2)$  °C por 1 h.

#### ***4.2.3.3 Imobilização de segunda camada de PFL após reticulação***

Após a reticulação, em ambos os casos, os biocatalisadores foram lavados com excesso de água destilada e tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e filtrados a vácuo para a nova imobilização, baseando-se na adsorção proposta por Palomo *et al.* (2004), para isso novamente imobilizou-se a carga de 2 mg de proteína/g de biocatalisadores, realizando-se o mesmo processo apresentado na secção 4.2.2 e obtendo-se os biocatalisadores: O-P-G-P e O-P-D-P, cujo preparo está ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Ilustração da imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens* no suporte poroso de octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P).



FONTE: Elaborada pela autora.

#### 4.2.3.4 Quantificação de aldeídos em solução de reticulação de dextrana aldeído através de análise quantitativa de açúcares redutores totais pelo método DNS

Para a determinação de aldeídos disponíveis para formação de ligações covalentes, se utilizou o método de DNS (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013), o qual se baseia na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS) paralelamente à oxidação do grupo aldeído à grupo carboxílico, causando a transição da cor amarela para vermelha detectável em espectro UV-visível (MILLER, 1959). Primeiramente, obteve-se a curva do reagente DNS a partir de soluções de concentração conhecida de glicose. Em seguida, para a análise da solução de dextrana aldeído, transferiu-se 0,5 mL das amostras para tubos de ensaio com 0,5 mL de amostras de DNS, aquecendo-se os tubos a 100 °C por 15 minutos e esfriando-os em banho de gelo por 5 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se a cada tubo 4 mL de água destilada para agitação em Vórtex, procedendo-se a leitura de absorbância em cubetas de quartzo a 540 nm. Ao inserir a absorbância na curva, o resultado foi registrado como conteúdo de aldeído (g/L), conforme o método de Wang e Xiong (2016).



#### 4.2.4 Determinação da atividade hidrolítica frente ao substrato sintético

A atividade hidrolítica da enzima livre e dos biocatalisadores heterogêneos foi determinada com o uso do substrato *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), cuja hidrólise resulta na geração de ácido butírico e *p*-nitrofenol como produtos, sendo o último uma molécula cromófora detectável no espectro UV-visível. O método de Garcia-Galan *et al.* (2014) foi adaptado para utilização. Inicialmente, preparou-se solução de *p*-NPB 50 mM diluída em acetonitrila. Em seguida, adicionou-se em cubeta de quartzo 2,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0), 50 µL de solução de *p*-NPB e 50 µL de solução enzimática para enzima livre ou 50 µL de re-suspensão de 50 mg de enzima imobilizada em 500 µL de tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7,0), conduzindo a leitura no comprimento de onda de 348 nm em espectrofotômetro, sob agitação constante e temperatura fixa em 25 °C. A variação diferencial da absorbância (dA/dt) ou taxa de absorbância, denominada inclinação (abs/min), foi monitorada por 90 segundos, com intervalo de 4 s entre cada leitura, e a atividade hidrolítica foi calculada através da seguinte equação:

$$Atv \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(Inclinação - AH) * F * V_R}{M(V)} \quad (1)$$

Em que:

- Atv é referente à atividade hidrolítica, medida em U/mL para a enzima livre e U/g para a enzima imobilizada, equivalente à liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol/minuto;
- AH é a auto-hidrólise do *p*-NPB, equivalente à inclinação (abs/min) medida sem enzima;
- F é o fator da curva de calibração do *p*-NPB, com valor de 0,1942 (µmol /mL·abs);
- V<sub>R</sub> é o volume reacional (mL);
- M (V) é o volume de solução enzimática (mL) ou massa de catalisador (g) utilizados.

#### 4.2.5 Determinação da concentração de proteína

As concentrações de proteína da enzima solúvel e sobrenadantes remanescentes da imobilização foram determinadas através do método de Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino como padrão da curva de calibração espectrofotométrica a 595 nm.

#### 4.2.6 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram calculados através dos métodos de Silva *et al.* (2012). O rendimento de imobilização (%),  $R$ , representa a atividade enzimática efetivamente imobilizada no suporte frente à atividade da solução enzimática, conforme apresentado na Equação 2, em que:  $At_I$  é a atividade inicial da solução enzimática de imobilização e  $At_F$  é a atividade do sobrenadante remanescente da imobilização, ambas determinadas através do método apresentado na secção 4.2.4, utilizando *p*-NPB como substrato da reação de hidrólise a 25°C.

$$Rendimento (\%) = \frac{At_I - At_F}{At_I} \times 100 \quad (2)$$

A atividade oferecida (U/g),  $At_o$  (Equação 3), é referente a quantidade de enzimas oferecida por grama de suporte, em que:  $V_{imobilização}$  é o volume de solução enzimática utilizado na imobilização e  $M_{suporte}$  é a massa de suporte utilizada na imobilização.

$$Atividade\ oferecida \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{At_I \times V_{imobilização}}{M_{suporte}} \quad (3)$$

A atividade teórica (U/g),  $At_T$ , é o produto da atividade oferecida pelo rendimento, (Equação 4).

$$Atividade\ teórica \left( \frac{U}{g} \right) = At_o \times \left( \frac{R}{100} \right) \quad (4)$$

A atividade do derivado (U/g),  $At_D$ , também foi obtida de acordo com o método descrito na seção 4.2.4. A atividade recuperada (%),  $At_R$ , é relativa à razão entre a atividade do derivado e a atividade teórica, conforme apresentado na Equação 5.

$$Atividade\ recuperada\ (\%) = \frac{At_D}{At_T} \quad (5)$$

#### **4.2.7 Caracterização dos biocatalisadores heterogêneos a base de octil-agarose**

##### *4.2.7.1 Avaliação da interação enzima-suporte através da análise qualitativa de proteínas por Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrilamide Gel)*

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE) de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970). Primeiro, o gel de corrida foi preparado com 12% poliacrilamida em uma zona de 9 cm x 6 cm. Então, a solução enzimática e os biocatalisadores foram submetidos ao tampão de ruptura de  $\beta$ -mercaptoetanol sob 100 °C durante 10 minutos. Em sequência, alíquotas contendo 12  $\mu$ L de cada amostra foram separadamente distribuídos nos poços do gel e comparadas com 1  $\mu$ L de marcador de baixo peso molecular (11 kDa e 245 kDa), preparado com Tris-Glicina 4-20% (Sigma Aldrich®). Para a corrida, o gel foi submetido à voltagem constante de 120 V por um tempo aproximado de 2h. Corou-se o gel através de solução de azul brilhante de Coomassie.

##### *4.2.7.2 Avaliação da estrutura química dos biocatalisadores através de Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

Para avaliar as modificações químicas nas estruturas dos biocatalisadores em relação à octil-agarose, realizaram-se análises por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier. Os espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrômetro FTIR Cary 630 da Agilent Technologies, registrados como transmitância. Os espectros foram coletados no número de onda na faixa de 650 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 1  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans. As amostras foram inseridas diretamente no espectrômetro com auxílio de uma espátula, sendo previamente secas a 50 °C até massa constante.

#### **4.2.8 Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores heterogêneos de octil-agarose**

Para determinação da estabilidade de pH, foram preparadas soluções tampão acetato de sódio, de pH 5,0, e fosfato de sódio, de pH 7,0, ambas de força iônica de 5mM. Conduziu-se ensaio acelerado para comparação da estabilidade térmica tanto entre os biocatalisadores deste trabalho quanto com relação aos biocatalisadores reportados na literatura. Os biocatalisadores foram incubados em duplicata, na proporção de 25 mg para 250 µL das soluções tampão de pH's 5,0 e 7,0, sob a temperatura de 60 °C e sem agitação (AMORIM, 2022; RIOS *et al.*, 2019d). Também foi realizada a incubação a 70 °C em pH 7,0 (RIOS *et al.*, 2019a). Medidas de atividade foram realizadas periodicamente conforme descrito na secção 4.2.4 e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade inicial, medida antes da incubação. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foi obtido a partir da desativação enzimática correspondente ao modelo de Sadana e Henley (HENLEY; SADANA, 1985). Calculou-se a média das replicatas em cada ponto do tempo analisado e a estimativa da  $k_D$ , constante de desativação, foi feita usando o método dos mínimos quadrados para ajuste não-linear do modelo aos dados experimentais. Então, a partir das  $k_D$ s, os  $t_{1/2}$  foram calculados. Métricas de ajuste, como  $R^2$ , também foram calculadas para observar a qualidade do ajuste aos dados experimentais.

#### **4.2.9 Ensaio de dessorção em Triton X-100**

Para esse procedimento adaptado do método de Arana-Peña *et al.* (2019), foi preparada uma solução de detergente Triton X-100 4% em água deionizada. Então, 50 mg de biocatalisadores foram incubadas em 500 µL da solução sob agitação à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) pelo período de 2 horas. Medidas de atividade foram realizadas periodicamente conforme descrito na secção 4.2.4 e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade inicial, medida antes da incubação. Antes de cada medida, as amostras foram lavadas com a solução de Triton X-100 4%, lavadas com água destilada abundante e filtradas à vácuo.

#### **4.2.10 Determinação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores frente a diferentes efluentes formulados**

Foram escolhidas como substratos para a produção de efluentes formulados diferentes fontes de lipídios comumente presentes nos efluentes industriais, que são: azeite de oliva, óleo de soja e leite em pó.

A atividade hidrolítica foi determinada a partir do método de Soares *et al.* (1999), com adaptações. Inicialmente, os substratos foram preparados conforme descrito a seguir:

- Adicionou-se 13,75 g de azeite ou óleo de soja a 41,25 g de solução de goma arábica 7 % m/v em água, diluindo-se cada mistura com 55 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0. As misturas com óleo ou azeite foram agitadas em agitador tipo Turrax por 10 min à 15000 rpm para formação da emulsão;
- No caso do leite em pó, já composto por estabilizantes e emulsificantes, adicionou-se 13,75 g de leite em 55 mL de água destilada, diluindo-se a mistura com 55 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7,0.

Os erlenmeyers contendo 9 mL de emulsão foram incubados a 37 °C, 120 rpm por 10 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se 1 mL de solução enzimática em diluições pré-determinadas ou massa de biocatalisador correspondente a quantidade de proteína da solução enzimática e a reação ocorreu por 20 minutos para medida do ponto final. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de solução de acetona e etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram medidos através da titulação das amostras com NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína 1% (m/v) em etanol como indicador.

A atividade foi expressa em U/mL (enzima livre) ou U/g (enzima imobilizada), sendo 1 U a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácidos graxos por minuto, nas condições de ensaio. O cálculo da atividade foi realizado através da Equação 6:

$$Atv \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(V_a - V_b) * M * D * 1000}{T * M_e (V_e)} \quad (6)$$

Em que:

- $V_a$  é o volume de NaOH utilizado na titulação (mL);
- $V_b$  é o volume de amostra titulado;
- $M$  é a molaridade real do NaOH, calculada após padronização (mol/L);
- $D$  é o fator de diluição da solução enzimática;
- $T$  é o tempo de reação (min);
- $M_e (V_e)$  é a massa de biocatalisador (g) ou volume de solução enzimática (mL) utilizados.

#### 4.2.10.1 Determinação da atividade específica

As atividades hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada foram convertidas para atividade específica (U/mg),  $At_E$ , a partir da introdução do teor de proteínas da solução enzimática e imobilizado nos biocatalisadores, determinado com o método de Bradford da secção 4.2.5. O cálculo utilizado para a enzima solúvel está presente na equação 7, enquanto para a enzima imobilizada foi utilizada a equação 8:

$$At_E \left( \frac{U}{mg} \right) = Atv \times P^{-1} \quad (7)$$

Em que:

- $Atv$  é a atividade hidrolítica (U/mL) descrita na secção 4.2.10;
- $P$  é a concentração de proteína (mg/mL).

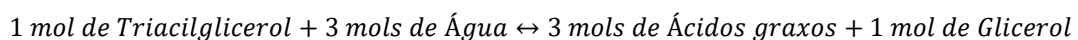
$$At_E \left( \frac{U}{mg} \right) = Atv \times (P_O \times R)^{-1} \quad (8)$$

Em que:

- $Atv$  é a atividade hidrolítica (U/g) descrita na secção 4.2.10;
- $P_O$  é a quantidade de proteína oferecida ao suporte (mg/g).
- $R$  é o rendimento de imobilização descrito na equação 2 da secção 4.2.6.

#### 4.2.10.2 Estimativa da conversão de lipídios em ácidos graxos

Os lipídios utilizados nos ensaios de hidrólise são majoritariamente constituídos por triacilgliceróis, cuja hidrólise enzimática pode ser descrita pela seguinte reação:



No caso de excesso de água no sistema reacional, essa reação pode ser considerada irreversível. De acordo com Fogler (2014, p. 30) a conversão (X) pode ser definida como o número de mols de reagente limitante, no caso os triacilgliceróis (A), que reagiram por mol de reagente limitante alimentado no sistema, para reações irreversíveis, a conversão máxima é 1,0,

indicando conversão completa do reagente em substrato. Desse modo, esse parâmetro foi estimado através da equação 9, cuja quantidade de mols reagidos foi calculada através da estequiometria da reação supracitada, dividindo-se o número de mols de produto por 3:

$$X = \frac{\text{mols de A reagidos}}{\text{mols de A alimentados}} = \frac{(At_E * P * t * 0,000001)/3}{M * MM^{-1}} \quad (9)$$

Em que:

- $At_E$  é a atividade específica (U/mg), com U =  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo/min;
- P é a quantidade de proteína empregada na hidrólise (mg);
- t é o tempo de reação (min);
- M é a massa de substrato alimentada (g);
- MM é a massa molar média dos substratos (g/mol):
  - 875,84 g/mol para o azeite (GONZÁLEZ *et al.*, 1999);
  - 874,8 g/mol para o óleo de soja (ALMEIDA, 2016);
  - 737,0 g/mol para o leite (GLASSER *et al.*, 2007).

#### ***4.2.11 Estabilidade operacional frente à hidrólise de efluente formulado de leite***

Esse ensaio foi realizado de acordo com os procedimentos da secção 4.2.10, contudo, após a hidrólise, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 7000 rpm e 10°C por 5 minutos, sendo coletadas 8 mL do sobrenadante para a titulação. O conteúdo remanescente, contendo o biocatalisador, foi lavado, adicionando-se 2 mL de tampão fosfato de sódio de 5 mM e pH 7,0, centrifugando-se 7000 rpm e 10°C por 5 minutos e retirando 2 mL do sobrenadante, repetindo-se o processo por 6 vezes para verificação de sobrenadante límpido e adição do biocatalisador na amostra do ciclo seguinte. Titulações com NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína 1% (m/v) em etanol como indicador, foram realizadas subsequentemente e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade inicial, medida no primeiro ciclo de hidrólise. Repetiu-se o processo em duplicata até que a atividade hidrolítica se tornasse constante.

