

**UNIVERSIDADE TECNÓLOGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

GABRIELLA SADA KO IGARASHI ZANELLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM TECIDO DE ALGODÃO: APROVEITAMENTO
DE RESÍDUOS TÊXTEIS PARA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES
HETEROGÊNEOS**

APUCARANA

2023

GABRIELLA SADA KO IGARASHI ZANELLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM TECIDO DE ALGODÃO: APROVEITAMENTO
DE RESÍDUOS TÊXTEIS PARA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES
HETEROGÊNEOS**

**IMMOBILIZATION OF LIPASES IN COTTON FABRIC: USE OF TEXTILE WASTE
TO OBTAIN HETEROGENEOUS BIOCATALYST**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental / multicampi Apucarana e Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Engenharia Ambiental

Linha de Pesquisa: Tecnologias Ambientais

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Machado Baron

APUCARANA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina



GABRIELLA SADAKO IGARASHI ZANELLA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM TECIDO DE ALGODÃO: APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS TÊXTEIS PARA
OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Ambiental.

Data de aprovação: 01 de Setembro de 2023

Alessandra Machado Baron, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Juliana Feijo De Souza Daniel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Valeria Marta Gomes Do Nascimento, Doutorado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 01/09/2023.

*Dedico mais esta etapa à minha mãe Tais,
às minhas irmãs Rafaella e Maria Clara,
ao querido Pedro e ao meu raio de Sol, Aurora.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Universo que entre furacões e tornados ainda sim conspirou para este capítulo encerrar. À minha orientadora Dra. Alessandra Machado Baron, exímia profissional e ser humano inestimável. Aos amigos e colegas durante todo o período de trabalho, o meu mais sincero obrigada. A todos os professores da UTFPR com quem tive contato, remota ou presencialmente. Ao laboratório multiusuário da UTFPR campus Apucarana pelas análises realizadas.

ZANELLA, Gabriella Sadako Igarashi. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM TECIDO DE ALGODÃO: APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS TÊXTEIS PARA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS. 63 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Brasil, 2023.

RESUMO

Peças feitas de algodão se decompõem em vinte anos podendo ser empregadas na imobilização enzimática como um suporte eco-amigável reduzindo os custos de produção e concedendo-lhes uma melhor destinação. Com isso, o objetivo principal deste presente trabalho foi imobilizar lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211 em tecidos de algodão para posterior aplicação biocatalítica. Para tanto, foi estudada a simultânea produção e imobilização de lipases por fermentação em estado sólido. Nesta etapa, utilizou-se o farelo de semente de girassol como substrato, 1 g de tecido de algodão, umidade do meio com 55%, 29°C, 144 h. O tecido antes e após o processo de fermentação e imobilização foi analisado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada ao acessório de reflectância total atenuada (ATR) e análise termogravimétrica (ATG). Em relação ao FTIR, observou-se apenas um alargamento da banda de absorção na faixa 3600-3000 cm⁻¹ que corresponde à região das ligações peptídicas entre grupos hidroxilas (-OH) e aminas (-NH₂) da lipase. Para a ATG, observou-se uma pequena diminuição na estabilidade térmica do tecido após a imobilização. A atividade lipolítica para a lipase imobilizada (Lip-Tecido) foi de 41,1 ± 2,5 U g⁻¹. Avaliou-se ainda o efeito da temperatura (40 a 60°) e a estabilidade à temperatura (40 a 70 °C) e em solventes orgânicos na atividade da lipase imobilizada. Os resultados mostraram que a atividade foi maior (105,33 ± 7,0 U g⁻¹) à 55°C, a Lip-Tecido perdeu aproximadamente 40% da atividade inicial após incubação a 70 °C por 30 min e foi mais estável em álcool isoamílico (138 ± 16 % de atividade residual). A Lip-Tecido foi aplicada na síntese do oleato de etila, tendo como solvente o *n*-heptano, em um planejamento experimental 2³ (temperatura-T, unidades enzimáticas- U e Razão molar ácido: álcool-RM), com triplicata no ponto central. A maior conversão em éster em 24 h foi de 56% (44°C; 50 U e RM de 1:1). Foi possível concluir que o método de imobilização realizado é simples, versátil e econômico para preparar um biocatalisador heterogêneo com eficiência catalítica em reações de hidrólise e síntese de ésteres. Além disso, há a possibilidade de outros tipos de tecidos serem utilizados como suporte na imobilização visando o aproveitamento e valorização de resíduos têxteis.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima, *Penicillium corylophilum*, Síntese de ésteres, Resíduos da indústria têxtil.

ZANELLA, GABRIELLA SADA KO IGARASHI. **IMMOBILIZATION OF LIPASES IN COTTON FABRIC: USE OF TEXTILE WASTE TO OBTAIN HETEROGENEOUS BIOCATALYST**. 63 pages. Dissertation (Master in Environmental Engineering) – Federal University of Technology – Paraná, Apucarana, Brazil, 2023.

ABSTRACT

Pieces made from cotton decompose in twenty years and can be used in enzymatic immobilization as an eco-friendly support, reducing production costs and giving them better disposal. Therefore, the main objective of this present work was to immobilize lipases from *Penicillium corylophilum* IOC 4211 on cotton fabrics for subsequent biocatalytic application. To this end, the simultaneous production and immobilization of lipases by solid state fermentation was studied. In this step, sunflower seed bran was used as substrate, 1 g of cotton fabric, medium humidity of 55%, 29°C, 144 h. The tissue before and after the fermentation and immobilization process was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) coupled to the attenuated total reflectance (ATR) accessory and thermogravimetric analysis (TGA). In relation to FTIR, only a broadening of the absorption band was observed in the range 3600-3000 cm^{-1} , which corresponds to the region of peptide bonds between hydroxyl groups (-OH) and amines (-NH₂) of the lipase. For ATG, a small decrease in tissue thermal stability was observed after immobilization. The lipolytic activity for the immobilized lipase (Lip-Tissue) was $41.1 \pm 2.5 \text{ U g}^{-1}$. The effect of temperature (40 to 60°) and stability at temperature (40 to 70°C) and in organic solvents on the activity of immobilized lipase were also evaluated. The results showed that the activity was higher ($105.33 \pm 7.0 \text{ U g}^{-1}$) at 55°C, the Lip-Tissue lost approximately 40% of its initial activity after incubation at 70°C for 30 min and was more stable in isoamyl alcohol ($138 \pm 16\%$ residual activity). Lip-Tecido was applied in the synthesis of ethyl oleate, using *n*-heptane as the solvent, in an experimental design 2³ (temperature-T, enzymatic units-U and molar ratio acid: alcohol-MR), with triplicate at the central point. The highest conversion to ester in 24 h was 56% (44°C; 50 U and RM of 1:1). It was possible to conclude that the immobilization method performed is simple, versatile and economical to prepare a heterogeneous biocatalyst with catalytic efficiency in hydrolysis reactions and ester synthesis. Furthermore, there is the possibility of other types of fabrics being used as support in immobilization aiming at the use and valorization of textile waste.

KEYWORDS: Enzyme, *Penicillium corylophilum*, Synthesis of esters, Textile industry waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações catalisadas por lipases.....	14
Figura 2 – Métodos comumente empregados para a imobilização de lipases. Sendo: CLE (reticulados de enzima), CLEC (cristais de enzima reticulado), CLEA (agregados enzimáticos reticulados) e CSDE (enzimas atomizadas reticuladas).....	22
Figura 3 – Classificação das fibras têxteis segundo sua origem.....	26
Figura 4 – Fluxograma da Pparte experimental realizada no presente trabalho.....	29
Figura 5 – Crescimento do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em meio batata, dextrose e ágar.....	31
Figura 6 – Processo de obtenção da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> por simultânea produção e imobilização em tecido de algodão. Sendo (I): meio de cultivo composto por farelo de semente de girassol e tampão fosfato pH 7,0 0,05 mol L ⁻¹ na presença da suspensão de esporos; (II) imobilização enzimática no suporte inerte de algodão simultânea à fermentação e (III) separação do sólido fermentado e do suporte inerte imobilizado.....	32
Figura 7 – Síntese do oleato de etila.....	34
Figura 8 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila catalisada por lipase.....	36
Figura 9 – Imagens dos tecidos (a) antes e (b) após a simultânea produção e imobilização da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> por fermentação em estado sólido (FES).....	39
Figura 10 – Espectros de FTIR-ATR do tecido de algodão antes e após a simultânea produção e imobilização enzimática.....	41
Figura 11 – Análise termogravimétrica ATG e DTG do tecido de algodão antes e após o processo de fermentação e imobilização da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i>	42
Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> imobilizada (Tecido-Lip). Condições de ensaio: Dosagem pelo método do <i>p</i> NPP aquoso, pH 8,0, cinética de reação de 5 min.....	43
Figura 13 – Estabilidade à temperatura da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> imobilizada (Lip-tecido). A Lip-tecido foi incubada por 30 minutos a 40°C; 45°C; 50°C; 55°C; 60°C; 65°C e 70°C. Atividade residual medida pelo método de hidrólise do <i>p</i> NPP em meio aquoso, 40 °C.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potenciais aplicações industriais de lipases imobilizadas.....	15
Tabela 2 – Produção de lipases por fermentação no estado sólido.....	18
Tabela 3 – Níveis máximos e mínimos para o planejamento fatorial 2^3	34
Tabela 4 – Temperatura ótima para a atividade e estabilidade à temperatura de algumas lipases de <i>Penicillium</i>	45
Tabela 5 – Estabilidade da lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> imobilizada (Lip-tecido) em diferentes solventes orgânicos.....	47
Tabela 6 – Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^3 aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, utilizando lipases de <i>Penicillium corylophilum</i> imobilizadas em tecido de algodão. A quantidade de suporte foi expressa em unidades totais dosadas através da hidrólise do pNPP.....	48
Tabela 7 – Valores calculados dos Coeficientes de contraste principais e secundárias para o delineamento fatorial 2^3 , com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de <i>Penicillium corylophilum</i> imobilizadas em tecido de algodão.....	49
Tabela 8 – Lipases imobilizadas em diferentes suportes para produção do éster oleato de etila.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Atividade residual
ATG	Análise termogravimétrica
ATR	Reflectância total atenuada
BDA	Batata, dextrose, ágar
CLE	Reticulados de enzima
CLEA	Agregados enzimáticos reticulados
CLEC	Cristais de enzima reticulados
cm	centímetro
CSDE	Enzimas atomizadas reticuladas
EB	Extrato bruto
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EP	Efeitos principais
FES	Fermentação em estado sólido
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FS	Fermentação submersa
g	grama
h	hora
Lip-tecido	Lipase imobilizada em tecido
mg g ⁻¹	Miligrama por grama
mL	mililitro
mm	milímetro
mol L ⁻¹	mol por litro
mU g ⁻¹	mili unidades por grama
m/v	massa, volume
nm	nanômetro
PEI	polietilenoimina
pH	Potencial hidrogeniônico
pNP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenol
pNPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
RM	Razão molar
RPM	Rotações por min

RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
SF	Sólido fermentado
T	Temperatura (°C)
U	Unidades totais de atividade enzimática
U g ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por grama de suporte
U gSS ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco
U mL ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por mililitro
v/m	volume, massa
v/v	volume, volume
W ₀	Teor de água do sistema, sendo definido como a razão entre a concentração molar de água e a concentração molar do surfactante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 LIPASES	14
3.1.1 Produção do oleato de etila por lipases	16
3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS	17
3.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	17
3.2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	18
3.2.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS DO GÊNERO PENICILLIUM	19
3.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	22
3.3.1 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	24
3.3.1.1 Imobilização de lipases em tecidos	25
4 OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 ESTERELIZAÇÃO DOS MEIOS	29
5.2 MICRORGANISMO	29
5.3 PRESERVAÇÃO DA CEPA E PREPARO DO INÓCULO	30
5.4 SIMULTÂNEA PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR FES	31
5.4.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE POR INFRAVERMELHO	32
5.4.2 EFEITO DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE À TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA	33
5.4.3 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS	33
5.4.4 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	33
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	35

5.5.1 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO DE ALGODÃO ANTES E APÓS A IMOBILIZAÇÃO POR FTIR E ATG	35
5.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	36
5.5.3 QUANTIFICAÇÃO DA ESTERIFICAÇÃO PELO MÉTODO LOWRY-TINSLEY	37
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA: TESTE DE TUKEY	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 SIMULTÂNEA PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR FES	39
6.2 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO DE ALGODÃO ANTES E APÓS A IMOBILIZAÇÃO POR FTIR E ATG	40
6.2.1 EFEITO E ESTABILIDADE À TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA	42
6.2.2 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS	46
6.3 APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM TECIDO DE ALGODÃO NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	48
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A globalização e o aumento das atividades de pesquisa e desenvolvimento de processos tecnológicos são fatores que, aliados ao surgimento de novos campos de aplicação, impulsionaram o crescimento do mercado enzimático. Como efeito da crescente demanda mundial, o mercado global de enzimas, avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017, está projetado para chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024. Ainda em 2017, a Europa foi responsável por 1/3 da produção global de enzimas, sendo estimado que 70% do mercado de enzimas era produzido por microrganismos (EMBRAPA, 2020; PAPADAKI et al., 2020).

Dentre os processos de maiores interesses industriais estão as reações de hidrólise, interesterificação e síntese de lipídeos catalisadas pelas lipases devido a sua acessibilidade, baixo custo, alta estabilidade a temperaturas e solventes orgânicos e especificidade quanto ao substrato, constituindo um grupo de enzimas com inestimável potencial biotecnológico (KUMAR et al., 2016; PATTI; SANFILIPPO, 2022; VALÉRIO et al., 2022).

De acordo com o número da Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês, *Enzyme Commission*), as lipases são triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3 amplamente utilizadas para catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise. São originadas de animais, microrganismos e vegetais ressaltando-se as procedentes de microrganismos por serem facilmente produzidas em larga escala e não estarem sujeitas às limitações de produção (BORELLI; TRONO, 2015; LUZ, et al., 2021, YAO, et al., 2021).

Industrialmente, as lipases podem ser produzidas por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). A diferença entre ambas é que a fermentação submersa ocorre em um meio com a presença de água livre e substratos solúveis, enquanto a fermentação em estado sólido ocorre na ausência ou quase ausência de água livre onde o crescimento dos microrganismos e a formação de produtos ocorrem na superfície dos substratos sólidos. Comparativamente, a FES apresenta vantagens por ser um processo mais simples, que simula o habitat natural dos microrganismos, apresenta maior estabilidade das enzimas a variações de pH e temperatura e gera menor volume de efluentes líquidos

ganhando espaço entre os métodos de imobilização enzimática (FARINAS et al., 2014; LIMA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; SILVA et al., 2017).

Um aspecto importante sobre os métodos de imobilização enzimática, que deve ser levado em consideração, é a inexistência de um método ou suporte únicos para imobilizar todas as enzimas devido às diferenças físico-químicas de cada enzima, bem como as diferentes propriedades dos substratos. Dentre os métodos de imobilização têm-se a adsorção, confinamento, encapsulação, ligação covalente e reticulação ressaltando-se o método de adsorção por ser um processo simples e de baixo custo além de poucos efeitos prejudiciais para a atividade e seletividade da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada no suporte (LIU; DONG, 2020; MOKHTAR et al., 2020; SOUZA et al., 2016; THANGARAJ; SOLOMON, 2019; TREICHEL et al., 2009).

