

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

CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR OBTIDO A
PARTIR DE RESÍDUOS ÁCIDOS DE DECAPAGEM E APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DE ÓLEOS DE FRITURA**

APUCARANA

2024

CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR OBTIDO A
PARTIR DE RESÍDUOS ÁCIDOS DE DECAPAGEM E APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DE ÓLEOS DE FRITURA**

**IMMOBILIZATION OF LIPASE IN LAMELAR DOUBLE HYDROXIDE OBTAINED
FROM ACID PICKLING WASTE AND APPLICATION IN THE HYDROLYSIS OF
FRYING OILS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental 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

Coorientador: Prof. Dr. Alesandro Bail

APUCARANA

2024

1



[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



CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS
ÁCIDOS DE DECAPAGEM E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEOS DE FRITURA**

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 Abril de 2024

Alessandra Machado Baron, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Katia Valeria Marques Cardoso Prates, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Patricia Salomao Garcia, - 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 02/04/2024.

Dedico esta dissertação a minha família, que me apoiou e incentivou ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois nada acontece se não for da Vossa vontade e permissão e a Nossa Senhora Aparecida pela intercessão e proteção.

Aos meus pais José e Viviane, meu irmão Caio, minha avó Maristela e meu tio Marcos, por todo suporte, esforço, presença e carinho incondicional.

À minha estrelinha Fábio (*in memoriam*), que sempre me incentivou e hoje intercede por mim do céu.

À orientadora Alessandra, por mais uma pesquisa juntas, pela paciência, ensinamentos, confiança e incentivo no desenvolvimento desse projeto.

Ao coorientador Alesandro Bail, pelo material cedido e por todo auxílio e disponibilidade durante a pesquisa.

À professora Valéria, por gentilmente contribuir com os materiais necessários para que as análises ocorressem.

As professoras que aceitaram compor a banca, Kátia, Patricia e Valéria.

Aos companheiros de laboratório, especialmente Michael e Isabela, pela disposição e colaboração nos experimentos.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA), pela oportunidade.

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Campus Apucarana (Lamap), pela utilização dos equipamentos e aos técnicos pela ajuda quando necessário.

Ao Laboratório Multiusuário do Campus Londrina (LabMult-LD) e técnicos, pelas análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos Nathele, Nathalia e Gabriel, pela parceria.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa realização.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos”.

(Marie Curie)

SANTOS, Camila Taynara Cardoso dos. **Imobilização de lipase em hidróxido duplo lamelar obtido a partir de resíduos ácidos de decapagem e aplicação na hidrólise de óleos de fritura**. 2024. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2024.

RESUMO

O aproveitamento de resíduos industriais ácidos de decapagem (RAD) para a produção de hidróxidos duplos lamelares (HDL) é uma alternativa relevante para a redução dos custos referentes às matérias-primas e torna o processo de produção do HDL mais sustentável. Hidróxidos duplos lamelares (HDL) pertencem a uma categoria de argilas sintéticas que são semelhantes aos argilominerais catiônicos e têm propriedades trocadoras de ânions. São adequados para imobilização de enzimas, pois são relativamente acessíveis economicamente, possuem várias composições, baixa toxicidade e alta área de superfície. Tendo em vista a preocupação com os descartes de resíduos industriais e analisando a potencialidade de catálise de lipases imobilizadas em HDLs, o presente trabalho propõe a imobilização, caracterização e aplicação de lipases de *Burkholderia lata* em um hidróxido duplo lamelar (HDL), formado por zinco, ferro e alumínio contendo cloreto, obtido a partir de resíduos ácidos de decapagem (RAD) que surge ao remover camadas de óxido de ferro da superfície do aço bruto. Para o processo de imobilização da enzima (HDL-Lip), por adsorção física, observou-se eficiência de 71% (24 h) e retenção da atividade após a imobilização de 193%. Em relação à caracterização, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que após a imobilização, o HDL manteve a estrutura lamelar com morfologia menos agrupada, em relação ao HDL sem enzima, e presença de cristalitos agudos. Para a análise termogravimétrica (ATG), foi notado maior estabilidade para o HDL-Lip em relação à lipase livre. Observou-se que para a análise do HDL-Lip por Difração de raios X (DR-X) houve perda de cristalinidade do material, mantendo os picos de difração referenciais praticamente nas mesmas posições. Os espectros de FTIR foram muito semelhantes para o HDL antes e após a imobilização. O HDL-Lip apresentou alta estabilidade em pHs ácidos (pH de 4,0 a 5,0), sendo a atividade residual próxima a 90% e foi estável à 40°C. Quanto à estabilidade ao armazenamento em 4°C, a enzima imobilizada não perdeu atividade durante 30 dias, com redução de aproximadamente 15% após 60 dias. A lipase livre e o HDL-Lip foram aplicados em reações de hidrólise de óleos vegetais usados (óleo de fritura), para a produção de ácidos graxos livres. As maiores quantidades de ácidos graxos livres, 959 e 133 μmol , foram obtidas a 55 °C e 100 U, para a lipase livre e depois de imobilizada respectivamente. Conclui-se que a imobilização da lipase em HDL, obtido a partir de RAD, pode ser uma alternativa para a aplicação de materiais avançados (HDL) à na produção do biocatalisador heterogêneo, contribuindo assim com a sustentabilidade de processos químicos.

