



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

**PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CAJU COM  
DIVINILSULFONA VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO SUPORTE PARA  
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DO TIPO A DE *Candida Antarctica***

**FORTALEZA-CE**

**2020**

**PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CAJU COM  
DIVINILSULFONA VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO SUPORTE PARA  
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DO TIPO A DE *Candida Antarctica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

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

**FORTALEZA-CE**

**2020**

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

---

- L71o Lima, Paula Jéssyca Morais.  
Otimização do tratamento do bagaço de caju com divinilsulfona visando sua utilização como suporte para imobilização da lipase do tipo A de Candida Antarctica / Paula Jéssyca Morais Lima. – 2020.  
72 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.  
Coorientação: Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves..
1. Imobilização Enzimática. 2. Lipase do tipo A de Candida antarctica. 3. Bagaço de caju residual. 4. Método Taguchi. I. Título.

CDD 660

---

**PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CAJU COM  
DIVINILSULFONA VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO SUPORTE PARA  
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DO TIPO A DE *Candida Antarctica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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: 06/03/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Valderez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

**A Deus,  
aos meus pais,  
Gracinha e  
Pedro (*in memoria*),  
a minha filha  
amada, Luiza.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me iluminado durante esta caminhada, me abençoando e me dando forças para seguir em frente.

À minha mãe Gracinha por ser meu suporte e minha fortaleza, estando ao meu lado em todos os momentos. A você mainha, todo meu amor e admiração.

Ao meu pai Pedro (*in memorian*), que faz muita falta! Sempre dedicado e amoroso.

Agradeço à minha filha Luiza, por mesmo tão nova já entender, do jeito dela, a minha ausência, por me dar tanto amor e carinho. Você é a minha vida, minha princesa.

A toda minha família pelo incentivo e confiança que me transmitem, em especial ao meu irmão Pedro Júnior e a minha tia Lourdinha.

Ao professor Cleiton e à professora Luciana por terem me guiado nessa trajetória, pela paciência, compreensão. Pelo conhecimento compartilhado e pela dedicação aos seus alunos.

Aos grandes amigos do GPBio, companheiros em todos os momentos, em especial a Layanne, Juliana, Carlos, Bruna, Ravena, Carlinha, Ticiane e Rodolpho, agradeço demais por toda ajuda e todos os momentos compartilhados.

Às minhas amigas de toda uma vida, que também são minha família

Ao CNPq, pelo consentimento da bolsa de pesquisa.

*“Mas tu, SENHOR, és o escudo que me protege: és a minha glória e me fazes andar de cabeça erguida.”  
(Salmo 3:3)*

*“Ninguém é digno do pódio se não usar seus fracassos para conquistá-lo. (A. Cury, em Nunca desista dos seus sonhos)*

## RESUMO

Um resíduo agroindustrial, o bagaço de caju, foi utilizado como suporte para imobilização da lipase do tipo A de *Candida antarctica* (CALA). A CALA é um biocatalisador muito atraente, apresenta alta termoestabilidade, seletividade para ácidos graxos *trans*, estabilidade no pH ácido e alta quimio-seletividade em relação aos grupos amina. O bagaço de caju, além de ter um custo muito baixo e reduzir os impactos ambientais, por ser um material biodegradável, também apresenta boas propriedades físicas e mecânicas favoráveis à imobilização enzimática. Entre os métodos de imobilização, a adsorção, um método simples e bastante utilizado, que permite a interação entre o suporte e a enzima, resultando em uma melhor estabilização enzimática. Neste estudo, a divinilsulfona (DVS) foi utilizada para modificar a estrutura do suporte e, dessa forma, testar o seu efeito nas interações enzima-suporte, visando imobilizar covalentemente. Para otimizar o tratamento do bagaço de caju com DVS para imobilização da CALA, um planejamento experimental avançado pelo método Taguchi foi utilizado, com uma matriz ortogonal padrão L16 (o 'L' e o '16' representam o quadrado latino e o número de experimentos, respectivamente), no qual cinco fatores em quatro níveis foram analisados (concentração de DVS: 1, 3, 5 e 7,5 mL; molaridade do tampão: 5, 25, 100 e 350 mM; pH: 3, 5, 7 e 12,5; temperatura: 4, 15, 25 e 30 °C e tempo de tratamento: 0,5, 3, 12 e 24 horas), a fim de maximizar a atividade do biocatalisador. Para o procedimento de imobilização, foram utilizados 1,0 mg de enzima por g de suporte na presença de Triton-X a 0,01% (v/v) e tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,0, por 24 h e 25 °C, sob agitação contínua. Após a imobilização, os biocatalisadores foram incubados em tampão de bicarbonato 100 mM a pH 10,0 (1:10 p/v) a 25 °C por 24 h, e depois em EDA 1 M a pH 10,0 também por 24 h a 4 °C. As condições ideais de preparação do suporte foram: concentração de DVS: 4,5 M, molaridade do tampão: 5 mM, pH: 3; temperatura: 30 °C e tempo de ativação: 12 horas, obtendo uma atividade do derivado de 6,8 U/g e o valor da atividade do derivado previsto pelo programa foi de 6,5 U/g. As análises de FTIR e análise elementar confirmaram a imobilização da CALA no BAG-DVS, em 1712 cm<sup>-1</sup> e com aumento de 3,71% de nitrogênio, respectivamente, no entanto essas análises não foram sensíveis o suficiente para demonstrar a ativação do suporte com a DVS. A imobilização da CALA em bagaço de caju ativado com divinilsulfona promoveu um aumento na estabilidade térmica a 70 °C em pH 5, 7 e 9. Além disso, após oito meses de estocagem a atividade do biocatalisador diminuiu apenas 50%. A análise de TGA apresentou degradação das amostras BAG, BAG-DVS e BAG-DVS-CAL a 500 °C com perda de massa, respectivamente, de 51,9%, 49,9% e 55,7%. Os resultados mostraram que o BAG pré-tratado e ativado com DVS melhorou significativamente a estabilidade da CALA se mostrando um suporte promissor para imobilização de enzimas.

**Palavras-chave:** Imobilização Enzimática. Lipase do tipo A de *Candida antarctica*. Bagaço de caju residual. Método Taguchi.

## ABSTRACT

An agro-industrial residue, cashew apple bagasse, was used as a support for immobilizing lipase A from *Candida antarctica* (CALA). CALA is a very attractive biocatalyst, has high thermostability, selectivity for trans fatty acids, stability in acid pH and high chemoselectivity in relation to amine groups. Cashew apple bagasse, in addition to having a very low cost and reducing environmental impacts, as it is a biodegradable material, also has good physical and mechanical properties favorable to enzymatic immobilization. Among immobilization methods, adsorption, a simple and widely used method, allows the interaction between the support and the enzyme, resulting in better enzymatic stabilization. In this study, divinyl sulfone (DVS) was used to modify the support structure and, thus, test its effect on enzyme-support interactions. To optimize the treatment of cashew apple bagasse with DVS for immobilization of CALA, an advanced experimental design by the Taguchi method was used, with a standard orthographic L16 matrix (the 'L' and the '16' represent the Latin square and the number of experiments, respectively), where five factors at four levels were analyzed (DVS concentration: 1, 3, 5 and 7.5; buffer molarity: 5, 25, 100 and 350 mM; pH: 3, 5, 7 and 12,5; temperature: 4, 15, 25 and 30 °C and optimization time: 0.5, 3, 12 and 24 h), in order to maximize the activity of the biocatalyst. For the immobilization process, 1.0 mg of enzyme per g of support was used in the presence of 0.01% Triton-X and 5 mM sodium phosphate buffer and pH 7.0, for 24 h and 25 °C, under controlled stirring. After immobilization, the biocatalysts were incubated in 100 mM bicarbonate buffer at pH 10.0 (1:10 w/v) at 25 °C for 24 h, and then in 1 M EDA at pH 10.0 also for 24 h at 4 °C. After the experimental planning was concluded, the ideal conditions for preparing the support were: DVS concentration: 4.5 M, buffer molarity: 5 mM, pH: 3; temperature: 30 °C and activation time: 12 h, obtaining a derivative activity of 6.8 U/g and immobilization yield of 24%. The value of the derivative activity provided by the software was 6.5 U/g. FTIR and Elemental Analysis confirmed the immobilization of CALA in BAG-DVS, at 1712 cm<sup>-1</sup> and with an increase of 3.71% nitrogen, respectively. The TGA analysis showed degradation of the BAG, BAG-DVS and BAG-DVS-CAL samples at 500 °C with weight loss, respectively, of 51.9%, 49.9% and 55.7%. The immobilization of CALA in cashew apple bagasse promoted an increase in thermal stability at 70 °C and pH 5, 7 and 9. In addition, after eight months of storage, the activity of the biocatalyst decreased only 50%. The results showed that the pretreated BAG is promising for immobilizing enzymes, improving the stability of CALA.

**Keywords:** Enzyme Immobilization. Lipase A from *Candida antarctica*. Residual cashew apple bagasse. Taguchi method.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Equilíbrio conformacional da lipase.....	18
<b>Figura 2</b>	Estrutura da Lipase tipo A de <i>Candida antarctica</i> onde os resíduos de cisteína estão representados em amarelo, os resíduos de lisina em verde e os resíduos de aspartato em azul. Os resíduos histidina (roxo)/ aspartato (azul)/ serina (vermelho) presentes no sítio ativo estão representados em forma de esfera (Código PBD: 3GUU).....	20
<b>Figura 3</b>	A média da razão S/R que representa a quantidade de DVS, a concentração do tampão, o pH, a temperatura e o tempo de ativação para o biocatalisador produzido.....	36
<b>Figura 4</b>	Espectro na região do infravermelho das amostras (I) BAG, (II) BAG – DVS e (III) BAG – DVS – CALA.....	40
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de ligações entre a DVS e o bagaço de caju.....	41
<b>Figura 6</b>	Análises Termogravimétricas TGA (A) e DTG (B) das amostras (I) BAG, (II) BAG – DVS e (III) BAG – DVS – CALA.....	43
<b>Figura 7</b>	Curso de imobilização da CALA em BAG-DVS em diferentes condições, tampão acetato de sódio a pH 5 (A), tampão fosfato de sódio a pH 7 (B) e tampão carbonato de sódio a pH 9. Atividades totais relativas de referência (■) sobrenadante (●) e a atividade de suspensão durante a imobilização (▲)....	44
<b>Figura 8</b>	Resíduos de aminoácidos da CALA a pH 5 (A), pH 7 (B) e pH 10 (C). Sítio ativo: histidina (vermelho)/ aspartato (amarelo)/ serina (laranja); Resíduos de aspartato (amarelo); Resíduos tirosina (rosa); Resíduos de lisina (verde); Resíduos de arginina (azul claro).....	48
<b>Figura 9</b>	Capacidade de carga de proteína do BAG para CALA.....	52
<b>Figura 10</b>	Eletroforese da lipase A de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em bagaço de caju pré-tratado. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: imobilização com carga de 10 mg/g; Poço 3: imobilização com carga de 1 mg/g; Poço 4: enzima livre.....	53
<b>Figura 11</b>	Esquema da produção enzimática do aroma de jasmim (acetato de benzila).....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fatores independentes e seus respectivos níveis para a produção do biocatalisador.....	30
<b>Tabela 2</b>	Planejamento experimental de matriz ortogonal L16 com os valores da atividade do derivado e as razões S/R.....	35
<b>Tabela 3</b>	Tabela de respostas das razões S/R .....	37
<b>Tabela 4</b>	Análise elementar (carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre) do bagaço puro, bagaço tratado com DVS e do biocatalisador. Outras especificações foram descritas nos métodos.....	41
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros de imobilização da CALA: Rendimento de imobilização (%), atividade teórica ( $A_{T1}$ ), atividade do biocatalisador após ( $A_{TD}$ ) incubação em tampão carbonato de sódio e bloqueio com EDA, e atividade recuperada ( $A_{TR}$ ). 1 mg de proteína por 1 g de suporte foi a carga de imobilização utilizada, conduzida em tampão acetato de sódio pH 5, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão carbonato de sódio pH 10. Outras especificações são descritas nos métodos.....	47
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros de imobilização da CALA no bagaço <i>in natura</i> (BAG-CALA) e no bagaço tratado sem a presença de DVS (BAGT-CALA): Rendimento de imobilização (R), atividade teórica ( $A_{T1}$ ), atividade do biocatalisador ( $A_{TD}$ ) sem as etapas de incubação em tampão carbonato de sódio e bloqueio com EDA, e atividade recuperada ( $A_{TR}$ ). A imobilização foi conduzida em tampão fosfato de sódio pH 7. Outras especificações são descritas nos métodos.....	49
<b>Tabela 7</b>	Tempos de meia-vida (expressa em minutos) da CALA e da BAG-DVS-CALA conduzidas a 70° C em pHs 5, 7 e 9.....	50
<b>Tabela 8</b>	Conversões dos biocatalisadores em 24, 48 e 72 h de reação de acetilação.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CALA</b>	Lipase comercial do tipo A de <i>Candida antarctica</i>
<b>DVS</b>	Divinilsulfona
<b>Pnpb</b>	butirato de <i>p</i> -nitrofenila
<b>Pnp</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>At<sub>T</sub></b>	Atividade teórica (U/g)
<b>At<sub>D</sub></b>	Atividade do biocatalisador (U/g)
<b>At<sub>R</sub></b>	Atividade recuperada (%)
<b>R</b>	Rendimento (%)
<b>BAG</b>	Bagaço de caju
<b>BAG-DVS</b>	Bagaço tratado com divinilsulfona
<b>BAG-DVS-CALA</b>	CALA imobilizada no bagaço de caju pré-tratado na presença de DVS
<b>BAG-TRAT-CALA</b>	CALA imobilizada no bagaço de caju pré-tratado na ausência de DVS
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	16
<b>1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Enzimas</b> .....	17
<b>2.1.1</b>	<i>Lipases</i> .....	17
<b>2.1.2</b>	<i>Lipase tipo A de Candida antarctica</i> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Imobilização de Enzimas</b> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Suportes</b> .....	23
<b>2.3.1</b>	<i>Bagaço de caju</i> .....	25
<b>2.3.1.1</b>	<i>Pré-tratamentos</i> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Método Taguchi</b> .....	28
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	29
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	29
<b>3.2.1</b>	<i>Preparação do suporte</i> .....	29
<b>3.2.2</b>	<i>Otimização do protocolo de modificação química do bagaço de caju com DVS</i>	29
<b>3.2.3</b>	<i>Imobilização da CALA</i> .....	30
<b>3.2.4</b>	<i>Determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína</i> .....	31
<b>3.2.5</b>	<i>Parâmetros de imobilização</i> .....	31
<b>3.2.6</b>	<i>Caracterizações do suporte</i> .....	31
<b>3.2.6.1</b>	<i>Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	32
<b>3.2.6.2</b>	<i>Análises Termogravimétricas (TGA e DTG)</i> .....	32
<b>3.2.6.3</b>	<i>Análise elementar</i> .....	32
<b>3.2.6.4</b>	<i>Determinação do teor de umidade</i> .....	32
<b>3.2.7</b>	<i>Caracterização da enzima livre e imobilizada</i> .....	33
<b>3.2.7.1</b>	<i>Curso de imobilização</i> .....	33
<b>3.2.7.2</b>	<i>Estabilidade térmica e de pH</i> .....	33
<b>3.2.7.3</b>	<i>Ensaio de carga máxima</i> .....	33
<b>3.2.8</b>	<i>Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE</i> .....	33
<b>3.2.9</b>	<i>Síntese enzimática do composto responsável pelo aroma de jasmim</i> .....	34

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	Otimização do protocolo de modificação química do bagaço de caju utilizando o Método Taguchi.....	35
<b>4.2</b>	<b>Caracterizações do suporte.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da imobilização da CALA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito do pH na estabilidade térmica do biocatalisador.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de Carga Máxima.....</b>	<b>51</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise qualitativa de proteína SDS-PAGE.....</b>	<b>53</b>
<b>4.8</b>	<b>Reações de acetilação do álcool benzílico.....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são as enzimas mais usadas na biocatálise, tanto em pesquisas acadêmicas como a nível industrial (ORTIZ et al., 2019). Essa classe de enzimas é altamente estável, possui alta especificidade de substrato e alta regio, quimio e estereosseletividade (GHANEM, 2007; LIMA et al., 2017). Esses biocatalisadores são bastante utilizados sob uma ampla gama de meios de reação, como solventes orgânicos, líquidos iônicos e fluidos supercríticos (LOZANO, 2010) e são capazes de catalisar diversas reações, tais como transesterificações (BAJAJ et al., 2010; RAO; DIVAKAR, 2001), hidrólises ou síntese de ligações éster (BOROWIECKI; JUSTYNIAK; OCHAL, 2017; REIS et al., 2009), aminação (DE SOUZA et al., 2016), alcoólise (SINGH et al., 2016), entre outros.

As lipases apresentam um mecanismo catalítico bastante peculiar, podendo se manifestar sobre duas conformações distintas, uma aberta ou ativa, que possibilita a catálise e uma fechada ou inativa, que isola o sítio ativo do meio reacional (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; RODRIGUES et al., 2013). Isso ocorre devido às lipases possuírem uma estrutura superficial denominada tampa. (BROCCA et al., 2003; GROCHULSKI et al., 1993). As lipases são ativadas pela presença de uma interface água/lipídio, geralmente essa conformação ocorre na presença de superfícies hidrofóbicas (DOS SANTOS et al., 2014). A ativação interfacial de lipases em superfícies hidrofóbicas tem sido utilizada para imobilizar diferentes lipases (DOS SANTOS et al., 2015a; MATEO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2019; SHARMA; KANWAR, 2014; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; ZHOU; HARTMANN, 2013), processo que envolve a forma aberta da lipase (MANOEL et al., 2015a). A lipase A de *Candida antarctica* (CALA) apresenta características únicas: alta termoestabilidade (temperatura ideal acima de 90 °C), seletividade para ácidos graxos trans, estabilidade na faixa de pH ácido, além de apresentar alta quimio-seletividade em relação aos grupos amina (ONDUL; DIZGE; ALBAYRAK, 2012). Além disso, sofre ativação interfacial na presença de superfícies hidrofóbicas (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019). No entanto, as lipases requerem uma etapa de melhoria para serem utilizadas como biocatalisadores, pois na sua forma livre são solúveis em água.