No processo de imobilização enzimática, o suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica sendo os suportes mais utilizados na técnica de adsorção a alumina, carvão ativado, celulose, cerâmica, resinas de troca aniônica e catiônica, sílica em gel e resíduos industriais. Levando em consideração a redução dos custos de produção, os resíduos industriais têxteis apresentam-se como promissores suportes de imobilização (BILAL; IQBAL, 2019; HASSAN et al., 2019; MAGHRABY et al., 2023).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor de têxteis do mundo e o responsável por gerar mais de 175 mil toneladas de resíduos por ano, dos quais 90% dos restos de tecidos são descartados incorretamente. Esses tecidos podem ser empregados na imobilização enzimática como um suporte eco-amigável reduzindo os custos de produção e concedendo-lhes uma melhor destinação (AN et al., 2014, DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012, IEMI, 2014, SINDITÊXTIL, 2012).

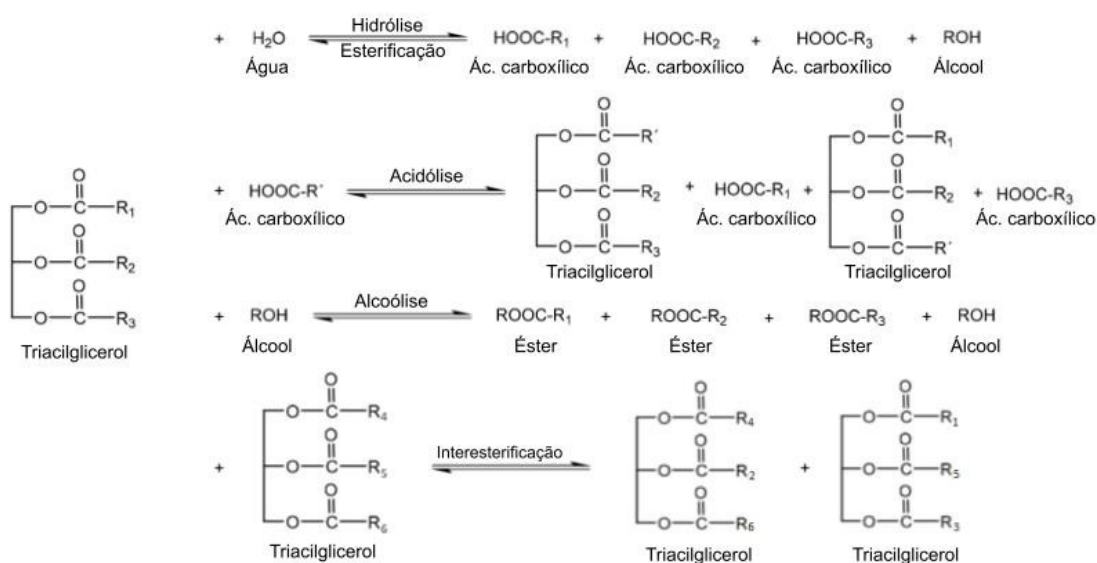
Considerando a importância da química sustentável e da economia verde, o presente trabalho intenta aproveitar e diminuir os resíduos sólidos da indústria têxtil mediante a simultânea produção por fermentação no estado sólido e imobilização de lipases em tecido de algodão (suporte).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LIPASES

As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases e destacam-se no cenário mundial de enzimas por sua versatilidade em catalisar uma série de reações, como ilustra a Figura 1. Além de promover a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, são capazes de formar ésteres a partir de um ácido carboxílico e álcool em um processo denominado de esterificação. Reações de transesterificação podem ser catalisadas e dependendo dos reagentes de partida podem resultar em uma acidólise ou em uma alcoólise onde o grupo acila é transferido entre um acilglicerol e um ácido carboxílico ou o grupamento acila é deslocado entre um acilglicerol e um álcool, respectivamente. Ademais, têm-se o processo de interesterificação onde dois grupos acilas são deslocados entre acilgliceróis (JAEGER; REETZ, 1998; PEREIRA et al.,2022; YAGI; KIMURA; KAMEZAWA, 2022).

Figura 1 – Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de NIMKANDE; BAFANA (2022).

Proveniente de animais, microrganismos e vegetais, as lipases catalisam diversas reações por atuarem em uma extensa faixa de pH e temperatura, serem estáveis e altamente seletivas. Do ponto de vista industrial as lipases provenientes de microrganismos são preferíveis devido ao baixo custo de isolamento, à versatilidade de suas propriedades, à facilidade de ser produzida em larga escala, à diversidade nas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato. As vantagens apresentadas pelas lipases de origem microbiana aliada a variedade de microrganismos que as produzem despertam o interesse das indústrias. O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem (Tabela 1) abrange a indústria alimentícia, como aditivos (síntese de aromatizantes naturais, corantes e emulsificantes), ambiental (tratamento de efluentes), biocombustíveis (produção de biodiesel), farmacêutica (produção de biossensores) e química (síntese de ésteres), demonstrando a multifuncionalidade dessas enzimas (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021; MAHADIK et al., 2002; VAZ; CHOUPINA, 2012).

Tabela 1 – Potenciais aplicações industriais de lipases imobilizadas.

Indústria	Finalidade	Microrganismos Utilizados	Referência
Alimentícia	1) Produção de queijo com baixo teor de gordura	1) <i>Bacillus licheniformis</i>	1) Guan et al., 2021.
	2) Maturação de queijo suíço	2) <i>Bacillus tequilensis</i> PR13	2) Rani; Jagtap, 2019.
Ambiental	1 e 2) Tratamento de águas residuais oleosas	1) <i>Penicillium brevicompactum</i> 2) <i>Bacillus stearothermophilus</i>	1) Damasceno et al., 2018. 2) Bacha et al., 2022.
	1) Resolução cinética da mistura racêmica do cetoprofeno	1) <i>Aspergillus niger</i>	1) Degórska et al., 2022.
Farmacêutica	2) Biossensor de lactato	2) <i>Pediococcus</i>	2) Bravo et al., 2017.
	3) Biossensor de clorpirifós	3) <i>Rhizopus niveus</i>	3) Sankar et al., 2020.
Química	1) Síntese de butirato de metila e etila	1 e 2) <i>Candida antarctica</i>	1) Souza et al., 2017.
	2) Síntese de metanoato de octila		2) Baek et al., 2020.
Energética	1) Síntese de biodiesel	1) <i>Aspergillus niger</i>	1) Kareem et al., 2020.
	2) Síntese de biodiesel	2) <i>Candida antarctica</i> A	2) Lv, Sun e Liu, 2019.

Fonte: Autoria própria (2023).

3.1.1 Síntese do oleato de etila catalisada por lipases

Os ésteres são amplamente utilizados em perfumes, cosméticos, solventes, plastificantes, aromatizantes, na medicina e na indústria farmacêutica. Especificamente, o oleato de etila é um éster com aplicações não apenas em cosméticos e na indústria alimentícia, mas também na produção de triacilglicerídeos modificados e como aditivo para biodiesel e diesel. Este éster apresenta funções como plastificantes, lubrificantes, aditivos biológicos e fluidos hidráulicos (FORESTI; ERRAZU; FERREIRA, 2005; HAZARIKA et al., 2002; LI et al., 2015; MOUAD et al., 2016; SALUM et al., 2008).

A obtenção do oleato de etila pode ser por fontes naturais, síntese química ou enzimática. A primeira tem baixo rendimento e a síntese química, baixa aceitação na indústria de alimentos. A síntese enzimática, utilizando lipases, tem recebido atenção especial devido às condições brandas de reação envolvidas, ao alto grau de pureza alcançado e à aceitação desses produtos na indústria de alimentos (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2018; RADZI et al. 2006; VERMA; AZMI; KANWAR, 2011)

A principal limitação dos processos catalisados por lipases e enzimas em geral é o seu elevado custo. A fim de minimizar esta desvantagem, e especialmente vislumbrando aplicações industriais, muitas enzimas, incluindo lipases, são imobilizadas em suportes sólidos, a fim de melhorar a estabilidade da enzima e permitir o reuso dos biocatalisadores em lotes repetidos ou sistema contínuo. A imobilização permitiria assim a recuperação do biocatalisador e separação dos produtos de forma simples e a reutilização levaria a redução nos custos de operação (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2018; SÉVERAC et al., 2011).

3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS

Na biotecnologia, os dois processos utilizados para a produção de lipases fúngicas são a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Nesses processos fermentativos, os fungos filamentosos transformam por meio da fermentação a matéria-prima em produto que posteriormente passa por processos de tratamento para maior qualidade e pureza. Nessas técnicas de fermentação, o efeito da composição do meio, pH, temperatura, umidade, concentração de inóculo e

porosidade de substrato são essenciais para o desenvolvimento da produção (RIGO et al., 2021).

O Brasil é o terceiro maior exportador de produtos agrícolas do mundo e por apresentar uma economia fortemente ligada à agricultura gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais como cascas, sementes e folhas de legumes e cereais. Devido à rica composição em açúcares fermentáveis e nutrientes como carbono e nitrogênio, os fungos conseguem utilizar esses substratos e convertê-los em enzimas. Nesse âmbito, os resíduos agroindustriais surgem como substratos formidáveis para a fermentação microbiana devido ao seu alto teor de componentes orgânicos, baixo custo e ampla disponibilidade, ademais agregam valor aos resíduos que seriam descartados e acumulados, contribuindo para a diminuição da poluição ambiental (SALAZAR et al., 2019; SCHMATZ et al., 2021).

3.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa (FS) é definida como aquela que possui o substrato dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente a água, que chega a constituir entre 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação é a principal forma de produção de enzimas onde aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas, pois a formação do produto, consumo do substrato e controle dos parâmetros fermentativos como esterilidade, oxigenação, pH e temperatura são facilmente acompanhados. Esse processo consiste em inocular o microrganismo diretamente no meio nutriente líquido que, no caso dos fungos filamentosos, pode-se iniciar tanto pela inoculação de esporos quanto pela inoculação de micélios desenvolvidos numa etapa de pré-cultivo tendo como desvantagens o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação entre o produto e o substrato (LIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2018).

3.2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) compreende o crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre, ou seja, a água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. Esse tipo de fermentação apresenta vantagens com relação à fermentação submersa, pois a fase sólida além de atuar como fonte de nutrientes, serve de suporte para o crescimento das células microbianas, utilizam maiores quantidades de resíduos agroindustriais sólidos e apresentam baixa contaminação devido à baixa quantidade de água utilizada. Trabalhos que produziram lipase por fermentação no estado sólido estão descritos na Tabela 2. (CARVALHO et al., 2023; LIMA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2017).

Tabela 2 – Produção de lipases por fermentação no estado sólido.

Microrganismo Utilizado	Substrato	Atividade Máxima	Referência
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 872	Casca de arroz, torta de semente de algodão e casca de grama vermelha	28,19 U gSS ⁻¹	Nema et al. (2019)
<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de coco	157 U gSS ⁻¹	Suyanto; Soetarto; Cahyanto, (2019)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo	200 U gSS ⁻¹	Hermansyah; Andikoputro; Alatas (2019)
<i>Aspergillus terreus</i> NRLL-255	Manteiga de bati	216,9 U gSS ⁻¹	Barros et al. (2023)

Fonte: Autoria própria (2023).

Nema et al. (2019) produziram lipase por fermentação em estado sólido usando *Aspergillus niger* MTCC 872 com diferentes combinações de substratos provenientes de resíduos agroindustriais (casca de arroz, torta de semente de algodão e casca de grama vermelha). A combinação dos três substratos na proporção de 2:1:1 respectivamente, mostrou atividade máxima da lipase de 28,19 U gSS⁻¹ (Unidades de atividade enzimática expressa em μmol de ácido graxo liberado

por minuto por grama de substrato sólido seco do qual a enzima foi extraída, sendo o óleo de oliva como substrato) à temperatura de 40 °C, teor de umidade de 75% (v/p) e pH 6,0.

Suyanto, Soetarto e Cahyanto (2019) também produziram lipase por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*, contudo neste trabalho utilizaram como substrato resíduos de polpa de coco. Obtiveram como melhor resultado atividade de 10,83 U mL⁻¹ ou 157 U gSS⁻¹ (titulométrico, óleo de coco) sob as condições ótimas de 30 °C, 60% de umidade e pH 7,0.

Hermansyah, Andikoputro e Alatas (2019) produziram lipase via fermentação em estado sólido através de *Rhizopus oryzae* usando farelo de trigo como substrato, com 90% de umidade relativa, a 35 °C obtendo atividade de 50 U mL⁻¹ ou 200 U gSS⁻¹ (pNPP como substrato).

Barros et al. (2023) avaliaram a manteiga de bati (*Ouratea parviflora*) como substrato para a produção de lipase por fermentação em estado sólido usando *Aspergillus terreus* NRRL-255. A maior produção de lipase foi obtida a 35°C e 120h de fermentação, rendendo 216,9 U.gSS⁻¹ (pNPP como substrato), demonstrando o potencial da manteiga como substrato enzimático.

Apesar de apresentar vantagens, a fermentação em estado sólido ainda não é aplicada industrialmente por apresentar dificuldades de homogeneização e reprodutibilidade, onde os nutrientes do meio não são completamente acessíveis para o microrganismo sendo um impeditivo para a reprodução do processo.

3.2.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS DO GÊNERO *PENICILLIUM*

Os fungos do gênero *Penicillium* são adaptáveis, pouco exigentes nutricionalmente, tolerantes a diversas condições físico-químicas e a maioria saprófita oportunista. São bastante conhecidos e podem ser encontrados do ar ao solo tendo como principal função a decomposição de matéria orgânica. No entanto, a maioria das cepas de *Penicillium* produz micotoxinas que comprometem a segurança dos alimentos. Ao longo da história da humanidade, fungos do gênero *Penicillium*, têm sido utilizados na fabricação de queijo e produção do antibiótico Penicilina também sendo considerado como um bom produtor de lipases, como apresenta a Tabela 3 (LEITÃO, 2009; LI; ZONG, 2010; WOLSKI, 2023).

Leistner (1990) descreve em seu trabalho a tradicional cultura de maturar alimentos pelo mofo, a exemplo do *Penicillium roqueforti*, utilizado na produção do queijo Gorgonzola ou queijo azul, *Penicillium camemberti* utilizado para queijo branco e *Penicillium nalgiovense* para salame e determinados tipos de presuntos crus.

Lima, Silva e Pinotti (2014) estudaram a produção de lipases de *Penicillium* sp. obtendo $0,60 \text{ U mL}^{-1}$ como melhor atividade extracelular utilizando um meio composto de 3% (m/v) de peptona, 3% (m/v) de óleo de oliva a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 horas. Como melhor resultado da atividade intracelular obtiveram $11,2 \text{ U g}^{-1}$ utilizando 1% de peptona bacteriológica e 3% de azeite de oliva.

Ortellado et al. (2020) determinaram o potencial lipolítico e o perfil isoenzimático de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* isolados da floresta paranaense para aplicação no tratamento de resíduos de óleo de cozinha. Neste trabalho os autores constataram que o melhor produtor de lipase foi o isolado *Penicillium* sp. com 1224 U mL^{-1} de atividade lipolítica.