#### ***4.2.12 Análise de dados e tratamento estatístico***

As análises descritivas contaram com média, desvio padrão para análises realizadas em triplicata e desvio médio para experimentos em duplicata, além disso, nos dados paramétricos e homogêneos foram realizadas Análises de Variância (ANOVA) de fator único e dois fatores, seguidas do teste post-hoc de Tukey a um nível de significância de 5%. No ANOVA de dois fatores em que se registrou interação significativa entre os fatores, realizou-se post-hoc apenas para a interação de fatores.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens*

A Tabela 2 apresenta os resultados do rendimento de imobilização de PFL, lipase amano de *Pseudomonas fluorescens*, no suporte de octil-agarose e concentração de aldeído oferecida no procedimento de reticulação. O biocatalisador O-P, não reticulado, é precursor de O-P-G-P e O-P-D-P, reticulados com glutaraldeído e dextrana aldeído, respectivamente, portanto, os dados de O-P são referentes à primeira camada de lipase e os valores de O-P-G-P e O-P-D-P se referem à segunda camada de lipase.

Tabela 2 – Rendimento de imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens* em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P) e concentração de aldeídos das soluções utilizadas na reticulação.

Amostra	Rendimento (%)	Concentração de aldeído (g/L)
O-P	92,5 ± 0,961 <sup>ab</sup>	-
O-P-G-P	94,8 ± 1,31 <sup>a</sup>	0,275**
O-P-D-P	90,8 ± 1,77 <sup>b</sup>	2,35

FONTE: Elaborada pela autora.

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a um nível de 5% pelo teste de Tukey.

\*\* Valor estimado a partir da densidade média do Glutaraldeído 25% de 1,1 kg/m<sup>3</sup> (U.S. Coast Guard, 1990).

De acordo com a Tabela 2, os rendimentos de imobilização dos biocatalisadores reticulados diferiram significativamente entre si. O biocatalisador O-P-D-P apresentou menor rendimento de imobilização com relação ao biocatalisador O-P-G-P. A diferença verificada para o rendimento de imobilização entre O-P-G-P e O-P-D-P pode estar associada tanto a concentração dos aldeídos utilizados na reticulação, quanto a suas diferenças estruturais (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Os grupos aldeído do glutaraldeído se encontram naturalmente disponíveis para formar a ligação imina com as aminas primárias da enzima (RAFIEE; REZAEI, 2021). Por apresentar tamanho de cadeia menor do que a dextrana aldeído, esse aldeído possibilita maior área superficial disponível para imobilização da enzima e contribui para o aumento da taxa de imobilização (MENDES *et al.*, 2012) e, consequentemente, do rendimento de imobilização registrado em O-P-G-P (94,8%) diante de O-P-D-P (90,8%).

Em relação a dextrana, quanto maior a sua oxidação, mais aldeídos estão disponíveis (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2019) e esse fator pode explicar a maior quantidade

de aldeídos frente à quantidade estimada para o glutaraldeído (Tabela 2). Isso também é importante para que a dextrana aldeído seja capaz de aproximar-se do valor de rendimento de imobilização alcançado com glutaraldeído, uma vez que a maior disponibilidade de aldeído aumenta a possibilidade de formação de entrecruzamento com a lipase (SANTOS *et al.*, 2022b) e facilita na compensação da menor área superficial disponível frente ao glutaraldeído.

Comparando os rendimentos de imobilização de PFL em quitosana ativada com glutaraldeído ou amido polialdeído, Santos *et al.* (2022b), obtiveram o valor de 98% para o biocatalisador funcionalizado com glutaraldeído, enquanto a funcionalização com o polialdeído resultou em valores entre 80% e 98%, conforme aumentava-se o conteúdo de aldeído do amido oxidado, o que ressalta a influência do agente de entrecruzamento. Esse efeito reforça a hipótese de que o aumento da disponibilidade de aldeídos pode ser benéfico para o rendimento de imobilização.

Os rendimentos de imobilização mostrados na Tabela 2 foram equivalentes aos resultados de Santos *et al.* (2022a), que co-imobilizou PFL e a Laccase em uma estratégia de 4 etapas, utilizando octil-agarose como suporte, polietilenimina ( $C_2H_5N$ )<sub>n</sub>, polímero multicatiónico com grupos amino, para o entrecruzamento entre as camadas de enzimas e glutaraldeído para formação de ligações covalentes entre as enzimas e o suporte. Os autores obtiveram rendimento de imobilização da PFL na primeira camada de 90,94%. Esse resultado de rendimento de imobilização foi semelhante ao obtido para O-P, de 92,5%.

Na Tabela 3 estão registrados demais parâmetros de imobilização para os biocatalisadores heterogêneos, compreendendo atividade teórica, atividade do derivado e atividade recuperada. A partir desses dados, observa-se que a atividade teórica ( $At_T$ ), a atividade dos biocatalisadores caso todas as enzimas imobilizadas estivessem ativas, estimada para o biocatalisador reticulado com glutaraldeído foi pouco maior do que para a reticulação com dextrana aldeído, apesar de não diferirem significativamente. Esse parâmetro foi influenciado pelo rendimento de imobilização, que foi levemente maior para O-P-G-P.

Apesar de apresentar um maior rendimento de imobilização, o biocatalisador reticulado com glutaraldeído registrou menor atividade ( $At_D$ ) frente ao reticulado com dextrana aldeído, novamente não representando uma diferença significativa. Entretanto, é possível explicar esse leve distanciamento entre os valores devido a maior hidrofobicidade da dextrana aldeído em relação à cadeia curta de glutaraldeído. Conforme destacado na Figura 12, a dextrana aldeído apresenta uma estrutura hidrofóbica, característica que influencia na ativação interfacial das lipases (RODRIGUES *et al.*, 2019), gerando contribuições para a atividade do derivado e atividade recuperada.

Tabela 3 – Parâmetros de imobilização, a 25°C e pH 7,0, de PFL em octil-agarose com atividade oferecida ( $At_O$ ) de 30,0 U/g a cada imobilização: O-P (imobilização em octil-agarose sem reticulação), O-P-G-P (imobilização em octil-agarose com reticulação por glutaraldeído) e O-P-D-P (imobilização em octil-agarose com reticulação por dextrana aldeído).

Amostra	$At_T$ (U/g)	$At_D$ (U/g)	$At_R$ (%)
O-P	$28,9 \pm 1,59^b$	$37,4 \pm 2,78^b$	$129,5 \pm 4,6^a$
O-P-G-P	$57,4 \pm 0,97^a$	$50,3 \pm 2,99^a$	$87,5 \pm 3,86^b$
O-P-D-P	$55,8 \pm 0,29^a$	$51,8 \pm 1,29^a$	$92,9 \pm 2,76^b$

FONTE: Elaborada pela autora.

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a um nível de 5% pelo teste de Tukey. Legenda:  $At_T$  – atividade teórica,  $At_D$  – atividade do derivado e  $At_R$  – atividade recuperada.

Os valores obtidos de atividade recuperada ( $At_R$ ) são dependentes da razão entre  $At_T$  e  $At_D$ , sendo O-P-D-P beneficiado pela maior proximidade entre suas  $At_T$  e  $At_D$  (Tabela 3). A possível hiperativação provocada pela hidrofobicidade da dextrana aldeído pode ter contribuído para que a atividade de O-P-D-P superasse as limitações difusionais promovidas pela presença desse agente de reticulação polimérico, inclusive em relação a um agente de cadeia menor, o glutaraldeído, que representava uma barreira menor à difusão do substrato *p*-NPB para o interior do biocatalisador (PALOMO *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2012).

Os dados da Tabela 3 indicam que a dextrana aldeído é capaz de equiparar-se ao glutaraldeído na função de entrecruzamento de lipase amano de *Pseudomonas fluorescens* com relação à atividade hidrolítica contra substratos de baixo peso molecular, como o *p*-NPB, contribuindo para o uso de substâncias atóxicas no desenvolvimento do biocatalisador à base de octil-agarose.

A  $At_D$  registrada para O-P (37,4 U/g) foi maior do que o valor registrado por Santos *et al.* (2022a) para imobilização de PFL em octil-agarose por adsorção, com atividade hidrolítica frente ao *p*-NPB de 20,28 U/g.

Rios *et al.* (2019a) registraram a hiperativação da suspensão de PFL imobilizada em octil-agarose com a atividade de cerca de 120% frente à referência ao fim da imobilização, aproximando-se do resultado obtido para atividade recuperada nesse trabalho, 129,5%. Arana-Peña *et al.* (2020b) reportaram resultados semelhantes para a imobilização de PFL em octil-agarose com tampão de acetato de sódio 5 mM de pH 5,0 e 30% glicerol, contudo, ao realizar imobilização em tampão fosfato de sódio de pH 7,0 e força iônica de 250 mM, obtiveram atividade em torno de 200%.

Fonseca *et al.* (2021) imobilizaram a PFL em suporte de 5% quitosana de peso molecular médio ativada com 0,6% glutaraldeído, obtendo atividade recuperada de 45,75%,

esse valor ressalta um dos principais benefícios do uso de octil-agarose como suporte: os altos valores de atividade recuperada.

## 5.2 Caracterização dos biocatalisadores

### 5.2.1 Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE

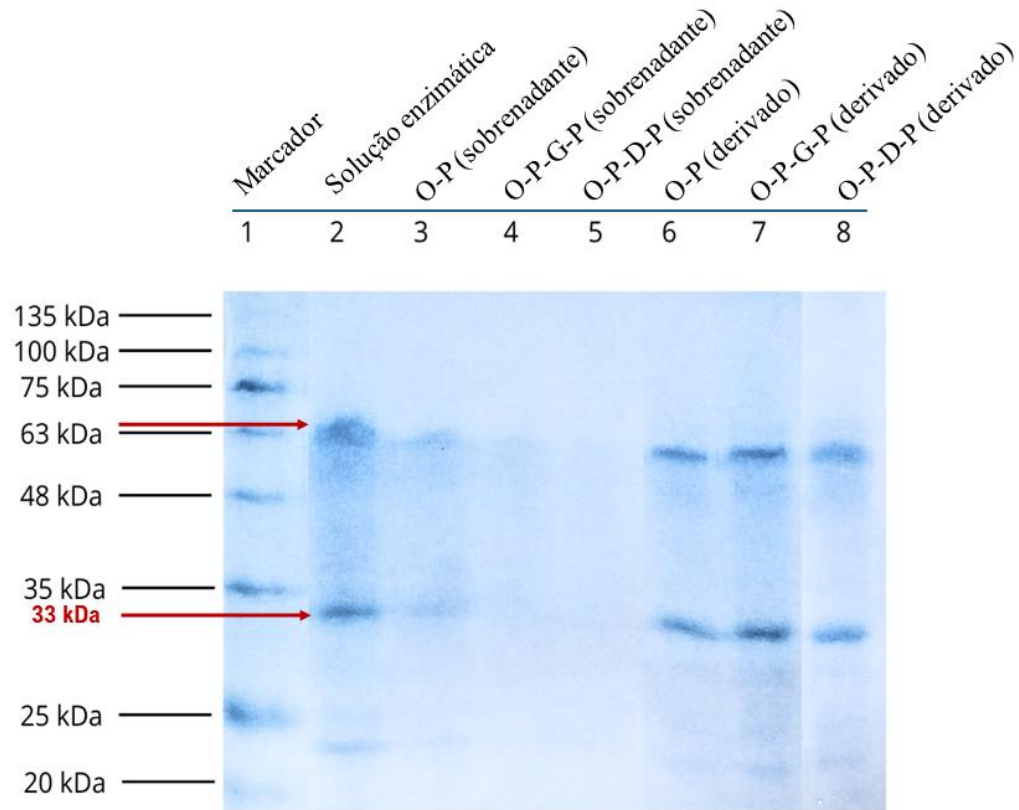
Na Figura 14 é possível observar os poços resultantes das amostras recolhidas ao longo do processo de imobilização, sobrenadantes e derivados (biocatalisadores) da análise de proteínas SDS-PAGE, para estimativa das interações entre as lipases e o suporte de imobilização, tanto hidrofóbicas, consideradas fracas, quanto covalentes, mais fortes. Nesse resultado é identificável o tamanho aproximado de 33 kDa para o monômero da PFL, levando-se em conta a intensidade das bandas visíveis.

Esse valor está em conformidade com o reportado na literatura (RIOS *et al.*, 2018). As lipases de *Pseudomonas fluorescens* geralmente apresentam peso molecular entre 32 e 33 kDa (GUAN *et al.*, 2020; LIU; LI; YAN, 2017), essa variação foi investigada em análise filogenética, em que se identificou que essas enzimas podem ser menores (32 kDa) devido a deleção de diversos aminoácidos, formando estruturas secundárias  $\beta$ -folha anti-paralelas na superfície da lipase (GUAN *et al.*, 2020).

Os poços 3 ao 5 indicam que a maior parte das proteínas oferecidas foram imobilizadas, dada a baixa intensidade das bandas referentes às proteínas presentes nos sobrenadantes remanescentes do processo de imobilização, especialmente na segunda imobilização de O-P-G-P e O-P-D-P, o que está de acordo com os altos valores de rendimento de imobilização apresentados na Tabela 2.

Ainda de acordo com a Figura 14, é observável a tendência à aglomeração para formação de dímero, constatada pelas bandas com aproximadamente o dobro do peso molecular do monômero (66 kDa), consistente com o comportamento da enzima PFL, que forma agregados bimoleculares mesmo em baixas quantidades, sendo a dissociação possível através do uso de detergentes, que estabilizam sua tampa aberta (LIMA *et al.*, 2013; RIOS *et al.*, 2018). Enquanto o dímero apresenta maior ativação interfacial no meio substrato-aquoso, favorecendo a atividade da lipase, o monômero apresenta maior seletividade frente aos substratos (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003).

Figura 14 - Eletroforese SDS-PAGE indicando monômero e dímero (vermelho) de lipase de *Pseudomonas fluorescens* com tamanhos de 33 kDa e 66 kDa, respectivamente, identificados na solução enzimática, sobrenadantes remanescentes e derivados da imobilização em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana aldeído (O-P-D-P).



FONTE: Elaborada pela autora.

Devido a essa propriedade de adsorver com a tampa aberta a substâncias hidrofóbicas, as lipases tendem a formar dímeros lipase-lipase envolvendo a forma aberta de cada lipase e, por consequência, adsorver apenas na forma monomérica aos suportes hidrofóbicos (RODRIGUES *et al.*, 2019). A presença de monômeros no poço 6 indica que a PFL está adsorvida a octil-agarose, mas os dímeros sugerem que parte das enzimas está imobilizada por interação lipase-lipase, favorecendo a interação dos dímeros com os agentes de entrecruzamento da etapa de reticulação (PALOMO *et al.*, 2005).

Os derivados, poços 6 ao 8, demonstram que as interações entre as enzimas e delas com a octil-agarose e agentes reticulantes não resistiram ao tampão de ruptura e a temperatura de 100°C, sendo desessorvidas do suporte, o que sugere ausência ou fragilidade de ligações covalentes fortes. Na presença de forte entrecruzamento entre enzimas e agentes reticulantes, as bandas referentes à PFL não seriam visíveis no biocatalisadores reticulados (RIOS *et al.*, 2019b).