A forma livre das lipases aumenta os custos e torna difícil o isolamento, recuperação e purificação para uso único desses biocatalisadores, ou seja, elas devem ser reutilizadas várias vezes para tornar o processo economicamente viável (GUPTA; BHATTACHARYA;

---

MURTHY, 2013). Esta desvantagem das enzimas livres são superadas pela imobilização das mesmas, resultando na melhora de suas aplicações (YÜCEL, 2012). Segundo Kraemer et al. (2000), a enzima imobilizada é um sistema ou preparação na qual a enzima é fisicamente confinada em uma região do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas e que pode ser usada repetida e continuamente. Atualmente, o termo imobilização é utilizado para as ligações diretas entre enzima-suporte e imobilizações suportadas pelos agentes intermediários (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

A imobilização de enzimas pode ser alcançada por uma variedade de métodos físicos e químicos (adsorção, ligação covalente, *cross-linking*, encapsulamento) influenciando direta e positivamente na especificidade, atividade e estabilidade das moléculas enzimáticas, além de possibilitar a reutilização do biocatalisador (LUZIA et al., 2019). Entre eles, o método mais utilizado é a imobilização por adsorção, visto que este faz uso das interações físicas que ocorrem entre o suporte e a enzima. Essas interações incluem forças de van der Waals, interações iônicas e ligações de hidrogênio, ligações menos intensas, mas que geralmente não alteram a estrutura da enzima e evitam que os sítios ativos da mesma sofram alguma perturbação e, dessa forma, detenha sua atividade (HWANG; GU, 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). No entanto, a ligação covalente é bastante visada, visto que fornece uma forte interação química entre o suporte e a enzima e reduz bastante a possibilidade de perda da enzima (LUZIA et al., 2019; MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos suportes que apresentem propriedades aprimoradas usando fortes ligações covalentes é bastante relevante e será abordado nesse estudo.

Diante disso, diferentes suportes podem ser utilizados para imobilização de enzimas (MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020; MONTEIRO et al. 2019b; PINHEIRO et al., 2019; RIOS et al., 2018; DE SOUZA et al., 2016; SANTOS, 2015). No entanto, o uso de suportes naturais pode contribuir para a redução dos custos dos biocatalisadores e, conseqüentemente, facilitar sua utilização em escala industrial, visto que, são mais baratos e sustentáveis que os suportes sintéticos (SHELDON; VAN PELT, 2013a). Dentre os suportes naturais, os resíduos gerados de processos desenvolvidos nas agroindústrias se apresentam como uma boa opção para imobilização de enzimas, visto que são considerados fontes renováveis, apresentam baixo custo e elevada disponibilidade para uso e podem passar por tratamentos e serem aplicados em reações que agregam valor ao produto final. Diante disso, o bagaço de caju (BAG) pode se apresentar como alternativa para este fim, pois possuem

---

propriedades físicas e mecânicas apropriadas para imobilização de enzimas (SANTOS et al., 2015).

O bagaço de caju, um resíduo agroindustrial, é um material lignocelulósico, composto em sua maioria por celulose, hemicelulose e lignina. Esses compostos apresentam grupos hidroxilas em sua superfície capazes de interagir com as proteínas (LIMA et al., 2012). Os grupos hidroxila (-OH) estão presentes nas estruturas gerais de biopolímeros (BERGER et al., 2004). No entanto, os compostos do BAG formam uma estrutura rígida e pouco reativa, sendo necessária a modificação da estrutura química do suporte, através de pré-tratamentos, para obter um material que possibilite a imobilização, para posterior aplicação (BERGER et al., 2004; DE SOUZA et al., 2016). Os pré-tratamentos reduzem a cristalinidade da biomassa, separam a matriz da lignina e hidrolisam a hemicelulose, por processos químicos, físicos, biológicos ou combinações deles.

Além disso, agentes ativantes também podem ser usados a fim de modificar a estrutura do suporte e promover interações enzima – suporte (DOS SANTOS et al., 2015a; PINHEIRO et al., 2019). Entre os que mais se destacam por apresentarem propriedades que favorecem a formação de ligações com maior rigidez estão os grupos epóxi, glioxil e aldeído (DE SOUZA et al., 2016). Atualmente, estudos mostram o uso da divinilsulfona (DVS) como forma de promover modificações na superfície do suporte, ou promover uma ligação covalente multipontual intensa (DOS SANTOS et al., 2015a; MILLÁN-LINARES et al., 2015; PINHEIRO et al., 2019). Diante disso, visto que a modificação do bagaço de caju com grupos vinilsulfona visando a imobilização enzimática não foi relatada na literatura, um estudo que aproveite ao máximo o potencial da DVS foi realizado, considerando todas as etapas de imobilização enzimática: ativação do suporte, imobilização, incubação e etapa de bloqueio (DOS SANTOS et al., 2015).

Com o intuito de otimizar as condições de preparação do bagaço de caju para a produção de um novo biocatalisador, o método Taguchi foi aplicado. Esse método é uma ferramenta muito importante para determinar as melhores condições a serem aplicadas em muitos processos (BALARAM NAIK; CHENNAKESHA REDDY, 2018; KAYTAKOĞLU; AKYALÇIN, 2007; BRAR; ELSAYED, 2017; CHEN et al., 2010; HU et al., 2018; OUYANG et al., 2017; KALAISELVAN et al., 2014), sendo possível alcançar maior qualidade dos produtos em um curto período de tempo a baixo custo (LI; ZHU, 2019).

Diante disso, neste trabalho são apresentados os resultados de imobilização e estabilização da lipase A de *Candida antarctica*. O suporte, bagaço de caju, foi modificado quimicamente através do uso da DVS utilizando as condições otimizadas pelo método

Taguchi, a fim de apresentar um novo suporte adequado para imobilização da CALA, visando sua aplicação em reações de acetilação do álcool benzílico.

### **1.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo geral modificar quimicamente o bagaço de caju com divinilsulfona para verificar a imobilização da lipase do tipo A de *Candida antarctica* (CALA), visando a produção de um biocatalisador ativo e estável, para aplicação em reações de acetilação do álcool benzílico, utilizando o método Taguchi, visando a otimização do processo através da realização de um menor número de experimentos e, conseqüentemente, menor tempo gasto, quando comparado ao Delineamento Composto Central (DCC).

### **1.2 Objetivos Específicos**

- Otimizar o processo de preparação do suporte, através do método Taguchi;
- Caracterizar o bagaço de caju *in natura*, o bagaço de caju após modificação química, além da caracterização do biocatalisador produzido através da imobilização nesse suporte, por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Análises Termogravimétricas (TGA) e Análise Elementar.
- Caracterizar o biocatalisador produzido pela imobilização da lipase do tipo A de *Candida antarctica* em bagaço de caju, quanto à estabilidade térmica, estabilidade em diferentes pHs, estabilidade de estocagem e eletroforese.
- Aplicar o biocatalisador produzido em reações de acetilação do álcool benzílico.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enzimas

As enzimas atuam como catalisadores biológicos e são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos, além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e derivadas de recursos renováveis (DOS SANTOS et al., 2015b). Elas agem nas condições experimentais e ambientais mais benignas, alterando a velocidade da reação, diminuindo a energia de ativação, sem serem consumidas e sem alterar o equilíbrio da reação (SHELDON; VAN PELT, 2013b).

As enzimas apresentam uma série de características que tornam o seu uso vantajoso em comparação aos catalisadores químicos. O uso do processo químico produz grande quantidade de resíduos tóxicos, e conseqüentemente o custo com as etapas de tratamento de efluentes é muito alto (GUO et al., 2018; LIU et al., 2014; SOUSA, 2015). Por outro lado, a rota enzimática apresenta diversas vantagens, tais como condições de reação mais brandas, menor formação de subprodutos indesejáveis, alta especificidade, eficiência e sustentabilidade (KIM, 2004; ZHANG et al., 2017). Diante disso, as enzimas vem sendo amplamente estudadas visando sua aplicação em diversas áreas, como: alimentos, biocombustíveis, farmacêutica, dentre outras (BORNSCHEUER, 2003; CHOUDHARY; JANA; JHA, 2004; SINGH et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

#### 2.1.1 Lipases

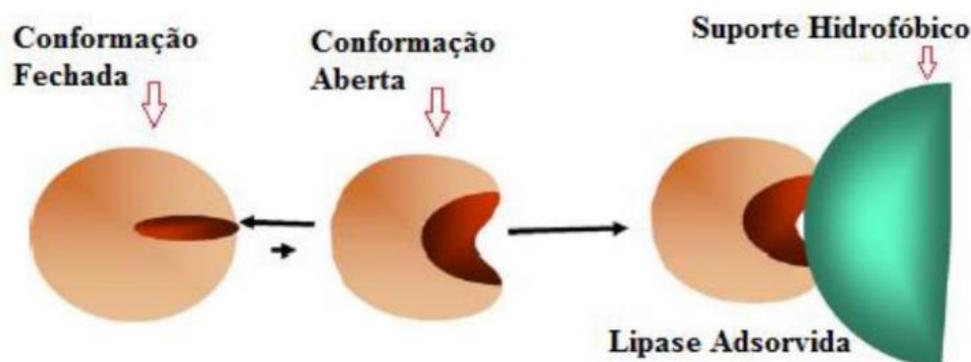
Dentre as classes de enzimas, as lipases são bastante utilizadas (MANOEL et al., 2015b). Isso ocorre devido á sua disponibilidade, visto que são enzimas onipresentes encontradas em todos os tipos de organismos vivos, desde fungos e bactérias até plantas e animais (KUMAR et al., 2016), conseqüentemente possuem baixo custo e, ainda, apresentam condições de reações moderadas (DE SOUZA et al., 2016). As lipases também catalisam uma ampla gama de reações com especificidade de substrato e alta regio, quimio e estereosseletividade em sua ação (GHANEM, 2007; LIMA et al., 2017).

Atualmente, para a produção de enzimas industriais, as lipases microbianas estão recebendo bastante atenção, pois apresenta, menor tempo de geração, grande versatilidade para se adaptar às condições ambientais, alto rendimento, simplicidade na manipulação genética e nas condições de cultivo (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases possuem papel de grande importância na aplicação industrial (DUMORNÉ et al., 2017). Devido à sua natureza versátil, a aplicação dessas enzimas se amplia a vários setores como, por exemplo, reações de síntese (JAKOVETIĆ TANASKOVIĆ et al., 2017), na produção de produtos farmacêuticos, também possuem grande potencial na tecnologia lipídica (BEZERRA et al., 2017) e de biocombustíveis (VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). A vasta área de aplicação das lipases se deve a sua diversidade e propriedades (MAIANGWA et al., 2015). O peso molecular das lipases pode variar entre 20 e 75 kDa, a atividade ótima de pH entre 4-9 e, atuam na faixa de temperaturas entre 25 – 70 °C (LOU et al., 2018; YAACOB et al., 2016).

As lipases são reconhecidas como enzimas interfaciais (YAACOB et al., 2017; SCHMID; VERGER, 1998). Eles têm uma cadeia polipeptídica móvel chamada tampa que permite a existência de duas formas conformacionais das lipases (fechadas e abertas), que estão em equilíbrio em meio homogêneo (KHAN et al., 2017; BROCCA et al., 2003) (Figura 1). Na forma fechada, a lipase tem o centro ativo bloqueado pela tampa. Na forma aberta, o centro ativo fica exposto ao solvente, de modo que a lipase exponha sua grande bolsa hidrofóbica ao meio (CARRASCOLÓPEZ et al., 2009). Na presença de uma gota hidrofóbica de substrato (uma gota de óleo), a lipase fica fortemente adsorvida e é capaz de atacar os substratos insolúveis (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Esse fato muda o equilíbrio conformacional da lipase para a forma aberta e causa um aumento na atividade enzimática, de modo que adsorção é chamada ativação interfacial (TACIAS-PASCACIO et al., 2019a) (Figura 1).

**Figura 1.** Equilíbrio conformacional da lipase.



**Fonte:** (MATEO et al., 2007)

Devido a esse mecanismo de ação, a estrutura das lipases é altamente flexível (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008), de modo que podem ser facilmente moduladas

pelas condições experimentais, por modificações genéticas, por modificações químicas ou pelo uso de diferentes protocolos de imobilização (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018). Nesse contexto, a lipase A de *Candida antarctica* (CALA) possui um papel interessante.

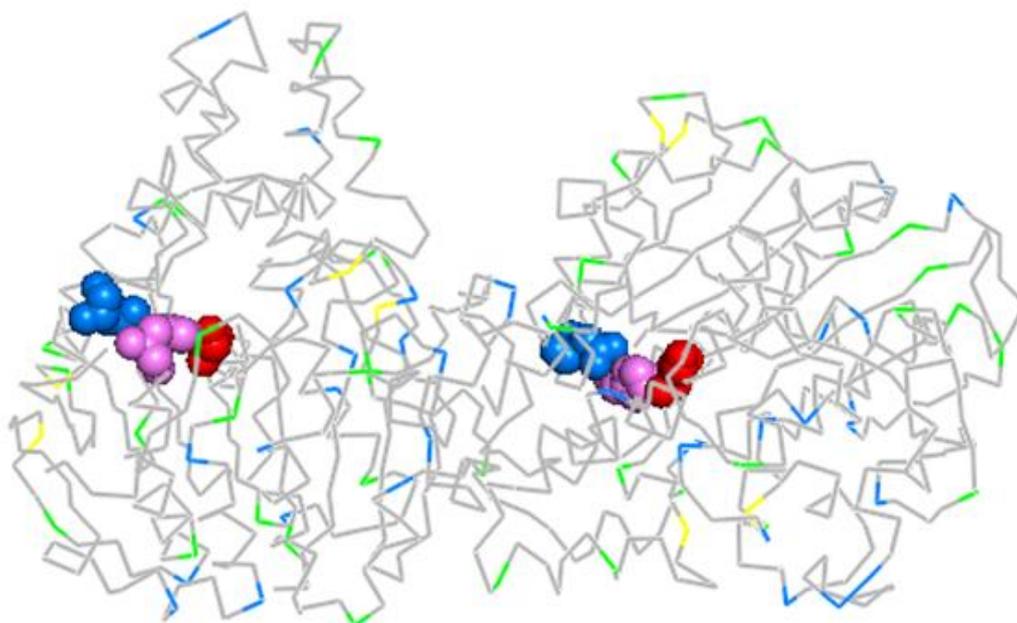
### **2.1.2 Lipase tipo A de *Candida antarctica***

A CALA é formada por 431 aminoácidos, possui massa molecular (MM) de 45 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 7,5 (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019). A CALA tem algumas propriedades úteis para catalisar reações, incluindo alta termoestabilidade, podendo trabalhar de maneira muito eficiente em temperaturas superiores a 90 °C, o que provavelmente torna a CALA a lipase do tipo selvagem mais termoestável (KIRK; CHRISTENSEN, 2002). Além disso, é capaz de tolerar uma ampla faixa de pHs, apresentando estabilidade em pHs ácido, no entanto seu pH ótimo é 7,0 (MONTEIRO et al., 2019b). Esse biocatalisador também apresenta seletividade para ácidos graxos trans e alta quimio-seletividade em relação aos grupos amina (ONDUL; DIZGE; ALBAYRAK, 2012). A CALA exibe atividade usando substratos grandes, como álcoois volumosos, ésteres e álcoois terciários e, é possível acomodar substratos estereoquimicamente impedidos (MONTEIRO et al., 2019a). A CALA é a única lipase do tipo selvagem capaz de catalisar a resolução cinética de álcoois terciários volumosos e estereotipados (LÖFGREN et al., 2019; TANYELI; ÖZDEMIRHAN, 2014). Este fato é uma consequência direta da extrema capacidade da CALA para catalisar preferencialmente a transferência de acila de álcoois ou aminas em vez de hidrólise, mesmo em meio aquoso volumoso (MÜLLER et al., 2014, 2015a). Para substratos como triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos, a CALA também mostra uma preferência maior por ácidos graxos de cadeia longa do que ácidos mais curtos (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005; KIRK; CHRISTENSEN, 2002).

Todos esses recursos da CALA estão relacionados à sua estrutura peculiar. Ericsson et al. (2008) publicou sua estrutura cristalina em 2008. Até aquele momento, devido à grande divergência entre as sequências primárias da CALA e a semelhança entre ela e as esterases, alguns debates sobre a inclusão da CALA na família das lipases aconteceram, pois foi previsto que a CALA não apresentaria tampa (uma característica clássica das lipases (CHENG et al., 2018) cobrindo o sítio ativo (KASRAYAN et al., 2007), e também devido ao modesto grau de ativação interfacial da CALA em comparação com outras lipases (MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995). De qualquer forma, Ericsson et al. (2008)

relataram que a CALA incluía uma tampa bem definida (resíduos 217–308), além de um domínio de hidrolases  $\alpha/\beta$  clássico (OLLIS et al., 1992), identificando a tríade catalítica como Ser184, Asp334 e His366, seguindo a ordem sequencial comum às lipases (RAUWERDINK; KAZLAUSKAS, 2015), com Ser184 colocado dentro de um cotovelo nucleofílico típico. Esses autores (ERICSSON et al., 2008) também relacionaram o comportamento catalítico de CALA em triglicerídeos reconhecendo à estrutura relatada; assim, eles relataram que a tampa era crucial para determinar o comportamento de acilação da CALA, pois eles observaram um túnel estreito ( $\approx 30$  Å, com urdidura de  $90^\circ$  próximo ao ponto central) começando perto dos resíduos catalíticos e se contorcendo pela hélices da tampa. A estrutura enzimática da CALA e os aminoácidos presentes em seu sítio ativo estão representados na Figura 2.

**Figura 2.** Estrutura da Lipase tipo A de *Candida antarctica* onde os resíduos de cisteína estão representados em amarelo, os resíduos de lisina em verde e os resíduos de aspartato em azul. Os resíduos histidina (roxo)/ aspartato (azul)/ serina (vermelho) presentes no sítio ativo estão representados em forma de esfera. (Código PDB: 3GUU).



**Fonte:** Pymol (2019), modificada pela autora.

A CALA possui uma tampa grande capaz de isolar o centro ativo do meio, dessa forma, sofre ativação interfacial convencional na presença de superfícies hidrofóbicas e essa conformação se estabiliza (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019).

## 2.2 Imobilização de Enzimas

As enzimas, em sua forma livre, apresentam algumas desvantagens, tais como, solubilidade em água, estabilidade moderada, inibição pelo produto ou substrato, entre outras (GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013). Diante disso, a imobilização de enzimas se apresenta como um requisito importante para a utilização desses biocatalisadores a nível industrial, permitindo, assim, sua recuperação e reutilização (YÜCEL, 2012). A possibilidade de reuso do biocatalisador torna-o economicamente mais viável (MATEO et al., 2007).

Segundo Katchalski-katzir e Kraemer (2000), a lipase imobilizada é um sistema ou preparação na qual a enzima é fisicamente confinada em uma região do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas e que pode ser usada repetida e continuamente. A ativação interfacial de lipases em superfícies hidrofóbicas tem sido utilizada para imobilizar muitas lipases diferentes, processo que envolve a forma aberta da lipase (MANOEL et al., 2015a).