Greco-Duarte et al. (2023) produziram e imobilizaram simultaneamente lipases de *Penicillium simplicissimum* em suporte de propileno por fermentação submersa e em estado sólido utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, azeite e uma combinação de ambos). Como resultados, obtiveram atividade máxima da lipase na fermentação submersa os seguintes valores, $0,2 \text{ U mL}^{-1}$ após 144h, $1,8 \text{ U mL}^{-1}$ após 96 h e $1,6 \text{ U mL}^{-1}$ após 144 h nos meios de glicose, glicose/azeite e azeite, respectivamente. Já na fermentação em estado sólido, os autores obtiveram como resultado $3,7 \text{ U g}^{-1}$ após 72 h no meio com glicose (G), $9,5 \text{ U g}^{-1}$ após 96 h utilizando o meio glicose e óleo (GO) e $16,38 \text{ U g}^{-1}$ após 96 h em meio contendo azeite (O). Para a fermentação submersa, onde havia o polipropileno, a atividade da enzima imobilizada foi de 5,88, 14,72 e $20,72 \text{ U g}^{-1}$ para os meios contendo G, GO e O respectivamente. Os autores também estudaram a produção e simultânea imobilização por fermentação em estado sólido. Neste caso, o polipropileno foi hidratado com os meios de cultivo, a fermentação ocorreu em bioreatores e as atividades foram de $3,7 \text{ U g}^{-1}$ após 72 h de fermentação usando meio G, $8,8 \text{ U g}^{-1}$ após 72 h chegando a $9,5 \text{ U g}^{-1}$ após 96 h de fermentação usando meio GO, que é estatisticamente o mesmo pelo teste t (P -valor = 0,55) e $16,38 \text{ U g}^{-1}$ após 96 h com meio O, ocorrendo na fase exponencial para todos os três meios. Para todas as dosagens de atividade, o substrato foi o pNPL (laurato de p-nitrofenila).

Em relação ao microrganismo utilizado neste trabalho, o *P. corylophilum*, alguns estudos anteriores para a produção de lipases foram relatados. Por exemplo, Baron et al. (2005) utilizou lipases de *P. corylophilum* IOC 4211 produzido por FS para estudar a reação de hidrólise de ésteres em meio aquoso e em micelas reversas, bem como, na síntese do oleato de *n*-butila em diferentes sistemas. Neste trabalho, as maiores atividades enzimáticas ($202,80 \pm 8,01 \text{ U mg}^{-1}$ e $31,81 \pm 0,69 \text{ U mg}^{-1}$) foram encontradas para o *p*NPP em meio aquoso e para a trioleína em meio micelar respectivamente. Com relação à esterificação em sistemas aquo-restritos, o melhor sistema para a síntese do oleato de *n*-butila foi o de micelas reversas com 100% de rendimento em 12 h e teor de água, em termos de W_0 ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$) de 10.

Romero et al. (2014) utilizaram o *P. corylophilum* IOC 4211 para produção e avaliação da lipase extracelular e ligada ao micélio. A fermentação submersa foi realizada na presença e ausência de um indutor lipídico (azeite) obtendo uma atividade nos meios suplementados com azeite de 163 mU g^{-1} em três dias e 188 mU g^{-1} em quatro dias, para a lipase extracelular e a lipase ligada ao micélio respectivamente. Quando comparado ao meio não suplementado, as atividades foram de 42 mU g^{-1} , para a lipase extracelular e 143 mU g^{-1} para a lipase ligada ao micélio, ambas em três dias.

Dos Santos (2022) estudou a produção de lipases de *P. corylophilum* IOC 4211 por FES utilizando meios de cultivo de baixo custo e resíduo agroindustrial (farelo de semente de girassol, torta de milho e trigoilho). Para isso, foram exploradas, a solução umidificadora com água e tampão fosfato pH 7,0 - $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e o efeito da liofilização na atividade enzimática do sólido fermentado, a umidade dos meios de cultivo foi fixada em 55% (v/m). O efeito da solução umidificadora para a produção da lipase demonstrou que a atividade enzimática foi maior nos três meios quando utilizado água como solução para umidificar os substratos. Já o efeito da liofilização apresentou como atividade residual 83, 40 e 38% para farelo de semente de girassol, torta de milho e trigoilho, respectivamente tendo como maior atividade lipolítica do fermentado de $32,3 \text{ U g}^{-1}$ em 168 h de cultivo, para o trigoilho.

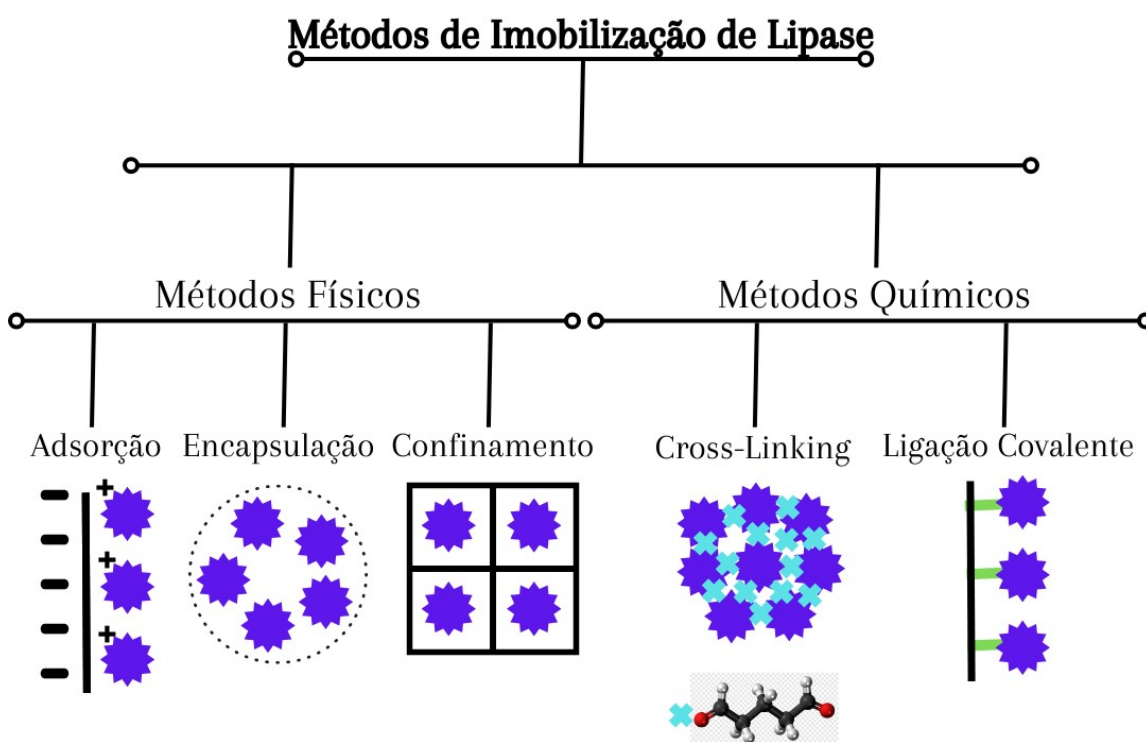
3.3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A imobilização é um termo genérico utilizado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico aplicada na

indústria alimentícia, biotecnológica, cosmética, química, têxtil e outras. No caso das enzimas, a imobilização consiste em aprisionar a enzima em um suporte sólido insolúvel para posterior reutilização do biocatalisador. Assim, a imobilização torna-se um método vantajoso por otimizar a estabilidade térmica e atividade da enzima, facilitar a separação da enzima no meio reacional, permitir a reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009; MEI et al., 2018).

Existem diferentes técnicas de imobilização enzimática (Figura 2), geralmente divididas em quatro categorias principais: adsorção, aprisionamento, ligação covalente e reticulação (ALTINKAYNAK, 2016).

Figura 2 – Métodos comumente empregados para a imobilização de lipases. Sendo: CLE (reticulados de enzima), CLEC (cristais de enzima reticulado), CLEA (agregados enzimáticos reticulados) e CSDE (enzimas atomizadas reticuladas).



Fonte: Adaptado de ISMAIL; KASHTOH; BAEK (2021).

A adsorção física, empregada neste trabalho, é o método mais simples e também o mais empregado na imobilização enzimática. Nesse processo o biocatalisador é estabilizado por interações fracas, como forças de van der Waals,

ligações de hidrogênio ou iônicas, com o suporte. As principais vantagens são a facilidade e simplicidade da técnica além de alterar minimamente a conformação da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada no suporte com uma orientação que a favoreça energeticamente (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

A imobilização por aprisionamento é também conhecida por encapsulação e tida como um método irreversível, onde a enzima é aprisionada na estrutura interna do material polimérico que permite que o substrato e os produtos passem, mas a enzima permaneça retida. Normalmente, esse tipo de imobilização melhora a estabilidade mecânica e minimiza a lixiviação da enzima. Além disso, evita a desnaturação pois a enzima não interage com o polímero (MOHAMAD et al., 2015; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A técnica para imobilizar por ligação covalente é formar ligações entre a enzima e o substrato, de modo que, essas ligações sejam feitas entre grupos funcionais específicos da enzima, que não sejam os fundamentais para a atividade catalítica, com os grupos reativos específicos do suporte. Os grandes benefícios deste método são a redução da lixiviação e o aumento da estabilidade que devido à estabilidade das ligações formadas entre a enzima e o suporte, a enzima não é liberada na solução após o uso. Todavia, a força dessas ligações não permite que o suporte e a enzima sejam regenerados, ou seja, a enzima e o suporte devem ser descartados após o decaimento da atividade enzimática (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIEIRA, 2013).

Já a imobilização por reticulação ou cross-linking, é realizada com ausência de suporte, ou seja, as enzimas ligam-se umas às outras sem precisar recorrer a um suporte. Essas ligações são formadas mediante ligações covalentes entre as moléculas de enzimas com a utilização de um agente reticulante. Esse agente é uma molécula que possui pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos da enzima unindo-as. Esse processo traz como vantagem uma maior estabilidade para a enzima quando comparada à livre, apesar disso, podem sofrer perda de atividade catalítica provenientes das alterações em sua conformação morfológica (SOUZA et al., 2016).

3.3.1 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte, devendo suas propriedades físicas e químicas serem analisadas. Os suportes podem ser classificados quanto a sua origem em orgânicos e inorgânicos e quanto a sua morfologia em materiais porosos, não porosos ou de estrutura em gel (JEGANNATHAN et al., 2008).

Os materiais orgânicos, especialmente os polímeros, são uma classe de materiais amplamente utilizados na imobilização enzimática e podem ser subdivididos em naturais ou sintéticos. Como exemplos de polímeros naturais têm-se os polissacarídeos e as proteínas que apresentam baixo custo e são facilmente degradados quando comparados com os polímeros sintéticos, como o náilon (LYU et al., 2021).

Entre os suportes inorgânicos, os mais empregados são à base de sílica e de óxidos. Comparativamente com os materiais orgânicos apresentam maiores resistência mecânica e térmica além de uma excepcional resistência microbiana, pois materiais inorgânicos não são substratos para qualquer tipo de crescimento bacteriano ou fúngico (ZUCCA; SANJUST, 2014).

Materiais porosos são descritos como materiais que possuem poros e podem ser classificados em três categorias: microporosos (<0,2 nm), mesoporosos (2-50 nm) e macroporosos (>50 nm). Os suportes microporosos são muito pequenos para difusão enzimática, apesar de possuírem uma alta adsorção e grandes áreas de superfície. Já os suportes mesoporosos são os comumente utilizados para imobilizar lipases devido a sua estabilidade e extensa área superficial. Com relação aos suportes macroporosos, por apresentar os poros com diâmetro em escala micrométrica as enzimas podem ser rapidamente imobilizadas como também lixiviadas (MOKHTAR et al., 2020).

Diferentemente dos materiais porosos que protegem as enzimas, devido a sua espaçosa área superficial interna livre, onde ocorre a imobilização enzimática, os materiais não porosos possuem uma reduzida área superficial. Em contrapartida, para a imobilização ocorrer na superfície externa do suporte há uma maior facilidade de interação da enzima com o substrato. Nesse contexto, observa-se que diversos materiais são utilizados nos processos de imobilização enzimática. Todavia, salienta-se a utilização dos materiais orgânicos naturais por encontrarem-se

facilmente disponíveis, serem renováveis e biodegradáveis além de apresentarem baixo custo (FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021).

Embora existam diversos suportes descritos na literatura, a obtenção de novos suportes para imobilização tem sido investigada nos últimos anos devido ao elevado custo dos suportes empregados comercialmente. Nesse cenário, pesquisadores têm estudado a aplicação de tecidos como suportes de imobilização, devido às suas notáveis propriedades como: eminente área superficial, alta resistência mecânica e microbiana, elevada estabilidade química, baixo custo e grande disponibilidade (CORADI et al., 2018; ISMAIL; AZHA, 2018).

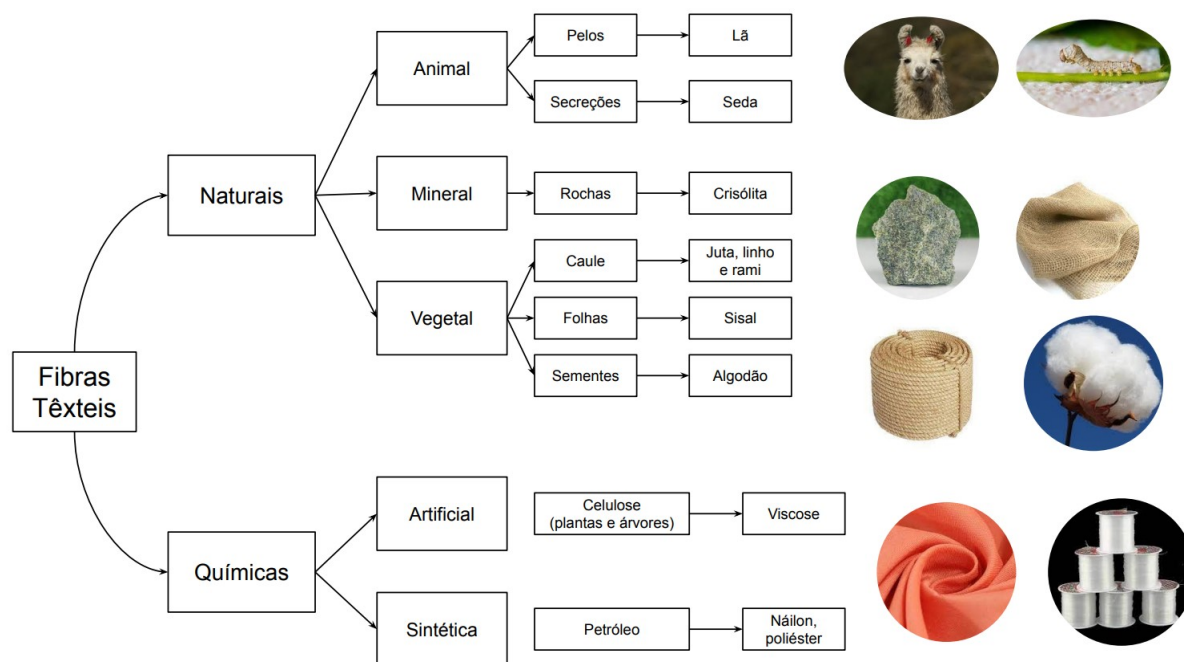
3.3.1.1 Imobilização de lipases em têxteis

Os materiais têxteis são oriundos inicialmente das fibras têxteis, que são transformadas em fios e posteriormente em tecidos. Essas fibras podem ser de origem natural (animal, mineral ou vegetal) ou química (artificial ou sintética), sendo as fibras naturais encontradas prontamente na natureza enquanto as fibras químicas são produzidas por processos químicos. A Figura 3 ilustra detalhadamente a classificação e procedência das fibras têxteis (DANIEL, 2011).