A primeira camada de enzimas foi adsorvida por interações hidrofóbicas ao suporte de octil-agarose e reticulada com os agentes de entrecruzamento, enquanto a segunda camada foi adsorvida a primeira camada, tornando as ligações fracas predominantes na construção do biocatalisador. Desse modo, as condições oferecidas durante a incubação no tampão de ruptura foram capazes de desnaturar as enzimas, tanto pela quebra das pontes de dissulfeto pelo  $\beta$ -mercaptoetanol do tampão de ruptura (HERMANSON, 2013) quanto pela alta temperatura (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021), prejudicando as interações das lipases com o suporte e promovendo a liberação da PFL do biocatalisador.

Contudo, o caráter qualitativo dessa análise não permite quantificar a liberação de proteínas, assim, observando as bandas dos poços 6 ao 8 é possível que apenas a segunda camada de enzimas tenha sido liberada do biocatalisador, o que é corroborado pela semelhança entre a intensidade das bandas de O-P, composta por apenas uma camada de PFL, e de O-P-G-P e O-P-D-P, compostas por duas camadas de PFL. Então, não é possível concluir que todas as lipases foram liberadas dos biocatalisadores reticulados apenas com a avaliação dos resultados da Eletroforese SDS-PAGE.

### 5.2.2 Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

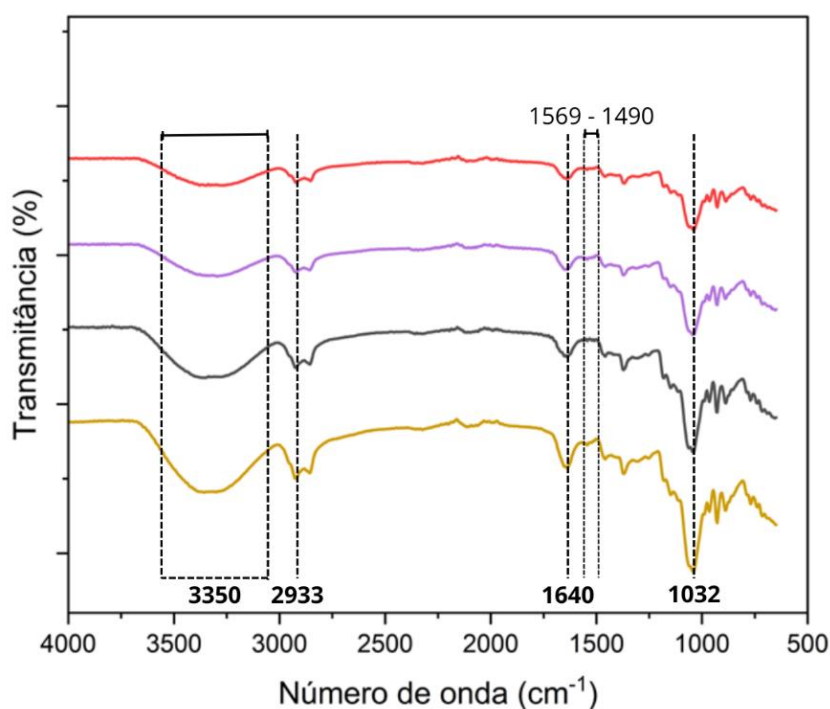
Os espectros de infravermelho da Figura 15 foram utilizados para compreensão das estruturas químicas dos biocatalisadores e sua associação aos resultados obtidos nos demais estudos, sendo investigado o caráter híbrido das interações entre a PFL, os agentes de entrecruzamento e suporte de octil-agarose. Buscando-se compreender a influência que as ligações covalentes podem exercer nas características dos biocatalisadores.

A banda larga com centro por volta de  $3400\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de -OH, associado à ligação de hidrogênio das hidroxilas nos polímeros de glicose (YANG *et al.*, 2010), representando as interações desses grupamentos tanto na estrutura polimérica de octil-agarose, aumentando a intensidade com a presença de dextrana aldeído. O número de onda próximo de  $2932\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento de -CH, tendo contribuições da presença da enzima (YANG *et al.*, 2010) e polímeros (GONÇALVES NETO *et al.*, 2023), por essa razão, todos os biocatalisadores registram transmitância nesse valor.

Também há uma banda característica de polímeros de glicose na faixa de  $1015 - 1200\text{ cm}^{-1}$  associada ao alongamento da ligação C-O (SANTOS *et al.*, 2022b), a maior disponibilidade desse grupamento é encontrada nas moléculas de cadeia longa e consequentemente mais hidrofóbicas, octil-agarose e dextrana aldeído, amostras OA e O-P-

D-P, respectivamente. Esse fator corrobora para a influência positiva da hidrofobicidade na atividade recuperada de O-P-D-P (Tabela 3).

Figura 15 – Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) na faixa de  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  com indicação (linha pontilhada) de números de onda representativos de octil-agarose (—) e de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem, O-P (—), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (—), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (—).



FONTE: Elaborada pela autora.

Os espectros das proteínas podem ser classificados em bandas amida baseadas na molécula modelo de N-metil-acetamida: Amidas I, II, III e A (RIOS, 2016). A região de amida I tem pico centrado por volta de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  e de amida II em  $1400 \text{ cm}^{-1}$  (RIOS, 2016), ambas regiões são detectáveis em dois pequenos picos identificados entre  $1490 \text{ cm}^{-1}$  e  $1569 \text{ cm}^{-1}$ , apresentando-se em maior intensidade em O-P-D-P, mas também sendo detectados em O-P e O-P-G-P. Esse dado pode indicar maior presença de lipases detectáveis em O-P-D-P.

O número de onda próximo de  $1640 \text{ cm}^{-1}$  foi amplamente descrito como indicativo da presença de imina ( $-\text{C}=\text{N}-$ ) como resultado da reação entre o aldeído e grupos amina, nesse trabalho, provenientes das enzimas (YANG *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2022b). Dentre as amostras, a O-P-D-P foi aquela que apresentou menor transmitância e, portanto, maior absorbância, indicando ser a amostra mais provável de haver formado ligação covalente entre o agente de entrecruzamento e as lipases.

O entrecruzamento promovido pela ligação imina possibilita a conexão intermolecular entre as lipases, quanto maior a intensidade dessa conexão maior a probabilidade de o biocatalisador manter-se íntegro e ativo (ORREGO *et al.*, 2018). Esse fator colabora para o aumento da resistência do biocatalisador reticulado com dextrana aldeído, podendo contribuir para a redução da dessorção de enzimas (RIOS *et al.*, 2019c) e aumento de estabilidade frente às condições de reação, como temperatura e pH (CEJUDO-SANCHES *et al.*, 2020; ORREGO *et al.*, 2018).

### 5.3 Ensaio de estabilidade dos biocatalisadores

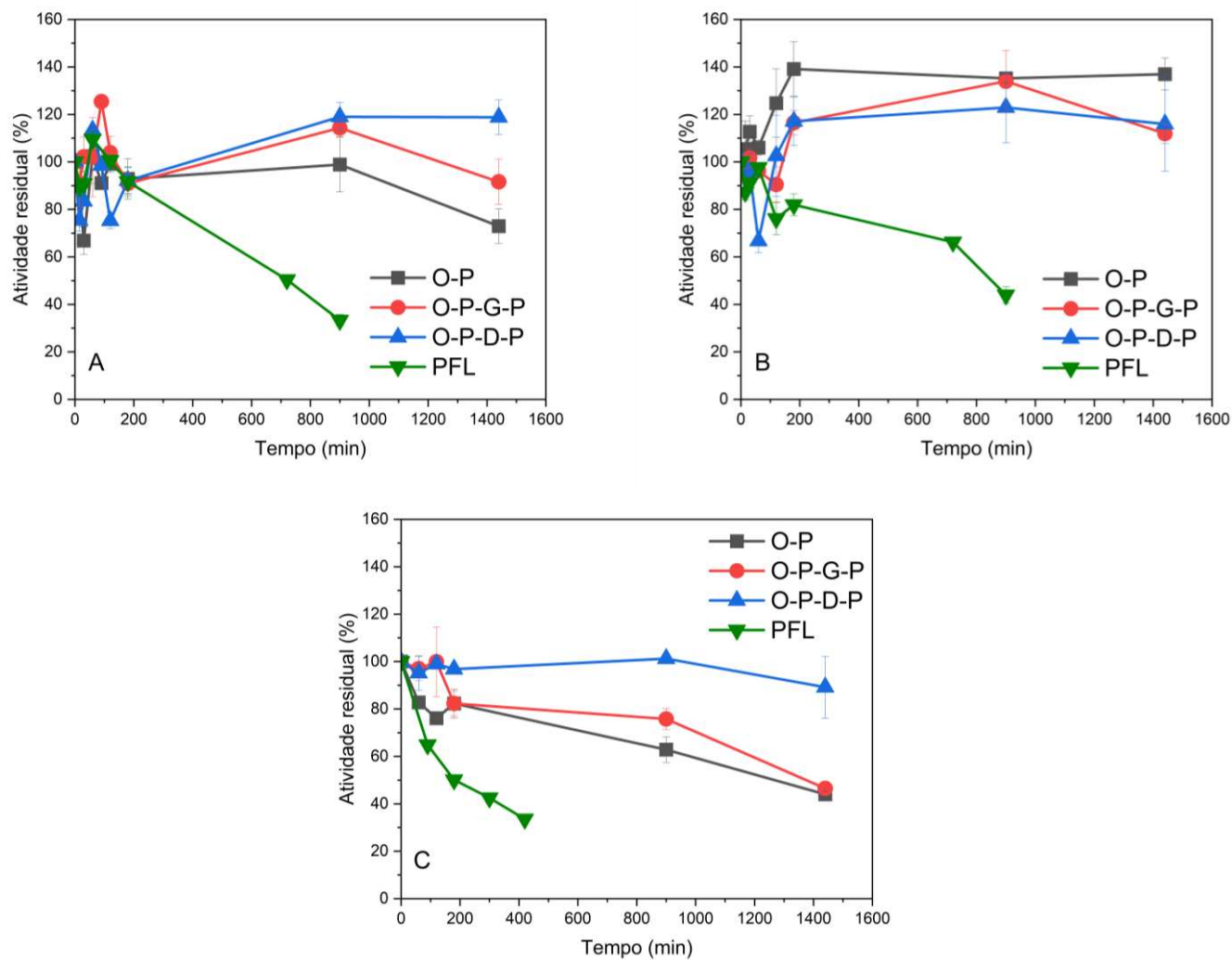
O comparativo entre os três ensaios de estabilidade térmica nas temperaturas de 60°C e 70°C e de pHs 5,0 e 7,0 é apresentado na Figura 16. A amostra O-P aproximou-se de 70% da sua atividade residual após 1440 min (24 h) de incubação a 60 °C em pH 7,0 (Figura 16A), diferentemente dos dois outros biocatalisadores, sendo o O-P-D-P beneficiado por essa temperatura, visto que sua atividade aumentou e se manteve com atividade residual acima de 100% a partir de 900 min (15 h) de incubação.

Já os resultados da incubação à 60 °C e pH 5,0 (Figura 16B) demonstraram que os biocatalisadores foram positivamente influenciados pela redução do pH, alcançando até 140% de atividade residual no caso de O-P, em que as enzimas estavam mais expostas ao meio reacional e puderam receber melhor os efeitos do pH. Esse resultado é relevante ao considerar-se a redução de pH induzida pela liberação de ácidos graxos em consequência da hidrólise de lipídios, reação-alvo deste trabalho. Rios *et al.*, (2019c) observaram que a PFL imobilizada em octil-agarose apresentou maior estabilidade ao ser incubada nos pHs 5,0 e 7,0, sendo a mais estável quando comparada a lipase de *Rhizomucor miehei* e a fosfolipase Lecitase Ultra.

Na temperatura de 70 °C e pH 7,0, (Figura 16C) os biocatalisadores O-P e O-P-G-P se aproximaram de 50% de atividade residual por volta de 1440 minutos de incubação, enquanto O-P-D-P manteve-se com atividade residual acima de 80% nesse período de tempo, sendo o mais estável termicamente. Dado que os biocatalisadores apresentaram-se estáveis nessas condições, espera-se que esse comportamento se mantenha em condições mais brandas, temperatura ambiente e pH neutro, em que se conduz boa parte das reações de hidrólise e tratamento de efluentes (BAENA *et al.*, 2022).



Figura 16 – Estabilidade térmica nas condições: 60 °C e pH 7,0 (A), 60 °C e pH 5,0 (B) e 70 °C e pH 7,0 (C) de lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (AI de 2,5 U/mL, ▼) e imobilizada em octil-agarose sem (AI de 37,4 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (AI de 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (AI de 51,8 U/g, ▲), dados em média de atividade residual com desvio-padrão.



FONTE: Elaborada pela autora.

Em todos os ensaios O-P-D-P demonstrou a tendência de manter-se estável por mais tempo do que O-P-G-P, indicando a superioridade do uso de dextrana aldeído como agente de reticulação para a estabilidade térmica da lipase imobilizada.

Santos *et al.* (2022b) incubaram seus biocatalisadores em n-hexano à 70 °C por 8h e registraram atividade residual acima de 70% para PFL imobilizada em quitosana funcionalizada com amido polialdeído, enquanto a funcionalização com glutaraldeído culminou no valor próximo de 60%, ambos superiores à enzima livre, abaixo de 40%. Reafirmando tanto a importância da imobilização quanto da utilização dos agentes de entrecruzamento na estabilidade térmica da PFL.

Os dados de constante de desativação térmica e tempo de meia-vida são apresentados na Tabela 4. A amostra O-P apresentou o menor tempo de meia-vida dentre os biocatalisadores, com o ajuste obtido para o estudo cinético de O-P apresentado na Figura 17, contudo os valores dos ajustes e tempos de meia-vida de O-P-G-P e O-P-D-P não puderam ser estimados de forma mais acurada dada a imprevisibilidade do comportamento dos biocatalisadores em períodos de tempo acima de 24 horas, período de tempo em que os dados foram coletados.

Tabela 4 – Parâmetros de inativação térmica de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem (O-P) e com reticulação por glutaraldeído (O-P-G-P) ou dextrana (O-P-D-P), constante de desativação térmica ( $k_D$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), comparados aos  $t_{1/2}$  encontrados na literatura para PFL imobilizada em outros suportes.

Amostra	Temperatura (°C)	$k_D$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
PFL solúvel pH 5,0	60	$8,15 \times 10^{-4}$	847,01
PFL solúvel pH 7,0	60	$9,70 \times 10^{-4}$	711,67
PFL solúvel pH 7,0	70	$3,20 \times 10^{-3}$	215,71
O-P pH 7,0	70	$6,06 \times 10^{-4}$	1138,95
O-P-G-P pH 7,0	70	*	>1440
O-P-D-P pH 7,0	70	*	>1440
TEOS-NN-BQ-PFL pH 7,0 <sup>1</sup>	60	NR	>1440
TEOS-NN-BQ-PFL pH 5,0 <sup>1</sup>	60	NR	243,42
TEOS-NN-BQ-PFL pH 10,0 <sup>1</sup>	60	NR	350,11
OCT-NN-PFL-DV 1% pH 7,0 <sup>2</sup>	60	NR	652,35
OCT-NN- PFL-GA 5% pH 7,0 <sup>2</sup>	60	NR	649,59

FONTE: Elaborada pela autora.