Existem diferentes métodos de imobilização, dentre os mais utilizados estão, a adsorção física ou iônica, a qual utilizam atrações mais fracas entre o suporte e a enzima; o método químico onde são formadas ligações covalentes, ligações mais fortes, entre as enzimas e o suporte matriz; ligações cruzadas, com o uso de um reagente multifuncional, e o encapsulamento, que ocorre quando moléculas de lipase são aprisionadas nos poros dos suportes (BHUSHAN et al., 2008; GHIACI et al., 2009; PRABHU; RAGHAVAN, 1996; SANTOS, 2015; SERRA et al., 2008; WANG et al., 2007).

Um método eficiente de imobilização deve se basear em condições químicas moderadas, de pH, temperatura e pressão, na grande área superficial da matriz, que também influencia a imobilização durante o contato com a enzima, na estabilidade química no meio reacional, bem como uma alta carga de enzima, visto que em termos de aplicações industriais, a matriz imobilizada quimicamente e mecanicamente robusta é preferível (ARROYO; SÁNCHEZ-MONTERO; SINISTERRA, 1999; GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013; KRAGELUND et al., 1996; WYSOCKI; ŁAWRYŃCZUK, 2015; YE et al., 2005). O método adequado tem a capacidade de minimizar barreiras para o transporte de massa de substrato e produto e, naturalmente, a eficiência da matriz imobilizada depende das aplicações alvo (GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013).

A estratégia de imobilização, se bem implementada, considerando todos os fatores importantes mencionados, pode impedir a degradação da enzima e melhorar sua estabilidade

---

operacional (MATEO et al., 2007). Uma imobilização controlada pode melhorar a estabilidade, seletividade e especificidade enzimática, além de reduzir a inibição da enzima, do contrário, a imobilização enzimática pode causar a perda da atividade catalítica, mudanças conformação da enzima e limitações difusionais (GARCIA-GALAN et al., 2011). A imobilização é uma tecnologia que permite proporcionar um biocatalisador estável e ativo, através de operações relativamente simples e, é importante que não necessite de suportes de alto custo (SANTOS, 2015).

Neste trabalho, espera-se obter um biocatalisador estável frente a alterações de condições reacionais. A adsorção é um método bastante utilizado e apesar das fracas ligações entre enzima e suporte, geralmente não altera a estrutura da enzima (HWANG; GU, 2013). No entanto, a ligação covalente é um método de imobilização bastante estudado por proporcionar maior rigidez as ligações enzima-suporte, entretanto esse método pode provocar alterações na conformação da enzimática, caso não seja realizado adequadamente (PINHEIRO et al., 2019).

No caso específico das lipases, devido ao seu mecanismo de ação, elas podem ser fortemente adsorvidas em suportes hidrofóbicos, na sua conformação aberta, mesmo com baixa força iônica (MANOEL et al., 2015a, 2015b). Através desta imobilização enzimática a estabilidade da enzima pode melhorar significativamente (YAACOB et al., 2017). Dessa maneira, esta estratégia de imobilização de lipases é considerada bastante adequada, sendo capaz de permitir a imobilização nas seguintes etapas: purificação, estabilização e hiperativação da enzima (C. RODRIGUES et al., 2015; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998), alterando as condições de imobilização e de uso do suporte (BILAL et al., 2019)

Devido à possibilidade de modular as características das enzimas via imobilização, no caso das lipases, é conveniente o uso de uma variedade de técnicas de imobilização, através da preparação de biocatalisadores adequados para um processo específico (HOMAEI et al., 2013; MONTEIRO et al., 2019a; RUEDA et al., 2016c). A CALA foi imobilizada usando muitos protocolos e alguns serão apresentados no decorrer deste trabalho.

Em alguns casos, a CALA foi usada como modelo para mostrar o ajuste das enzimas ao utilizar algum detergente ou molécula semelhante a detergente durante a imobilização, para fixar a forma aberta da lipase. Por exemplo, a CALA foi uma das enzimas modelo usadas para mostrar que a reticulação de lipases adsorvidas em suportes aminados na presença de detergentes permite congelar o estado aberto da lipase, resultando em preparações enzimáticas hiperativadas (DE OLIVEIRA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2015b). No estudo apresentado por SHAKERI et al. (2010), a CALA foi imobilizada em

espuma mesocelular na presença de sacarose e liofilizados. Este tratamento permitiu obter um aumento muito significativo da termoestabilidade e enantioselectividade da enzima. O biocatalisador imobilizado foi utilizado na resolução 3-amino-3-fenilpropanoato de etila. Coimobilizando a enzima em um complexo de rutênio (para racemizar o substrato) foi alcançada uma resolução cinética de 3-amino-3-fenilpropanoato de etila, com uma conversão de 85% e 89% (SHAKERI et al., 2010).

A CALA também foi imobilizada em vários suportes diferentes. Por exemplo, em nanopartículas magnéticas (MONTEIRO et al., 2019<sup>a</sup>; CIPOLATTI et al., 2014). Nesse contexto, a CALA foi imobilizada em nanopartículas de glutaraldeído-quitosana, de modo que a imobilização melhorou a estabilidade da enzima em 8 a 11 vezes e mudou o pH ideal de 7 a 10 a pH 5-9 (MONTEIRO et al., 2019a). A CALA também foi imobilizada em superfícies planas de sílica e ouro, revestidas com alcanotóis fluorados (VOLDEN et al., 2009). Os resultados apontaram que a maior carga da CALA foi obtida usando a superfície fluorada e que a hidrofobicidade do suporte aumentada com a quantidade de enzima. Estudos também apontam a imobilização da CALA em monólitos. Por exemplo, a CALA foi imobilizado em monólitos de sílica macroporosos com porosidade controlável (HE; GREENWAY; HASWELL, 2010), dessa forma, o butirato de 4-nitrofenil no meio água/decano foi hidrolisado pelo meio imobilizado e a enzima livre, com uma conversão de 96% e 23%, respectivamente.

Muitos outros estudos podem ser encontrados nos últimos anos em relação à imobilização da CALA, como a imobilização desta em quitosana usando glutaraldeído para obter biocatalisadores ligados covalentemente ao suporte para serem utilizados na produção de éster metílico de ácidos graxos a partir de óleo de canola frito usado (AYBASTIER; DEMIR, 2014). Outro exemplo é a imobilização da CALA apenas em suportes hidrofóbicos, uma simples alternativa com resultados muito bons, na qual a CALA foi imobilizada em silicone com atividades volumétricas cerca de 53 vezes maiores que a atividade encontrada para a enzima imobilizada em gel (WU; KRAUME; ANSORGE-SCHUMACHER, 2011).

Visto que as propriedades de um biocatalisador são conduzidas pelas características da enzima e do suporte, é muito importante a etapa de escolha do suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

### **2.3 Suportes**

A escolha do suporte para o processo de imobilização deve ser avaliada por algumas propriedades. Este deve apresentar características como funcionalidade química,

---

estabilidade na temperatura e pH utilizados na reação, compatibilidade com a enzima e com o substrato, baixo custo, entre outros (BEZERRA, 2012).

Segundo Vieira (2009), é importante que o suporte escolhido possua grupos químicos que não causem a desnaturação da enzima ao se ligar a ele, se apresentando quimicamente resistente às condições de imobilização e às condições em que as reações serão realizadas.

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos (BEZERRA et al., 2015). Para aplicação em processos industriais os suportes inorgânicos têm sido utilizados por apresentarem alta resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência ao ataque microbiano e fácil regenerabilidade (DE SOUZA, 2016). No entanto, os suportes orgânicos apresentam vantagens no sentido de possuírem grupos funcionais capazes de promover a ligação enzima-suporte, além de uma variedade de grupos funcionais reativos poderem ser ligados a eles (BEZERRA, 2012; PINHEIRO et al., 2017; ADRIANO, 2008).

Nesse contexto, vários reagentes químicos podem ser usados como agentes ativantes. Dentre os que se destacam por apresentarem propriedades que favorecem a formação de ligações covalentes multiponto entre a enzima e o suporte, estão os grupos epóxi, glioxil e o glutaraldeído (DE SOUZA et al., 2016). Os grupos epóxi podem reagir com vários aminoácidos presentes na superfície da enzima (Lis, grupo amino terminal, His, Tir, Cis Asp ou Glu), entretanto, a enzima precisa ser primeiro adsorvida no suporte e, só depois algumas ligações covalentes podem ocorrer, devido à sua baixa reatividade (PINHEIRO et al., 2018). A imobilização covalente multiponto de proteínas em suportes de glioxil ocorre apenas na presença de grupos aminos primários (MATEO et al., 2006). O glutaraldeído é um produto químico bastante usado no processo de modificação da superfície do biocatalisador. A ativação com glutaraldeído é umas das técnicas mais utilizadas para imobilizar enzimas (PINHEIRO et al., 2019) e é aplicada para produzir ligações muito estáveis ao reagir com os grupos aminos da enzima (DOS SANTOS, 2015). A estabilidade da enzima pode ser significativamente melhorada se uma intensa ligação covalente multiponto for alcançada (BARBOSA et al., 2014). No entanto, ele apresenta fraca estabilidade em pHs mais alcalinos, o que reduz as possibilidades de se obter ligações covalentes multipontuais (PINHEIRO et al., 2019; DE SOUZA et al., 2016).

Estudos recentes mostram o uso da divinilsulfona (DVS) como agente ativante, promovendo uma ligação covalente multipontual intensa (DOS SANTOS et al., 2015a; MILLÁN-LINARES et al., 2015; PINHEIRO et al., 2019). Para isso, o suporte deve conter uma ampla gama de grupos amino, tiol ou hidroxila para que a ativação com DVS ocorra (DE SOUZA et al., 2016).

---

Os grupos vinil-sulfona podem envolver uma porcentagem maior da superfície da enzima na reação enzima-suporte, uma vez que estes grupos são bastante estáveis em uma faixa de pH entre 4 e 10 (DOS SANTOS et al., 2015b). Nesse trabalho, a possibilidade do ataque nucleofílico dos grupos vinil-sulfona aos grupos hidroxila do suporte, na reação do bagaço de caju com DVS, foram estudados. Diante disso, dentre os suportes orgânicos naturais já estudados, o bagaço de caju foi escolhido para aplicação neste trabalho.

### **2.3.1 Bagaço de Caju**

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tropical, sendo o caju composto da castanha (fruto) e do pedúnculo (pseudofruto) (REIS, 2016). O cajueiro é originário da região Nordeste do Brasil, no litoral nordestino, que apresenta as melhores condições ecológicas para o seu cultivo (CORREIA, 2013). A castanha de caju representa grande valor comercial no Brasil e no exterior e, o pedúnculo é subutilizado (REIS, 2016; CORREIA, 2013). Estima-se que para cada tonelada de castanha de caju produzida aproximadamente 10 - 15 toneladas de caju são obtidas como subproduto (DAS e ARORA, 2017).

O bagaço de caju (BAG) é um material orgânico e renovável (DE ALBUQUERQUE, 2014; ROCHA, 2010). O BAG é um subproduto da indústria de suco de caju e representa cerca de 15 a 20% do peso total do pedúnculo. No processo industrial de produção de suco de caju, são gerados cerca de 15% (m/m) de bagaço, representando um dos principais resíduos agroindustriais do Brasil (QUEIROZ et al., 2010; CORREIA et al., 2013 ; ROCHA et al., 2014; REIS et al., 2017; PADILHA et al., 2019).

Dessa forma, considerando a quantidade perdida no processamento industrial e a não utilização dos pedúnculos pelo mercado consumidor, devido as exigências de não aceitar esse produto com aspectos físicos inferiores, a utilização do bagaço de caju como material lignocelulósico surge como uma forma viável para produção de produtos de valor agregado, pois além de adquirir um produto final, também é dada uma finalidade aos rejeitos industriais.

Nesse contexto, o bagaço de caju pode ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, pois são materiais de baixo custo, minimizam os impactos ao meio ambiente e agregam valor a esses resíduos que não serão descartados na natureza, além de serem constituídos por material lignocelulose que apresentam boas propriedades mecânicas e físicas (DE SOUZA et al., 2016).

---

Os maiores constituintes do bagaço de caju são celulose, hemicelulose e lignina. As proporções desses constituintes foram relatadas por Rocha (2010) e por Correia et al. (2013): 20,54% e 20,56%; 16,33% e 10,17%; 33,62% e 35,26%, respectivamente. Esses componentes formam uma estrutura rígida, pouco reativa e quando interligados atuam como uma barreira para a ação de enzimas, sendo necessário passar por tratamentos para posterior aplicação e, desse forma, promover a solubilização da lignina e o rompimento das estruturas cristalinas destes materiais (ARANTES E SADDLER, 2010; REIS, 2016). Nesse contexto, são realizados tratamentos que podem ser físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

### *2.3.1.1 Pré-tratamentos*

A estrutura recalcitrante do material lignocelulósico é a principal barreira para sua utilização. A etapa para romper essa estrutura e tornar o material mais acessível ao ataque enzimático para conversão em açúcares ou para imobilização é o pré-tratamento (CORREIA et al., 2013).

Devido à natureza cristalina da celulose e a dificuldade na acessibilidade dos agentes hidrolíticos, diante das complexas interações entre celulose e hemicelulose nas paredes celulares dos vegetais, entre esses polissacarídeos e lignina e também da barreira física formada por lignina em volta das fibras de celulose, surgiram inúmeros métodos de pré-tratamento de biomassa (ROCHA, 2010). Estes métodos de pré-tratamento podem ser classificados como físicos, químicos, biológicos ou físico-químicos (CORREIA et al., 2013; ROCHA, 2010). Um tratamento é considerado eficiente se a acessibilidade ao ataque biológico (enzimas e microrganismos) é maximizada, e a formação dos co-produtos inibidores diminui (DE SOUZA, 2016). Dessa forma, vários reagentes químicos podem ser usados para modificar a estrutura do suporte, como grupos epóxidos, glioxil, glutaraldeído, divinilsulfona, considerando suas boas propriedades para permitir a ligação covalente multiponto entre a enzima e o suporte (DE SOUZA et al., 2016).

A determinação do tratamento adequado para a matéria-prima é realizada considerando o tipo de matéria-prima empregada, os rendimentos obtidos em cada processo e a aplicação do material.

De acordo com CORREIA (2013) e KODALI e POGAKU (2008), em busca de encontrar um método eficiente de pré-tratamento, importantes estudos vêm sendo realizados, visto que, se o pré-tratamento for muito agressivo o resultado é a produção de compostos

tóxicos e se o pré-tratamento não é eficaz o resultado é um material difícil de ser hidrolisado por enzimas. Diante disso, o tratamento com DVS pode ser promissor.

Dependendo do tipo de pré-tratamento, diferentes efeitos podem ser observados no material lignocelulósico pré-tratado como, por exemplo, alta extração de açúcares; remoção parcial ou quase total da lignina, aumento da porosidade e da área superficial do material, entre outros efeitos apresentados por GALBE e ZACCHI (2007).

Tratamentos físicos, como a moagem e a extrusão não alteram a composição da biomassa, mas alteram a sua estrutura por meio do aumento da área superficial e redução da cristalinidade e embora sejam simples, apresentam elevado custo energético. Enquanto, os biológicos apresentam um elevado tempo de processamento, tornando-os desinteressantes para aplicação comercial (ALVIRA et al., 2010). Os pré-tratamentos físico-químicos e químicos, de modo geral são eficientes, mas aumenta a produção de inibidores. Dentre os tratamentos químicos, os alcalinos removem, principalmente, a fração da lignina, logo a biomassa será composta predominantemente por hemicelulose e celulose ao final do processo (RODRIGUES, 2010), e o tratamento ácido, remove a hemicelulose para a corrente líquida, reduz a cristalinidade da celulose e, forma uma corrente rica em celulose e lignina (DE ALBUQUERQUE, 2014; DE SOUZA, 2016).

Vários estudos tem sido realizados utilizando os pré-tratamentos químicos, destacando-se pré-tratamentos ácidos e básicos (CORREIA et al, 2013; SAHA, 2003; SAHA et al., 2005; SAHA e COTTA, 2006; ROCHA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; DE SOUZA et al., 2016). Alguns desses estudos utilizaram o bagaço de caju como matéria-prima. No estudo desenvolvido por Correia (2013) foram realizados ensaios com bagaço de caju para a produção de etanol. Albuquerque (2015) estudou a produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de caju. Souza (2016) avaliou a produção de biocatalisadores enzimáticos utilizando o bagaço de caju como suporte para imobilização de enzimas. Silva et al. (2019) estudou a biodegradação do fenol por *Candida tropicalis* ATCC 750 imobilizada em bagaço de caju.

Embora muitos métodos de pré-tratamentos tenham sido experimentados ao longo dos últimos anos, constata-se a necessidade em desenvolver novas alternativas eficientes em termos de baixos custos. Diante disso, este trabalho se baseou no estudo do pré-tratamento químico. Visto que, na literatura não foi relatado pré-tratamentos utilizando a DVS no processo, as melhores condições para este fim foram estudadas, de modo que a otimização das condições aplicadas foi realizada utilizando como ferramenta de análise o planejamento experimental através do Método Taguchi. Esse método será relatado a seguir.

## 2.4 Método Taguchi

O método Taguchi é um método muito eficaz usado na otimização e análise de efeitos de parâmetros, ele se destaca quando comparado aos modelos experimentais tradicionais que necessitam de bastante tempo e recurso, como o planejamento fatorial (ZHANG et al., 2019). O método Taguchi utiliza um arranjo ortogonal adequado de modo que é possível reduzir a maioria dos cálculos e também apresentar claramente a influência de cada fator no parâmetro desejado com a realização de menos experimentos, como apresentado no estudo de El khalidi (2018), onde um arranjo ortogonal L9 ( $3^3$ ) foi utilizado usando as características da função "quanto maior, melhor", a fim de maximizar a resposta do coeficiente de textura.

Este método utiliza a relação sinal/ruído (S/R) para medir a variabilidade de desempenho, enquanto a ANOVA avalia a importância relativa de cada fator (PETERSEN; LINK; RUSHFORTH, 2009). O valor da razão S/R é calculada a partir da Equação 1 (PETERSEN; LINK; RUSHFORTH, 2009).

$$\frac{S}{R} = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (1)$$

Em que  $y$  é a atividade do biocatalisador para cada experimento,  $i$  é o número de repetições e  $n$  é o número de respostas para a combinação de todos os níveis dos fatores em qualquer combinação paramétrica. A relação S/R prevista em condições ideais para o processo de obtenção da atividade do biocatalisador foram estimadas pela Equação 2 (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$\frac{S}{R_{predita}} = \frac{S_M}{R} + \sum_{j=1}^n \left( \frac{S}{R_j} - \frac{S_M}{R} \right) \quad (2)$$

Em que  $S_M/R$  é a média aritmética de todas as relações S/R,  $S/R_j$  é a relação S/R no ponto ideal para cada fator e  $n$  é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

A lipase A de *Candida antarctica* (CALA) (20,88 mg de proteína/ mL) foi fornecida pela Novozymes (Alcobendas, Espanha). O bagaço de caju (*Anacardium occidentale L.*) foi gentilmente doado pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia (Ceará, Brazil). A divinilssulfona, etilenodiamina (EDA), triton X-100 e o butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) foram todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de qualidade analítica. A elaboração do planejamento experimental foi realizada pelo método Taguchi usando o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA).