Materiais têxteis vêm sendo considerado um tipo de suporte eficaz para imobilização de enzimas, pois oferece flexibilidade em termos de tamanho, forma e orientação, oferece também uma separação completa e rápida dos catalisadores imobilizados sem deixar resíduos, além disso, a estrutura aberta, ativa e porosa da superfície oferece baixa queda de pressão, permitindo uma fácil difusão dos substratos, transferência de massa e ótima renovação do substrato (FENG et al., 2013; MORSHED et al., 2021).

O primeiro registro referente à imobilização de enzima em material têxtil foi de Shemer et al. (1979) onde imobilizaram, com sucesso, a enzima urease em tecidos de nylon. Já a primeira imobilização em tecido de algodão foi realizada por Yamazaki et al. (1984) utilizando invertase de levedura. Desde então, a exploração de diferentes tipos de têxteis combinados com os mais variados métodos de imobilização são estudados na busca por melhores propriedades enzimáticas e aplicações em larga escala.

Figura 3 – Classificação das fibras têxteis segundo sua origem.



Fonte: Adaptado de DANIEL (2011).

O algodão está entre as mais importantes culturas de fibra do mundo. Segundo Santana, Wanderley e Beltrão (1998) a fibra do algodão é composta em 94% de celulose (cuja cadeia é constituída por moléculas de glicose). Depois da celulose, o constituinte de maior relevância é a cera (0,6%), pois controla a absorção de água e lubrifica as fibras durante o processo industrial. Por fim, também são compostas residualmente por proteínas, substâncias pécnicas e outros elementos não dosados.

Kamath, Melo, D'Souza (1998) imobilizaram urease de feijão de porco em tecido de algodão revestido com polietilenoimina por adsorção seguida de reticulação com suberimidato de dimetila. O tecido imobilizado foi utilizado na hidrólise da uréia (mais de 90% alcançada em 24h) com reutilização apreciável (5 lotes) e perda insignificante na atividade catalítica em comparação com a urease livre.

Shu et al. (2011) imobilizaram lipases de *Candida rugosa* em tecidos de algodão por ligação covalente com posterior aplicação na síntese de butirato de etila para avaliação de seu desempenho. A maior conversão em éster foi de 91,2% utilizando 0,25 mol L⁻¹ de etanol e 0,6 mol L⁻¹ de ácido butírico à 25 °C. A reutilização da enzima imobilizada foi posteriormente estudada e a atividade residual

permaneceu em cerca de 50% após 12 ciclos. Por fim, os autores desenvolveram um reator contínuo utilizando a lipase imobilizada para produção de butirato de etila, alcançando 70,6% de conversão em éster.

Ondul, Dizge e Albayrak (2012) estudaram a imobilização de lipases provenientes de *Candida antarctica A* e *Thermomyces lanuginosus* em fibras de algodão por ligação covalente. Neste estudo, os autores revestiram o tecido de algodão com polietilenoimina (PEI) e imobilizaram as lipases por adsorção seguida de reticulação com glutaraldeído imobilizando 180 mg/g_{suporte} e 200 mg/g_{suporte} para as lipases de *T. lanuginosus* e *C. antarctica A*, respectivamente. Verificou-se que a imobilização não teve efeito sobre a temperatura ótima de 60 °C (para enzimas livres e imobilizadas). Por fim, também foram analisados os efeitos da estabilidade operacional e de armazenamento na atividade das lipases livres e imobilizadas demonstrando que ambas lipases imobilizadas são mais estáveis do que as lipases em solução, podendo ser armazenadas à temperatura ambiente com pouca perda de atividade durante 28 dias.

É perceptível que a pesquisa sobre imobilização enzimática em tecido não é contemporânea, porém é importante ressaltar a significância, para além da técnica de imobilização e suas posteriores aplicações, a preocupação em reaproveitar e reciclar esse tipo de suporte que atualmente está disponível em altíssima quantidade devido à grande produção e posteriormente, em sua grande maioria, erroneamente descartado. Estudos voltados para essas preocupações permitem não somente o reaproveitamento e uma melhor destinação como concede valor agregado àquilo que anteriormente não apresentava valor.

Diante deste contexto, a inovação deste trabalho é o uso do tecido de algodão como uma matriz para imobilização de lipase de *P. corylophilum* que contribui para uma melhor destinação destes resíduos têxteis.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para a valorização de resíduos têxteis através da imobilização de lipases de *P. corylophilum* em tecido de algodão para posterior aplicação na síntese do oleato de etila.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e imobilizar simultaneamente lipases de *P. corylophilum* por fermentação em estado sólido (FES) em meio de cultivo relativamente baixo e tecido de algodão como suporte;
- Caracterizar o tecido de algodão antes e após a fermentação em estado sólido (FES) por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada ao acessório de reflectância total atenuada (ATR) e análise termogravimétrica (ATG);
- Analisar algumas características da lipase imobilizada pelo método proposto, tais como: efeito da temperatura e estabilidade à temperatura e em solventes orgânicos;
- Estudar os parâmetros da produção do oleato de etila por esterificação: Efeito da razão molar ácido:álcool; quantidade de enzima e temperatura .

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho, descrita na Figura 4, foi realizada nos Laboratórios de pesquisa L104 da Coordenação de Licenciatura em Química (Coliq) e LabMulti da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Apucarana. As análises de infravermelho foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química.

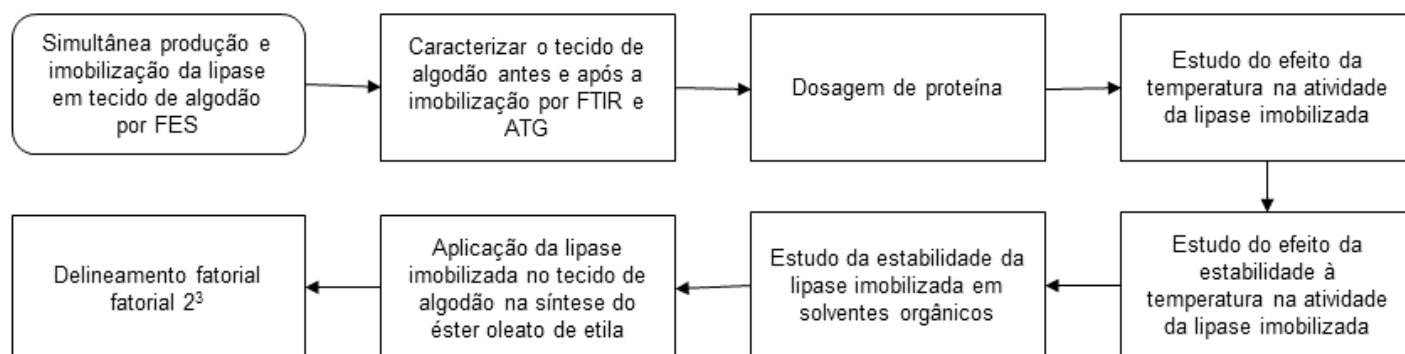
A enzima imobilizada, denominada Lip-tecido, foi preparada através da simultânea produção por fermentação no estado sólido e imobilização em tecido de algodão. Para tal, a semente de girassol gigante e o tecido de algodão branco foram adquiridos em comércio local.

Para as reações de esterificação, bem como para a curva analítica do ácido oleico, o padrão utilizado (Dinâmica, PA), etanol (Êxodo científica, 99,5%). Os demais reagentes para esta etapa foram de grau analítico.

Para a dosagem da atividade de hidrólise da enzima imobilizada utilizou-se palmitato de p-nitrofenila (pNPP Sigma-Aldrich, <100%).

Os demais reagentes foram de grau analítico e tiveram o grau de pureza requerido no experimento.

Figura 4 – Fluxograma da Parte experimental realizada no presente trabalho.



Fonte: Autoria própria (2023).

5.1 ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS

Para garantir as condições estéreis dos materiais utilizados, de crescimento do fungo, dos meios sólidos de propagação, dos meios líquidos de pré-inóculo e fermentação foram feitas esterilizações em autoclave a 120 °C pelo período de 15 minutos.

5.2 MICRORGANISMO

O fungo *P. corylophilum* foi produzido e isolado no laboratório de Biocatálise da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelo Departamento de Química e caracterizado taxonomicamente pelo Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz, onde encontra-se depositado como *P. corylophilum* Dierckx (IOC-4211).

5.3 PRESERVAÇÃO DA CEPA E PREPARO DO INÓCULO

Para manutenção da cepa do fungo filamentoso utilizou-se o meio BDA (batata, dextrose e ágar), previamente esterilizado e adicionados em placas de Petri, repicando o fungo em três regiões distintas da placa (Figura 5) e incubado a 29 °C. Depois de crescido, normalmente no período de sete dias, cortou-se pequenos cubos do gel. Em um recipiente pequeno, com aproximadamente 5 mL de água destilada estéril foram colocados cerca de quatro pequenos cubos retirados da placa. Este recipiente foi fechado e mantido a 4 °C.

Para preparo do inóculo, após o período de incubação, os esporos foram raspados, suspensos em água destilada estéril contendo Tween 80 (0,01%, v/v) e agitados. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Figura 5 – Crescimento do fungo *Penicillium corylophilum* em meio batata, dextrose e ágar.

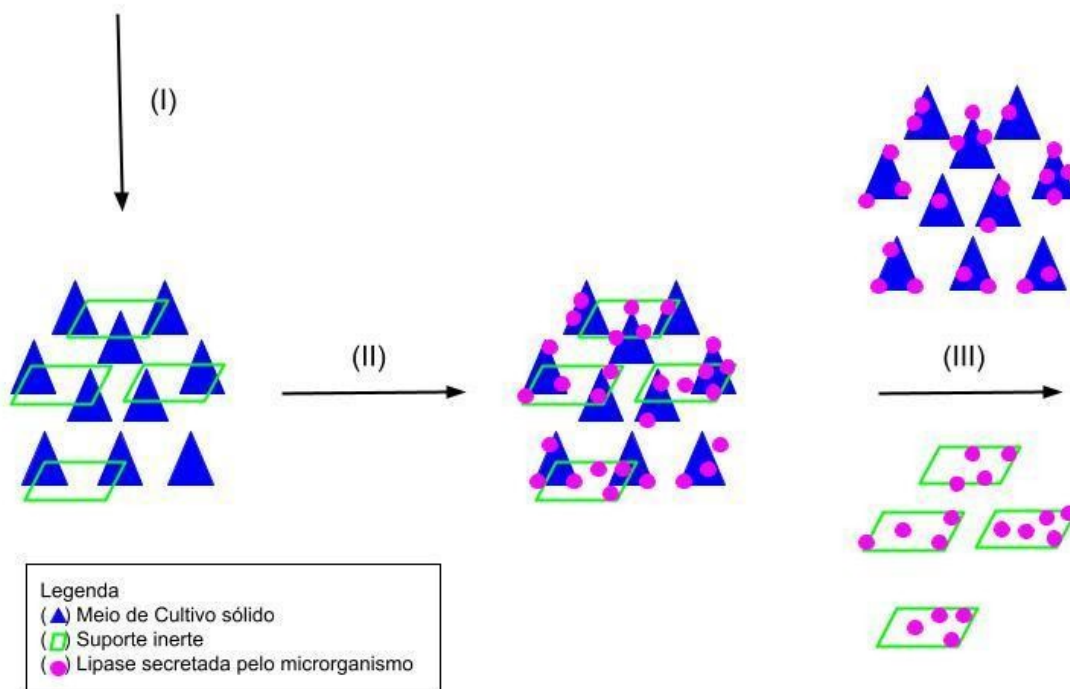


Fonte: Autoria própria (2022).

5.4 SIMULTÂNEA PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR FES

Os cultivos foram feitos utilizando-se Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g do farelo de semente de girassol (granulometria entre 0,85 e 1,70 mm de diâmetro) e tecido de algodão (2 x 2 cm) umedecidos com tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L⁻¹ para atingir a umidade de 55% (m/m). Em seguida, ao meio de cultivo já contendo o suporte inerte (tecido de algodão), adicionou-se 1 mL de suspensão de esporos (10 x 10⁷ esporos. mL⁻¹) (Etapa I, Figura 6). Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 29 °C por 144 h. Assim, à medida que o microrganismo utiliza o meio de cultivo para seu desenvolvimento (farelo de semente de girassol com casca triturada) produz lipases extracelulares, essas enzimas adsorvem no suporte inerte (tecido), sendo, portanto, imobilizadas (Etapa II, Figura 6). Na produção máxima de lipase (para o caso específico, 6 dias) a fermentação é interrompida, o suporte contendo a enzima (Lip-tecido) e o sólido fermentado (SF) são separados e podem ser aplicados como catalisadores pois ambos possuem as enzimas (Etapa III, Figura 6). Porém, para este trabalho foram utilizadas apenas a enzima imobilizada no tecido de algodão, obtida conjuntamente ao sólido fermentado. A Lip-tecido foi armazenada a 4 °C para determinação da atividade lipolítica, expressa em U g⁻¹ (unidades de atividade por grama do suporte).

Figura 6 – Processo de obtenção da lipase de *Penicillium corylophilum* por simultânea produção e imobilização em tecido de algodão. Sendo (I): meio de cultivo composto por farelo de semente de girassol e tampão fosfato pH 7,0 0,05 mol L⁻¹ na presença da suspensão de esporos; (II) imobilização enzimática no suporte inerte de algodão simultânea à fermentação e (III) separação do sólido fermentado e do suporte inerte imobilizado.



Fonte: Adaptado de Baron et al. (2020).

5.4.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE POR INFRAVERMELHO

O teor de umidade do farelo de semente de girassol e tecido foi determinada em analisador de umidade com lâmpada infravermelha halógena IV3100 (Gehaka), utilizando 1 g de amostra.

5.4.2 EFEITO DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE À TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA

Para determinar a melhor temperatura para a atividade da Lip-Tecido, ensaios de atividade lipolítica foram realizados variando a temperatura de 40 a 60 °C. Para determinar a estabilidade térmica da Lip-tecido, as amostras foram incubadas nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C por 30 minutos. A dosagem da atividade foi realizada pelo método do *p*NPP (item 5.5.2) em triplicata. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato pH 8,0 com aproximadamente 5 mg Lip-tecido.