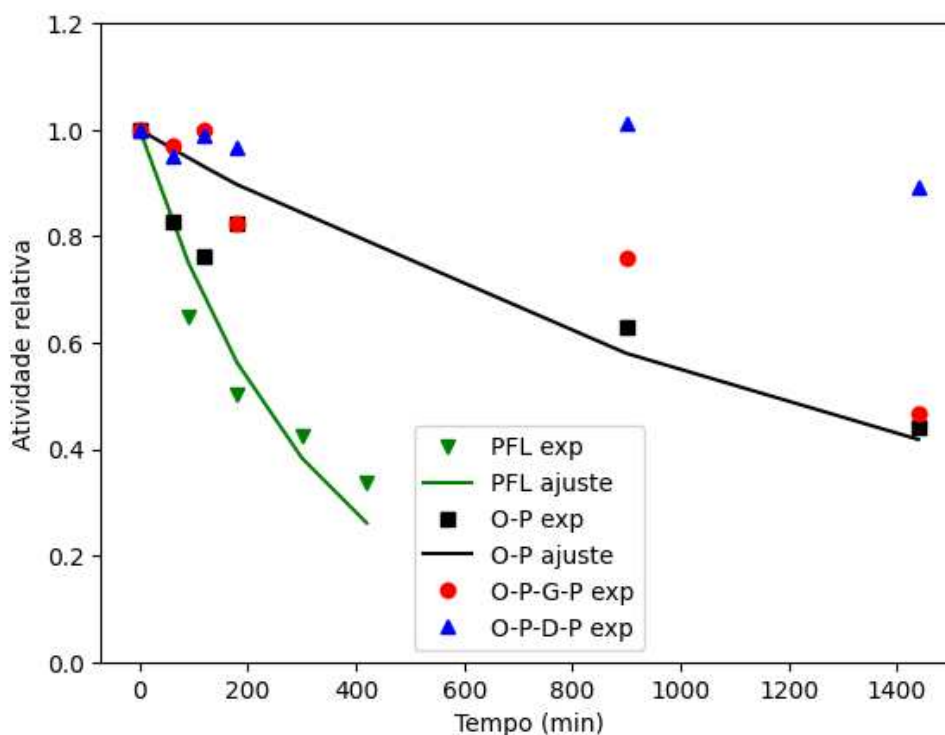
<sup>1</sup> Rios *et al.* (2019d).

<sup>2</sup> Rios *et al.* (2019b).

Legenda: \* Valor não-estimado, pois a atividade residual não alcançou 50% dentro de 24 horas; NR – Não reportado; TEOS-NN-BQ-PFL - Nanopartículas superparamagnéticas de NiZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> revestidas com sílica por impregnação com tetraetoxissilano e ativadas com 0,1 M *p*-benzoquinona para imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens*; OCT-NN-PFL-DV 1% - Nanopartículas superparamagnéticas de NiZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> octil

quimicamente modificadas com divinilsulfona 1%; OCT-NN- PFL-GA 5% - Nanopartículas superparamagnéticas de  $\text{NiZnFe}_2\text{O}_4$  octil quimicamente modificadas com glutaraldeído 5%.

Figura 17 – Estabilidade térmica a 70°C e pH 7,0 de lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (AI de 2,5 U/mL, ▼), ajuste ( $R^2$ ) 0,9215, e imobilizada em octil-agarose sem (AI de 37,4 U/g, ■), ajuste ( $R^2$ ) de 0,6995, e com reticulação por glutaraldeído (AI de 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (AI de 51,8 U/g, ▲).



FONTE: Elaborada pela autora.

Todos os biocatalisadores superaram o tempo de meia-vida da PFL livre, mesmo com a enzima solúvel apresentando alta estabilidade. A imobilização foi eficiente em aumentar o tempo de meia-vida da PFL na condição de 70°C e pH 7,0 em um fator de 5 vezes no caso de O-P e em mais de 6 vezes no caso dos biocatalisadores reticulados.

Amorim (2022) em seu estudo incubando PFL solúvel a 60°C e pH 7,0, em tampão TRIS-HCl 50 mM, reportou tempo de meia-vida de 2,24 h (134,4 min), valor menor do que o obtido neste trabalho (711,67 min). Essa diferença pode ser registrada devido a composição e concentração das soluções tampão, que interferem diretamente na estabilidade da enzima e na presença de dímeros, que são reportados para PFL como sendo termicamente mais estáveis do que os monômeros (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003).

Os dados obtidos para tempos de meia-vida a 70°C foram comparáveis aos biocatalisadores a base de suporte magnético com ligações covalentes a 60°C (RIOS *et al.*,

2019d, 2019b), demonstrando que os biocatalisadores deste trabalho, apesar de serem obtidos majoritariamente por adsorção, não tiveram sua estabilidade térmica afetada frente aos biocatalisadores compostos por conexões mais fortes.

Os resultados verificados no ensaios realizados em diferentes condições indicam o impacto positivo que a reticulação causou na estabilidade térmica dos biocatalisadores, além disso, a presença de uma camada externa de enzimas nos suportes reticulados também pode ter atuado como proteção a camada interna conforme tem-se observado para a imobilização de camadas sucessivas de enzimas (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020a, ZAAK *et al.*, 2017a).

Apesar da inativação de pouco mais de 50% de sua atividade após 1440 minutos à 70 °C e pH 7, o biocatalisador O-P se mostra bastante estável frente a outros casos de PFL imobilizada em baixa carga de proteínas em octil-agarose, com dados apontando para tempos de meia-vida aparentes próximos ou abaixo de 200 minutos (RIOS *et al.*, 2019a; ARANA-PEÑA *et al.*, 2020b) sob influência da composição e força iônica do tampão utilizado, sendo discutida a interferência negativa de ânions de fosfato sobre a atividade e, consequentemente na estabilidade, de lipases (RIOS *et al.*, 2019a; ARANA-PEÑA *et al.*, 2020b; Zaak *et al.*, 2017b).

A estabilidade da amostra O-P-D-P pode estar associada com a maior disponibilizade de aldeídos e consequente formação de uma fração de ligações covalentes entre as enzimas e a dextrana aldeído, que já foi reportada como forte contribuinte para aumento da termoestabilidade (RODRIGUES *et al.*, 2019). A resistência do biocatalisador pode ser aumentada por dois fatores: pela barreira aos fatores externos, proporcionada pelas amplas moléculas de dextrana, e pela formação de entrecruzamento covalente (CEJUDO-SANCHES *et al.*, 2020; SOJITRA; NADAR; RATHOD, 2017).

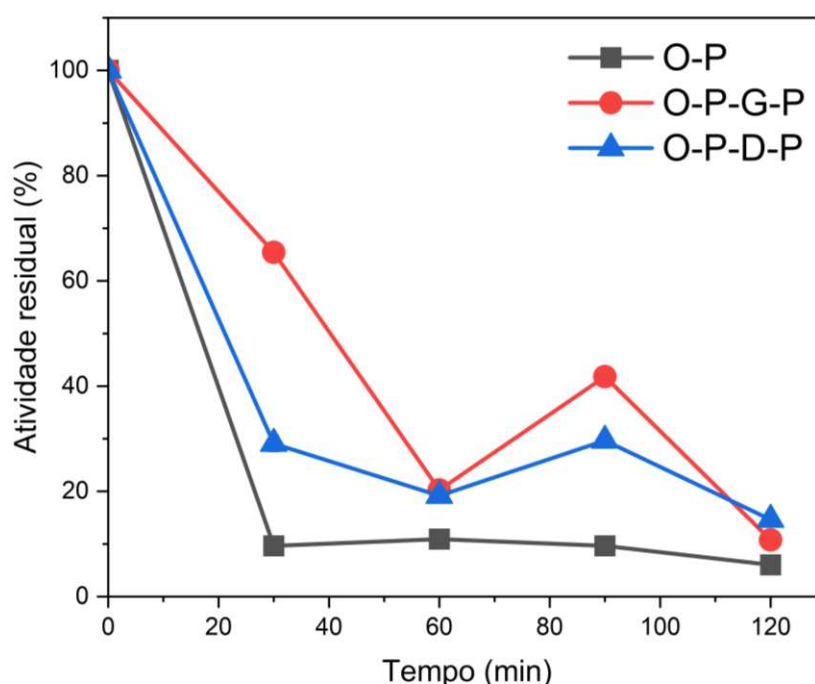
As ligações covalentes formadas com o entrecruzamento aumentam a rigidez da estrutura enzimática, contribuindo para sua resistência à perda de atividade diante de fontes de calor, variações de pH e solventes orgânicos (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995).

Cejudo-Sanches *et al.* (2020) registraram o aumento do tempo de meia-vida do biocatalisador conforme se aumentava o peso molecular da dextrana utilizada, obtendo tempo de meia-vida de 94 h a 55 °C e pH 7,0 ao utilizar dextrana de 40 kDa na imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em octil-agarose reticulada com *poly-allylamine* (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N)<sub>n</sub>, polímero lineal catiônico e hidrofílico, somada ao entrecruzamento adicional por dextrana aldeído. Esse fator corrobora com o impacto positivo na estabilidade térmica causado pela escolha de uma dextrana de alto peso molecular (450 – 650 kDa) para este trabalho.

#### 5.4 Ensaio de dessorção em Triton X-100

Na Figura 18 são apresentados os resultados desse ensaio para os três biocatalisadores desse trabalho. A dessorção de lipases quase completa ocorreu primeiramente no biocatalisador O-P, após 30 minutos de incubação no detergente, enquanto O-P-D-P manteve cerca de 30% da atividade residual e O-P-G-P foi o mais resistente, com atividade residual acima de 60%.

Figura 18 – Dessorção em Triton X-100 4%, com dados apresentados como média de atividade residual com desvio-médio lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem (atividade inicial 37,4 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (atividade inicial 50,3 U/g, ●) ou dextrana aldeído (atividade inicial 51,8 U/g, ▲).



FONTE: Elaborada pela autora.

O catalisador O-P manteve-se praticamente constante de 30 minutos até 2 horas de ensaio, mas os biocatalisadores reticulados apresentaram leve aumento de atividade aos 90 minutos de incubação, provavelmente em decorrência da difusão de detergente em baixa concentração para o interior das partículas, gerando ativação interfacial das enzimas remanescentes, devido às interações hidrofóbicas com Triton X-100, que também interfere nos agregados bimoleculares de lipase (LIMA *et al.*, 2013).

Outra explicação para esse comportamento de aumento de atividade se deve a proteção oferecida pelos agentes de entrecruzamento, fazendo com que a dessorção ocorresse primeiramente na camada mais externa de PFL, expondo a camada mais interna, que manteve-se ativa e, em seguida, também foi dessorvida.

Foi reportado na literatura que a dessorção total de lipases imobilizadas por adsorção ocorre com 1 hora de incubação em Triton X-100 4% (ARANA-PEÑA *et al.*, 2019), portanto, O-P-G-P e O-P-D-P mantiveram-se ativos por cerca de 30 minutos a mais devido a proteção que a reticulação e a segunda camada de PFL ofereceram para a primeira camada de PFL.

Com a difusão de detergente através das partículas dos biocatalisadores ao longo do tempo, foi possível observar a dessorção enzimática quase completa das enzimas dos catalisadores reticulados ao fim das 2 horas de incubação, com O-P-D-P e O-P-G-P apresentando atividade residual final de  $14,64 \pm 1,17\%$  e  $10,78 \pm 0,30\%$ , respectivamente.

Esse ensaio sugere a importância em se reforçar a resistência a detergentes do biocatalisador empregado no tratamento de efluentes, tendo em vista que boa parte dos efluentes industriais apresenta traços ou grandes quantidades de agente higienizantes ou sanitizantes em sua composição, sendo os detergentes altamente empregados no caso de efluentes ricos em lipídios (NIMKANDE; BAFANA, 2022). A baixa resistência dos biocatalisadores está relacionada com o método de imobilização por adsorção, visto que nesse método as enzimas estão fracamente conectadas ao suporte em comparação à imobilização por ligação covalente.

Rios *et al.* (2019a), imobilizando a PFL em suporte de glioxil-octil-agarose, realizaram a imobilização covalente em um processo de 20 horas em pH 10,5 para possibilitar a ligação entre os resíduos de lisina na lipase interfacialmente adsorvida e os grupos glioxil do suporte, enquanto a adsorção ocorreu de forma mais rápida e em pH 7,0, evidenciando a maior complexidade do primeiro processo em relação ao segundo. A formação do entrecruzamento é capaz de conferir maior resistência à dessorção da PFL em Triton X-100 4%, inclusive ao ser incubada nele a 70°C (RIOS *et al.*, 2019c).

Entretanto, vale ressaltar que esse ensaio é conduzido com o intuito de investigar a dessorção total de enzimas, sendo, portanto, conduzido com detergente em alta concentração (4%). Detergentes alcalinos utilizados na indústria de laticínios para saponificação de gorduras são empregados em concentração entre 0,15 e 5% a depender do nível de sujidade (PANT *et al.*, 2023), sendo ainda diluídos ao longo das etapas de lavagem. A taxa de dessorção de lipase varia de acordo com a concentração de detergente, logo o

emprego dos biocatalisadores deste trabalho pode ser viabilizado em menores concentrações de detergentes.

O outro fator trata-se do benefício da dessorção, que se concentra na recuperação e possibilidade de reutilização do suporte de octil-agarose, que seria inviável no caso da formação de ligações covalentes entre o suporte e as enzimas (RODRIGUES *et al.*, 2019), enquanto neste trabalho pôde ser parcialmente realizada apenas com o uso do detergente, propiciando a recuperação da octil-agarose e compensando o investimento monetário de sua aquisição através da reutilização.

### 5.5 Atividade hidrolítica frente a diferentes efluentes formulados

As características dos efluentes formulados utilizados no ensaio de atividade hidrolítica foram compiladas na Tabela 5, contando com densidade, viscosidade, concentração de substrato e teor de gordura saturada, para análise dos resultados obtidos a partir de sua hidrólise pela PFL solúvel e imobilizada em octil-agarose sem reticulação (O-P).

Tabela 5 – Características dos efluentes formulados utilizados no ensaio de hidrólise à 37°C por 20 min com a lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel e imobilizada.

Substrato	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade (mPa·m)	Gorduras Totais (g/mL)*	Gorduras saturadas (g/mL)*
Azeite	897,4 <sup>1</sup>	40,1 <sup>1</sup>	0,145 <sup>2</sup>	0,021 <sup>2</sup>
Óleo de soja	903,3 <sup>1</sup>	31,3 <sup>1</sup>	0,144 <sup>2</sup>	0,025 <sup>2</sup>
Leite	NE	NE	0,033 <sup>2</sup>	0,019 <sup>2</sup>

FONTE: Elaborada pela autora.

<sup>1</sup> Sahasrabudhe *et al.* (2017), valor estimado a 40 °C.

<sup>2</sup> Valor calculado a partir das tabelas nutricionais do azeite de oliva (Gallo®), óleo de soja (Soya®) e leite (Ninho®).