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1 Preparação do suporte

A preparação do bagaço de caju foi realizada seguindo a metodologia utilizada por SOUZA et al. (2016). O bagaço de caju (BAG) coletado foi lavado três vezes com água destilada, seco a 60 °C por 24 h e moído em um moinho de faca para obter um tamanho médio de partícula inferior a 80 mesh (0,177 mm) e, então, foi usado como suporte. O BAG moído foi armazenado à temperatura ambiente (20-30 °C).

##### 3.2.2 Otimização do protocolo de modificação química do bagaço de caju com DVS

Para este estudo, um planejamento experimental avançado pelo método Taguchi com uma matriz ortogonal padrão L16 (o "L" representa o quadrado latino e "16" o número de experimentos) foi usado para examinar cinco fatores em quatro níveis a fim de otimizar o protocolo de modificação química do bagaço de caju na presença de DVS e, dessa forma, obter as melhores condições de preparação do suporte para imobilização da CALA, em busca de maximizar a atividade do biocatalisador produzido. Os valores preestabelecidos para realização do planejamento experimental foram determinados de acordo com estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Para isso, 1,0 g de BAG foi suspenso em 20 mL de solução de bicarbonato de sódio, variando a concentração (5, 25, 100 e 350 mM) e pH (3, 5, 7 e 12,5) da solução. A DVS também foi adicionada à solução variando sua

quantidade em quatro níveis (1, 3, 5 e 7.5 mL). O sistema foi mantido sob constante agitação durante os tempos de 30min, 3, 12, e 24 h a 4, 15, 25 e 30 °C.

Após o tempo específico para cada ensaio de preparação do suporte, este foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada. Em seguida, o BAG pré-tratado foi utilizado para imobilizar a CALA, como descrito na seção (3.2.3). Os resultados de atividade do derivado obtidos após imobilização da CALA em cada um dos suportes pré-tratados, definiu a otimização das melhores condições de preparação do suporte. A Tabela 1 mostra os cinco fatores independentes (quantidade de DVS, concentração de tampão, pH, temperatura e tempo) e seus níveis correspondentes.

**Tabela 1.** Fatores independentes e seus respectivos níveis para o tratamento do suporte.

	Quantidade de DVS (mL)	Concentração do tampão (mM)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
Nível 1 (L1)	1	5	3	4	0,5
Nível 2 (L2)	3	25	5	15	3
Nível 3 (L3)	5	100	7	25	12
Nível 4 (L4)	7,5	350	12,5	30	24

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Para o delineamento experimental e análise estatística, o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA) foi utilizado. Diante do objetivo deste estudo de maximizar a resposta (atividade do biocatalisador), os valores das relações S/R referentes às atividades do derivado foram calculadas utilizando a função "quanto maior, melhor". O valor da razão S/R para cada experimento foi calculado de acordo com a Equação 1 e 2, apresentadas na seção (2.5).

### 3.2.3 Imobilização da CALA

Os ensaios de imobilização foram realizados utilizando carga de 1 mg de proteína/g de suporte. A CALA foi imobilizada no bagaço de caju pré-tratado na presença de 0,01% (v/v) de Triton-X, para evitar a formação de dímeros e para que ocorra a ativação interfacial da lipase. O tampão utilizado foi o tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 a 25 °C por 24 h, sob agitação contínua de acordo com Pinheiro et al. (2019). Após imobilização, os biocatalisadores foram incubados em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0 (1:10 m/v) a 25 °C por 24 h. Em seguida, os biocatalisadores foram incubados em uma solução de EDA 1 M, pH 10,0 também por 24 h a 4 °C. Finalmente, os biocatalisadores foram filtrados a vácuo, lavados com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 e armazenados a 6 °C. Os

experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são relatados como os valores médios obtidos e o desvio padrão mantido abaixo de 15%.

### **3.2.4 Determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína**

A atividade hidrolítica da CALA livre e imobilizada foi determinada seguindo a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2019). Foi utilizado como solução de substrato o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB 50 mM em acetonitrila). Assim, 50 microlitros de solução de *p*-NPB foi adicionada a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7.0 (25 mM) a 25 °C, juntamente com 50 microlitros de solução enzimática ou 30 mg de enzima imobilizada. O produto da reação, *p*-nitrofenol, foi quantificado espectrofotometricamente a 348 nm ( $\epsilon = 5.236 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), com temperatura e agitação controladas (PINHEIRO et al., 2019). Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-NPB por minuto, nas condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e a albumina de soro bovino foi usada como referência.

### **3.2.5 Parâmetros de imobilização**

Os parâmetros de imobilização foram determinados de acordo com a metodologia apresentada por Pinheiro et al. (2019). O rendimento de imobilização (%) descreve a porcentagem de atividade enzimática que foi imobilizada com sucesso no suporte. A atividade do derivado (U/g) foi determinada pela inclinação da curva ( $\alpha$ ) em abs/min multiplicada pelo fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol (*p*NP) em  $\mu\text{mol/mL.abs}$ , pelo volume de reação em mL e o resultado dividido pela massa do suporte em g. A atividade teórica ( $A_{T}$ ) da lipase imobilizada no suporte pode ser calculada usando a quantidade de enzima oferecida/g de suporte multiplicada pelo rendimento da imobilização (DOS SANTOS et al., 2017). E a atividade recuperada é a porcentagem de atividade enzimática que é medida na enzima imobilizada versus a atividade imobilizada teórica.

### **3.2.6 Caracterização do suporte antes e após otimização das condições de pré-tratamento**

O BAG, BAG-DVS e o BAG-DVS-CALA foram caracterizados por diferentes técnicas, a saber: espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Análise de Termogravimetria (TGA e DTG) e análise elementar. O bagaço de caju *in natura* e o

bagago pré-tratado na presença de DVS, também foram caracterizados quanto a concentração de umidade.

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

Os espectros de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier foram obtidos no Espectrômetro Perkin Elmer 2000 na faixa de 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Para isso, as amostras foram previamente secas e pressionadas com KBr em formato de disco (MONTEIRO et al., 2019b).

### 3.2.6.2 Análises de Termogravimetria (TGA e DTG)

Os ensaios termogravimétricos foram realizados elevando a temperatura da amostra de 25 °C para 800 °C a uma taxa de 10 °C/min sob fluxo de nitrogênio em um analisador termogravimétrico V20 Q50 (MONTEIRO et al., 2019b).

### 3.2.6.3 Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas utilizando um Analisador Elementar - Perkin Elmer Série 2400 no modo CHNS.

### 3.2.6.4 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com metodologia do National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008b). Em um cadinho de 25 mL, previamente pesado, adicionou-se 0,5 g  $\pm$  0,1 mg da amostra e em seguida foi levado para estufa a 105 °C por 4 h. Após esse período o material foi retirado da estufa e esfriado a temperatura ambiente em um dessecador para efetuar a pesagem. Colocou-se a amostra novamente na estufa a 105 °C e secou-se até peso constante. O peso constante foi definido como  $\pm$  0,1% de alteração no peso dos sólidos sobre uma hora de aquecimento da amostra. A percentagem de sólidos totais (ST) foi determinada segundo a Equação 3.

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_{\acute{U}MIDA} - m_{SECA}}{m_{\acute{U}MIDA}} * 100 \quad (3)$$

### **3.2.7 Caracterização da enzima livre e imobilizada**

#### *3.2.7.1 Curso de imobilização*

A enzima foi imobilizada em tampão acetato de sódio (5 mM; pH 5,0), tampão fosfato de sódio (5 mM; pH 7,0) e tampão carbonato de sódio (5 mM; pH 9,0), durante 24 h a 25 °C. O suporte tratado na condição otimizada foi suspenso na solução enzimática sob agitação suave e periodicamente, amostras do sobrenadante e suspensão ou derivado foram retiradas e a atividade enzimática foi medida. Também foi realizado um ensaio em branco, na qual uma solução enzimática foi preparada nas mesmas condições de imobilização, mas na ausência de suporte (PINHEIRO et al., 2019).

#### *3.2.7.2 Estabilidade térmica e de pH*

O biocatalisador foi incubado em tampão acetato de sódio (5 mM; pH 5,0), tampão fosfato de sódio (5 mM; pH 7,0) e tampão carbonato de sódio (5 mM; pH 9,0) a 70 °C. A atividade foi mensurada periodicamente usando o ensaio *p*-NPB, descrito na seção 3.2.4 e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade inicial (atividade hidrolítica antes da incubação térmica). As meias-vidas foram calculadas a partir da desativação enzimática a 70 °C de acordo com o modelo de Sadana e Henley (HENLEY; SADANA, 1985).

#### *3.2.7.3 Ensaio de carga máxima*

A capacidade de carga do suporte foi investigada seguindo metodologia aplicada por SOUZA et al. (2016), oferecendo diferentes quantidades de proteína por g de suporte (1 a 15 mg/g de suporte). As condições de imobilização foram apresentadas na seção 3.2.3.

### **3.2.8 Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE**

Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS- PAGE) foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970). A enzima solúvel e imobilizada foi submetida a 100 °C durante 10 minutos e alíquotas contendo 10 µL de solução foram distribuídas nos poços do gel. O gel de corrida, 12% de separação em uma zona de 9 cm x 6 cm, com 5% de concentração de poliacrilamida, foi submetido à voltagem de 150 V e tempo de corrida aproximadamente 1h e 30 minutos. A revelação dos géis foi com azul brilhante de Comassie. Os marcadores de

baixo peso molecular (GE Healthcare Life Sciences) utilizados eram compreendidos entre 14 – 97 KDa.

### ***3.2.9 Síntese enzimática do composto responsável pelo aroma do jasmim***

Uma quantidade de 5 mg da enzima imobilizada foi adicionada a 20  $\mu$ L de álcool benzílico e 50  $\mu$ L de acetato de vinila em 2 mL de solução de hexano. Em seguida, as alíquotas foram retiradas após 12, 24 e 72 h, analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa usando colunas quirais (MELO et al., 2017).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Otimização do protocolo de modificação química do bagaço de caju utilizando o Método Taguchi

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do processo de maximização da atividade do biocatalisador (BAG-DVS-CALA), em que a relação S/R foi determinada pela função “quanto maior, melhor”.

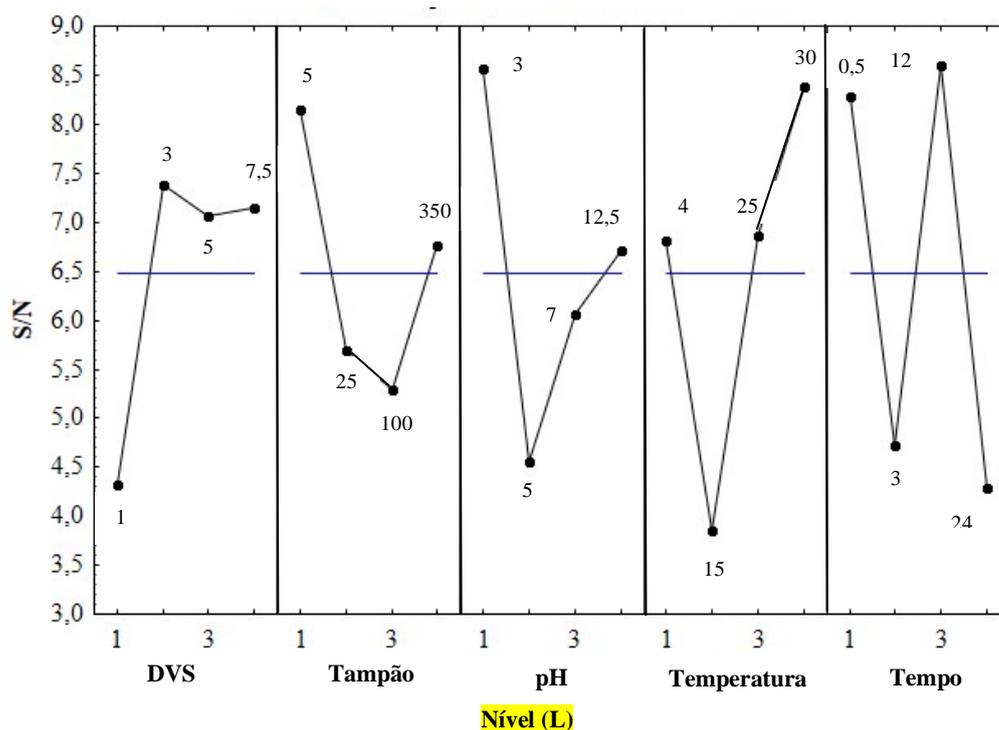
**Tabela 2.** Planejamento experimental de matriz ortogonal L16 com os valores da atividade do derivado e as razões S/R (o processo de imobilização dos experimentos foi realizado em tampão fosfato de sódio 5 Mm em pH 7 a 25 °C por 24 h, na presença de Triton - X 0,01%).

Experimento	Quantidade de DVS (mL)	Concentração do tampão (mM)	pH	Temperatura (° C)	Tempo (h)	Atividade do Derivado (U/g)	Razões S/R
1	1	5	3	4	0,5	<b>3,2 ± 0,2</b>	10,24
2	3	100	12,5	4	3	<b>0,7 ± 0,1</b>	-2,73
3	5	350	5	4	12	<b>1,8 ± 0,2</b>	5,25
4	7,5	25	7	4	24	<b>1,7 ± 0,0</b>	4,55
5	1	350	12,5	30	24	<b>1,8 ± 0,1</b>	5,34
6	3	25	3	30	12	<b>4,3 ± 0,1</b>	12,73
7	5	5	7	30	3	<b>1,8 ± 0,1</b>	5,01
8	7,5	100	5	30	0,5	<b>2,1 ± 0,1</b>	6,44
9	1	25	5	15	3	<b>2,6 ± 0,2</b>	8,46
10	3	350	7	15	0,5	<b>2,7 ± 0,1</b>	8,72
11	5	100	3	15	24	<b>1,4 ± 0,0</b>	3,17
12	7,5	5	12,5	15	12	<b>2,5 ± 0,2</b>	7,89
13	1	100	7	25	12	<b>2,7 ± 0,0</b>	8,56
14	3	5	5	25	24	<b>1,6 ± 0,2</b>	4,08
15	5	25	12,5	25	0,5	<b>2,4 ± 0,0</b>	7,75
16	7,5	350	3	25	3	<b>2,6 ± 0,1</b>	8,16

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

O método Taguchi analisa os melhores resultados obtidos no planejamento experimental e, a partir disso fornece condições otimizadas para se alcançar um maior valor da atividade do biocatalisador. Esse valor é obtido pela maior razão S/R, que indica o melhor nível para cada parâmetro. A razão S/R ótima prevista para as condições otimizadas foi calculada a partir da Equação 1 (seção 2.5) e, para este estudo, a melhor razão obtida para maximizar a atividade do biocatalisador foi de 15,18. Esse resultado é fornecido pelo programa e sugere os melhores níveis para cada parâmetro, L2 (3 mL) para a quantidade de DVS, L1 (5 mM) para a concentração do tampão, L1 (3) para o pH, L4 (30 °C) para a temperatura e L3 (12 h) para o tempo, como pode ser observado na Figura 3. Para essa combinação de parâmetros, a atividade teórica do BAG-DVS-CALA foi de 6,5 U/g, determinada pelo programa. A fim de validar as condições ideais, foram realizados experimentos em triplicata, obtendo uma atividade do derivado de  $6,83 \pm 0,55$  (U/g).

**Figura 3.** A média da razão S/R que representa a quantidade de DVS, a concentração do tampão, o pH, a temperatura e o tempo para otimização da preparação do suporte.



**Fonte:** Adaptada de Software Estatística (2019).

As condições otimizadas (DVS: 3 mL, tampão: 5 mM, pH 3, 30 °C, 12 horas) proporcionaram mudanças na estrutura química do bagaço que favoreceram a imobilização da CALA. De acordo com De souza et al. (2016), para utilização do bagaço de caju como suporte são necessárias modificações na sua estrutura a fim de aumentar sua reatividade com

a enzima. A maioria dos métodos de pré-tratamento resultam no desarranjo das estruturas da celulose, contribuindo para uma maior exposição dos elementos que compõem o bagaço de caju (ROCHA et al, 2010; DE ALBUQUERQUE, 2014). Neste estudo, o método de moagem também foi utilizado, previamente, a fim de reduzir o tamanho das partículas e, assim, facilitar a introdução da enzima no suporte (DA SILVA et al., 2010; DE ALBUQUERQUE, 2014).

Diante da possibilidade da introdução dos grupos divinilsulfona em diferentes pHs (DOS SANTOS et al., 2015b; PINHEIRO et al., 2019), os pré-tratamentos ácido, básico e neutro, foram avaliados. Para isso, uma solução de bicarbonato de sódio foi utilizada como descrito na seção métodos e, as condições utilizadas variaram em concentração de tampão (5, 25, 100, 350 mM) e pH (3, 5, 7 e 12,5), de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1. Os melhores resultados foram obtidos em pH ácido, como pode ser observado na Figura 3.

A temperatura foi o fator que mais influenciou no pré-tratamento do bagaço de caju, favorecendo a etapa de imobilização da CALA neste suporte, como pode ser visto na Tabela 3. A classificação dos parâmetros (quantidade de DVS, concentração e pH do tampão, temperatura e tempo) com base na diferença dos valores da razão S/R entre os níveis mais alto e mais baixo dos fatores do processo (valores delta) é apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Tabela de respostas das razões S/R. Outras especificações são descritas nos métodos.

Níveis	Quantidade de DVS (mL)	Concentração do Tampão (mM)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
L1	4,33	8,15	8,57	6,80	8,29
L2	7,38	5,70	4,56	3,86	4,73
L3	7,06	5,29	6,06	6,87	8,61
L4	7,14	6,76	6,71	8,37	4,29
Delta	3,05	2,86	4,01	4,51	4,32
Rank	4	5	3	1	2

Fonte: Adaptada de Software Estatística (2019).

A temperatura aumenta as colisões moleculares e provoca uma diminuição na barreira de energia entre as moléculas dos reagentes, o que causa um acréscimo na taxa de reação do processo (BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2015; GUMEL; ANNUAR, 2016). Logo, é possível observar que temperaturas maiores podem melhorar ou facilitar as

modificações no suporte e a temperatura ótima de reação varia dependendo de vários fatores (KIM et al., 2019).