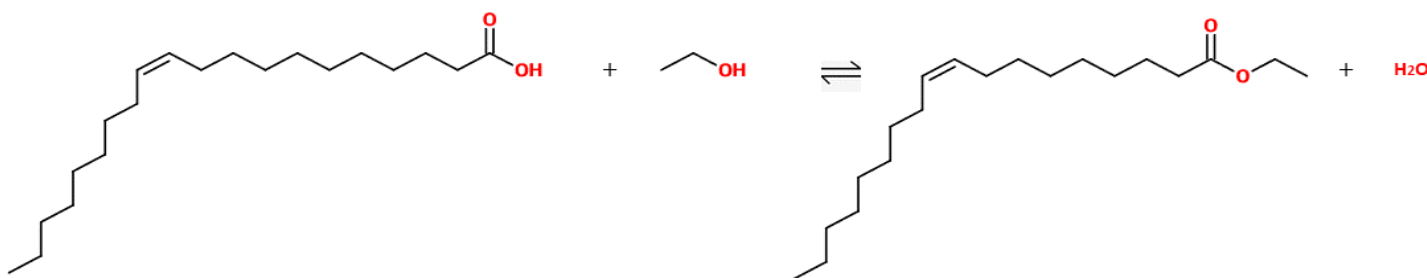
5.4.3 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Para estudar a estabilidade em solventes orgânicos, a enzima imobilizada (5 mg) foi incubada a 25 °C por 1 h em diferentes solventes orgânicos: acetona (Log P = -0,23); álcool isoamílico (Log P = 1,42); butanol (Log P = 0,80); etanol (Log P = -0,24); *n*-heptano (Log P = 4,00); *n*-hexano (Log P = 3,50); isopropanol (Log P = 0,29); metanol (Log P = -0,74) e tolueno (Log P = 2,50) e posteriormente transferidos para o dessecador para secagem das amostras. Após seco, a atividade do material foi medida pelo método do *p*NPP.

5.4.4 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Para verificar a eficiência catalítica da Lip-tecido em ambientes aquo-restritos, reações de síntese do oleato de etila (Figura 7) foram realizadas utilizando um delineamento fatorial 2^3 com repetição no ponto central (Tabela 3). Os seguintes parâmetros foram estudados na conversão do éster: efeito da razão molar (RM) ácido: álcool, concentração da enzima (em termos de unidades de atividade) e temperatura.

Figura 7 – Síntese do oleato de etila.



Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 3 – Níveis máximos e mínimos para o planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X_1 – Temperatura (T, °C)	30	37	44
X_2 – Unidades Totais (U)	50	75	100
X_3 – RM ^a ácido: álcool	1:1	1:2	1:3

Fonte: Autoria própria (2023).

Os ensaios foram feitos em erlenmeyers de 25 mL em agitador orbital, a 120 rpm, usando 10 mL de *n*-heptano e quantidade suficiente de tecido imobilizado para fornecer a concentração de enzima requerida no planejamento. A reação foi iniciada pela adição do ácido oleico (165 μ L) ao meio reacional contendo álcool etílico (25, 50 e 75 μ L), para os ensaios com razão molar ácido:álcool de 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente. Em intervalos de 24 h, amostras de 100 μ L do meio reacional foram coletadas e analisadas pelo método Lowry-Tinsley (item 5.5.3). Uma curva padrão foi construída usando ácido oleico sob as mesmas condições. O rendimento em éster foi calculado a partir do consumo de ácidos graxos livres.

Para medir a influência de cada variável na reação, foi calculada a contribuição de cada variável na formação do éster. Para tal, empregou-se o esquema de sinais da Tabela 3, atribuindo-se a cada valor do rendimento do éster, o sinal correspondente a cada uma das condições estudadas. Em seguida, fez-se a somatória dos valores, respeitando os sinais atribuídos sendo o resultado dividido por quatro, o que corresponde ao coeficiente de contraste (C_i) (Equação 1).

$$C_i = \frac{2(\sum y_i^+ - \sum y_i^-)}{n} \quad (1)$$

Onde:

C_i : o coeficiente de contraste da variável independente i

y_i^+ : valores obtidos para a variável resposta (% do éster de rendimento) quando a variável independente i está em seu nível máximo

y_i^- : valores obtidos para a variável resposta quando a variável independente i está em seu nível mínimo

y^+ : níveis dos parâmetros + (44 °C; 100 U; RM 1:3)

y^- : níveis dos parâmetros - (30 °C; 50 U; RM 1:1)

n : número total de experimentos

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO DE ALGODÃO ANTES E APÓS A IMOBILIZAÇÃO POR FTIR e ATG

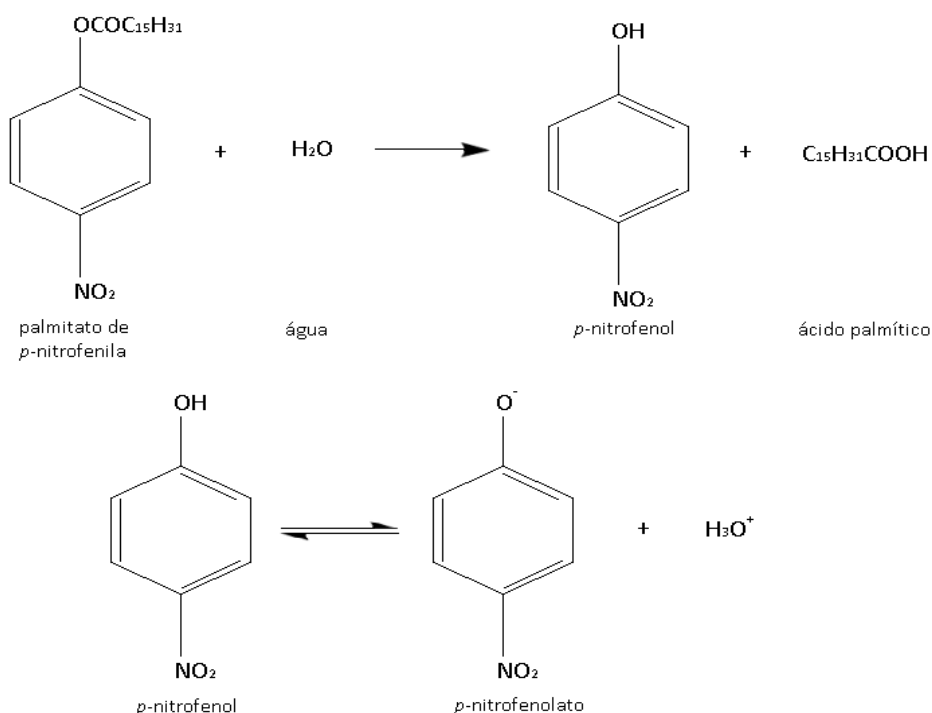
Os espectros de infravermelho do tecido de algodão antes e após o processo de fermentação foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Bruker® modelo Vertex 70 com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR), utilizando 32 scans, com resolução de 2 cm^{-1} e janela de trabalho entre 4000 e 400 cm^{-1} .

A análise termogravimétrica (ATG) foi realizada no equipamento Shimadzu modelo TGA-50, para avaliar as propriedades térmicas e possíveis modificações no tecido antes e após o processo de fermentação e imobilização. As amostras foram aquecidas de 20 a 600°C com taxa de aquecimento de 10°C min^{-1} sob atmosfera de nitrogênio (razão de fluxo – 50 mL min^{-1}).

5.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (Figura 8) é um método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stuckmann (1979) que pode ser catalisado por lipases. Consiste no rompimento da ligação éster do *p*NPP pela enzima na presença de água onde há a liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP) que é analisado em comprimento de onda de 410 nm.

Figura 8 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipase.



Fonte: Autoria própria (2023).

Para a dosagem da atividade lipolítica da Lip-tecido, misturou-se 0,5 mL da solução A, contendo palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma) em isopropanol (3 mg mL^{-1}) com 4,5 mL da solução B, contendo 2 g de Triton X-100 em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 8,0, lentamente e sob agitação contínua. A mistura foi preparada imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é

instável em meio aquoso. Desta solução foi colocado 1 mL em cubeta estabilizada na temperatura de 40 °C para leitura do branco.

Em seguida, 5 mL do meio reacional (A+B) foram adicionados em erlenmeyers de 25 mL climatizados em banho termostático a 40 °C e agitação ultrassônica (Schuster L200). A reação iniciou-se com a adição de 5 mg da enzima imobilizada e a cinética das reações foram seguidas em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 minutos) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorvâncias em comprimento de onda de 410 nm.

Para calcular a atividade de hidrólise, a Equação 2 foi empregada, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol (*p*NP) por minuto. O coeficiente de absorvidade molar do *p*NPP ($15 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em pH 8,0, foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura. A unidade final da atividade de hidrólise é U g⁻¹ (U por g de enzima imobilizada, sendo as reações realizadas em triplicata).

$$A = \frac{CA \cdot V}{\varepsilon \cdot Ma} \quad (2)$$

Sendo:

CA: coeficiente angular da reta

V: volume do meio reacional (mL)

ε: coeficiente de absorvidade molar para tampão fosfato pH 8: $1,5 \cdot 10^4 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$

Ma: massa da enzima imobilizada (g)

5.5.3 QUANTIFICAÇÃO DA ESTERIFICAÇÃO PELO MÉTODO LOWRY-TINSLEY

O método Lowry-Tinsley foi utilizado para quantificar indiretamente o teor de ésteres formados, a partir do teor residual de ácido oléico consumido durante a síntese de ésteres catalisada pelas lipases de *P. corylophilum*. Trata-se de um método colorimétrico que mede a cor do complexo azul-esverdeado, em comprimento de onda de 715 nm, formado entre os íons Cu²⁺ e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica. O teor de éster (%) foi calculado através da curva

de calibração construída a partir de concentrações de 5 a 100 mmol de ácido oléico, preparada em 10 mL de *n*-heptano. Após, em tubos de ensaio contendo 1,15 mL de tolueno, adicionou-se 0,25 mL do reagente acetato cúprico e 100 µL da solução do ácido oléico com concentração conhecida, formando duas fases que foram misturadas vigorosamente durante 20 s usando um misturador vórtex. A mistura foi centrifugada a 3000xg por 10 min, até que a fase aquosa (inferior) fosse separada da fase orgânica. A curva analítica foi determinada a partir da medida da absorvância da fase superior da mistura (*n*-heptano e complexo ácido oléico/Cu²⁺) a 715 nm contra o controle, que não continha ácidos graxos livres. Para a análise das amostras das reações, realizou-se o mesmo procedimento, sendo substituída a solução de ácido oléico por 100 µL do meio reacional.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA: TESTE DE TUKEY

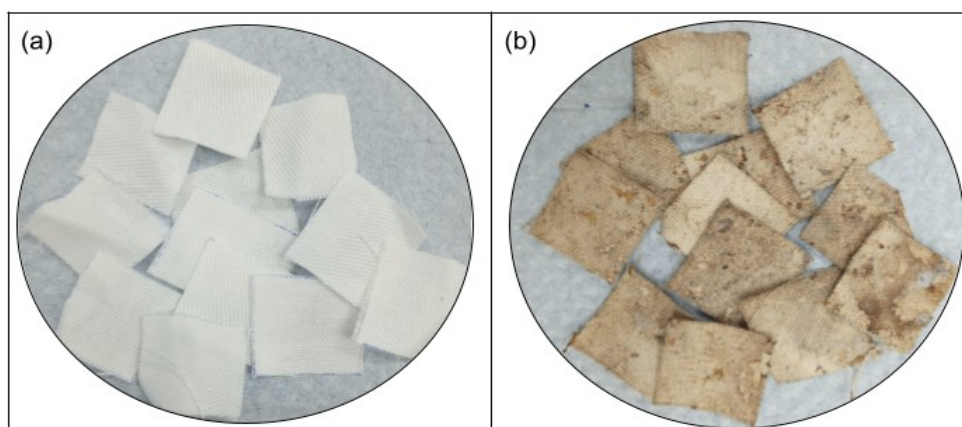
A análise estatística foi empregada para verificar diferenças significativas entre avaliações da Lip-tecido para os estudos de efeito e estabilidade à temperatura e em solventes orgânicos. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (TUKEY, 1953). As análises foram realizadas por meio do software estatístico OringinPro8.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SIMULTÂNEA PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR FES

Através da simultânea produção por FES e imobilização da lipase em tecido de algodão foi possível observar que o processo provoca modificações no aspecto do tecido como na coloração (Figura 9) e na maleabilidade do tecido, deixando-o mais rígido.

Figura 9 – Imagens dos tecidos (a) antes e (b) após a simultânea produção e imobilização da lipase de *Penicillium corylophilum* por fermentação em estado sólido (FES).



Fonte: Autoria própria (2023).

Posteriormente, a determinação da atividade lipolítica da enzima imobilizada no tecido de algodão, obtida conjuntamente ao sólido fermentado no processo de simultânea produção e imobilização da lipase por FES, foi realizada pelo método da hidrólise do *p*NPp apresentando atividade de $41,1 \pm 2,5 \text{ U g}^{-1}$ e atividade específica de $51 \pm 2 \text{ U mg}^{-1}$ (concentração de proteína $0,81 \pm 0,0042 \text{ mg g}^{-1}$). Este valor significa que $41,1 \mu\text{mol}$ do éster foram hidrolisados por min e por 1 g do suporte contendo as lipases.

Comparativamente Baron et al. (2020) produziram por fermentação sólida convencional e posterior imobilização de lipases oriundas do fungo *P. corylophilum*

IOC 4211 e obtiveram uma atividade de $26 \pm 3 \text{ U g}^{-1}$. Neste mesmo trabalho, os autores produziram e imobilizaram lipases de *P. corylophilum* simultaneamente por FES e obtiveram atividade de $33 \pm 8 \text{ U g}^{-1}$. Acerca da atividade obtida pela imobilização convencional houve uma melhora no resultado e ao considerarmos a redução de etapas (de cinco para três) e equipamentos, o processo de simultânea produção e imobilização se torna mais vantajoso que o processo convencional.

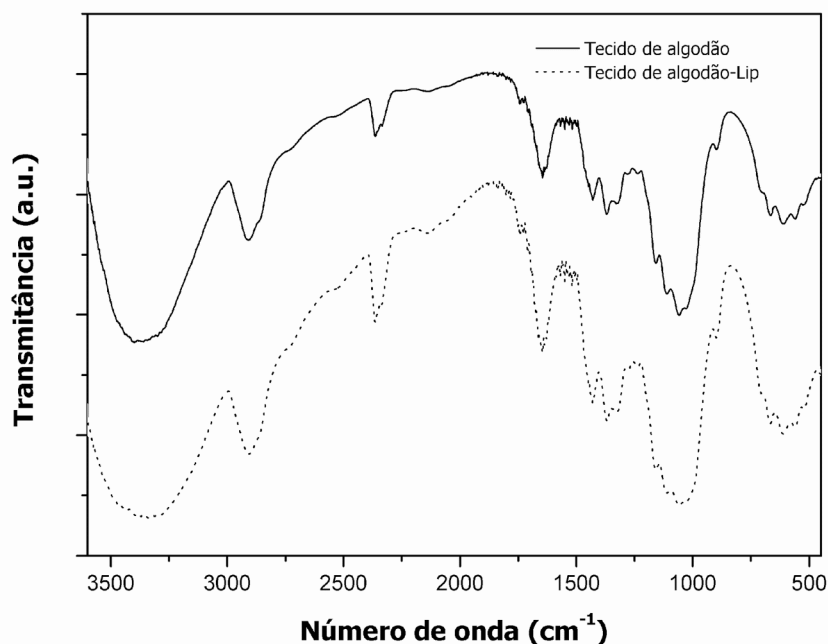
Para se ter uma ideia comparativa dos dois métodos, o processo convencional necessita de 144 h para a atividade máxima, em seguida a enzima é extraída do sólido fermentado com água (1 h), utilizando nesta etapa *shaker*, centrífuga e acessórios da centrífuga, 24 horas de imobilização, sendo necessário *shaker* e sistema de filtração, 24 horas de secagem (utilização de dessecador) que são reduzidos em 144 horas de fermentação, com utilização da estufa (BARON, et al., 2019).