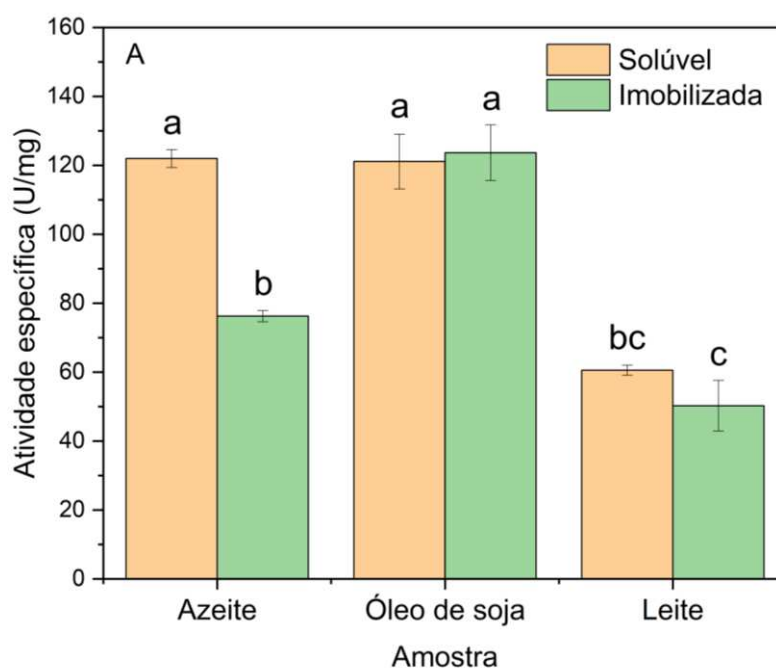
Legenda: \*Valor calculado para a emulsão utilizada no ensaio de atividade hidrolítica apresentado na secção 4.2.10;

NE – Valores não estimados.

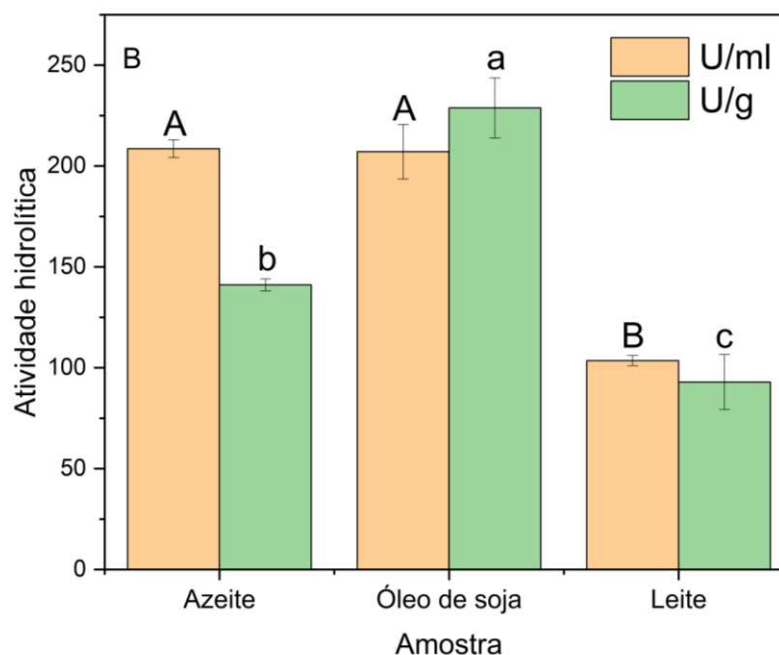
Considerando as informações nutricionais do azeite e óleo de soja da Tabela 5, a solução de azeite antes da hidrólise apresentava quantidade de gorduras totais pouco maior do que a de óleo de soja, diferindo entre si principalmente com relação ao teor de gorduras saturadas, em que a solução de azeite de oliva contava com menor teor de gorduras saturadas do que a solução de óleo de soja. Inicialmente, avaliou-se o potencial de hidrólise da enzima livre, aplicando-se 0,086 mg de proteína por amostra, e imobilizada, utilizando-se também cerca

de 0,086 mg de proteína imobilizada, diante de azeite, óleo de soja e leite, os resultados desse ensaio podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 – Atividade específica (A), U/mg de proteína, e atividade enzimática (B), U/ mL de solução enzimática ou g de biocatalisador, para hidrólise à 37 °C por 20 minutos com lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (amarelo) e imobilizada em octil-agarose, O-P (verde), frente a azeite, óleo de soja e leite.



\* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey a um nível de 5%.



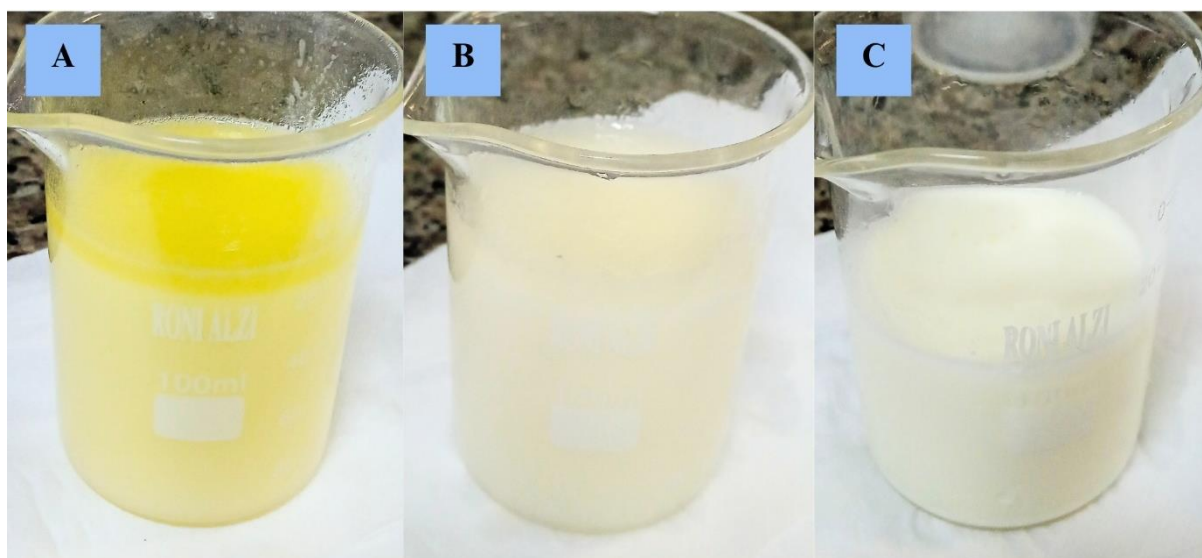


FONTE: Elaborada pela autora.

\* As letras maiúsculas diferentes nas colunas amarelas indicam que há diferença significativa entre as amostras submetidas à enzima livre pelo teste de Tukey a um nível de 5%. As letras minúsculas nas colunas verdes indicam que há diferença significativa entre as amostras submetidas ao biocatalisador O-P.

A semelhança entre as soluções de azeite e óleo de soja proporcionaram atuação equivalente para a enzima livre. Contudo, observa-se maior eficiência hidrolítica contra o óleo de soja para a enzima imobilizada. Na temperatura de 40 °C, próxima dos 37 °C utilizados da reação de hidrólise, a viscosidade do azeite corresponde a 40,1 mPa·m, enquanto o óleo de soja apresenta 31,3 mPa·m (SAHASRABUDHE *et al.*, 2017). Essa diferença de viscosidade facilita a homogeneização do meio reacional, a estabilidade da emulsão e beneficia a interação do biocatalisador com seu substrato, devido à redução da limitação de difusão e transferência de massa (SURESH *et al.*, 2021). Ademais, a Figura 20A sugere que a emulsão de azeite é menos estável do que as demais misturas, devido a formação de uma camada de gordura sobrenadante, concentrada após 10 minutos de repouso das misturas.

Figura 20 – Emulsões preparadas com azeite (A), óleo de soja (B) e leite (C) para ensaio de atividade hidrolítica.



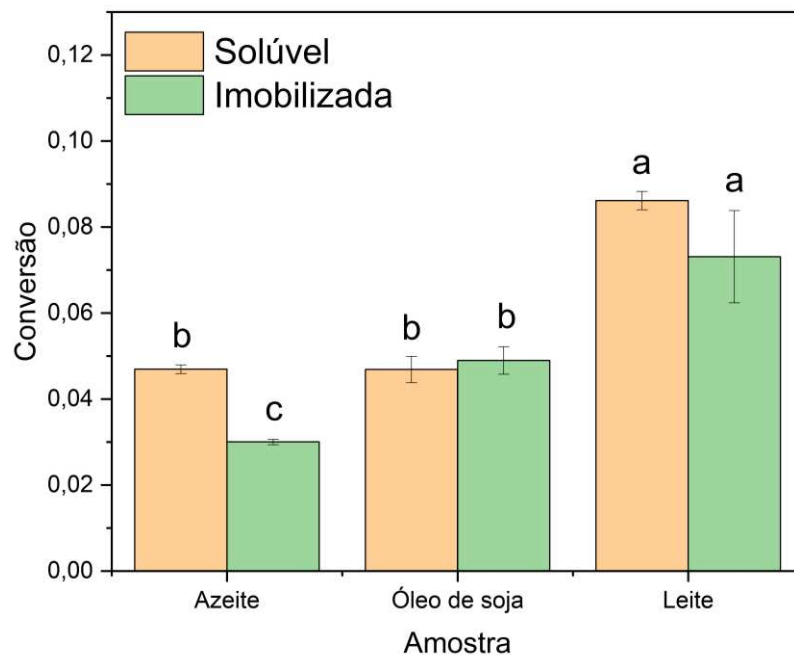
FONTE: Elaborada pela autora.

As enzimas livre e imobilizada hidrolisaram os óleos vegetais de forma mais eficiente do que a gordura do leite, sendo a solução de leite a de menor concentração de gordura antes da hidrólise (Tabela 5). Além da amostra apresentar menor quantidade de substrato disponível frente as duas outras, esse resultado pode ser consequência da composição

diversificada do leite, cujos carboidratos e proteínas são capazes de interferir na interação da lipase com os lipídios, sendo importante pôr em prática uma razão concentração de enzima/concentração de efluente adequada, de modo a reduzir essa interferência (NEVES *et al.*, 2024).

Na Figura 21 observa-se a estimativa para conversão dos lipídios com a hidrólise pela lipase livre e imobilizada. A menor quantidade de substrato oferecida pela solução de leite foi benéfica para o cálculo desse parâmetro, a qual foi a fonte de lipídio que apresentou valor de conversão mais alta, especialmente pela enzima solúvel. Ademais, não houve diferença significativa entre a enzima solúvel e imobilizada frente ao leite, o que indica a baixa influência de limitações difusionais causadas pela imobilização da enzima.

Figura 21 – Conversão de lipídios em ácidos graxos para a hidrólise realizada à 37 °C por 20 min com lipase de *Pseudomonas fluorescens* solúvel (amarelo) e imobilizada em octil-agarose, O-P (verde), frente a azeite, óleo de soja e leite.



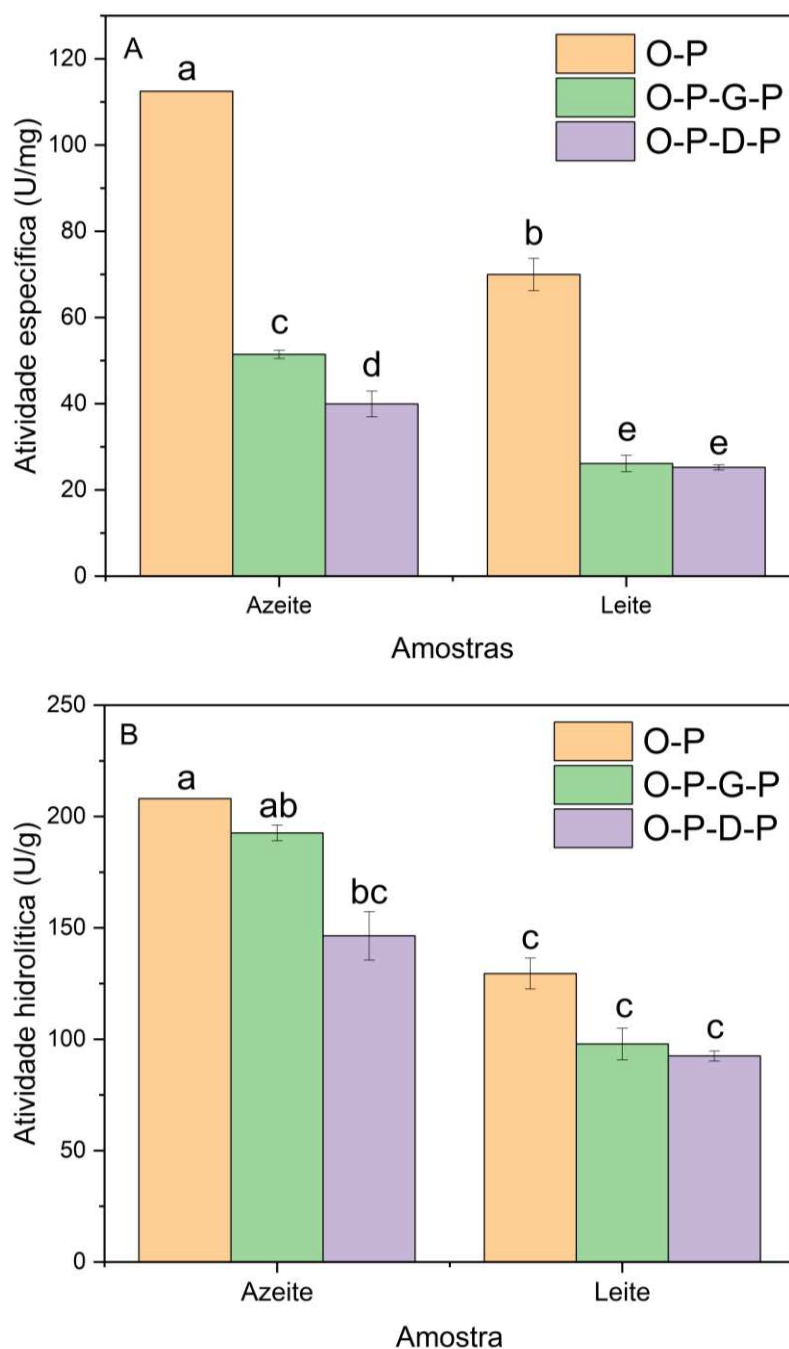
FONTE: Elaborada pela autora.

\* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey a um nível de 5%.

Em seguida, aumentou-se a massa de biocatalisador empregada nos ensaios para padronização, estabelecendo-se 50 mg de biocatalisador por amostra, com aproximadamente 0,1 mg de proteína imobilizada, e se compararam as performances dos biocatalisadores,

reticulados ou não, quanto à hidrólise de azeite e leite. Os resultados estão compilados na Figura 22.

Figura 22 – Atividade específica (A), U/mg de proteína, e atividade enzimática (B), U/g de biocatalisador, para hidrólise à 37 °C por 20 minutos com lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem, O-P (amarelo), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (verde), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (lilás), frente a azeite e leite.



FONTE: Elaborada pela autora.

\* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa entre as amostras submetidas aos biocatalisadores pelo teste de Tukey a um nível de 5%.

Os valores de atividade específica dos biocatalisadores reticulados se mostram reduzidos frente aos valores do biocatalisador não-reticulado e essa diferença se dá devido a presença da segunda camada de lipases nos reticulados, aumentando sua quantidade de proteína. Além disso, a Figura 22B também indica certa superioridade do catalisador O-P com relação aos demais, especialmente O-P-D-P.