O segundo fator de maior influência para este estudo foi o tempo, como pode ser observado na Tabela 3. Segundo Oliveira et al. (2019) o tempo é considerado um importante indicador da eficácia do processo e do desempenho econômico. Uma vez que um processo biotecnológico usado em larga escala deve combinar altas taxas de conversão em tempos de reação relativamente curtos (MARTINS et al., 2011). No entanto, dentre os tempos estudados (0,5, 3, 12 e 24 h), o tempo de 12 h se apresentou como condição ótima, como pode ser observado na Figura 3. Analisando a Figura 3 também é possível observar que o tempo de 0,5 h teve comportamento aproximado da condição ótima (12 horas), no entanto tentamos ser fieis aos resultados fornecidos pelo programa.

Com relação ao pH, é importante observar, ao analisar a Figura 3, que o pH 3, o mais ácido utilizado nesse estudo, foi determinado como ótimo. O pré-tratamento ácido aplicado, ainda que em condições brandas, contribuiu para a introdução da enzima no suporte.

Outro fator considerado nesse estudo foi a quantidade de DVS adicionada ao suporte durante sua preparação, para testar o seu efeito nas interações enzima-suporte, devido à alta reatividade dos grupos DVS. Dessa forma, como mostrado na Figura 3, 3mL de DVS por g de suporte foi determinada como condição ótima neste planejamento, dentre os valores preestabelecidos (1, 3, 5 e 7,5 mL). Este resultado mostra que é possível que em altas concentrações de DVS ocorra cross-linking intermolecular e, não favoreça a função da DVS como agente ativador para formar a ligação entre a enzima e o suporte. Entretanto, é importante observar (Tabela 3) que o pH teve maior influência nos resultados alcançados quando comparado a quantidade de DVS adicionada. Visto que os grupos vinil-sulfona são bastante estáveis a uma gama de pH entre 4 e 10, valores extremos de pH podem não favorecer a introdução de DVS no suporte (PINHEIRO et al., 2019). Além disso, possivelmente em altas concentrações de DVS pode ter ocorrido cross-linking intermolecular, como mostra a Figura 5. No entanto, é possível que a divinilsulfona tenha apresentado os efeitos esperados como agente ativador, como será mostrado no decorrer das discussões.

Apesar de a força iônica ter apresentado menor influência na maximização dos resultados, como pode ser observado na Tabela 3, este é um parâmetro importante a ser considerado na preparação e ativação do suporte, bem como para imobilização enzimática (BISSWANGER, 2014; MENDES et al., 2011; SIMON, 2015). Neste trabalho, como pode ser observado ao analisar a Figura 3, o menor valor estudado da concentração do tampão (5

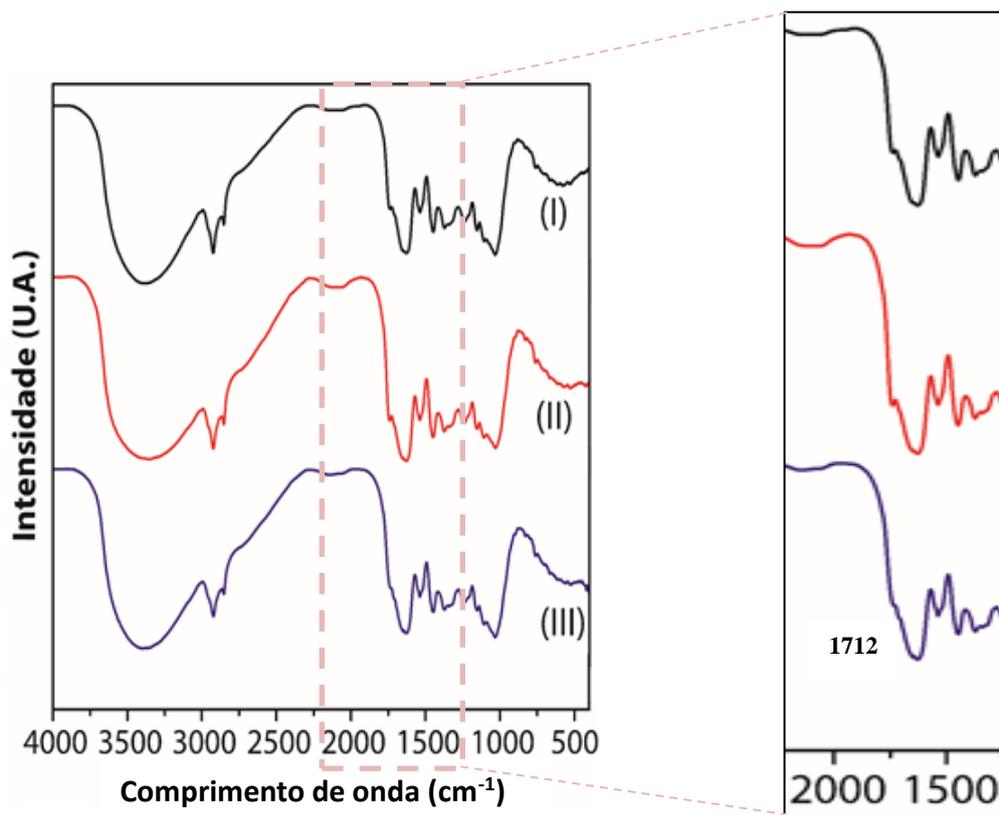
mM) através do planejamento experimental, foi determinado como condição ideal para se obter os melhores resultados de atividade do derivado. Observando as condições utilizadas para a maior atividade do derivado apresentada na Tabela 2 (ensaio 6), pode-se ver que a concentração do tampão foi de 25 mM. É possível que a utilização da força iônica do tampão a 5 e 25 mM não tenham apresentado diferença significativa nos resultados. Dessa forma, o programa tendeu ao menor valor, já que ele visa à redução de custos de produção (LI; ZHU, 2019). De acordo com Bisswanger (2014) uma quantidade elevada de íons na solução, pode diminuir a solubilidade da enzima, conduzindo a sua precipitação. Essa precipitação pode provocar a redução da capacidade catalítica e a desativação da enzima, dependendo da natureza do íon (BISSWANGER, 2014). Além disso, segundo Arana-Peña et al. (2020) observaram, o aumento da força iônica durante a imobilização da enzima pode produzir um efeito negativo na atividade da enzima com *p*NPB. Portanto, o bagaço preparado com baixa força iônica favoreceu a imobilização enzimática.

#### 4.2 Caracterizações do Suporte

Análises FTIR foram realizadas para avaliar a modificação da estrutura do bagaço de caju (BAG) devido à reação de ativação com a divinilsulfona (DVS), nas condições ótimas obtidas a partir do planejamento experimental (BAG – DVS) e imobilização da CALA (BAG – DVS – CALA). Os espectros obtidos na região do infravermelho para as amostras do bagaço de caju, BAG – DVS, e BAG – DVS – CALA estão mostrados na Figura 4. Nos espectros em todas as amostras são observadas bandas em 3375, 2927 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  que podem ser associadas ao estiramento da ligação O – H e aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C – H, respectivamente. Além dessas, também foi observado uma banda próximo de 1739  $\text{cm}^{-1}$  que é relacionada ao estiramento C = O associadas a grupos acetil e de ácidos carboxílicos presentes na unidade de hemicelulose (SILVA et al., 2015). As bandas relacionadas ao estiramento assimétrico de carboxilatos foram observadas em aproximadamente 1629  $\text{cm}^{-1}$  (LEÃO et al., 2017). Vibrações esqueléticas características da ligação C – C de anéis aromáticos foram observadas na faixa de 1560 – 1500  $\text{cm}^{-1}$  (XU et al., 2018). Bandas características da lignina presente nas amostras foram observadas em 1516 e 1448  $\text{cm}^{-1}$  e são associadas ao estiramento C = C e a deformação angular da ligação C – H em anéis fenólicos, respectivamente (REIS et al., 2017). Outras bandas características de materiais lignocelulósicos também foram observadas em 1375, 1236, 1153 e 1031  $\text{cm}^{-1}$  e podem ser associadas a vibração de estiramento da ligação C – H, C – O de grupos acetil presentes na hemicelulose, estiramento assimétrico da ligação C – O e ao estiramento da

ligação C – O – C, respectivamente (DE SOUZA et al., 2016; KLAPISZEWSKI et al., 2013). Com relação aos grupamentos provenientes da DVS, essa caracterização não foi sensível o suficiente para indicar a reação ou interação do bagaço com a divinilsulfona, devido a complexa estrutura do suporte.

**Figura 4.** Espectro na região do infravermelho das amostras (I) BAG, (II) BAG – DVS e (III) BAG – DVS – CALA.

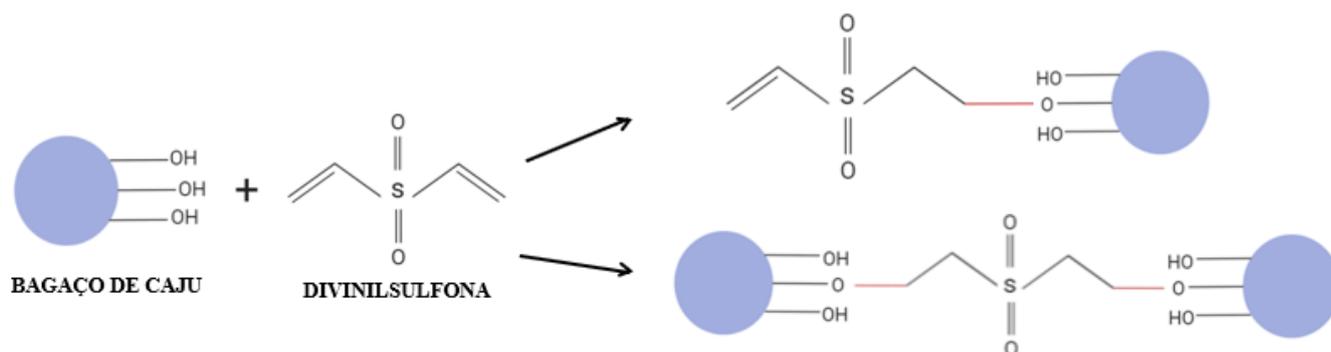


**Fonte:** Elaborada pela autora (2019).

Os espectros na região do infravermelho obtidos para as amostras sintetizadas neste trabalho são extremamente semelhantes. A ativação da amostra BAG com a molécula DVS deveria gerar na sua estrutura grupos S = O, como mostra a Figura 5, que deveriam mostrar uma absorção na região de 1300 cm<sup>-1</sup> (PINHEIRO et al., 2019). No entanto, não foi possível observar mudanças nas intensidades relativas dessas bandas, visto que os materiais lignocelulósicos são bastante complexos e devido a presença de interferentes e o fato desse método ser qualitativo, não foi possível observar modificações na estrutura química da amostra BAG com a DVS. O mesmo acontece com a amostra BAG – DVS – CALA, na qual a complexa estrutura química do suporte dificultou observar bandas que possa sugerir a inserção da enzima CALA, foi possível identificar apenas uma sutil mudança que surge em

1712  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído aos estiramentos  $\text{C} = \text{O}$  de cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres não-conjugados, grupos estes que fazem parte do bagaço (REIS et al., 2017).

**Figura 5.** Mecanismos de ligações entre a DVS e o bagaço de caju.



**Fonte:** Elaborada pela autora (2019).

A Tabela 4 mostra os resultados da análise elementar (percentagem de C, H, N e S) do bagaço puro, bagaço tratado com DVS e do biocatalisador. A percentagem de carbono, hidrogênio e enxofre no bagaço não foi significativamente alterada quando comparada com a percentagem de nitrogênio. Com relação a quantidade de enxofre, através da análise elementar não foi possível observar aumento na quantidade de DVS na amostra em que o bagaço de caju foi ativado com a divinilsulfona (BAG – DVS) e na amostra BAG – DVS – CALA. No entanto, a considerável alteração na quantidade de nitrogênio apresentada no biocatalisador, sugere que a enzima foi imobilizada.

**Tabela 4.** Análise elementar (carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre) do bagaço puro, bagaço tratado com DVS nas condições otimizadas e do biocatalisador. Outras especificações foram descritas nos métodos.

Material	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio	% Enxofre
<b>BAG</b>	47,08	6,63	1,92	1,67
<b>BAG-DVS</b>	46,02	6,43	1,88	1,87
<b>BAG-DVS-CALA</b>	46,23	6,58	5,61	1,69

**Fonte:** Elaborada pela autora (2019).

Estes resultados indicam que a modificação química do suporte favoreceu a imobilização da CALA e que possivelmente não houve ativação do suporte com divinilsulfona, uma vez que a pH muito ácido, como a condição ótima obtida através do planejamento experimental (pH 3), os grupos divinilsulfona podem reagir muito pouco com

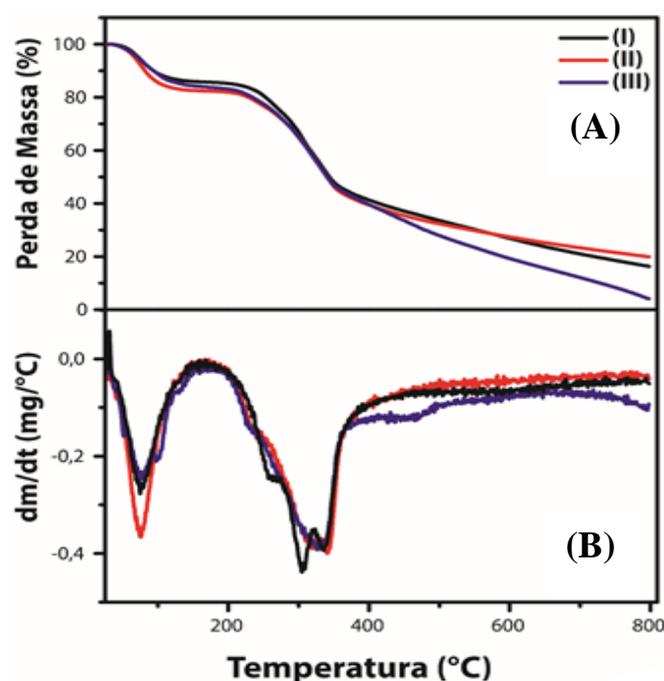
os grupos hidroxilas, ou seja, pode não ocorrer a ionização desses grupos que facilite a ligação com os grupos vinilsulfona (PINHEIRO et al., 2019). No entanto, diante dos resultados de imobilização apresentados no decorrer das discussões (Tabela 5) é possível que essa modificação na composição química do suporte tenha ocorrido e que este tenha sido ativado com DVS, mas que, como já foi citado, poucos grupos tenham sido introduzidos, visto que o pH é muito ácido (pH 3). Além disso, também é possível que a ligação entre o suporte e o agente ativante (DVS) tenha ocorrido pelos dois extremos da molécula, como mostrado na Figura 5, de modo que esta conformação tenha impedido a inserção de novas moléculas de divinilsulfona e impedido uma maior ativação do suporte.

Outras caracterizações também foram realizadas no suporte puro, suporte tratado com DVS nas condições otimizadas e no biocatalisador, a fim de compreender as mudanças químicas e físicas que ocorreram.

A Figura 6 A, B mostra as curvas de TGA e DTG obtidos para as amostras BAG, BAG – DVS e BAG – DVS – CALA. O primeiro ocorre em uma faixa de temperatura de 25 – 168 °C e pode ser atribuída a evolução de água adsorvida nas amostras (WATKINS et al., 2015). Nessa etapa as amostras BAG, BAG – DVS e BAG – DVS – CALA apresentam uma perda de massa de 14,3, 17,2 e 16,1%, que pode ser atribuída à maior retenção de água com a funcionalização e imobilização. O segundo evento térmico é onde se dá início a degradação dos principais componentes do bagaço, ele tem início em 187 °C e continua até 500 °C. A perda de massa para esse evento foi de 51,9, 49,9 e 55,7% para as amostras BAG, BAG – DVS e BAG – DVS – CALA, respectivamente. Nesse evento são observadas o início da degradação da celulose, hemicelulose e lignina, que são os principais componentes do bagaço. A DTG para esse evento pode revelar em que temperatura cada uma desses componentes contribui de forma majoritária. Para o bagaço puro, a DTG revela que o segundo evento térmico tem três máximos de degradação que podem estar relacionados com os principais componentes do bagaço. Yang et al. (2007) estudaram separadamente a pirolise dos principais componentes de materiais lignocelulósicos. Eles observaram que a hemicelulose é o componente que se decompõe com mais facilidade seguido da celulose e lignina. Isso pode estar relacionado com os grupamentos que formam estas moléculas, podendo haver regiões que ocorrem a degradação de mais de uma delas. Assim, o primeiro máximo que ocorre em 257 °C pode ser relacionado com a degradação da hemicelulose, enquanto que o segundo e o terceiro ocorrem nas temperaturas de 306 e 335 °C e podem ser relacionados com a degradação da celulose e lignina, respectivamente (CHEN; YE; SHEEN, 2012; MENDU et al., 2011). Interessantemente para a amostra ativada com DVS foi

observado somente dois máximos de absorção que ocorrem em 320 e 340 °C. Enquanto que para a amostra contendo a enzima foi observado somente um máximo de degradação em 329 °C. Para todos os materiais a degradação continua até 800 °C. Entretanto, é interessante notar que as amostras BAG e BAG – DVS tem uma perda de massa total abaixo de 85%, que pode ser devido a repolimerização da lignina formando coque (MENDU et al., 2011). Contudo, a amostra com a enzima CALA obteve uma perda total acima de 85%, mostrando-se ser menos estável termicamente.