Em relação a outros trabalhos onde se utilizou substratos têxteis para imobilizar lipases, Feng et al. (2013) imobilizaram lipases de *Pseudomonas fluorescens* em tecido de lã utilizando polietilenoimina (PEI) com reticulação de glutaraldeído mantendo 81% de sua atividade após dez reutilizações na hidrólise da tributirina. Tal como Feng et al. (2013), An et al. (2014) também imobilizaram lipases de *Pseudomonas fluorescens* em tecido de lã e obtiveram atividade semelhante (mais de 80%) quando a enzima imobilizada foi armazenada em tampão Tris 0,05 M (pH 8,5) por mais de 80 dias em geladeira, provando a sua alta estabilidade.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO DE ALGODÃO ANTES E APÓS A IMOBILIZAÇÃO POR FTIR e ATG

Na Figura 10 observa-se que não há diferenças nos espectros de FTIR do tecido de algodão antes e após (Tecido-Lip) a simultânea produção e imobilização enzimática, notando a existência de espectros característicos de celulose. Ambos os espectros apresentam bandas em aproximadamente $3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ (referentes à ligação O-H), $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (referente ao estiramento C-H), $900 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ (referente a deformação angular C-H que está diretamente ligada ao estiramento dos grupos C-O-C).

Figura 10 – Espectros de FTIR-ATR do tecido de algodão antes e após a simultânea produção e imobilização enzimática.



Fonte: Autoria própria (2022).

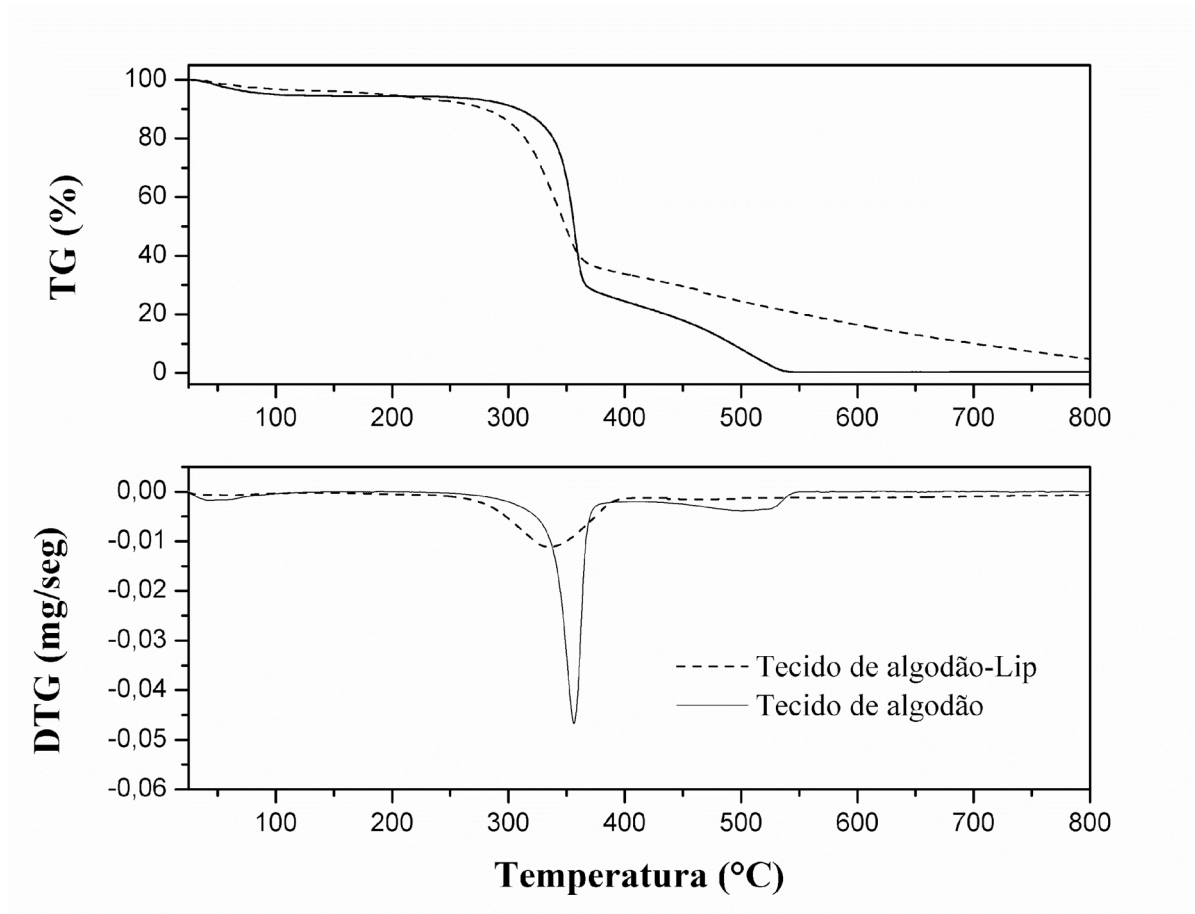
Observa-se ainda que o processo de fermentação não alterou a composição química do tecido de algodão e não foi possível confirmar a imobilização através da análise de FTIR.

A análise termogravimétrica (ATG) é utilizada para analisar a decomposição e a perda de massa de diversos materiais, com o aumento da temperatura. Para compostos orgânicos como tecidos de algodão e enzimas, esta técnica é utilizada para determinar decomposição e estabilidade térmica.

O comportamento térmico do tecido antes e após a imobilização foi comparado por análise de ATG e DTG sob atmosfera de nitrogênio (Figura 11). De acordo com os termogramas, inicialmente, há uma pequena perda de massa de 4% até 150°C, correspondendo à perda de H₂O ligados aos grupos hidrofílicos (OH) das cadeias de celulose. As amostras possuem uma temperatura de degradação máxima próximo de 400°C para Tecido-Lip e 550°C para o tecido. Observa-se uma pequena diminuição na estabilidade térmica do tecido após a imobilização. Essa

perda de estabilidade observada deve-se possivelmente à degradação da enzima adsorvida no tecido.

Figura 11 – Análise termogravimétrica ATG e DTG do tecido de algodão antes e após o processo de fermentação e imobilização da lipase de *Penicillium corylophilum*.

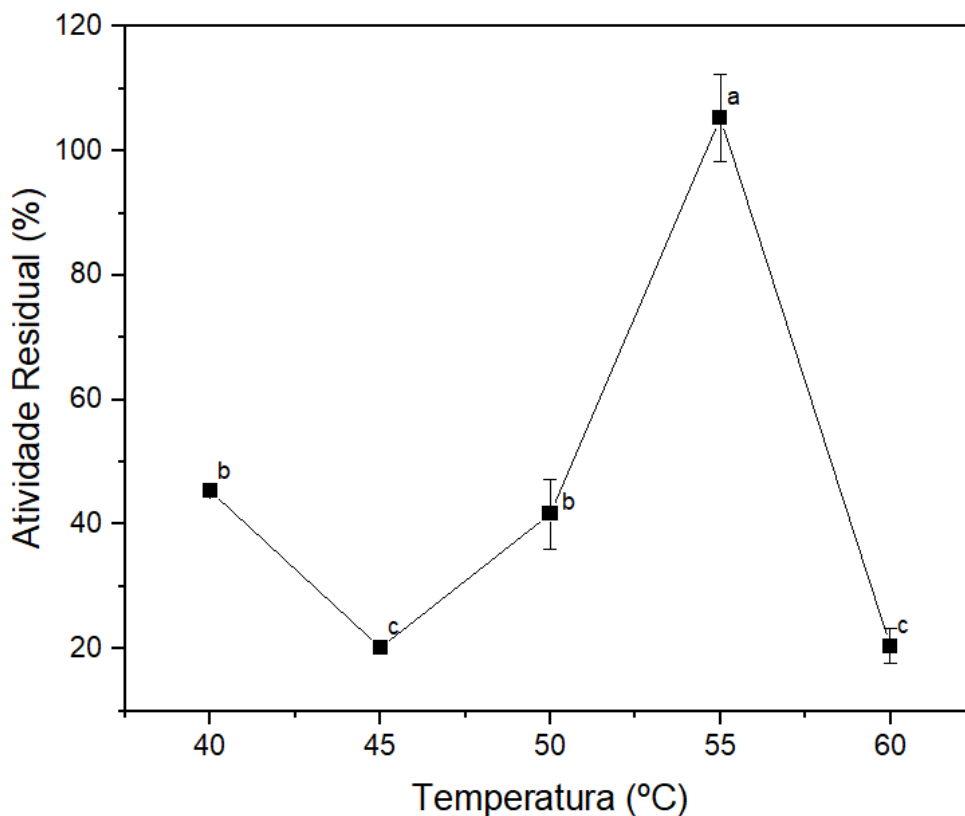


Fonte: Autoria própria (2023).

6.2.1 EFEITO E ESTABILIDADE À TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA

O efeito da temperatura na atividade da Lip-tecido foi investigado (Figura 12) e comparado com o efeito da temperatura da enzima livre, obtida por fermentação submersa (BARON, 2003). A temperatura ótima tanto para a lipase livre quanto para a Lip-tecido foi de 55°C. A lipase livre manteve atividade máxima a 60°C, enquanto a Lip-tecido reteve 20% apenas.

Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Penicillium corylophilum* imobilizada (Tecido-Lip). Condições de ensaio: Dosagem pelo método do pNPP aquoso, pH 8,0, cinética de reação de 5 min.



Fonte: Autoria própria (2022).

As letras acima dos pontos representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). Letras iguais não representam diferenças estatísticas.

A atividade relativa da Lip-tecido foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) a 55°C. As atividades relativas a 40°C e 50°C não apresentam diferenças significativas entre si, porém, são significativamente diferentes das temperaturas de 45°C e 60°C, as quais também não diferem entre si. Por último, as temperaturas de 50°C e 60°C também apresentaram diferença significativa entre si.

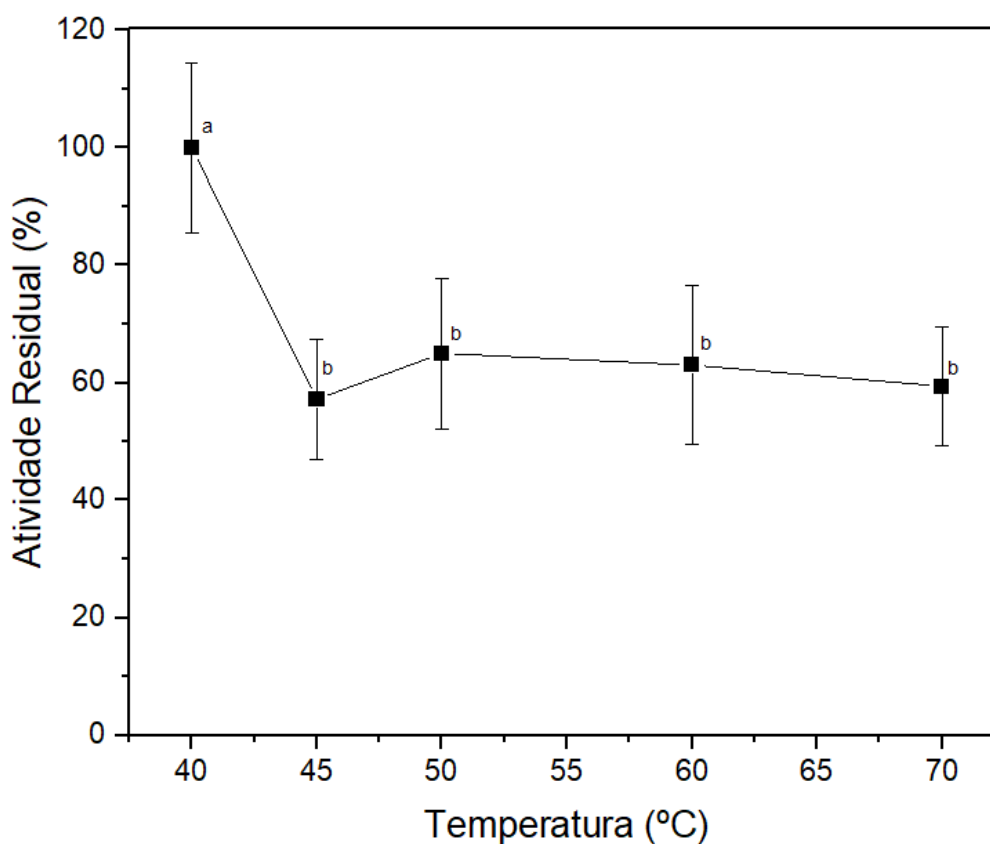
Enzimas podem sofrer desnaturação em ambientes físicos e químicos adversos. A temperatura elevada pode resultar na alteração da estrutura secundária e terciária de muitas proteínas causando desnaturação e conseqüentemente perda de sua atividade catalítica. Entretanto, a alta temperatura também pode induzir mudanças estruturais positivas, levando ao aumento da atividade catalítica da enzima, além de influenciar diretamente no aumento da velocidade de reações

químicas. Portanto, a tolerância térmica de enzimas é de suma importância na determinação de suas aplicações biocatalíticas (BILAL et al., 2016).

O estudo da estabilidade à temperatura da Lip-tecido (Figura 13) mostrou que o preparado foi estável a 40°C e apresentou atividade residual de aproximadamente 60%, para as temperaturas de 45 a 70°C.

Figura 13 – Estabilidade à temperatura da lipase de *Penicillium corylophilum* imobilizada (Lip-tecido).

A Lip-tecido foi incubada por 30 minutos a 40°C; 45°C; 50°C; 55°C; 60°C; 65°C e 70°C. Atividade residual medida pelo método de hidrólise do pNPP em meio aquoso, 40 °C.



Fonte: Autoria própria (2022).

As letras acima dos pontos representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). Letras iguais não representam diferenças estatísticas.

A atividade relativa da Lip-tecido foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) a 40°C e as atividades relativas de 45°C a 70°C não apresentaram diferenças significativas entre si. Além disso, a lipase de *P. corylophilum* imobilizada em tecido de algodão foi mais estável que a lipase livre produzida por fermentação submersa. A atividade residual para a lipase livre foi de $72 \pm 5\%$ e $12,5 \pm 1$ a 40°C e 50°C respectivamente e não apresentou atividade residual a 60°C (BARON, 2003). A

estabilidade à temperatura de lipases de *P. corylophilum* ligadas ao micélio foram avaliadas por Romero et al. (2014), sendo observado pelo autor que a enzima foi mais estável quando comparada à lipase extracelular (Tabela 4).

Tabela 4 – Temperatura ótima para a atividade e estabilidade à temperatura de algumas lipases de *Penicillium*.