Palavras-chave: Biocatalisador heterogêneo; HDL; Resíduos industriais; Valorização de resíduos.

SANTOS, Camila Taynara Cardoso dos. **Imobilização de lipase em hidróxido duplo lamelar obtido a partir de resíduos ácidos de decapagem e aplicação na hidrólise de óleos de fritura**. 2024. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2024.

ABSTRACT

The use of industrial waste pickling acid (WPA) for the production of layered double hydroxides (LDH) is a relevant alternative for reducing raw material costs and making the LDH production process more sustainable. Layered double hydroxides (LDH) belong to a category of synthetic clays that are similar to cationic clay minerals and have anion exchange properties. They are suitable for enzyme immobilization because they are relatively affordable, have various compositions, low toxicity and high surface area. Considering the concern with the disposal of industrial waste and analyzing the catalysis potential of lipases immobilized in LDHs, this work proposes the immobilization, characterization and application of lipases from *Burkholderia lata* in a layered double hydroxide (LDH) formed by zinc, iron and aluminum containing chloride, obtained from waste pickling acid (WPA) that arises when removing iron oxide layers from the surface of raw steel. For the enzyme immobilization process (LDH-Lip), by physical adsorption, an efficiency of 71% (24 h) and retention of activity after immobilization of 193% were observed. Regarding the characterization, scanning electron microscopy (SEM) showed that after immobilization, the LDH maintained the lamellar structure with less grouped morphology, in relation to LDH without enzyme, and presence of sharp crystallites. For the thermogravimetric analysis (TGA), greater stability was noted for LDH-Lip in relation to free lipase. It was observed that for the analysis of LDH-Lip by X-ray diffraction (X-RD) there was a loss of crystallinity of the material, maintaining the reference diffraction peaks practically in the same positions. The FTIR spectra were very similar for LDH before and after immobilization. LDH-Lip showed high stability at acidic pHs (pH 4.0 to 5.0), with residual activity close to 90%, and was stable at 40°C. Regarding storage stability at 4°C, the immobilized enzyme did not lose activity for 30 days, with a reduction of approximately 15% after 60 days. Free lipase and LDH-Lip were applied in hydrolysis reactions of used vegetable oils (frying oil) for the production of free fatty acids. The highest amounts of free fatty acids, 959 and 133 μmol , were obtained at 55°C and 100 U, for free lipase and after immobilization, respectively. It is concluded that the immobilization of lipase in LDH, obtained from WPA, can be an alternative for the application of advanced materials (LDH) in the production of heterogeneous biocatalysts, thus contributing to the sustainability of chemical processes.