**Figura 6.** Análises Termogravimétricas ATG (A) e DTG (B) das amostras (I) BAG, (II) BAG – DVS e (III) BAG – DVS – CALA.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

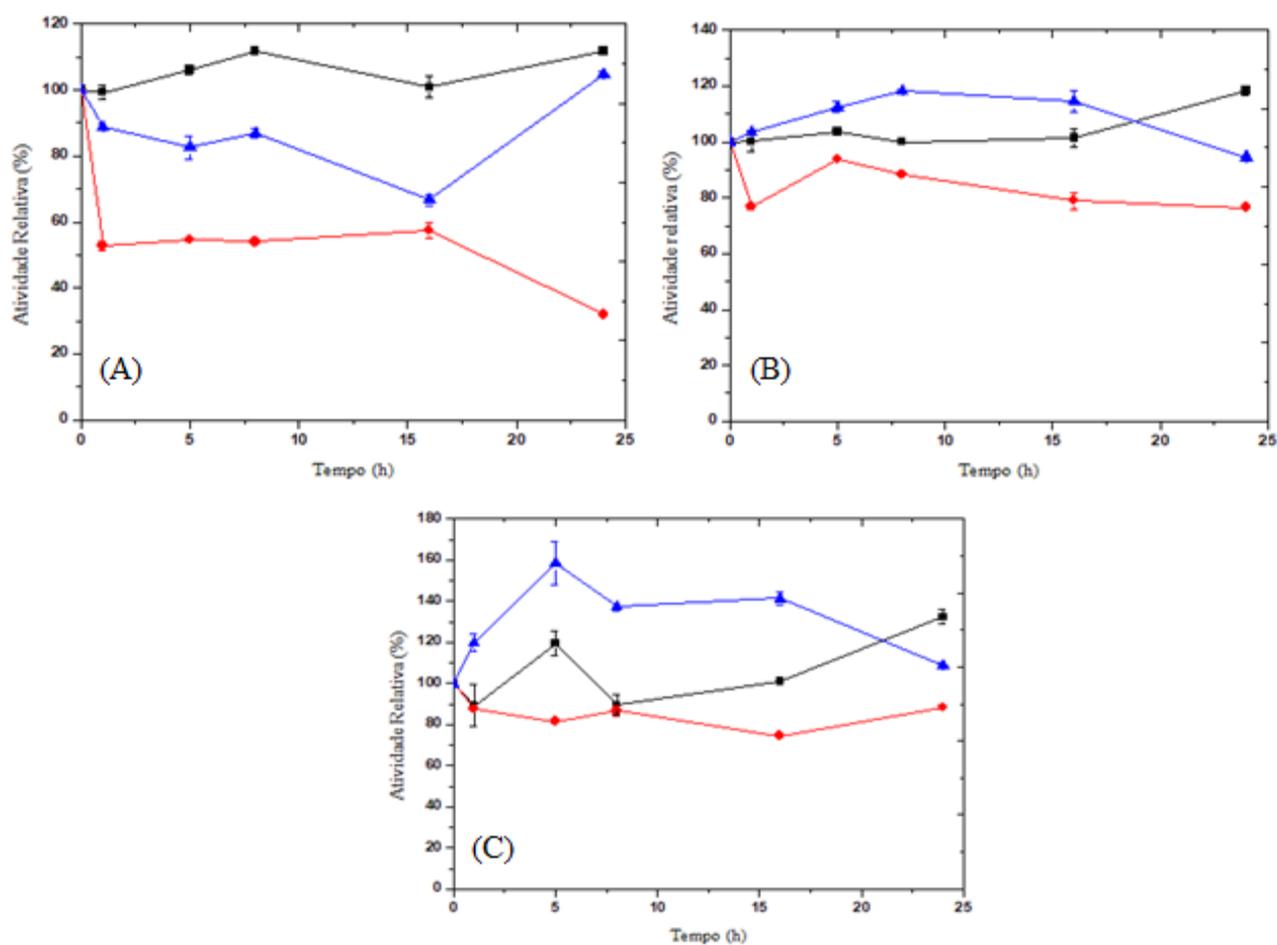
Nesse contexto, a fim de analisar o teor de água no bagaço utilizado, e padronizar as amostras, analisou-se o percentual de umidade após pré-tratamento, na amostra BAG-DVS, observando-se assim que a modificação química realizada alterou significativamente o percentual de umidade presente na matéria-prima. O bagaço isento do pré-tratamento (*in natura*) apresenta  $8,5 \pm 0,06\%$  em umidade e após o pré-tratamento com a DVS apresentou  $49,0 \pm 0,54\%$ , visto que a inserção de grupos promove maior hidratação do suporte. Este resultado está em consonância com o TG. Outro fator que pode ter influenciado é o fato de não ter sido realizada uma etapa de secagem prévia, como no bagaço isento de pré-tratamento.

O uso do BAG-DVS úmido como suporte para imobilização se deu devido aos bons resultados obtidos, dessa forma uma etapa de secagem não foi considerada antes da imobilização da CALA, evitando uma nova etapa no processo.

### 4.3 Avaliação da imobilização da CALA

Após definir as melhores condições de preparação do suporte, obtidas através do método Taguchi, o efeito do pH durante a imobilização foi avaliado. A enzima foi imobilizado em tampão acetato de sódio a pH 5,0, tampão fosfato de sódio pH 7,0 e tampão carbonato de sódio pH 9,0. Os resultados referentes aos cursos de imobilização são mostrados na Figura 7.

**Figura 7.** Curso de imobilização da CALA em BAG-DVS em diferentes condições, tampão acetato de sódio a pH 5 (A), tampão fosfato de sódio a pH 7 (B) e tampão carbonato de sódio a pH 9. Atividades totais relativas de referência (■); sobrenadante (●) e a atividade de suspensão durante a imobilização (▲).



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

---

Para cada caso, uma solução de referência foi preparada (uma solução enzimática em condições idênticas às de imobilização, mas na ausência de suporte) e manteve a atividade durante o processo de imobilização, de modo que o rendimento da imobilização pudesse ser calculado pela diminuição da atividade do sobrenadante. Uma característica distintiva das lipases é que elas frequentemente exibem aumento na atividade enzimática na interface de lipídios e água. Esse processo de ativação, geralmente conhecido como ativação interfacial, é devido as alterações conformacionais na estrutura da lipase (ERICSSON et al., 2008). Esse fato foi observado nesse estudo, devido à utilização do detergente Triton-X 0,01%, (v/v) na imobilização da CALA no bagaço de caju, em todos os pHs analisados.

Os cursos de imobilização realizados foram acompanhados por 24 h. A partir da interpretação dos gráficos (Figura 7), é possível observar que na imobilização a pH 5 (Figura 7A) o melhor tempo de imobilização foi obtido em 24 h, no qual se observa a maior queda da atividade do sobrenadante, com aproximadamente 68% da enzima imobilizada. A imobilização nesse pH favoreceu a adsorção iônica, visto que a atividade da sobrenadante diminuiu e houve aumento na atividade da suspensão. A pH 5, provavelmente, os resíduos reativos estão mais expostos, de forma a ter uma maior interação enzima-suporte. Visto que o ponto isoelétrico da CALA é 7,5, neste pH ela tem carga global positiva. No entanto, não foi observado um aumento na atividade do biocatalisador, possivelmente devido à conformação da CALA ao ser imobilizada. A literatura reporta valores baixos de atividade do derivado neste pH (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019). Entre os tempos de 1 e 16 h praticamente não teve alteração do rendimento de imobilização no pH 5, o que pode estar relacionado à alta estabilidade da CALA em pHs ácidos (ONDUL; DIZGE; ALBAYRAK, 2012).

A pH 7 (Figura 7B) é possível notar uma oscilação maior na atividade do sobrenadante, nos tempos iniciais. No entanto, após 16 h a imobilização chega a se manter praticamente constante. De acordo com Guisan (2013), as interações para imobilização de lipases por adsorção podem ser relativamente fracas, desta forma as porções fracamente adsorvidas de CALA podem ter sido dessorvidas do bagaço de caju e depois imobilizadas novamente ao longo do tempo. No entanto, após 5 h de imobilização a atividade do derivado se manteve praticamente constante, provavelmente devido a forma de interação entre os grupos funcionais do suporte com os aminoácidos residuais da enzima que serão apresentados e explicados no decorrer do trabalho.

No curso de imobilização a pH 9 (Figura 7C), foram encontrados os menores valores de rendimento de imobilização da CALA no bagaço de caju, visto que a atividade do sobrenadante apresentou pouca diminuição. Além disso, ocorre uma grande oscilação na atividade de suspensão, sendo possível observar um aumento na atividade do derivado até o tempo de 5 h, após isso, ela passa a diminuir. Em pHs maiores, a tendência seria a formação de ligação covalente no suporte, entretanto o processo de introdução de grupos no BAG não ocorreu de forma satisfatória. Com isso, as interações físicas via adsorção podem ter prevalecido, por outro lado o rendimento de imobilização foi baixo. Isso pode estar relacionado ao fato da CALA apresentar alta instabilidade em pHs alcalinos (MONTEIRO et al., 2019a) possivelmente devido a repulsão de cargas negativas do suporte e da enzima que pode ter ocorrido.

Dessa forma, foi importante acompanhar o curso de imobilização nos diferentes pHs, por 24 h, pois observou-se que em pH 7, pH ótimo da CALA (MONTEIRO et al., 2019a), após 16 h a imobilização se manteve constante. Assim, selecionou-se o tempo de 24 h como o tempo de imobilização da enzima no suporte, o mesmo tempo utilizado na imobilização da CALA após os pré-tratamentos do bagaço de caju, que determinaram as melhores condições do suporte para se obter a melhor atividade do derivado.

Os parâmetros de imobilização foram avaliados em pH 5, 7 e 9 e os resultados estão apresentados na Tabela 5. O protocolo de imobilização completo (imobilização, incubação e bloqueio), descrito na metodologia (seção 3.2.3), continuou a ser utilizado.

O melhor rendimento de imobilização foi obtido a pH 5 ( $64,1 \pm 0,8$  %) (Tabela 7), possivelmente devido a maior quantidade de resíduos reativos neste pH (Figura 7A). Entretanto, nessa mesma condição, o biocatalisador apresentou baixo valor de atividade do derivado e atividade recuperada,  $0,46 \pm 0,0$  U/g e  $3,23 \pm 0,2$  U/g, respectivamente, o que deve estar relacionado à grande quantidade de resíduos reativos da enzima interagindo com o suporte, a qual pode ter causado uma distorção na estrutura da enzima de forma que a mesma perdesse atividade catalítica.

A pH 9, o rendimento atingido foi de  $48,1 \pm 0,7$  %, enquanto a atividade do derivado foi de  $1,26 \pm 0,0$  U/g (Tabela 5). Como pode ser observado através da Figura 7C, em pH 9, a quantidade de resíduos reativos é menor que nos demais pHs (5 e 7). No entanto, é possível que os resíduos reativos neste pH, estejam mais expostos de forma a ter uma maior interação enzima-suporte. A atividade do derivado provavelmente está sendo afetada pela conformação que a enzima está apresentando ao se ligar por esses resíduos.

O melhor valor de atividade do derivado foi alcançado a pH 7 ( $6,83 \pm 0,5$  U/g), apesar do baixo rendimento de imobilização ( $24,1 \pm 0,5$  %), como pode ser visto na Tabela 4. Isso pode estar relacionado à conformação que a CALA apresenta ao imobilizar pelos resíduos que estão mais reativos neste pH, os resíduos de lisina, aspartato e arginina.

**Tabela 5.** Parâmetros de imobilização da CALA: Rendimento de imobilização (R), atividade teórica ( $At_T$ ), atividade do biocatalisador após ( $At_D$ ) incubação em tampão carbonato de sódio e bloqueio com EDA, e atividade recuperada ( $At_R$ ). 1 mg de proteína por 1 g de suporte foi a carga de imobilização utilizada, conduzida em tampão acetato de sódio pH 5, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão carbonato de sódio pH 9.

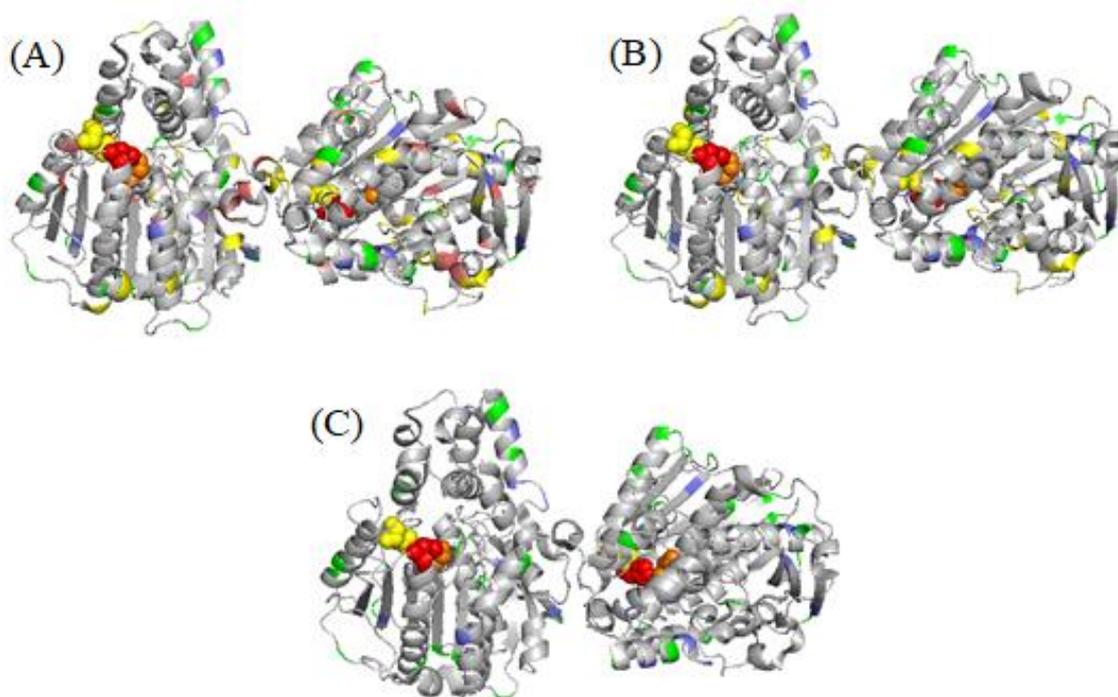
Biocatalisador	pH	R (%)	$At_T$ (U/g)	$At_D$ (U/g)	$At_R$ (%)
BAG-DVS-CALA	5	$64,1 \pm 0,8$	$14,2 \pm 0,3$	$0,46 \pm 0,0$	$3,23 \pm 0,2$
	7	$24,1 \pm 0,5$	$5,14 \pm 0,1$	$6,83 \pm 0,5$	$130,0 \pm 13,2$
	9	$48,1 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,2$	$1,26 \pm 0,0$	$12,3 \pm 0,7$

**Fonte:** Elaborada pela autora (2019).

Na Figura 8 é mostrado os resíduos de aminoácidos da CALA durante imobilização no bagaço de caju em pH 5, 7 e 9. O ponto isoelétrico do BAG foi considerado ácido, visto que o mesmo passa por um pré-tratamento em pH 3. Foi relatado que a cisteína e a histidina são resíduos bastante reativos com grupos divinilsulfona em pH 5 e 7 (DOS SANTOS et al., 2015b). Também foi relatado a reatividade dos grupos lisina a pH 7 e, dos grupos lisina, cisteína e histidina a pH 9 com divinilsulfona (DOS SANTOS et al., 2015b).

Diante disso, os resultados dos rendimentos apresentados na Tabela 5, podem ser explicados. Pois, com relação a CALA, em pH 5, a cisteína e a histidina não apresentam reatividade na imobilização com o bagaço de caju pré-tratado e ativado com DVS a pH 3 (Figura 8A). No entanto, a pH 7 e 9, a lisina apresenta reatividade (Figura 8B,C). Porém, em pH 7 existe a presença de uma quantidade maior de grupos reativos, além da lisina. Os resíduos cisteína a pH 9 e a histidina a pH 5 e 7, apresentam um quantidade irrelevante na sequência de aminoácidos da CALA. A histidina foi apresentada apenas no sítio ativo.

**Figura 8.** Resíduos de aminoácidos da CALA a pH 5 (A), pH 7 (B) e pH 9 (C). Sítio ativo: histidina (vermelho)/ aspartato (amarelo)/ serina (laranja); Resíduos de aspartato (amarelo); Resíduos tirosina (rosa); Resíduos de lisina (verde); Resíduos de arginina (azul claro).



**Fonte:** Pymol (2019), modificada pela autora.

Diante do melhor resultado de atividade do derivado encontrado a pH 7, também foram realizadas neste pH, para comparação dos resultados, a imobilização com o bagaço *in natura* (BAG-CALA), por adsorção física e, a imobilização utilizando o bagaço pré-tratado, sobre condições otimizadas pelo método Taguchi, no entanto, sem a adição da DVS (5 mM, pH 3, 30 °C, 12 h). Esse novo biocatalisador será apresentado como BAG-TRAT-CALA.

Na imobilização por adsorção física, o biocatalisador apresentou desempenho inferior ao BAG-DVS-CALA, com relação à atividade do derivado, como é mostrado na Tabela 6. No entanto, o rendimento de imobilização foi superior ( $66 \pm 0,9$  %). Esses resultados podem estar relacionados com as interações enzima-suporte que são muito fracas, na imobilização por adsorção física e, provavelmente, após a lavagem e filtração à vácuo do derivado, a enzima se desorveu do suporte com maior facilidade.

**Tabela 6.** Parâmetros de imobilização da CALA no bagaço *in natura* (BAG-CALA) e no bagaço tratado sem a presença de DVS (BAG-TRAT-CALA): Rendimento de imobilização (R), atividade teórica ( $At_T$ ), atividade do biocatalisador ( $At_D$ ) sem as etapas de incubação em tampão carbonato de sódio e bloqueio com EDA, e atividade recuperada ( $At_R$ ). A imobilização foi conduzida em tampão fosfato de sódio pH 7.

<b>Biocatalisador</b>	<b>R (%)</b>	<b><math>At_T</math> (U/g)</b>	<b><math>At_D</math> (U/g)</b>	<b><math>At_R</math> (%)</b>
<b>BAG – CALA</b>	66,0 ± 0,9	21,7 ± 0,3	2,3 ± 0,2	10,6 ± 0,9
<b>BAG – TRAT – CALA</b>	40,2 ± 1,6	14,6 ± 1,4	6,11 ± 0,8	43,8 ± 0,1
<b>BAG – DVS – CALA</b>	24,1 ± 0,5	5,14 ± 0,1	6,83 ± 0,5	130,0 ± 13,2

**Fonte:** Elaborada pela autora (2019).

Para o BAG – TRAT – CALA a atividade do derivado foi de  $6,11 \pm 0,8$  U/g. Apesar desse resultado ser próximo ao resultado encontrado para o bagaço tratado na presença de DVS ( $6,83 \pm 0,5$ ), é possível que a modificação da estrutura química do bagaço de caju tenha ocorrido tanto devido ao pré-tratamento químico aplicado quanto com a ativação do suporte com DVS, diante dos excelentes resultados de estabilidade térmica obtidos, apresentados na Tabela 7. Devido a isso, possivelmente além da imobilização por adsorção, a imobilização por ligação covalente também pode ter ocorrido, de modo que poucas ligações covalentes foram formadas e por isso a enzima desorveu do suporte.

Com relação a diferença dos rendimentos de imobilização para as amostras BAG – CALA, BAG-TRAT-CALA e BAG-DVS-CALA, mostrados na Tabela 6, podem estar relacionados ao *cross – linking* formado com a adição da DVS que faz com que haja recobrimento da superfície do suporte, o que reduz a capacidade de imobilização. Consequentemente, obtem-se menos efeitos difusivos e maior atividade.

Dessa forma, as caracterizações do biocatalisador apresentadas a seguir foram realizadas na presença DVS.

#### 4.5 Efeito do pH na estabilidade do biocatalisador

A enzima livre e o biocatalisador foram avaliados quanto à inativação térmica a  $70^\circ$  C em diferentes pHs. A estabilidade da CALA e do BAG-DVS-CALA foram investigadas

incubando-os em tampão acetato de sódio pH 5, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão carbonato de sódio pH 9. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tempos de meia-vida (expressa em minutos) da CALA e da BAG-DVS-CALA conduzidas a 70 °C em pHs 5, 7 e 9.