Fungo	Temperatura ótima para a atividade (°C)	Estabilidade à temperatura (°C)	Ref.
<i>P. corylophilum</i>	lipase imobilizada: 55 °C	100% (40 °C, 30 min) 60% (45-70 °C, 30 min)	Este trabalho
<i>P. cyclopium</i>	lipase livre: 25 °C	25% (40 °C, 30 min)	HUANG et al. (2019)
<i>P. camembertii</i>	lipase livre: 40 °C	<50% (45 °C, 30 min)	LIU et al. (2018)
<i>P. notatum</i>	lipase livre: 40 °C lipase imobilizada em polímero de silicone, por aprisionamento: 60 °C	-	REHMAN et al. (2017)
<i>P. corylophilum</i>	-	Lipase ligada ao micélio: 75% (50 °C, 1 h) Lipase livre extracelular: 30% (50 °C, 1 h)	ROMERO et al. (2014)
<i>P. expansum</i>	lipase livre: 35 °C ligação cruzada: 40 °C	50% (40 °C, 13 min) 50% (50 °C, 258 min, 60 °C, 61 min, 70 °C, 9 min)	LAI et al. (2012)
<i>P. corylophilum</i>	lipase livre: 55 °C	72% (40 °C, 30 min) 12,5 (50 °C, 30 min)	BARON (2003)

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados obtidos de estabilidade à temperatura não devem ser comparados com aqueles obtidos para o efeito da temperatura (Figura 12) pois os resultados da estabilidade foram verificados após um tempo de incubação de 30 minutos, enquanto os resultados do efeito da temperatura foram determinados com apenas 1 minuto de reação. Ou seja, neste último, mesmo em temperaturas elevadas a enzima estava ativa.

A literatura relata que, de maneira geral, lipases fúngicas são pouco estáveis em temperaturas acima de 40°C (ISOBE; AKIBA; YAMAGUCHI 1988; RAZAK et al., 1997; SUGIHARA et al., 1995). Além disso, lipases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* apresentam diferentes temperaturas ótimas para a atividade, assim como

distintas estabilidade à temperatura. Quando imobilizadas, tendem apresentar um aumento para os dois parâmetros, como pode ser observado na Tabela 4.

6.2.2 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS

A biocatálise em solventes orgânicos ou ambientes aquo-restritos é uma área emergente da pesquisa a fim de adquirir vários produtos industriais. Desde o processamento e fatores econômicos, o alto ponto de ebulição e a baixa pressão de vapor da água resultam em purificação cara para processos biotransformados em meio aquoso. Além disso, reações colaterais indesejadas, como hidrólise, racemização, polimerização e decomposição ocorrem frequentemente na água, limitando muitas reações de interesse na síntese enzimática.

Lipases são geralmente mais instáveis em solventes polares miscíveis em água em relação aos imiscíveis em água (KLIBANOV, 1990; KUMAR et al., 2016). Portanto, estudos envolvendo a estabilidade em solventes orgânicos de enzimas em geral, mais especificamente lipases, são importantes para reações que precisam ser realizadas com ausência ou baixo teor de água.

Os resultados evidenciaram uma ativação da Lip-tecido em álcool isoamílico ($138 \pm 16\%$) (Tabela 5) e boa estabilidade para o *n*-butanol ($75 \pm 15\%$) e tolueno ($65 \pm 4\%$) (Tabela 5), solventes de polaridade média, quando comparado aos demais e pouco miscíveis em água.

A estabilidade em solventes da Lip-tecido foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) para o álcool isoamílico, em relação aos demais solventes. Não apresenta diferenças significativas na estabilidade da Lip-tecido quando em presença de *n*-butanol e tolueno; isopropanol, *n*-hexano e *n*-heptano; acetona e isopropanol; etanol e acetona.

Em relação à lipase de *P. corylophilum* livre, o trabalho de Romero et al. (2014) apresenta o estudo da atividade e estabilidade de preparações da lipase em condições basais e induzidas por azeite de oliva em suas formas extracelular ou ligadas ao micélio. Para as lipases extracelulares não induzidas em azeite de oliva apresentaram maiores atividades residuais para os solventes acetona ($135,9 \pm 5,0\%$) e etanol ($123,4 \pm 3,7\%$) e a incubação foi por 1 h. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que a adição de solventes miscíveis a uma solução, como

acetona e etanol, pode causar agregação das enzimas livres, que por sua vez, apresentam alta estabilidade na presença de solventes orgânicos. Por outro lado, a presença de etanol pode contribuir para o rearranjo da estrutura secundária melhorando também a atividade residual.

Tabela 5 – Estabilidade da lipase de *Penicillium corylophilum* imobilizada (Lip-tecido) em diferentes solventes orgânicos.

Solvente	log P	Atividade Residual (%)
Metanol	-0,74	0
Etanol	-0,24	10,9 ± 1,2 ^e
Acetona	-0,23	35 ± 3 ^{d,e}
Isopropanol	0,29	46 ± 7 ^{c,d}
<i>n</i> -Butanol	0,80	75 ± 15 ^b
Álcool isoamílico	1,42	138 ± 16 ^a
Tolueno	2,50	65 ± 4 ^{b,c}
<i>n</i> -Hexano	3,50	41 ± 8 ^{c,d}
<i>n</i> -Heptano	4,00	40 ± 10 ^{c,d}

Fonte: Autoria própria (2023).

As letras acima na coluna representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). Letras iguais não representam diferenças estatísticas.

Em contrapartida, solventes com alto log P e alta capacidade de solvatação, como os alcoóis superiores, por exemplo, *n*-butanol ou álcool isoamílico, são desnaturantes fortes, causadores de inativação. No entanto, a lipase extracelular não induzida apresentou valor de atividade residual de 52,0 ± 1,2% (*n*-butanol). Comparativamente tem-se uma maior tolerância para o solvente *n*-butanol neste trabalho (75 ± 15%). Uma lipase com alta tolerância ao *n*-butanol é interessante porque esta matéria-prima pode ser produzida a partir de uma fonte renovável e pode ser usada para a síntese de biocombustíveis via biocatálise de lipase.

6.3 APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM TECIDO DE ALGODÃO NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Reações preliminares utilizando a Lip-tecido como catalisador na síntese do oleato de etila, tendo como co-solvente o *n*-heptano, foram realizadas. Vale ressaltar que estes experimentos antecederam os estudos da estabilidade da Lip-tecido em solventes orgânicos. Para tal, foram testados os parâmetros temperatura, concentração da enzima e razão molar ácido:álcool na reação de síntese do éster utilizando um delineamento fatorial 2³.

A Tabela 4 apresenta os resultados experimentais do delineamento fatorial aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, bem como, as variáveis e níveis estudados.

Com base nos resultados obtidos para o ponto central (Tabela 6, experimento 5 realizado em triplicata), foi possível calcular o desvio padrão para a conversão do éster oleato de etila, que foi de $\pm 4,5$ em 24 h, que também são válidos para as demais respostas do delineamento. Um efeito será tanto ou mais significativo, quanto maior for a diferença entre o desvio-padrão obtido e o valor encontrado para o efeito. O melhor resultado (56%) foi encontrado a 44°C, 50 U e razão molar de 1:1.

Tabela 6 – Resultados experimentais do delineamento fatorial 2³ aplicado no estudo da síntese do oleato de etila, utilizando lipases de *Penicillium corylophilum* imobilizadas em tecido de algodão. A quantidade de suporte foi expressa em unidades totais dosadas através da hidrólise do pNPP.

Experimento	Temperatura (°C)	Unidades Totais (U)	RM ^a Ácido:álcool	Rendimento após 24 h (%)
1	30	100	1:3	32
2	30	50	1:3	25
3	44	100	1:1	42
4	44	50	1:1	56
5 ^b	37	75	1:2	36 \pm 4,5
6	44	100	1:3	30
7	30	50	1:1	21
8	44	50	1:3	35
9	30	100	1:1	20

^aRM = razão molar. A concentração do ácido oleico em cada experimento foi de 65 mmol L⁻¹

^bExperimento 5 realizado em triplicata. O desvio padrão relativo para este experimento foi de $\pm 4,5$ (24 h).

Fonte: Autoria própria (2023).

A Tabela 7 apresenta os coeficientes de contrastes (C_i), calculados a partir dos resultados experimentais da Tabela 3 e da Equação 2. Os resultados do delineamento foram interpretados em função da conversão em éster (24 h).

Os coeficientes de contraste (Tabela 7) mostram que a variável mais importante, dentro da faixa estudada e considerando o desvio padrão, foi a temperatura ($C_i = +16$). As unidades enzimáticas totais e a razão molar álcool:ácido (MR) não foram significativas, pois apresentaram C_i menor que o desvio padrão no ponto central. Quando a temperatura é alterada do nível menos (30°C) para o nível mais (44°C), a conversão em éster apresenta um aumento de 16 pontos percentuais.

Analisando-se os efeitos secundários, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas ou três variáveis, verificam-se valores mais significativos para a interação Temperatura x RM Ácido:Álcool (-12 pontos) e Temperatura x Unidades Totais x RM Ácido:Álcool (+11 pontos). Ou seja, quando simultaneamente temperatura e razão molar são alterados do nível menos para o nível mais a conversão em éster diminui em 16 pontos percentuais. Além disso, quando simultaneamente Temperatura, Unidades Totais e razão molar são alterados do nível menos para o nível mais a conversão em éster aumenta em 11 pontos percentuais.

Tabela 7 – Valores calculados dos Coeficientes de contraste principais e secundárias para o delineamento fatorial 2^3 , com repetição no ponto central em relação aos rendimentos da síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de *Penicillium corylophilum* imobilizadas em tecido de algodão.

Variáveis	Coefficiente de contraste (C_i)
Temperatura (°C)	+16
Unidades Totais (U)	-3
RM Ácido:álcool	-4
Temperatura (°C) x Unidades Totais (U)	-6
Temperatura (°C) x RM Ácido:álcool	-12
Unidades Totais (U) x RM Ácido:álcool	+4
Temperatura (°C) x Unidades Totais (U) x RM Ácido:álcool	+11

Fonte: Autoria própria (2023).

Este estudo mostrou que maiores rendimentos de éster ocorreram com temperaturas mais altas e razões molares mais baixas.

Em relação à síntese do oleato de etila catalisada por lipases imobilizadas, existem inúmeros trabalhos que relatam a produção de oleato de etila por diferentes lipases imobilizadas nos mais diversos materiais de suporte. Afim de sintetizar, a Tabela 8 apresenta em ordem cronológica trabalhos que produziram oleato de etila utilizando diferentes lipases e suportes.

Panchal et al. (2022) utilizaram uma lipase que denominaram de lipase reutilizável (L) obtida de Macklin Biochemical, Xangai, China com atividade de 20.000 U/g imobilizada por encapsulação em um polímero iônico mesoporoso, sintetizado pela reação de Friedel-Crafts de 1,4-bis(bromometil)benzeno na presença de cloreto férrico como catalisador, em tempos variados (6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h e 36 h) para posterior aplicação na produção do éster com conversão máxima de 88,21% em condições otimizadas.

Castro et al. (2021) imobilizaram lipases provenientes de *Botryosphaeria ribis* EC-01 por adsorção em um filme eco-amigável e de baixo custo composto por fécula de mandioca, álcool polivinílico e mistura de sericina obtendo 95% de oleato de etila em 30 h à 49 °C. Para além da boa conversão em éster, vale ressaltar a utilização de um suporte ecológico e de baixo custo que contribui com o meio ambiente e agrega valor a um produto que inicialmente não tinha.

Nessa mesma linha de suportes eco-amigáveis, Cea et al. (2019) imobilizaram por adsorção lipases de *Candida rugosa* em biochar (material derivado da decomposição térmica de biomassa orgânica) obtendo uma conversão em éster de 95% em 24 h à 30 °C.

Já Martínez-Ruiz et al. (2018) produziram lipases de *Rhizopus microsporus* por fermentação em estado sólido e imobilizaram em perlita (tipo de rocha vulcânica não tóxica, mais especificamente um mineral do grupo da sílica) com granulometria de 0,8 - 1,19 nm para sintetizar oleato de etila. Nesse trabalho foi obtido 90% do éster em 14 h à 45°C.

Outro trabalho que sintetizou oleato de etila foi de Madalozzo et al. (2014) que utilizaram lipases de *Rhizopus oryzae* imobilizadas por adsorção no suporte hidrofóbico polipropileno Accurel MP 1000 para investigar o potencial da preparação imobilizada para a síntese de oleato de etila e obtiveram 79% de conversão em éster após 30 min a 30°C.

Tabela 8 – Lipases imobilizadas em diferentes suportes para produção do éster oleato de etila.

Lipase	Suporte	Ácido oleico:álcool (RM)	Solvente	Tempo / Temperatura	Conversão	Ref.
Lipase reutilizável (L)	Polímero iônico mesoporoso (PIP)	1:12	Etanol	5 h / 45 °C	88,21%	Panchal et al., 2022.
<i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	Filmes	1:3	Etanol	30 h / 49°C	95%	Castro et al., 2021.
<i>Candida rugosa</i>	Biochar	1:4	Hexano	24 h / 30 °C	95%	Cea et al., 2019.
<i>Rhizopus microsporus</i>	Perlita	1:2	Hexano	14 h / 45°C	90%	Martínez-Ruiz et al., 2018.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Accurel MP 1000	1:1,4	Etanol	30 min / 30 °C	79%	Madalozzo et al., 2014.

Fonte: Autoria própria (2023).

Não encontrou-se na literatura, a aplicação de lipases imobilizadas em tecidos como catalisador na síntese do oleato de etila abrindo caminho para uma potencial vertente de catalisadores a serem estudados. Além disso, como a Lip-tecido apresentou alta estabilidade em alguns alcoóis, outros ésteres podem ser sintetizados, como oleato de *n*-butila e o oleato de isoamila, com a possibilidade da reação ser livre de co-solvente.

7 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados neste trabalho, pode-se concluir que:

- Foi possível produzir e imobilizar simultaneamente lipases de *P. corylophilum* por fermentação em estado sólido (FES) com atividade de $41,1 \pm 2,5 \text{ U g}^{-1}$ e atividade específica de $51 \pm 2 \text{ U mg}^{-1}$.
- Não houve diferenças entre os espectros de FTIR-ATR para o tecido de algodão antes e após a fermentação em estado sólido (FES), indicando que o processo de fermentação não altera quimicamente as fibras do tecido e a análise termogravimétrica (ATG) indicou uma pequena diminuição na estabilidade térmica do tecido após a imobilização.
- A temperatura ótima tanto para a lipase livre quanto para a Lip-tecido foi de 55°C .
- A lip-tecido foi mais estável que a lipase livre produzida por fermentação submersa.
- A lip-tecido apresentou ativação quando em presença de álcool isoamílico e alta estabilidade em *n*-butanol e tolueno.
- Foi possível aplicar a Lip-tecido na síntese do oleato de etila com rendimento máximo de 56% (44°C , 50 U, razão molar de 1:1 e 24 h).

Desta forma, foi possível contribuir para a valorização de resíduos têxteis através da imobilização de lipases de *Penicillium corylophilum* em tecido de algodão bem como para a sua aplicação na síntese do éster oleato de etila.