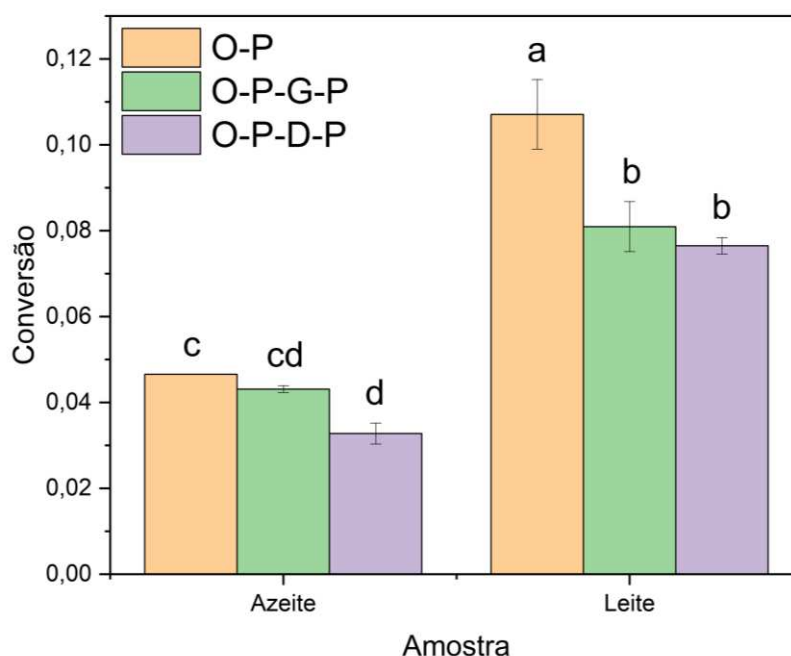
Essa maior eficiência, possivelmente, se deve ao fácil acesso das lipases ao substrato, o que depende da difusividade através da camada de agentes de entrecruzamento nos biocatalisadores reticulados, de modo que os substratos apresentam acesso dificultado à primeira camada de lipase, sob esses agentes (ARANA-PEÑA *et al.*, 2021). Esse caminho é mais curto com a reticulação por glutaraldeído do que com a reticulação por dextrana aldeído, o que justifica a maior atividade hidrolítica de O-P-G-P frente a O-P-D-P, apesar de não diferirem significativamente ao considerar-se a hidrólise do azeite e do leite individualmente. O fato dos substratos se tratarem de macromoléculas também contribui para limitações difusionais (NADAR; RATHOD, 2016).

Bourlieu *et al.* (2012) avaliaram a eficiência hidrolítica de lipases sn-1,3 específicas, de *Pseudomonas fluorescens* e de *Mucor miehei*, e não-específica, de *Candida rugosa*, frente à emulsão natural de gordura do leite e uma emulsão modelo baseada na homogeneização da gordura do leite, sendo a eficiência hidrolítica menor frente à emulsão natural. Ademais, identificaram que a utilização de um pré-tratamento do substrato por proteases aumenta a taxa inicial de hidrólise, evidenciando, assim, que a menor eficiência hidrolítica da PFL com relação ao leite diante do azeite é principalmente decorrente da interferência dos demais componentes do leite, incluindo proteínas, lipoproteínas e lipídios polares, como os fosfolipídios, que são mais rapidamente hidrolisados por *Mucor miehei* do que PFL.

A atividade específica contra a emulsão modelo de gordura do leite anidra foi de 165,1 U/mg, 16,8 U/mg e 0,5 U/mg para lipase de *P. fluorescens*, *M. miehei* e *C. rugosa*, respectivamente (BOURLIEU *et al.*, 2012). Mesmo diante de um substrato otimizado para a reação de hidrólise, esses valores foram comparáveis aos valores obtidos neste trabalho contra a gordura do leite natural de 69,97 U/mg, 26,12 U/mg e 25,21 U/mg para O-P, O-P-G-P e O-P-D-P (Figura 19A).

Na Figura 23 é possível observar a conversão estimada para a hidrólise do azeite e do leite. Novamente registrou-se a maior conversão da gordura do leite frente ao azeite e isso também pode ser atribuído a menor concentração de substrato oferecida pela solução de leite, além disso, as limitações difusionais provocadas pela presença da camada de reticulação podem explicar a diferença significativa entre O-P e os biocatalisadores reticulados.

Figura 23 – Conversão de lipídios em ácidos graxos para a hidrólise realizada à 37 °C por 20 min com lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem, O-P (amarelo), e com reticulação por glutaraldeído, O-P-G-P (verde), ou dextrana aldeído, O-P-D-P (lilás) frente a azeite e leite.



FONTE: Elaborada pela autora.

\* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa entre as amostras submetidas aos biocatalisadores pelo teste de Tukey a um nível de 5%.

Ao comparar-se as Figuras 21 e 23, é possível observar que o aumento de massa de biocatalisador empregado na reação aumentou a conversão de cerca de 8% (0,08) para 11% (0,11). Esse resultado indica a importância da quantidade de biocatalisador utilizada no processo para a obtenção de valores de conversão satisfatórios.

Os valores de conversão do leite (Figura 23) são relevantes frente à reação alvo, visto que neste trabalho utilizou-se soluções de leite com concentração de 0,033 g/mL (33,0 g/L) para a reação de hidrólise, enquanto a concentração de lipídios nas águas residuais de

fábricas de laticínios especializadas na produção de produtos com alto teor de gordura é de 0,2 a 0,4 g/L, tendo sido relatados valores de até 2,88 g/L em fábricas de manteiga, contudo, geralmente, em indústrias de laticínios esse valor não excede 0,1 g/L (SLAVOV, 2017). Portanto, espera-se que os biocatalisadores obtidos sejam mais eficientes na hidrólise de efluentes da indústria de laticínios, menos concentrados, do que foram nos efluentes formulados de alta concentração estudados.

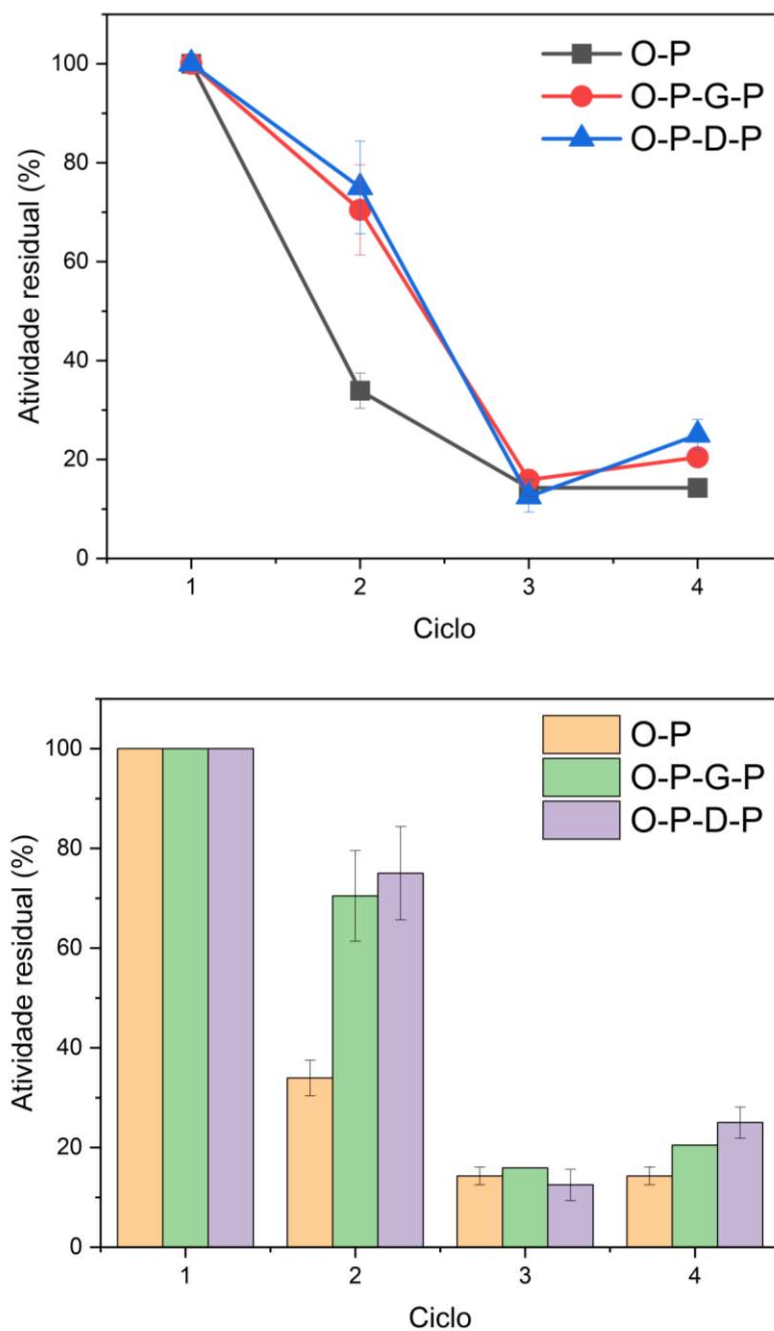
## 5.6 Ciclos de hidrólise do efluente formulado de leite

A Figura 24 apresenta os resultados dos ciclos de hidrólise do efluente formulado de leite utilizando os biocatalisadores a base de octil-agarose produzidos neste trabalho. Pode-se observar que o potencial para reuso desses catalisadores foi de até dois ciclos. Contudo, a reprodutibilidade do ensaio foi comprometida pelos procedimentos sucessivos de centrifugação e lavagem, visto que o processo de centrifugação não somente separou os biocatalisadores do fluido, mas ocasionou a sedimentação de proteínas do leite e flotação de sua gordura, gerando perdas no processo de recuperação dos catalisadores.

Com esse ensaio, o potencial de recuperação dos biocatalisadores reticulados, O-P-G-P e O-P-D-P, é aparentemente maior do que de O-P, que possivelmente sofreu dessorção de enzimas durante o processo de centrifugação ou devido ao contato com moléculas hidrofóbicas que se agregaram. Isso é corroborado pelos resultados obtidos nos ensaios de dessorção em Triton X-100 (Figura 18), em que foi observada a dessorção da PFL de todos os biocatalisadores, conforme se prolongou seu contato com o detergente. Ademais, o procedimento pode ser modificado, de modo a tornar a recuperação mais eficiente, reduzindo a perda de biocatalisador.

Apesar de não manterem atividade acima de 2 ciclos, os biocatalisadores podem ser mais eficientes na hidrólise com o aumento do tempo de reação. Um dos benefícios do uso de lipases microbianas é a sua alta atividade, sendo essa eficiência capaz de promover altas taxas de conversão em curtos intervalos de tempo (ALI *et al.*, 2023). Bourlieu *et al.* (2012) verificaram a alta atividade entre 50 e 70 minutos de reação, mas também enfatizaram a existência do curto tempo de fase de atraso inicial de 4 minutos para a PFL frente a hidrólise da gordura do leite à 30°C em decorrência da matriz complexa e da baixa atividade fosfolipase da PFL, registrada em cerca de 0,8 U/mg e melhor frente à outras enzimas, como de *Candida rugosa*, que não apresenta essa atividade e gera tempo de atraso de 13 minutos.

Figura 24 – Atividade residual com desvio-médio da hidrólise do leite à 37°C por 20 minutos em ciclos reacionais para lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-agarose sem (atividade inicial 129,44 U/g, ■) e com reticulação por glutaraldeído (atividade inicial 97,85 U/g, ●) ou dextrana aldeído (atividade inicial 92,46 U/g, ▲).



FONTE: Elaborada pela autora.

Hidrolisando efluente formulado à base de leite com lipase de *Candida rugosa* imobilizada em hidrogel de pectina, Neves *et al.* (2024) observaram que o biocatalisador alcançou a taxa constante da produção de ácidos graxos pouco antes de 150 minutos de reação, semelhante aos achados com o uso de PFL de Bourlieu *et al.* (2012), em cerca de 120 minutos, indicando a relevância do estudo do tempo de reação para a hidrólise de efluentes provenientes de indústrias lácteas.

Ao imobilizar PFL em nanopartículas magnéticas com entrecruzamento por glutaraldeído, Arana-Peña *et al.* (2019b) verificaram que os biocatalisadores mantiveram sua atividade residual acima de 50% por no mínimo 5 ciclos, o que indica a influência benéfica da presença de ligações covalentes na construção do biocatalisador e o potencial de reutilização da PFL imobilizada.

Estudando a imobilização de lipase de *Rhizomucor* spp. em nanopartículas magnéticas reticuladas com glutaraldeído e amido dialdeído, produzido com a oxidação de amido de milho, Yang *et al.* (2019) verificaram que o amido dialdeído garantiu o reuso frente à hidrólise de azeite por até 6 ciclos antes de perder mais do que 50% da sua atividade relativa.

Assim, é possível melhorar a resistência a dessorção e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade operacional dos biocatalisadores obtidos ao modificar concentrações e tempo de reticulação com os aldeídos, uma vez que a PFL possui poucas aminas, representados pelo aminoácido lisina, o que desacelera a formação de ligações covalentes (PALOMO *et al.*, 2005), que podem ser intensificadas para promover a otimização da resistência e longevidades dos biocatalisadores heterogêneos reticulados.



## 6 CONCLUSÃO

A imobilização da segunda camada de PFL promoveu maior rendimento com a reticulação por glutaraldeído, que proporcionou maior superfície de contato com as lipases do que a dextrana aldeído, contudo, ambos agentes reticulantes alcançaram altos valores de atividade recuperada.

O biocatalisador reticulado com dextrana aldeído apresentou maior estabilidade térmica do que os demais biocatalisadores, possivelmente em decorrência das ligações covalentes sugeridas pela FTIR, que aumentaram a rigidez e resistência das lipases a mudanças conformacionais. Ademais, os biocatalisadores reticulados resistiram por mais tempo à dessorção em Triton X-100 do que o biocatalisador não-reticulado, entretanto, a estabilidade a dessorção pode ser incrementada para aumentar o potencial de aplicação desses biocatalisadores.

A reticulação gerou limitações difusionais, com maior intensidade no caso da dextrana aldeído, dada a extensão da sua cadeia, mas os biocatalisadores apresentaram atividade hidrolítica relevante frente ao efluente formulado de leite. Além disso, os biocatalisadores reticulados apresentaram atividade residual acima de 60% por 2 ciclos de reação, superando o biocatalisador não reticulado e demonstrando maior estabilidade operacional. Dessa forma, esse trabalho propôs uma alternativa de biocatalisador reticulado com dextrana aldeído, o qual apresenta potencial para o uso no tratamento de efluentes ricos em lipídios e como alternativa à utilização do glutaraldeído.