Biocatalisador	t <sub>1/2</sub> (min)		
	pH 5	pH 7	pH 9
CALA	661,8	95,4	1,4
BAG-DVS-CALA	>1440	390	>1440

**Fonte:** Elaborada pela autora (2020).

A meia-vida da enzima solúvel (Tabela 7) foi inferior a enzima imobilizada em todos os pHs estudados. Obteve-se melhor resultado de estabilidade térmica em pH 5, uma vez que, neste pH, o tempo de meia-vida do biocatalisador não foi alcançado a 70 °C após 24 h, tendo uma diminuição da sua atividade inicial em torno de 25%, apenas. Isso se deve ao fato da CALA apresentar alta estabilidade em pH ácido (ONDUL; DIZGE; ALBAYRAK, 2012).

A pH 9 a enzima livre alcançou o tempo de meia-vida em menos de 2 min, diante disso, o resultado de inativação do biocatalisador se torna bastante interessante para este pH, visto que com 24 h de análise o BAG-DVS-CALA diminuiu aproximadamente 35% da sua atividade inicial. Estudos relatam que a CALA é capaz de tolerar uma faixa de pH relativamente ampla (5-9), sendo altamente estável em sua forma imobilizada, de modo que pode ser usada em temperatura elevada por milhares de horas, sem perda significativa de atividade (MONTEIRO et al., 2019b). De acordo com Monteiro et al (2019b) quanto menor estabilidade da enzima, maior a estabilização devido à imobilização. Nesse contexto, a literatura apresenta alta instabilidade da CALA em pHs muito básicos (MONTEIRO et al., 2019a). De fato, o estudo de inativação térmica (70 °C) que começou a ser realizado a pH 10 não foi continuado, pois a enzima livre se desnaturava imediatamente ao entrar em contato com o tampão.

Nos estudos a pH 7, a enzima livre apresentou meia-vida de 95,4 min, no entanto o biocatalisador se apresentou, aproximadamente, 4 vezes mais estável que a enzima livre. O fato de nesse pH (7) o biocatalisador apresentar a mais baixa meia-vida dentre os pHs estudados (5, 7, 9) pode estar relacionado ao uso do tampão fosfato de sódio, que pode causar

---

efeitos negativos na estabilidade da lipase, como relatado recentemente (MONTEIRO et al., 2019a).

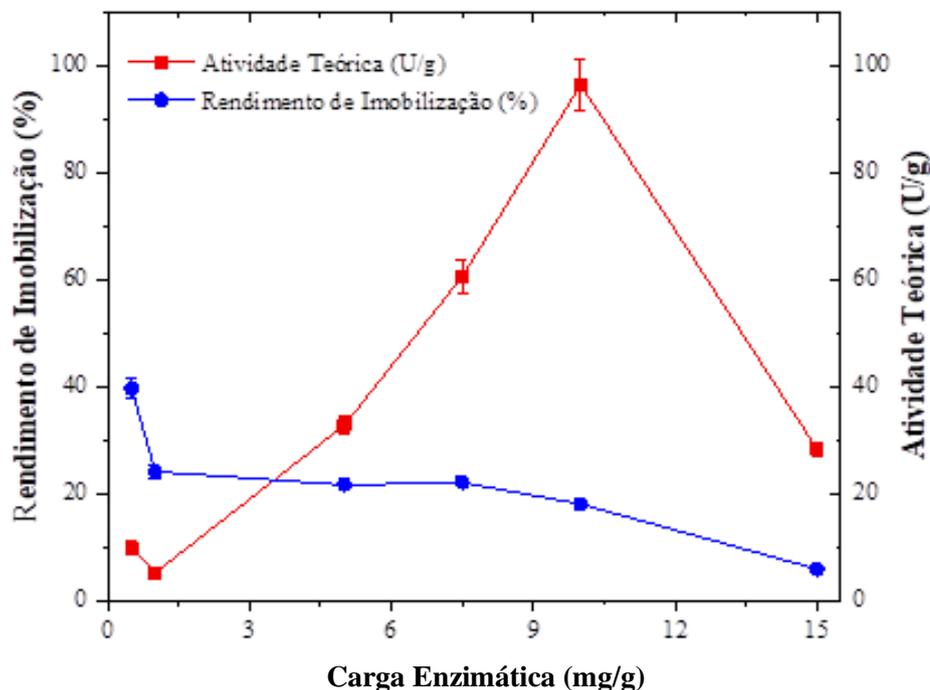
Estes resultados indicam que houve uma forte interação entre a enzima e o suporte e, que a incubação do biocatalisador em uma temperatura mais alta contribuiu para um rearranjo e conformação mais estável da enzima. Visto que a CALA é capaz de manter sua atividade hidrolítica em temperaturas mais altas, acima de 90 °C e, em uma faixa ampla de pH (5-9) (ERICSSON et al., 2008). O estudo de inativação térmica foi realizado a 70° C, no intuito de analisar um faixa de pH mais ampla e, apesar desta não ser a temperatura ótima da CALA, ela pode se inativar devido as condições de imobilização. Como foi relatado com relação ao pH 10.

Confirmando os bons resultados de estabilidade do biocatalisador em estudo, após 8 meses de estocagem, este apresentou perda de aproximadamente 50% da sua atividade inicial, diminuindo de 6,8 U/g para 3,6 U/g.

#### **4.6 Ensaio de carga máxima**

Para aproveitar ao máximo a superfície externa do bagaço de caju, considerando que materiais lignocelulósicos possuem poucos poros, logo, a área superficial do bagaço é pequena (DE SOUZA et al., 2016), o carregamento máximo da CALA deve ser utilizado. É importante ressaltar que esse estudo foi realizado na tentativa de atingir a carga máxima de imobilização. Para esse fim, a Figura 9 mostra o rendimento de imobilização e a atividade teórica em diferentes cargas da CALA (0,5-15 mg de CALA por grama de BAG).

**Figura 9.** Capacidade de carga de proteína do BAG para CALA.



**Fonte:** Elaborada pela autora (2020).

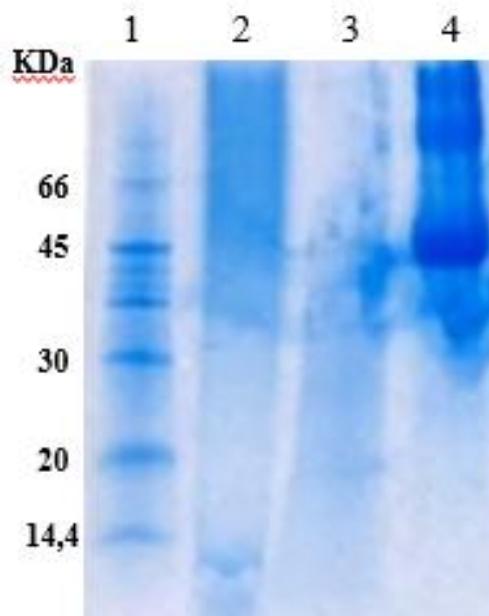
O maior rendimento de imobilização (40%) foi atingido por 0,5 mg/g e diminui à medida que o carregamento de CALA no BAG aumenta. Por outro lado, a atividade teórica aumenta à medida que a carga de CALA no BAG aumenta, até 10 mg/g. De fato, a maior atividade teórica (96 U/g) foi atingida com carga de 10 mg/g. Após isso, a atividade teórica diminui. A maior carga enzimática pode ter aumentado a difusão de substrato (RIOS et al., 2019), diminuindo o valor da atividade teórica. Além disso, altas cargas podem causar interações enzima-enzima e inibir o alongamento flexível de conformação enzimática, resultando em impedimento estérico e inativação da enzima (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A literatura apresenta um estudo da capacidade de carga no bagaço de caju utilizando um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (DE SOUZA et al., 2016), onde variaram a carga de enzima oferecida entre os valores de 0,5 a 30 mg/g de suporte. No entanto, a enzima utilizada foi a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), o glutaraldeído foi usado como grupo ativante e a imobilização ocorreu por ligações covalentes. Os resultados indicaram que os maiores rendimentos de imobilização foram observados utilizando baixas concentrações de proteína, a capacidade máxima de carga do suporte foi de cerca de 10 a 11 mg/g de suporte.

#### 4.7 Análise qualitativa de proteína SDS-PAGE

O ensaio de eletroforese foi realizado para a enzima livre e a enzima imobilizada em duas cargas diferentes, na carga máxima definida anteriormente (10 mg/g) e na carga utilizada no decorrer deste estudo como parâmetro de imobilização (1 mg/g). As amostras de enzimas imobilizadas a pH 7 em bagaço de caju pré-tratado foram inativadas a 100 °C na presença de tampão de ruptura. Estas condições de inativação devem liberar as enzimas que foram adsorvidas no suporte por interações iônicas ou hidrofóbicas, de modo que os baixos volumes utilizados permitem a detecção de uma quantidade mínima de moléculas de enzima liberadas sob essas condições drásticas (ALBUQUERQUE et al., 2016). Este método é frequentemente utilizado para este objetivo (PINHEIRO et al., 2019) e os resultados estão apresentados na Figura 10.

**Figura 10.** Eletroforese da lipase A de *Candida antarctica* imobilizada em bagaço de caju pré-tratado. Poço 1: marcador de massa molecular; Poço 2: imobilização com carga de 10 mg/g; Poço 3: imobilização com carga de 1 mg/g; Poço 4: enzima livre.



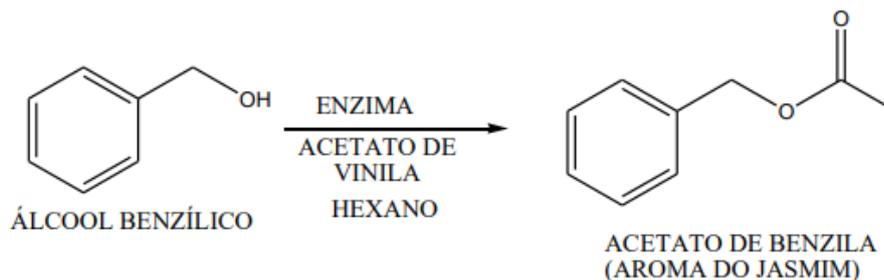
**Fonte:** Elaborada pela autora (2020).

Os resultados demonstraram que nos poços contendo a enzima imobilizada, a enzima foi liberada do suporte e além dela é possível observar a presença de outras enzimas e contaminantes.

#### 4.8 Reações de acetilação do álcool benzílico

Neste estudo foi avaliada a capacidade de aplicação de quatro biocatalisadores na produção artificial do composto responsável pelo aroma do jasmim (Figura 11), composto este que tem amplas aplicações nas indústrias de cosméticos e perfumes (MELO et al., 2017). Os biocatalisadores aplicados foram o BAG – TRAT – CALA com cargas de 1 e 10 mg/g e o BAG – DVS – CALA também nas cargas de 1 e 10 mg/g.

**Figura 11.** Esquema da produção enzimática do aroma de jasmim (acetato de benzila).



**Fonte:** Elaborada pela autora (2020)

A Tabela 8 mostra os resultados de conversão dos biocatalisadores nos tempos de 24, 48 e 72 h. Os maiores rendimentos de conversão na síntese acetato de vinila responsável pelo aroma de jasmim foram obtidos pelo BAG – TRAT – CALA com cargas de 1mg/g em todos os tempos estudados, na qual o tempo de 72 h apresentou a melhor conversão (79,45 %). Esses resultados sugerem que altas cargas enzimáticas podem ter aumentado a difusão de substrato (RIOS et al., 2019) e, ocasionando impedimento estérico e inativação da enzima (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013). Além disso, a presença da divinilsulfona nas amostras ativadas podem ter formado um *cross – linking* de modo que a superfície do suporte fique recoberta e, assim, dificulte a catálise enzimática.

**Tabela 8.** Conversões dos biocatalisadores em 24, 48 e 72 h de reação de acetilação.

<b>Biocatalisador</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Conversão (%)</b>
BAG – TRAT – CAL 1mg /g	24	49,70
BAG – TRAT – CAL 10 mg/g	24	6,00
BAG – DVS – CAL 1 mg/g	24	14,18
BAG – DVS – CAL 10 mg/g	24	10,51
BAG – TRAT – CAL 1mg /g	48	67,50
BAG – TRAT – CAL 10 mg/g	48	13,10
BAG – DVS – CAL 1 mg/g	48	27,10
BAG – DVS – CAL 10 mg/g	48	15,82
BAG – TRAT – CAL 1mg /g	72	79,45
BAG – TRAT – CAL 10 mg/g	72	38,54
BAG – DVS – CAL 1 mg/g	72	18,32
BAG – DVS – CAL 10 mg/g	72	22,53

**Fonte:** Elaborada pela autora (2020).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que com a otimização das condições aplicadas ao pré-tratamento do bagaço de caju, usando como ferramenta de análise um planejamento experimental avançado pelo método Taguchi foi possível obter um biocatalisador ativo e estável. A otimização de parâmetros fundamentais para a produção de um novo biocatalisador foi de grande importância, visto que os custos de processo são reduzidos, especialmente na etapa de pré-tratamento, necessária para o uso do bagaço de caju como suporte. Essa estratégia de obtenção de um novo biocatalisador a partir de resíduos agroindustriais pode ser considerada ambientalmente benigna, reutilizável, além de ter como objetivo seu uso em reações de interesse industrial. A imobilização da CALA em BAG-DVS a pH 7 mostrou parâmetros de imobilização mais relevantes do que os realizados a pH 5 e 10, obtendo atividade do derivado de  $6,83 \pm 0,55$  U/g. O BAG-DVS-CALA apresentou um aumento na estabilidade térmica a 70 °C, em todos os pHs estudados (5, 7 e 9), visto que a pH 5 e a pH 9 o tempo de meia-vida não foi atingindo após 24 horas. Em pH 7 o biocatalisador se mostrou aproximadamente 4 vezes mais estável que a enzima livre. O BAG – TRAT – CALA apresentou bom desempenho para as reações de síntese enzimática do composto responsável pelo aroma do jasmim com um rendimento de 79,45 %% após 72 h de reação. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o bagaço de caju, após modificações químicas e físicas na sua estrutura pode se apresentar como um novo suporte para imobilização de lipases.

---

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

ALBUQUERQUE, T. L. D.; RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BINAY, B.; OZDEMIR, E.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 7, p. 865–874, 2016.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 511, 2018.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 35, n. 1, 2019.

ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES D.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, [s.l.], 2020.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 3, p. 3-4, 2010.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 24, n. 1–2, p. 3–12, 1999.

AYBASTIER, Ö.; DEMIR, C. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase A on Chitosan Beads for the Production of Fatty Acid Methyl Ester from Waste Frying Oil. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, [s.l.], v. 36, n. 21, p. 2313–2319, 2014.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 9–14, 2010.

- BALARAM NAIK, A.; CHENNAKESHA REDDY, A. Optimization of tensile strength in TIG welding using the Taguchi method and analysis of variance (ANOVA). **Thermal Science and Engineering Progress**, [s.l.], v. 8, n. August, p. 327–339, 2018.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, [s.l.], n. 4, p. 1583- 1600, 2014.
- BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 36, n. 5, p. 1470–1480, 2018.
- BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, G. D. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 877–882, 2006.
- BEZERRA, C. S. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2012.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C. M. G. F.; SOUSA, M.; GONÇALVES, L. R. B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, [s.l.], v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BEZERRA, R. M.; NETO, D. M. A.; GALVÃO, W. S.; RIOS, N. S.; CARVALHO, A. C. L. M.; CORREA, M. A.; BOHN, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FECHINE, P. B. A.; MATTOS, M. C.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 125, p. 104–115, 2017.
- BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G. N.; GUPTA, V. K. Immobilization of lipase by entrapment in Ca-alginate beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 552–562, 2008.
- BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 202–219, 2019.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, [s.l.], v. 1, n. 1–6, p. 41–55, 2014.
- BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 42, n. 29, p. 3336–3337, 2003.
- BOROWIECKI, P.; JUSTYNIAK, I.; OCHAL, Z. Lipase-catalyzed kinetic resolution approach toward enantiomerically enriched 1-( $\beta$ -hydroxypropyl)indoles. **Tetrahedron**

---

**Asymmetry**, [s.l.], v. 28, n. 12, p. 1717–1732, 2017.

BRAR, L. S.; ELSAYED, K. Analysis and optimization of multi-inlet gas cyclones using large eddy simulation and artificial neural network. **Powder Technology**, [s.l.], v. 311, p. 465–483, 2017.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARREA, G.; LOTTI, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Protein Sci**, [s.l.], v. 12, n. 10, p. 2312–2319, 2003.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatitesupported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 215–216, p. 491–499, 2013.

CHEN, Q.; ZENG, M.; ZHANG, J.; WANG, Q. Optimal design of bi-layer interconnector for SOFC based on CFD-Taguchi method. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 35, n. 9, p. 4292–4300, 2010.

CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, [s.l.], v. 93, p. 237–244, 2012.

CHENG, C.; JIANG, T.; WU, Y.; CUI, L.; QIN, S.; HE, B. Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 119, p. 1211–1217, 2018.

CHOUDHARY, R. B.; JANA, A. K.; JHA, M. K. Enzyme technology applications in leather processing. **Indian Journal of Chemical Technology**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 659–671, 2004.

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R. O.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L.; FREIRE, D. M. G.; MANOEL, E. A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; OLIVEIRA, D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. **RSC Advances**, [s.l.], v. 6, n. 106, p. 104675–104692, 2016.

CORREIA, J. A. C.; JÚNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment of Cashew Apple Bagasse for Ethanol Production: Study of Parameters. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 139, p. 249–256, 2013.

CORREIA, J. A. C. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de caju com peróxido de hidrogênio alcalino para a produção de etanol**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2013.

DA SILVA, A. S. A.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S.; Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 87–98, 2017.

---

DE ALBUQUERQUE, T. L. **Produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de caju**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2014.

DE ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; JÚNIOR, J. E. M.; JÚNIOR, I. J. S.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, [s.l.], v. 255, p. 33–40, 2015.

DE OLIVEIRA, U. M. F.; MATOS, L. J. B. L.; SOUZA, M. C. M.; PINHEIRO, B. B.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 2018.

DE OLIVEIRA, U. M. F.; MATOS, L. J. B. L.; SOUZA, M. C. M.; PINHEIRO, B. B.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 597–608, 2019.

DE SOUZA, T. C.; FONSECA, T. S.; COSTA, J. A.; ROCHA, M. V. P.; MATOS, M. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GONÇALVES, L. R. B.; SANTOS, J. C. S. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 130, p. 58–69, 2016.

DE SOUZA, T. C. Uso de bagaço de caju como suporte para a imobilização de lipase do tipo B de *Candida antarctica*: aplicação na síntese de *r*-indanol. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s.l.], v. 53, n. 9, 2016.