REFERÊNCIAS

- ALI, U. et al. Bioprocessing and screening of indigenous wastes for hyper production of fungal lipase. **Catalysts**. v. 13, n. 853, p. 1 – 29, 2023. DOI: 10.3390/catal13050853.
- ALTINKAYNAK, C. et al. A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 93, p. 105-112, 2016.
- AN, J. D. et al. Immobilization of lipase on woollen fabrics: enhanced effectiveness in stain removal. **Biotechnology Progress**. v. 30, n. 4, p. 806-817, 2014.
- BACHA, A. B. et al. Biochemical study if *Bacillus stearotherophilus* immobilized lipase for oily wastewater treatment. **Processes**. v. 10, p. 1-12, 2022. DOI: 10.3390/10112220.
- BAEK, Y. et al. Enzymatic synthesis of formate ester through immobilized lipase and its reuse. **Polymers**. v. 12, n. 1802, p. 1-10, 2020. DOI: 10.3390/polym12081802.
- BARON, A. M. **Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais**. 2003. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BARON, A. M. et al. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium corylophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 34, p. 25 - 32, 2005.
- BARON, A. M. et al. **Método para imobilizar lipases em suportes oriundos da indústria têxtil durante a fermentação no estado sólido**. Depositante: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. BR n. 102019000255-7. Depósito: 07/01/2019.
- BARROS, K. S. et al. Bati butter as potential substrate for lipase production by *Aspergillus terreus* NRRL-255. **Foods**. v. 12, n. 564, 2023.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities - A review. **Food Research International**. v. 123, p. 226 - 240, 2019.
- BORELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 20774-20840, 2015.
- BRAVO, I. et al. Reagent-less and robust biosensor for direct determination of lactate in food samples. **Sensors**. v. 17, n. 1, p. 1-11, 2017.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *In: GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells*. Nova Iorque: Springer, 2013, cap. 2, p. 15-31.

CARVALHO, A. S. S. et al. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation using amazon fruit by-products and soybean meal as substrate. *Catalysts*. v. 13, n. 289, p. 1-15, 2023. DOI: 10.3390/catal13020289

CASTRO, M. C. et al. Lipase immobilization on biodegradable film with sericin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. v. 69, p. 660-667, 2021.

CEA, M. et al. Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. *Journal of Environmental Management*. v. 242, p. 171-177, 2019.

CORADI, M. et al. Production of antimicrobial textiles by cotton fabric functionalization and pectinolytic enzyme immobilization. *Materials Chemistry and Physics*. v. 208, p. 28 - 34, 2018.

DANIEL, M. H. Guia Prático dos tecidos. Osasco, São Paulo: **Novo Século Editora**, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

DAMASCENO, F. R. C. et al. Treatment of wastewater with high fat content employing an enzyme pool and biosurfactant: technical and economic feasibility. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 35, n. 2, p. 531-542, 2018.

DEGÓRSKA, O. et al. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization. *Pharmaceutics*. v. 14, n. 1443, p. 1-18, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14071443.

DOS SANTOS, C. T. C. et al. Resíduos agroindustriais como alternativa para produção de lipases por fermentação em estado sólido. *In: Viana, W. C. Territorialidades da Agricultura Brasileira*. 1 ed. São Paulo: Científica Digital, 2022, 131 - 145.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>. Acesso em: 04 jan. 2022.

FARINAS, et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. *In: NAIME, et al. Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura*. Brasília: Embrapa, 2014, cap. 7, p. 211-241.

FENG, X. et al. Enabling the utilization of wool as an enzyme support: Enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 102, p. 526-533, 2013.

FEDERSEL, H.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. T. C. Recent trends in enzyme immobilization - concepts for expanding the biocatalysis toolbox. **Molecules**. v. 26, n. 2822, p. 1 - 14, 2021.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**. p. 1-25, 2019. DOI:10.1007/s00253-019-10027-6.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**. v. 25, p.69 - 77, 2005.

GRECO-DUARTE, et al. Simultaneous lipase production and immobilization: morphology and physiology study of *Penicillium simplicissimum* in submerged and solid-state fermentation with polypropylene as an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 164, p. 1-13, 2023.

GUAN, T. et al. The enhanced fatty acids flavor release for low-fat cheeses by carrier immobilized lipases on O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**. v. 116, p. 1-9, 2021.

HASSAN, M. E. et al. Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. **Biotech**. v. 9, n. 12, p. 1-16, 2019.

HAZARIKA, S. et al. Ethyl oleate synthesis by *Porcine pancreatic* lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**. v. 85, p. 61-68, 2002.

HERMANSYAH, H.; ANDIKOPUTRO, M. I.; ALATAS, A. Production of lipase enzyme from *Rhizopus oryzae* by solid fermentation and submerged fermentation using wheat bran as substrate. **AIP Conference Proceedings**. v. 2085, n. 1 – 7, 2019.

HUANG, L. et al. Improvement of the alkali stability of *Penicillium cyclopium* lipase by error-prone PCR. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 39, p. 91-97, 2019. DOI: 10.1016/j.ejbt.2019.04.002.

IEMI - **Instituto de Estudos e Marketing Industrial**. Relatório setorial da indústria têxtil brasileira. São Paulo: IEMI, v.14, n.11, 2014.

ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 187, p. 127-142, 2021.

ISMAIL, S.; AZHA, S. F. Cotton cloth: diversified applications beyond fashion and wearable cloth. **Current Trends in Fashion Technology & Textile Engineering**. v. 2, n. 3, p. 1 - 7, 2018.

ISOBE, K.; AKIBA, T.; YAMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium corylophilum*. **Agriculture and Biological Chemistry**. v. 52, p. 41-47, 1988.

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

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase - a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 28, n. 4, p. 253-264, 2008.

JESIONOWSKI, T; ZDARTA, J; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Springer**. v. 20, p. 801-821, 2014.

KAREEM, S. O. et al. Improved biodiesel from palm oil using lipase immobilized calcium alginate and *Irvingia gabonensis* matrices. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 9, n. 59, p. 1-8, 2020.

KAMATH, N.; MELO, J. S.; D'SOUZA, S.F. Urease immobilized on polyethyleneimine cotton cloth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 19, n. 3, p. 251-258, 1998.

KUMAR, A. et al. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**. v. 18, n. 2, p. 1-11, 2016. DOI: 10.1186/s12575-016-0033-2.

LAI, J. et al. Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 2058-2063, 2012.

LEISTNER, L. Mould-fermented foods: recent developments. **Food Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 433-441, 1990.

LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.6, p. 1393-1417, 2009. DOI: 10.3390/ijerph6041393.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 66, n. 1, p. 43-54, 2010.

LI, W. et al. Synthesis of ethyl oleate by esterification in a solvent-free system using lipase immobilized on PDMS-modified nonwoven viscose fabrics. **Process Biochemistry**. v. 50, p. 1859 - 1869, 2015.

LIMA, A. C. M. et al. Use of agro-industrial residues for lipase production by *Candida viswanathii* in solid-state cultivation system. **Scientia Plena**. v. 17, p. 1-8, 2021. DOI: 10.14808/sci.plena.2021.081513

LIMA, L. G. R. et al. Lipase production by *Aspergillus niger* C by submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 62, p. 1-14, 2019.

LIMA, R.C.; SILVA, H. N. L.; PINOTTI, L. M. Produção de lipases por *Penicillium sp.* **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. v. 1, n. 1, p. 1-7, 2014.

LIU, D.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**. v. 92, p. 464-475, 2020.

LUZ, B. D. S. et al. Lipase production by microorganisms isolated from the Serra de Ouro Branco State Park. **An Acad. Bras. Science**. v. 93, n. 1, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1590/0001-3765202120190672.

LYU, X., et al. Immobilization of enzymes by polymeric materials. **Catalysts**. v. 11, n. 1211, p. 1 - 15, 2021.

LV, Y.; SUN, S. LIU, J. Biodiesel production catalyzed by a methanol-tolerant lipase A from *Candida antarctica* in the presence of excess water. **ACS Omega**. v. 4, n. 22, p. 20064-20071, 2019.

MADALOZZO, A. D. et al. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 13-19, 2014.

MAGHRABY, Y. et al. Enzyme immobilization technologies and industrial applications. **ACS Omega**. v. 8, p. 5184-5196, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07560.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. et al. Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource Technology**. v. 256, p. 52-58, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.080.

MEI, S. et al. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. **Journal of Biotechnology**. v. 266, p. 1-8, 2018.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 29, n. 2, p. 1-16, 2015.

MOKHTAR, N. F. et al. The immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrofobic interaction method. **Catalysts**. v. 10, n. 7, p. 1-17, 2020.

MORSHED, N. M. et al. An overview on biocatalysts immobilization on textiles: Preparation, progress and application in wastewater treatment. **Chemosphere**. v. 279, p. 1 - 23, 2021.

MOUAD, A. N. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 126, p. 64 - 68, 2016.

NEMA, A. et al. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**. v. 43, n. 82, p. 1 - 8, 2019.

NIMKANDE, V. D.; BAFANA, A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**. v. 46, p.1-13, 2022.

OLIVEIRA, B. H. et al. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium sp.* (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. **Industrial Crops & Products**. v. 147, p. 1-10, 2020. DOI> 10.1016/j.indcrop.2020.112235.

OLIVEIRA, F. et al. Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 40, n. 7, p. 1123-1132, 2017. DOI: 10.1007/s00449-017-1774-2.

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**. v. 95, p. 109-114, 2012.

ORTELLADO, L. E. et al. Exploring novel *Penicillium* lipolytic activity from the Paranaense rainforest. **Environmental Technology**. 2020. DOI: 10.1080/09593330.2020.1759697.

PANCHAL, B. et al. Functionalized mesoporous polymer ionic liquids for efficient immobilization of lipase: Effects of ethyl oleate. **Journal of Catalysis**. v. 416, p. 186-197, 2022.

PAPADAKI, E. et al. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**. v. 309, 123317, 2020. DOI 10.1016/j.biortech.2020.123317.

PATTI, A; SANFILIPPO, C. Stereoselective promiscuous reactions catalyzed by lipases. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. DOI: 10.3390/ijms23052675.

PEREIRA, A. S. et al. Lipases as effective green biocatalysts for phytosterol esters' production: A review. **Catalysts**. v. 12, n.88, p. 1-28, 2022. DOI: 10.3390/catal12010088.

RADZI, S. M. et al. Optimisation study of large-scale enzymatic synthesis of oleyl oleate, a liquid wax ester, by response surface methodology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 81, n. 3, p. 374-380, 2006.

RANI, S.; JAGTAP, S. Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics. **Journal of Food Science and Technology**. v. 56, n. 1, p. 497-506, 2019.

RAZAK, C. N. A. et al. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 3, p. 153-159, 1997.

REHMAN, S. et al. Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale polymeric films. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 97, p. 279-286, 2017.

RIGO, D. Produção microbiológica de enzimas: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

ROMERO, C. M. et al. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering Technology**. v. 37, n. 11, p. 1987-1992, 2014.

SALAZAR, L. N. et al. Production, partial characterization and application of cellulases by newly isolated *Penicillium sp.* using agro-industrial substrate solid-state fermentation. **Industrial Biotechnology**. v. 15, n. 2, 2019.

SALUM, T. F. C. et al. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolate *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 26, n. 3, p. 197 - 203, 2008.

SANKAR, K. et al. Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device. **Talanta**. v. 208, p. 1-9, 2020.

SANTANA, J. C. F.; WANDERLEY, M. J. R.; BELTRÃO, N. E. D. Tecnologia da fibra e do fio de algodão, análises e interpretações dos resultados. *In*: EMPRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste (Dourados, MS). **Algodão: informações técnicas**. Dourados: Embrapa-CPAO/EmbrapaCNPA, 1998. 267p. Embrapa-CPAO. Circular Técnica, 7.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**. v. 4, n. 2, p. 181-188, 2018.

SCHMATZ, L. O. et al. Uso de resíduos agroindustriais para a produção de compostos fenólicos por fermentação em estado sólido. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 11, n. 2, p. 1024-1028, 2021.

SHEMER, L. et al. Multilayer immobilized-enzyme filter reactors: urease bound to nylon fabric filter. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 21, p. 1607-1627, 1979. DOI: 10.1002/bit.260210908.

SÉVERAC, E. et al. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. **Biosource Technology**. v. 102, p. 4954 - 4961, 2011.

SHU, C. et al. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 72, p. 139-144, 2011.

SILVA, et al. Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa. **Caderno de Ciência Agrária**. v. 9, n. 3, p. 49-53, 2017.

SINDITÊXTEL - Sindicato das Indústrias de Fiação e Tecelagem do Estado de São Paulo. **Retalho Fashion - Projeto de reciclagem une ambiente e inclusão social**. v. 7, n. 25, 2012. Disponível em: http://www.sinditextilsp.org.br/jornal/sindi_25.pdf.

SOUZA, et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2016, cap. 15, p. 524-568, 2016.

SOUZA, M. C. M. et al. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 34, n. 3, p. 681-690, 2017.

SUGIHARA, S. T. et al. Purification and characterization of lipase from *Pichia burtoni*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.43, p. 277-281, 1995.

SUYANTO, E.; SOETARTO, E. S.; CAHYANTO, M. N. Production and optimization of lipase by *Aspergillus niger* using coconut pulp waste in solid state fermentation. **Journal of Physics: Conference Series**. v. 1374, p. 1 - 7, 2019.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of lipases - A review part I: Enzyme immobilization. **ChemBioEng Reviews**. v. 6, n. 5, p. 157-166, 2019. DOI: 10.1002/cben.201900016.

TREICHEL, H. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.

TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. *In*: BRAUN, H. I. (Ed). **The collected Works of John W. Tukey, Volume VIII, Multiple comparisons: 1948-1953**. New York: Champman & Hall, p. 1-300, 1953.

VALÉRIO, R. B. R. et al. Understanding the biocatalytic potential of lipase from *Rhizopus chinensis*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. v. 12, n. 3, p. 4230-4260, 2022.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalisadores da hidrólise de triacilgliceróis. **Revista Eletrônica de Biologia. Produção, caracterização e aplicação de lipase de Aspergillus niger ATCC 1004 produzida a partir do óleo de soja**. v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

VERMA, M. L.; AZMI, W.; KANWAR, S. S. Enzymatic synthesis of isopropyl acetate by immobilized *Bacillus cereus* lipase in organic medium. **Enzyme Research**. p. 1 - 7, 2011. DOI: 10.4061/2011/919386.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.** v. 138, n. 9, p. 663-670, 1979.

WOLSKI, E. A. The versatility of *Penicillium* species to degrade organic pollutants and its use for wastewater treatment. **Studies in Fungi**. v. 8, n. 2, p. 1-10, 2023. DOI: 10.48130/SIF-2023-0002

YAGI, Y.; KIMURA, T.; KAMEZAWA, M. Biomolecular chemical simulations on enantioselectivity and reactivity of lipase enzymes to azulene derivatives. **Natural Product Communications**. v. 17, n. 6, p. 1-10, 2022. DOI: 10.1177/1934578X221108572.

YAMAZAKI, H. et al. Immobilization of invertase on polyethylenimine-coated cotton cloth. **Biotechnology Letters**. v. 1, n. 3, p. 165-170, 1984. DOI: 10.1007/bf00127033.

YAO, W. et al. A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, p. 1-16, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.743377.

ZHANG, D.; YUWEN, L.; PENG, L. Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. **Journal of Chemistry**. p. 1-7, 2013.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. **Molecules**. v. 19, n. 9, p. 12139-14194, 2014.