## REFERÊNCIAS

- ABELLANAS-PEREZ, Pedro; CARBALLARES, Diego; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA-MARTIN, Javier. Glutaraldehyde modification of lipases immobilized on octyl agarose beads: roles of the support enzyme loading and chemical amination of the enzyme on the final enzyme features. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 248, p. 125853, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125853>.
- ALI, Awatif S.; ELOZEIRI, Alaaeldin A.. Metabolic Processes During Seed Germination. *Advances In Seed Biology*, [S.L.], p. 141-166, 6 dez. 2017. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70653>.
- ALI, Sajid; KHAN, Sumera Afzal; HAMAYUN, Muhammad; LEE, In-Jung. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: a review. *Microorganisms*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 510, 17 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11020510>.
- AL-MAQDI, Khadega A.; ELMERHI, Nada; ATHAMNEH, Khawlah; BILAL, Muhammad; ALZAMLY, Ahmed; ASHRAF, Syed Salman; SHAH, Iltaf. Challenges and Recent Advances in Enzyme-Mediated Wastewater Remediation—A Review. *Nanomaterials*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 3124, 19 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano11113124>.
- ALMEIDA, Thaís dos Santos de. ESTUDO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA E PINHÃO-MANSO POR METANÓLISE E ETANÓLISE EMPREGANDO DIVERSOS CATALISADORES. 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/495c2373-a9d4-4cd9-a4d8-92db0ea021b7/content>. Acesso em: 13 jul. 2024.
- AMORIM, Kímlerle Paiva dos Santos. **Production of Multi-Active Biocatalysts through Lipase and Laccase Layer-By-Layer Co-Immobilization using different supports**. 2022. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Cap. 4. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/67762/1/2022\\_tese\\_kpsamorim.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/67762/1/2022_tese_kpsamorim.pdf). Acesso em: 19 jun. 2024.
- ANDRADES, Diandra de; GRAEBIN, Natália G.; KADOWAKI, Marina Kimiko; AYUB, Marco A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C.. Immobilization and stabilization of different  $\beta$ -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: optimal protocol depends on the enzyme. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 129, p. 672-678, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057>.
- ARANA-PEÑA, Sara; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLLING, Roberto; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCÁNTARA, Andrés R.; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Enzyme co-immobilization: always the biocatalyst designers' choice?: or not?. *Biotechnology Advances*, [S.L.], v. 51, p. 107584, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107584>.
- ARANA-PEÑA, Sara; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; RIOS, Nathalia S.; ORTIZ, Claudia; GONÇALVES, Luciana R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: strategies to reuse the most stable lipase.

**International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 131, p. 989-997, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.163>.

ARANA-PEN˜A, Sara; RIOS, Nathalia S.; CARBALLARES, Diego; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; LOKHA, Yuliya; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, [S.L.], v. 8, 28 fev. 2020b. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00036>.

ARANA-PEN˜A, Sara; RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; LOKHA, Yuliya; GONÇALVES, Luciana R.B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalysts with very high volumetric activity using octyl-agarose beads: avoiding enzyme release during multilayer production. *Enzyme And Microbial Technology*, [S.L.], v. 137, p. 109535, jun. 2020c. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109535>.

ARANA-PEN˜A, Sara; RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; LOKHA, Yuliya; CARBALLARES, Diego; GONÇALVES, Luciana R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Coimmobilization of different lipases: simple layer by layer enzyme spatial ordering. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 145, p. 856-864, fev. 2020a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.087>.

ARAVINDAN, Rajendran; ANBUMATHI, Palanisamy; VIRUTHAGIRI, Thangavelu. Lipase applications in food industry. **Indian Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 141–158, abr. 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/256202353>. Acesso em: 15 Abr. 2024.

BAENA, Alexander; ORJUELA, Alvaro; RAKSHIT, Sudip K.; CLARK, James H.. Enzymatic hydrolysis of waste fats, oils and greases (FOGs): status, prospective, and process intensification alternatives. **Chemical Engineering And Processing - Process Intensification**, [S.L.], v. 175, p. 108930, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2022.108930>.

BOURLIEU, C.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; MADEC, M.-N.; BOUHALLAB, S.. Hydrolysis of native milk fat globules by microbial lipases: mechanisms and modulation of interfacial quality. **Food Research International**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 533-544, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.036>.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 97, n. 17, p. 2195-2210, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.030>.

CEJUDO-SANCHES, Janaina; ORREGO, Alejandro H.; JAIME-MENDOZA, Adriana; GHOBADI, Rohollah; MORENO-PEREZ, Sonia; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; ROCHA-MARTIN, Javier; GUISAN, José M.. High stabilization of immobilized Rhizomucor miehei lipase by additional coating with hydrophilic crosslinked polymers: poly-allylamine/aldehyde::dextran. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 92, p. 156-163, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.026>.

CHANDRA, Prem; ENESPA; SINGH, Ranjan; ARORA, Pankaj Kumar. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-42, 26 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHANDRA, Rashmi; CASTILLO-ZACARIAS, Carlos; DELGADO, Patricio; PARRA-SALDÍVAR, Roberto. A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 183, p. 1184-1196, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.124>.

CHAUHAN, Nidhi; THAKUR, Indu Shekhar. Treatment of pulp and paper mill effluent by pseudomonas fluorescens in fixed film bioreactor. **Pollution Research**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 429-434, jan. 2002. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/260831147\\_Treatment\\_of\\_Pulp\\_and\\_Paper\\_mill\\_effluent\\_by\\_Pseudomonas\\_flourescens\\_in\\_fixed\\_film\\_Bioreactor](https://www.researchgate.net/publication/260831147_Treatment_of_Pulp_and_Paper_mill_effluent_by_Pseudomonas_flourescens_in_fixed_film_Bioreactor). Acesso em: 14 set. 2024.

CHRISTEN, G.L.; MARSHALL, R.T.. Effect of Histidine on Thermostability of Lipase and Protease of Pseudomonas fluorescens 27. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 594-604, mar. 1985. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(85\)80863-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(85)80863-8).

COSTA-SILVA, T.A.; CARVALHO, A.K.F.; SOUZA, C.R.F.; CASTRO, H.F. de; BACHMANN, L.; SAID, S.; OLIVEIRA, W.P.. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: application in butyl butyrate production. **Applied Catalysis A: General**, [S.L.], v. 622, p. 118217, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217>.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-9, 6 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DONG, Zhe; JIN, Jun; WEI, Wei; WU, Gangcheng; WANG, Xingguo; JIN, Qingzhe. Hyperactivation of lipase by oil-water interface in interfacial immobilization on hierarchical porous hollow silica microsphere: dynamics, mechanism and application. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 58, p. 103706, abr. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103706>.

DROGUI, Patrick; *et al.* Electrochemical removal of pollutants from agro-industry wastewaters. **Separation And Purification Technology**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 301-310, 15 jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2007.10.013>.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; GUISAN, J.M.. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 517-523, jun. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00090-e](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)00090-e).

FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, José M.; FUENTES, Manuel; MATEO, Cesar; GUISÁN, José M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Self-assembly of Pseudomonas fluorescens lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 232-237, 12 fev. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10560>.

FERREIRA, Tainá F.; SANTOS, Patrick A.; PAULA, Ariela V.; CASTRO, Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle S.s.. Biogas generation by hybrid treatment of dairy wastewater with

lipolytic whole cell preparations and anaerobic sludge. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 169, p. 107965, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2021.107965>.

FERREIRA-LEITÃO, Viridiana; CAMMAROTA, Magali; AGUIEIRAS, Erika Gonçalves; SÁ, Lívian Vasconcelos de; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; FREIRE, Denise. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 9, 1 jan. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/catal7010009>.

FOGLER, H. S. Elements of Chemical Reaction Engineering. 4. ed. Harlow: Pearson, 2014. v. 1.

FONSECA, Thiago de Sousa; OLIVEIRA, Ulisses Marcondes Freire de; OLIVEIRA, Maria da Conceição Ferreira de; LEMOS, Telma Leda Gomes de; SILVA, Marcos Reinaldo da; RIOS, Nathalia Saraiva; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; MATTOS, Marcos Carlos de. Immobilization of Amano lipase AK from *Pseudomonas fluorescens* on different types of chitosan-containing supports: use in the kinetic resolution of rac-indanol. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 785-792, 3 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02487-2>.

GARCIA-GALAN, Cristina; BARBOSA, Oveimar; HERNANDEZ, Karel; SANTOS, Jose; RODRIGUES, Rafael; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 7629-7645, 10 jun. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19067629>.

GLASSER, F.; DOREAU, M.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.. Technical Note: estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 90, n. 5, p. 2302-2304, maio 2007. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-870>.

GOLÇALVES NETO, João; SIMON, Douglas A.; FIGUEIREDO, Karla; BRANDÃO, Amanda L.T.. Framework for data-driven polymer characterization from infrared spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, [S.L.], v. 300, p. 122841, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2023.122841>.

GONZÁLEZ, C.; IGLESIAS, M.; LANZ, J.; RESA, J.M.. Temperature dependence of excess molar volumes in (n-alkane (C6–C9) or alcohol (C2–C4))+olive oil mixtures. **Thermochimica Acta**, [S.L.], v. 328, n. 1-2, p. 277-296, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-6031\(98\)00653-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-6031(98)00653-4).

GUAN, Lijun; GAO, Yang; LI, Jialei; WANG, Kunlun; ZHANG, Zhihong; YAN, Song; JI, Nina; ZHOU, Ye; LU, Shuwen. Directed Evolution of *Pseudomonas fluorescens* Lipase Variants With Improved Thermostability Using Error-Prone PCR. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 8, 2 set. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.01034>.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 50–60, 1985.

HERMANSON, Greg T.. Functional Targets for Bioconjugation. *Bioconjugate Techniques*, [S.L.], p. 127-228, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00002-9>.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and Their Industrial Applications: an overview. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 118, n. 1-3,

p. 155-170, 2004. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1385/abab:118:1-3:155>.

ISMAIL, Abdallah R.; KASHTOH, Hamdy; BAEK, Kwang-Hyun. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: biotechnological approaches and applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 187, p. 127-142, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.101>.

ISMAIL, Abdallah R.; KASHTOH, Hamdy; BAEK, Kwang-Hyun. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: biotechnological approaches and applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 187, p. 127-142, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.101>.

IYER, Padma V.; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 43, n. 10, p. 1019-1032, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>.

JAVED, Saira; AZEEM, Farrukh; HUSSAIN, Sabir; RASUL, Ijaz; SIDDIQUE, Muhammad Hussnain; RIAZ, Muhammad; AFZAL, Muhammad; KOUSER, Ambreen; NADEEM, Habibullah. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress In Biophysics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 132, p. 23-34, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

KHAN, Faez Iqbal; LAN, Dongming; DURRANI, Rabia; HUAN, Weiqian; ZHAO, Zexin; WANG, Yonghua. The Lid Domain in Lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 5, 9 mar. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAL, Shane N.D.; O'CONNOR, Charmian J.; EYRES, Laurence. Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology. **Advances In Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 123-126, p. 433-437, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.009>.

LIMA, Lionete Nunes de; ARAGON, Caio C.; MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; GIORDANO, Raquel L.C.; TARDIOLI, Paulo W.; GUIBAN, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 118-123, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.11.008>.

LIU, Wu; LI, Menggang; YAN, Yunjun. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 16 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7>.

LIU, Xiang; SUN, Wei; JIAN, Sijie; CHAO, Jia; CHEN, Chen; CHEN, Chunlin; CHEN, Rui; DING, Rui. Passive protective ability of the outer membrane protein PF1380 of *Pseudomonas fluorescens* against the major pathogenic bacteria of freshwater aquaculture in fish. **Aquaculture Reports**, [S.L.], v. 22, p. 100985, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100985>.



LOKHA, Yuliya; ARANA-PENÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; GONÇALVES, Luciana R.B.; LOPEZ-GALLEGO, Fernando; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 133, p. 109461, fev. 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmitec.2019.109461>.

MAKHZOOM, A.; OWUSU-APENTEN, R.K.; KNAPP, J.s.. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 459-472, maio 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00064-x](http://dx.doi.org/10.1016/0958-6946(95)00064-x).

MARTINS, Maurilio L.; PINTO, Uelinton M.; RIEDEL, Katharina; VANETTI, Maria C.D.. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 207-217, maio 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-838246120130859>.

MARTINS, Pedro Alves; TROBO-MASEDA, Lara; LIMA, Frederico Alves; MORAIS JÚNIOR, Wilson Galvão de; MARCO, Janice Lisboa de; SALUM, Thaís Fabiana Chan; GUISÁN, José Manuel. Omega-3 production by fish oil hydrolysis using a lipase from *Burkholderia gladioli* BRM58833 immobilized and stabilized by post-immobilization techniques. **Biochemistry And Biophysics Reports**, [S.L.], v. 29, p. 101193, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101193>.

MATEO, Cesar; PALOMO, José M.; VAN LANGEN, Luuk M.; VAN RANTWIJK, Fred; SHELDON, Roger A.. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 273-276, 11 mar. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20033>.

MATIAS, Alexandre B.; REIS, Willian de S.M.; COSTA-SILVA, Tales A.; BENTO, Heitor B.s.; CARVALHO, Ana K.F. de; PEREIRA, Ernandes B.. Mycelium-bound lipase as skillful biocatalysts: production of fatty acid concentrates from waste oils for the food industry. **Catalysis Communications**, [S.L.], v. 184, p. 106787, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2023.106787>.

MELCHIORS, Marina S.; PIOVESAN, Mauricio; BECEGATO, Vitor R.; BECEGATO, Valter A.; TAMBOURGI, Elias B.; PAULINO, Alexandre T.. Treatment of wastewater from the dairy industry using electroflocculation and solid whey recovery. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 182, p. 574-580, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.022>.

MELO, Ricardo Rodrigues de; ALNOCH, Robson Carlos; VILELA, Adriana Ferreira Lopes; SOUZA, Emanuel Maltempi de; KRIEGER, Nadia; RULLER, Roberto; SATO, Hélia Harumi; MATEO, Cesar. New Heterofunctional Supports Based on Glutaraldehyde-Activation: a tool for enzyme immobilization at neutral pH. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 1088, 29 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22071088>.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; VÉLEZ, Ana M.; GIORDANO, Roberto C.; GIORDANO, Raquel de L.C.; CASTRO, Heizir F. de. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 503-511, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2012.01.020>.

MENDES, Adriano Aguiar; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JUNIOR, Agenor; CASTRO, Heizir Ferreira de. Anaerobic biodegradability of dairy wastewater pretreated with porcine pancreas lipase. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 53, n. 6,

p. 1279-1284, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000600003>.

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JÚNIOR, Agenor. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 296-305, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000200022>.

MILLER, G. L.. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 426-428, 1 mar. 1959. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MOREIRA, Katerine da S.; OLIVEIRA, André Luiz Barros de; MOURA JÚNIOR, Lourembergue Saraiva de; SOUSA, Isamayra Germano de; CAVALCANTE, Antonio Luthierre Gama; SIMÃO NETO, Francisco; VALÉRIO, Roberta Bussons Rodrigues; CHAVES, Anderson Valério; FONSECA, Thiago de Sousa; CRUZ, Daniel Morais Vieira. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research And Design**, [S.L.], v. 177, p. 223-244, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2021.10.033>.

NADAR, Shamraja S.; RATHOD, Virendra K.. Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 83, p. 78-87, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.10.009>.

National Library of Medicine. Dextran. 2024c. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4125253>. Acesso em: 21 maio 2024.

National Library of Medicine. Glutaral. 2024b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3485>. Acesso em: 21 maio 2024.

National Library of Medicine. Octyl-agarose. 2024a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/129673105#section=Structures>. Acesso em: 15 agosto 2024.