DOS SANTOS, J. C. S.; GARCIA-GALAN, C.; RODRIGUES, R. C.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 9, p. 1511–1515, 2014.

DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015a.

DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-SANCHÉZ, J. F.; MEDINA-CASTILLO, A. L.; RAMÓN-MARQUÉZ, T.; ARIAS-MARTOS, M. C.; MILLÁN-LINARES, M. C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. D. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, [s.l.], v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015b.

DOS SANTOS, J. C. S.; BONAZZA, H. L.; MATOS, L. J. B. L.; CARNEIRO, E. A.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GONÇALVES, L. R. B.; SANT'ANA, H. B.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. Immobilization of CALB on activated chitosan:

Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, [s.l.], v. 14, p. 16–26, 2017.

DOS SANTOS, J. C. S. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2015.

DUMORNÉ, K.; CÓRDOVA, D. C.; ASTORGA-ELÓ, M.; RENGANATHAN, P. Extremozymes: A potential source for industrial applications. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 27, n. 4, p. 649–659, 2017.

EL KHALIDI, Z.; HARTITI, B.; FADILI, S.; THEVENIN, P. Nickel oxide optimization using Taguchi design for hydrogen detection. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 43, n. 27, p. 12574–12583, 2018.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J.; MOWBRAY, S. L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 376, n. 1, p. 109–119, 2008.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 45, n. 6–7, p. 405–418, 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s.l.], v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.

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

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, [s.l.], v. 108, p. 41–65, 2007.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUS, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s.l.], v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 63, n. 8, p. 1721–1754, 2007.

GHIACI, M.; AGHAEI, H.; SOLEIMANIAN, S.; SEDAGHAT, M. E. Enzyme immobilization. Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Applied Clay Science**, [s.l.], v. 43, n. 3–4, p. 289–295, 2009.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 268, n. 17, p. 12843–12847, 1993.

GUO, Q.; AN, Y.; YUN, J.; YANG, M.; MAGOCHA, T. A.; ZHU, J.; XUE, Y.; QI, Y.; HOSSAIN, Z.; SUN, W.; QI, X. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 247, n. July 2017, p. 940–946, 2018.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 171–190, 2013.

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

HE, P.; GREENWAY, G.; HASWELL, S. J. Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 593–597, 2010.

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.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.

HOLANDA, J. S.; TORRES, J. F.; OLIVEIRA, M. T.; FERREIRA FILHO, L.; HOLANDA, A. C. Da carne de caju à carne de cordeiro. **Natal: Emparn (Emparn. Boletim de pesquisa)**, p. 42, 2010.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HU, Y.; YANG, J.; WANG, J.; WANG, Q. Investigation of hydrodynamic and heat transfer performances in grille-sphere composite pebble beds with DEM-CFD-Taguchi method. **Energy**, [s.l.], v. 155, p. 909–920, 2018.

HWANG, E. T.; GU, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 49–61, 2013.

JAKOVETIĆ TANASKOVIĆ, S.; JOKIĆ, B.; GRBAVCIC, S.; DRVENICA, I.; PRLAINOVIC, N.; LUKOVIC, N.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, [s.l.], v. 135, p. 103–111, 2017.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by

adsorption: A review. **Adsorption**, [s.l.], v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

KALAISELVAN, K.; ELANGO, A.; NAGARAJAN, N. M.; MATHIYAZAGAN, N. Studies on Ti/Al Sheet Joint Using Laser Beam Welding – A Review. v. 8, n. 4, p. 795–798, 2014.

KASRAYAN, A.; BOCOLA, M.; SANDSTROM, A. G.; LAVÉN, G.; BACKVALL, J. Prediction of the *Candida antarctica* Lipase A Protein Structure by Comparative Modeling and Site-Directed Mutagenesis. **ChemBioChem**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 1409–1415, 2007.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, [s.l.], v. 10, n. 1–3, p. 157–176, 2000.

KAYTAKOĞLU, S.; AKYALÇIN, L. Optimization of parametric performance of a PEMFC. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 32, n. 17, p. 4418–4423, 2007.

KIM, H.; CHOI, N.; KIM, Y.; KIM, H.; LEE, J.; KIM, I. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 130, p. 489–494, 2019.

KIM, P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], p. 243–249, 2004.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 446–451, jul. 2002.

KLAPISZEWSKI, Ł.; NOWACKA, M.; MILCZAREK, G.; JESIONOWSKI, T. Physicochemical and electrokinetic properties of silica/lignin biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 345–355, 2013.

KODALI, B.; POGAKU, R. Pretreatment studies of rice bran for the effective production of cellulose. **Electron J Environ Agric Food Chem**, [s.l.], v.5, p. 1253–64, 2006.

KOMESU, A. Imobilização da enzima xilanase em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação 1. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, [s.l.], 2009.

KRAGELUND, B. B.; HOJRUP, P.; JENSEN, M. S.; SCHJERLING, C. K.; JUUL, E.; KNUDSEN, J.; POULSEN, M. Fast and one-step folding of closely and distantly related homologous proteins of a four-helix bundle family. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 256, n. 1, p. 187–200, 1996.

KUMAR, A.; KHAN, A.; MALHOTRA, S.; MOSURKAL, R.; DHAWAN, A.; PANDEY, M. K.; SINGH, B. K.; KUMAR, R.; PRASAD, A. K.; SHARMA, S. K.; SAMUELSON, L. A.; CHOLLI, A. L.; LEN, C.; RICHARDS, N. G. J.; JUMAR, J.; HAAG, R.; WATTERSON, A. C.; PARMAR, V. S. Synthesis of macromolecular systems: Via lipase catalyzed biocatalytic reactions: Applications and future perspectives. **Chemical Society**

---

**Reviews**, [s.l.], v. 45, n. 24, p. 6855–6887, 2016.

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.

LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) fruit by-products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 225, p. 146–153, 2017.

LI, Y.; ZHU, L. Optimization of user experience in mobile application design by using a fuzzy analytic-network-process-based Taguchi method. **Applied Soft Computing Journal**, [s.l.], v. 79, p. 268–282, 2019.

LIMA, F. C. S.; SILVA, F. L. H.; GOMES, J. P.; NETO, J. M. S. Chemical Composition of the Cashew Apple Bagasse and Potential Use for Ethanol Production. **Advances in Chemical Engineering and Science**, [s.l.], v. 02, n. 04, p. 519–523, 2012.

LIMA, G. V.; SILVA, M. R.; FONSECA, T. S.; LIMA, L. B.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; ZAMPIERI, D.; SANTOS, J. C. S.; RIOS, N. S.; GONÇALVES, L. R. B.; MOLINARI, F.; MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 546, n. May, p. 7–14, 2017.

LIU, Y.; LI, S.; XU, H.; WU, L.; XU, Z.; LIU, J.; FENG, X. Efficient production of d-tagatose using a food-grade surface display system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 28, p. 6756–6762, 2014.

LOU, L. L.; QU, H.; YU, D. W.; WANG, B.; OUYANG, L.; LIU, S.; ZHOU, W. Covalently Immobilized Lipase on a Thermoresponsive Polymer with an Upper Critical Solution Temperature as an Efficient and Recyclable Asymmetric Catalyst in Aqueous Media. **ChemCatChem**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 1166–1172, 2018.

LÖFGREN, J.; GORBE, T.; OSCHMANN, M.; HUMBLE, M. S.; BACKVALL, J. Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered *Candida antarctica* Lipase A. **ChemBioChem**, [s.l.], v. 20, n. 11, p. 1438–1443, 2019.

LOZANO, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 555–569, 2010.

M. M. BRADFORD. 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, 1976.

MAIANGWA, J.; ALI, M. S. M.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R.; SHARIFF, F. M.; LEOW, T. C. Adaptational properties and applications of cold-active lipases from *Psychrophilic bacteria*. **Extremophiles**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 235–247, 2015.

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

MANOEL, E. A.; RIBEIRO, M. F. P.; SANTOS, J. C. S.; COELHO, M. A. Z.; SIMAS, A. B. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 10, p. 1557–1564, 2015b.

MARÍA, P. D.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; MEER, A. V. D.; GEMERT, R. V. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 37, n. 1–6, p. 36–46, 2005.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, [s.l.], v. 1258, n. 3, p. 272–276, 1995.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 12, p. 2311–2316, 2011.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MENDU, V.; HARMAN-WARE, A. E.; CROCKER, M.; JAE, J.; STORK, J.; MORTON III, S.; PLACIDO, A.; HUBER, G.; DEBOLT, S. Identification and thermochemical analysis of high-lignin feedstocks for biofuel and biochemical production. **Biotechnology for Biofuels**, [s.l.], v. 4, 2011.

MILLÁN-LINARES, M. D. C.; SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; PEDROCHE, J.; YUSTE, M. D. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 117, p. 38–44, 2015.

MOHD HUSSIN, F. N. N.; ATTAN, N.; WAHAB, R. A. Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary

- alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 136, p. 109506, 2020.
- MONTEIRO, R. R. C.; NETO, D. M. A.; FECHINE, P. B. A.; LOPES, A. A. S.; GONÇALVES, L. R. B.; SANTOS, J. C. S.; SOUZA, M. C. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipases a and b from *Candida antarctica* immobilized onto magnetic nanoparticles. Improvement of biocatalysts' performance under ultrasonic irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 22, 2019a.
- MONTEIRO, R. R. C.; LIMA, P. J. M.; PINHEIRO, B. B.; FREIRE, T. M.; DUTRA, L. M. U.; FECHINE, P. B. A.; GONÇALVES, L. R. B.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, J. C. S.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 16, p. 4018, 2019b.
- MÜLLER, J.; FREDRICH, B.; KOHLMANN, C.; MAKSYM, L. A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A: Acyltransferase assay. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s.l.], v. 116, n. 2, p. 232–236, 2014.
- MÜLLER, J.; SOWA, M. A.; FREDRICH, B.; BRUNDIEK, H.; BORNSCHEUER, U. T. Enhancing the Acyltransferase Activity of *Candida antarctica* Lipase A by Rational Design. **ChemBioChem**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 1791–1796, 2015a.
- OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILAN, I.; SCHRAG, J. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.
- ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 95, p. 109–114, 2012.
- ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; BRIAND, L. E.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science & Technology**, [s.l.], 2019.
- OUYANG, K.; WU, H.; HUANG, S.; WU, S. Optimum parameter design for performance of methanol steam reformer combining Taguchi method with artificial neural network and genetic algorithm. **Energy**, [s.l.], v. 138, p. 446–458, 2017.
- PADILHA, C. E. DE ARAÚJO.; NOGUEIRA, C. DA C.; FILHO, M. A. O.; SOUZA, D. F. DE S.; OLIVEIRA, J. A. DE.; SANTOS, E. S. DOS. Valorization of cashew apple bagasse using acetic acid pretreatment: Production of cellulosic ethanol and lignin for their use as sunscreen ingredients. *Process Biochemistry*, (In Press, Corrected Proof), 2019.
- PETERSEN, R.; LINK, R.; RUSHFORTH, R. Review of Design Experiments Using the Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement. **Journal of Testing**

**and Evaluation**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 588, 2009.

PINHEIRO, B. B.; RIOS, N. S.; AGUADO, E. R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T. M.; FECHINE, P. B. A.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 130, p. 798–809, 2019.

PINHEIRO, M. P.; RIOS, N. S.; FONSECA, T. S.; BEZERRA, F. A.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MATTOS, M. C.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic resolution of drug intermediates catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on immobead-350. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 878–889, 2018.

PRABHU, M. M.; RAGHAVAN, S. V. Security in computer networks and distributed systems. **Computer Communications**, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 379–388, 1996.

QUEIROZ, R. F.; CORRÊA, M. C. M.; CRISOSTOMO, L. A.; LIMA, F. F.; CAVALCANTE, R. D. Aproveitamento do bagaço de caju como fertilizante orgânico em material e métodos resultados e discussão. [s.d.].

RAO, P.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed esterification of  $\alpha$ -terpineol with various organic acids: Application of the Plackett-Burman design. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 36, n. 11, p. 1125–1128, 2001.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzymes. **ACS Catalysis**, [s.l.], v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2015.

REIS, C. L. B.; SOUSA, E. Y. A.; SERPA, J. F.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. C. S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.

REIS, C. L. B.; SILVA, L. M. A.; RODRIGUES, T. H. S.; FÉLIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; CANUTO, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 224, p. 694–701, 2017.

REIS, C. L. B. **Estudos de pré-tratamentos do bagaço de caju utilizando líquido iônico prótico visando a obtenção de produtos de valor agregado**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2016.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 147–148, n. C, p. 237–250, 2009.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; SANTOS, J. C. S.; FONSECA, T. S.; LIMA, L. D.; MATTOS, M. C.; FREIRE, D. M. G.; JÚNIOR, I. J. S.; RODRÍGUEZ-AGUADO, E.; GONÇALVES, L. R. B. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution

---

of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 133, p. 246–258, 2016.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, [s.l.], 2018.

ROCHA, M. V. P. **Produção de Bioetanol a partir de Pedúnculo de Caju (*Anacardium occidentale L.*) por Fermentação Submersa**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte – Natal, 2010.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus CE025*. **Journal of industrial microbiology e biotechnology**, [s.l.], v. 38, p. 1099-1107, 2011.

RODRIGUES, R. C.; HERNANDEZ, K.; BARBOSA, O.; RUEDA, N.; GARCIA-GALAN, C.; SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. **Current Organic Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 17, p. 1707–1718, 2015.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, T. H. S. **Estudo do pré-tratamento alcalino em microondas da fibra do caju (*Anacardium occidentale L.*) seguido de hidrólise enzimática para produção de etanol**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2010.

RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, [s.l.], v. 164, p. 929-943, 2011.

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 1436–1455, 2016c.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of wheat straw to ethanol. **Proc. Biochem.**, [s.l.], v. 40, p. 3693-3700, 2005.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw. **Biotechnol. Prog.**, [s.l.], v. 22, p. 449-453, 2006.

- SANTOS, J. C. S. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2015.
- SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, ago. 2015.
- SERRA, E.; ALFREDSSON, V.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. A comprehensive strategy for the immobilization of lipase in ordered mesoporous materials. **Elsevier B.V.**, [s.l.], v. 174, 2008.
- SHAKERI, M.; ENGSTROM, K.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. Highly Enantioselective Resolution of  $\beta$ -Amino Esters by *Candida antarctica* Lipase A Immobilized in Mesocellular Foam: Application to Dynamic Kinetic Resolution. **ChemCatChem**, [s.l.], v. 2, n. 5, p. 534–538, 2010.
- SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2014, 2014.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013a.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013b.
- SILVA, N. C. G.; SOUZA, M. C. M.; JÚNIOR, I. J. S.; SANTOS, Z. M.; ROCHA, M. V. P. Removal of Reactive Turquoise Blue Dye from Aqueous Solution Using a Non-Conventional Natural Adsorbent. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, [s.l.], v. 50, n. 11, p. 1616–1628, 2015.
- SIMON, P. **Imobilização de celulase em nanopartículas poliméricas de poli(metacrilato de metila) via polimerização em miniemulsão.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina, Brasil, 2015.
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.
- SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, [s.l.], v. 79, p. 179–211, 2016.
- SOUSA, M. DE. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil, 2015.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.;

- CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 4/25/2008. **Technical Report NREL/TP-510-42618**, 2008b.
- TANYELI, C.; ÖZDEMIRHAN, D. Chemoenzymatic route to various spirocyclic compounds based on enantiomerically enriched tertiary allylic, homoallylic, and homopropargylic alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 25, n. 8, p. 658–666, 2014.
- VERDASCO-MARTÍN, C. M.; VILLALBA, M.; SANTOS, J. C. S.; TOBAJAS, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; OTERO, C. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 111, p. 75–86, 2016.
- VOLDEN, S.; MOEN, A. R.; GLOMM, W. R.; ANTHONSEN, T.; SJOBLUM, J. Immobilization of Lipases from *Candida antarctica*. Influence of Surface Polarity on Adsorption and Transesterification Activity. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 865–872, 2009.
- WANG, Y.; HU, Y.; XU, J.; LUO, G.; DAI, Y. Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen. **Journal of Membrane Science**, [s.l.], v. 293, n. 1–2, p. 133–141, 2007.
- WATKINS, D.; NURUDDIN, M.; HOSUR, M.; TCHERBI-NARTEH, A.; JEELANI, S. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Research and Technology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 26–32, 2015.
- WU, C.; KRAUME, M.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Optimized Biocatalytically Active Static Emulsions for Organic Synthesis in Nonaqueous Media. **ChemCatChem**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 1314–1319, 2011.
- WYSOCKI, A.; ŁAWRYŃCZUK, M. Predictive control of a multivariable neutralisation process using elman neural networks. **Advances in Intelligent Systems and Computing**, [s.l.], v. 350, p. 335–344, 2015.
- XU, A. R.; CHEN, L.; GUO, X.; XIAO, Z.; LIU, R. Biodegradable lignocellulosic porous materials: Fabrication, characterization and its application in water processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 115, p. 846–852, 2018.
- YAACOB, N.; KAMARUDIN, N. H. A.; LEOW, A. T. C.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; ALI, M. S. M. The Role of Solvent-Accessible Leu-208 of Cold-Active *Pseudomonas fluorescens* Strain AMS8 Lipase in Interfacial Activation, Substrate Accessibility and LowMolecular Weight Esterification in the Presence of Toluene. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 8, p. 1312, 2017.
- YAACOB, N.; ALI, M. S. M.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; LEOW, A. T. C. Toluene promotes lid 2 interfacial activation of cold active solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.], v. 68, p. 224–235, 2016.

- 
- YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, [s.l.], v. 86, n. 12–13, p. 1781–1788, 2007.
- YE, P.; XU, Z.; WANG, Z.; WU, J.; DENG, H.; SETA, P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 115–121, 2005.
- YÜCEL, Y. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 39–44, 2012.
- ZHANG, Q.; FENG, J.; ZHANG, Q.; PENG, X. Performance prediction and evaluation of the scroll-type hydrogen pump for FCVs based on CFD–Taguchi method. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s.l.], 2019.
- ZHANG, Y.; FAN, Y.; HU, H.; YANG, H.; LUO, X.; LI, Z.; XHOU, H.; MA, W.; SONG, Y.; ZHANG, T. D-tagatose production by *Lactococcus lactis* NZ9000 cells harboring *Lactobacillus plantarum* L-arabinose isomerase. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, [s.l.], v. 51, n. 2, p. 288–294, 2017.
- ZHANG, Z.; WONG, H. H.; ALBERTSON, P. L.; HARRISON, M. D.; DOHERTY, W. O. S.; OIHARA, I. M. Effects of glycerol on enzymatic hydrolysis and ethanol production using sugarcane bagasse pretreated by acidified glycerol solution. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 192, p. 367–373, 2015.
- ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 9, p. 3894–3912, 2013.