NEVES, Amanda Magalhães das; VISIOLI, Luiz Jardel; ENZWEILER, Heveline; PAULINO, Alexandre Tadeu. Lipase from *Candida rugosa* incorporated in pectin hydrogel via immobilization for hydrolysis of lipids in dairy effluents and production of fatty acids. **Journal Of Water Process Engineering**, [S.L.], v. 58, p. 104821, fev. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.104821>.

NIMKANDE, Vijay D.; BAFANA, Amit. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. **Journal Of Water Process Engineering**, [S.L.], v. 46, p. 102591, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591>.

ONYINYECHUKWU, J. Chioke; CHRISTIANA, N. Ogbonna; CHUKWUDI, Onwusi; JAMES, C. Ogbonna. Lipase in biodiesel production. **African Journal Of Biochemistry Research**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 73-85, 30 set. 2018. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajbr2018.0999>.

ORREGO, Alejandro; GHOBADI, Rohollah; MORENO-PEREZ, Sonia; MENDOZA, Adriana; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUI SAN, Jose; ROCHA-MARTIN, Javier. Stabilization of Immobilized Lipases by Intense Intramolecular Cross-Linking of Their Surfaces by Using Aldehyde-Dextran Polymers. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 553, 12 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020553>.



PALOMO, Jose M.; ORTIZ, Claudia; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; FUENTES, Manuel; GUISÁN, Jose M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme And Microbial Technology*, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 447-454, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmitec.2004.09.013>.

PALOMO, José M; MUÑOZ, Gloria; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; MATEO, Cesar; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S.L.], v. 19-20, p. 279-286, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177\(02\)00178-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177(02)00178-9).

PALOMO, Jose M; ORTIZ, Claudia; FUENTES, Manuel; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUISAN, Jose M; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. *Journal Of Chromatography A*, [S.L.], v. 1038, n. 1-2, p. 267-273, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.058>.

PANT, Karan J.; COTTER, Paul D.; WILKINSON, Martin G.; SHEEHAN, Jeremiah J.. Towards sustainable Cleaning-in-Place (CIP) in dairy processing: exploring enzyme :based approaches to cleaning in the cheese industry. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 3602-3619, 17 jul. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.13206>.

PESTA, Gunther; MEYER-PITTROFF, Roland; RUSS, Winfried. Utilization of Whey. Utilization Of By-Products And Treatment Of Waste In The Food Industry, [S.L.], p. 193-207, 2007. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-35766-9\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-35766-9_10).

POPOOLA, B.M.; OLATERU, C.T.. Purification and Kinetics of Lipase of Pseudomonas fluorescens from Vegetable Oil Polluted Soil. *Journal Of Biological Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 29-37, 15 dez. 2020. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2021.29.37>.

PRIYA, Sakshi; CHOUDHARI, Manisha; TOMAR, Yashika; DESAI, Vaibhavi Meghraj; INNANI, Srinath; DUBEY, Sunil Kumar; SINGHVI, Gautam. Exploring polysaccharide-based bio-adhesive topical film as a potential platform for wound dressing application: a review. *Carbohydrate Polymers*, [S.L.], v. 327, p. 121655, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121655>.

RABBANI, Gulam; AHMAD, Ejaz; AHMAD, Abrar; KHAN, Rizwan Hasan. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 225, p. 822-839, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146>.

RAFIEE, F.; REZAEI, M.. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 179, p. 170-195, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198>.

REIS, Carla; SOUSA, Emerson; SERPA, Juliana; OLIVEIRA, Ravena; OLIVEIRA, Ravena; SANTOS, José. DESIGN OF IMMOBILIZED ENZYME BIOCATALYSTS: drawbacks and opportunities. *Química Nova*, [S.L.], v. 42, n. 7, p. 768-783, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>.

REMONATTO, Daniela; MIOTTI JUNIOR, Rodney H.; MONTI, Rubens; BASSAN, Juliana C.; PAULA, Ariela Veloso de. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 114, p. 1-20, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.

RIBEIRO, Bernardo Dias; CASTRO, Aline Machado de; COELHO, Maria Alice Zarur; FREIRE, Denise Maria Guimarães. Production and Use of Lipases in Bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, [S.L.], v. 2011, p. 1-16, 7 jul. 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/615803>.

RIBEIRO, Bernardo Dias; CASTRO, Aline Machado de; COELHO, Maria Alice Zarur; FREIRE, Denise Maria Guimarães. Production and Use of Lipases in Bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, [S.L.], v. 2011, p. 1-16, 7 jul. 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/615803>.

RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; ARANA-PEÑA, Sara; RUEDA, Nazzoly; ORTIZ, Claudia; GONÇALVES, Luciana R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: improved stability and reusability. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1867, n. 9, p. 741-747, set. 2019a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.06.005>.

RIOS, Nathalia Saraiva. **Estudo de imobilização da lipase de tipo B de Candida antarctica em silicato mesoporoso nanoestruturado (SBA-15) visando a aplicação em reações de elevado interesse Industrial**. 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15880/1/2016\\_dis\\_nsrios.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15880/1/2016_dis_nsrios.pdf). Acesso em: 28 ago. 2024.

RIOS, Nathalia Saraiva; ANDRADE NETO, Davino M.; SANTOS, José Cleiton Sousa dos; FECHINE, Pierre Basílio Almeida; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Comparison of the immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on divinylsulfone or p-benzoquinone activated support. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 134, p. 936-945, ago. 2019d. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.106>.

RIOS, Nathalia Saraiva; MORAIS, Eva Gomes; GALVÃO, Wesley dos Santos; ANDRADE NETO, Davino M.; SANTOS, José Cleiton Sousa dos; BOHN, Felipe; CORREA, Marcio A.; FECHINE, Pierre Basílio Almeida; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 141, p. 313-324, dez. 2019b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.003>.

RIOS, Nathalia Saraiva; PINHEIRO, Bruna Bandeira; PINHEIRO, Máisa Pessoa; BEZERRA, Rayanne Mendes; SANTOS, José Cleiton Sousa dos; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 75, p. 99-120, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>.

RIOS, Nathalia; ARANA-PEÑA, Sara; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; ORTIZ, Claudia; GONÇALVES, Luciana; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Reuse of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* via Its Step-by-Step Coimmobilization on Glyoxyl-Octyl Agarose

Beads with Least Stable Lipases. **Catalysts**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 487, mai. 2019c. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/catal9050487>.

RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLING, Roberto; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of enzymes via immobilization: multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 52, p. 107821, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.

RODRIGUES, Rafael C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; SANTOS, José C.s. dos; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCANTARA, Andres R.; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 746-770, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

RUAN, Lian; SU, Mengrong; QIN, Xinyun; RUAN, Qingting; LANG, Wen; WU, Minhui; CHEN, Yujie; LV, Qizhuang. Progress in the application of sustained-release drug microspheres in tissue engineering. **Materials Today Bio**, [S.L.], v. 16, p. 100394, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100394>.

SAHASRABUDHE, Shreya N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, Veronica; O'MEARA, Meghan.; FARKAS, Brian E.. Density, viscosity, and surface tension of five vegetable oils at elevated temperatures: measurement and modeling. **International Journal Of Food Properties**, [S.L.], p. 1-17, 29 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1360905>.

SALGADO, Cleonice Aparecida; SANTOS, Clarissa Isabela Aparecida dos; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 45, p. 101509, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101509>.

SANTOS, Kimberle Paiva dos; RIOS, Nathália Saraiva; LABUS, Karolina; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Co-immobilization of lipase and laccase on agarose-based supports via layer-by-layer strategy: effect of diffusional limitations. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 185, p. 108533, jul. 2022a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2022.108533>.

SANTOS, Leandro Alves dos; ALNOCH, Robson Carlos; SOARES, Glêydison Amarante; MITCHELL, David Alexander; KRIEGER, Nadia. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with polyaldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 122, p. 238-247, nov. 2022b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.014>.

SCHRAG, Joseph D; LI, Yunge; CYGLER, Mirosław; LANG, Dietmar; BURGDORF, Tanja; HECHT, Hans-Juergen; SCHMID, Rolf; SCHOMBURG, Dietmar; RYDEL, Timothy J; OLIVER, Joel D. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 187-202, fev. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00178-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00178-0).

SIGMA ALDRICH. FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: dextrana obtido de *leuconostoc* spp. DEXTRANA OBTIDO DE LEUCONOSTOC SSP. 2024. Disponível em:

<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/sigma/31392?userType=anonymous>. Acesso em: 12 jul. 2024.

SILVA, J.; GONÇALVES, J.C.; ROCHA, C.; VILAÇA, J.; MADEIRA, L.M.. Biomethane production from biogas obtained in wastewater treatment plants: process optimization and economic analysis. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 220, p. 119469, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2023.119469>.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.s.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B.. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 60, p. 16-24, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011>.

SINGH, Bikram Jit; CHAKRABORTY, Ayon; SEHGAL, Rippin. A systematic review of industrial wastewater management: evaluating challenges and enablers. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 348, p. 119230, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119230>.

SLAVOV, Aleksandar Kolev. Dairy Wastewaters – General Characteristics and Treatment Possibilities – A Review. **Food Technology And Biotechnology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 14-28, 2017. Faculty of Food Technology and Biotechnology - University of Zagreb. <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4520>.

SOARES, Cleide M. F.; CASTRO, Heizir F. de; MORAES, Flávio F. de; ZANIN, Gisella M.. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 79, n. 1-3, p. 745-758, 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1385/abab:79:1-3:745>.

SOJITRA, Uttam V.; NADAR, Shamraja S.; RATHOD, Virendra K.. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 157, p. 677-685, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.018>.

SURESH, Aravind; RAMGOPAL, Dhakshin Shravan; GOPINATH, Kannappan Panchamoorthy; ARUN, Jayaseelan; SUNDARRAJAN, Panneerselvam; BHATNAGAR, Amit. Recent advancements in the synthesis of novel thermostable biocatalysts and their applications in commercially important chemoenzymatic conversion processes. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 323, p. 124558, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124558>.

TABELINI, Diego Borges; LIMA, Juan Pablo Pereira; BORGES, Alisson Carraro; AGUIAR, André. A review on the characteristics and methods of dairy industry wastewater treatment in the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal Of Water Process Engineering**, [S.L.], v. 53, p. 103779, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103779>.

TACIAS-PASCACIO; ORTIZ; RUEDA; BERENGUER-MURCIA; ACOSTA; ARANAZ; CIVERA; FERNANDEZ-LAFUENTE; ALCÁNTARA. Dextran Aldehyde in Biocatalysis: more than a mere immobilization system. **Catalysts**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 622, 21 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/catal9070622>.

TANG, Hao L.; XIE, Yuefeng F.; CHEN, Yen-Chih. Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 124, p. 52-58, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.012>.

U.S. Coast Guard. 1999. Chemical Hazard Response Information System (CHRIS) - Hazardous Chemical Data. Commandant Instruction 16465.12C. Washington, D.C.: U.S.

Government Printing Office. Disponível em:

[http://www.suttercountyfire.org/YSHMRT/CHRIS%20MANUAL%20CIM\\_16465\\_12C.pdf](http://www.suttercountyfire.org/YSHMRT/CHRIS%20MANUAL%20CIM_16465_12C.pdf).

Acesso em: 15 mai. 24.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. *Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa*, p. 1–59, 2013.

WAHAB, Roswanira Abdul; ELIAS, Nursyafiqah; ABDULLAH, Faizuan; GHOSHAL, Sib Krishna. On the taught new tricks of enzymes immobilization: an all-inclusive overview.

**Reactive And Functional Polymers**, [S.L.], v. 152, p. 104613, jul. 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>.

WANG, Lei; LIU, Tianzhen; SUN, Hongwen; ZHOU, Qixing. Transesterification of para-hydroxybenzoic acid esters (parabens) in the activated sludge. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 354, p. 145-152, jul. 2018. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.077>.

WANG, Xu; XIONG, Youling L.. Oxidative polyaldehyde production: a novel approach to the conjugation of dextran with soy peptides for improved emulsifying properties. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 53, n. 8, p. 3215-3224, 29 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-016-2296-7>.

WANG, Yifei; SERVENTI, Luca. Sustainability of dairy and soy processing: a review on wastewater recycling. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 237, p. 117821, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.117821>.

WOŃNIAK, Dagmara; CICHY, Wojciech; DOBRZYŃSKA, Małgorzata; PRZYSŁAWSKI, Juliusz; DRZYMAŁA-CZYŚ, Sławomira. Reasonableness of Enriching Cow's Milk with Vitamins and Minerals. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1079, 8 abr. 2022. MDPI AG.

<http://dx.doi.org/10.3390/foods11081079>.

YANG, Guang; WU, Jianping; XU, Gang; YANG, Lirong. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods.

*Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 351-356, jul. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.022>.

YANG, Xinyi; CHEN, Yunfei; YAO, Shen; QIAN, Junqing; GUO, Hui; CAI, Xiaohua. Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch.

**Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 218, p. 324-332, ago. 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.012>.

ZAAK, Hadjer; FERNANDEZ-LOPEZ, Laura; VELASCO-LOZANO, Susana; ALCARAZ-FRUCTUOSO, Maria Teresa; SASSI, Mohamed; LOPEZ-GALLEGO, Fernando;

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: dramatic deleterious effects of phosphate anions. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 62, p. 128-134, nov. 2017b. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.018>.

ZAAK, Hadjer; KORNECKI, Jakub F.; SIAR, El-Hocine; FERNANDEZ-LOPEZ, Laura; CORBERÁN, V. Cortés; SASSI, Mohamed; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto.

Coimmobilization of enzymes in bilayers using pei as a glue to reuse the most stable enzyme: preventing pei release during inactivated enzyme desorption. *Process Biochemistry*, [S.L.], v. 61, p. 95-101, out. 2017a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.014>.



ZHANG, Jing; JIANG, Yungeng; ZHANG, Heyu; FENG, Dan; BU, Hongling; LI, Linlin; LU, Shaoyong. A critical review of characteristics of domestic wastewater and key treatment techniques in Chinese villages. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 927, p. 172155, jun. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172155>.

ZHANG, Weiqing; WANG, Bo; MA, Changlu; PANG, Xiaoyang; LV, Jiaping. A clarifying reagent and microplate-based method for the high-throughput analysis of lipase activity in milk. **European Food Research And Technology**, [S.L.], v. 247, n. 9, p. 2161-2169, 16 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-021-03702-4>.

ZHONG, Le; FENG, Yuxiao; WANG, Gaoyang; WANG, Ziyuan; BILAL, Muhammad; LV, Hexin; JIA, Shiru; CUI, Jiandong. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 152, p. 207-222, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>.

ZHOU, Xiaonan; ZHANG, Wang; ZHAO, Linwei; GAO, Shan; LIU, Tianyi; YU, Dianyu. Immobilization of lipase in chitosan-mesoporous silica material and pore size adjustment. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 235, p. 123789, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123789>.

ZOU, Shuo; CHEN, Jiena; LEE, Yee-Ying; WANG, Yong; ZHANG, Zhen. Candida antartica lipase-catalyzed esterification for efficient partial acylglycerol synthesis in solvent-free system: substrate selectivity, molecular modelling and optimization. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 412, p. 131368, nov. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131368>.

ZUCCA, Paolo; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; SANJUST, Enrico. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1577, 19 nov. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21111577>.