Key-words: Heterogeneous biocatalyst; LDH; Acid pickling residue; Waste recovery.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura dos HDLs. _____	21
FIGURA 2 – Reações de hidrólise catalisada por lipase em meio aquoso. _____	22
FIGURA 3 – Métodos de imobilização enzimática. _____	24
FIGURA 4 – Diferentes métodos de imobilização enzimática utilizando HDL como suporte. _____	25
FIGURA 5 – Fotografia do hidróxido duplo lamelar (HDL) obtido a partir de resíduos ácido de decapagem (RAD). _____	27
FIGURA 6 – Representação esquemática do processo de imobilização por adsorção física da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em HDL ZnFeAl. _____	29
FIGURA 7 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila catalisada por lipase. _____	31
FIGURA 8 – Cinética de imobilização da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em HDL ZnFeAl utilizando tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L ⁻¹ . Atividade residual no sobrenadante determinada pelo método pNPP aquoso. _____	37
FIGURA 9 – Micrografias do HDL antes (A, 2000x; B, 35000x) e após (C, 2000x; D 35000x) a imobilização enzimática. _____	38
FIGURA 10 – Resultados da análise termogravimétrica (ATG) e da análise térmica diferencial (DTG), expostos nas figuras A e B, respectivamente. _____	39
FIGURA 11 – Difratoograma de raios X do HDL e HDL-Lip. _____	41
FIGURA 12 – Espectro de FTIR do HDL-Lip. _____	42
FIGURA 13 – Estabilidade ao pH do HDL-Lip. Condições: Atividade residual em reações de hidrólise do pNPP, 55 °C, após incubação em diferentes pH por 1 h a 25 °C. Tampões usados para os ensaios (0,05 mol L ⁻¹): Glicina-HCl pH 2,5 (■), Citrato pH 3,0 a 6,0 (●), Fosfato pH 7,0 e 8,0 (▲) e Glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0 (▼). A atividade foi comparada com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0, sem prévia incubação (15,5 ± 2,1 U mg ⁻¹ , 100 %). _____	43
FIGURA 14 – Estabilidade à temperatura do HDL-Lip. Condições: Atividade residual em reações de hidrólise do pNPP, 55 °C, após incubação em diferentes temperaturas por 1 h. A atividade foi comparada com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0, sem prévia incubação (13,2 ± 3,8 U mg ⁻¹ , 100 %). _____	44

FIGURA 15 – Superfície de contorno para produção de ácidos graxos a partir de reações com a enzima livre. _____ 48

FIGURA 16 – Superfície de contorno para produção de ácidos graxos a partir de reações com a enzima imobilizada. _____ 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Síntese de HDLs a partir de resíduos metálicos. _____	19
TABELA 2 – Utilização de HDLs para imobilização de lipases. _____	26
TABELA 3 – Determinações físico-químicas das amostras de óleos vegetais alimentícios residuais. _____	28
TABELA 4 – Variáveis e níveis para o delineamento fatorial com 2 níveis e 2 variáveis para estudos de hidrólise do óleo de fritura catalisada por HDL-Lip. ____	34
TABELA 5 – Estabilidade em relação ao armazenamento, 4°C e temperatura ambiente, da lipase de <i>Burkholderia lata</i> em solução e HDL-Lip. Atividade residual (%) dosada pela hidrólise do pNPP, pH 8,0. _____	45
TABELA 6 – Delineamento fatorial 2 ² aplicado no estudo da hidrólise de diferentes óleos de fritura, utilizando HDL-Lip. A quantidade de suporte foi expressa em unidades totais dosadas através da hidrólise do pNPP. _____	47
TABELA 7 – Coeficiente de Regressão para as variáveis independentes e Análise de Variância (ANOVA) dos modelos polinomiais. _____	47
TABELA 8 – Aplicações de lipases livres e imobilizadas em reações de hidrólise de óleos vegetais e animais. _____	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_f	Atividade hidrolítica remanescente no sobrenadante após o procedimento de imobilização
AGL(s)	Ácidos graxos livres
A_i	Atividade hidrolítica da solução aquosa de lipase antes da imobilização
AR	Atividade residual
A_T	Atividade teórica da enzima imobilizada ($U\ g^{-1}$ do suporte)
A_o	A_o é a atividade hidrolítica do HDL-Lip ($U\ g^{-1}$ do suporte) medida em meio aquoso
ATG	Análise termogravimétrica
BSA	Soro albumina bovina
$^{\circ}C$	Graus Celsius
CA	Coeficiente angular da reta (Abs x tempo em min)
C_i	Concentração inicial de NaOH ou Coeficiente de contraste da variável independente i
C_R	Concentração real de NaOH
DR-X	Difração de raios X
DTG	Análise térmica diferencial
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar para tampão fosfato pH 7: $0,8 \cdot 10^4$ ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)
EAA	Espectrometria de absorção atômica
EB	Extrato bruto
E (%)	Eficiência de imobilização
FC	Fator de correção do NaOH
FD	Fator de diluição
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
g	Gramas
h	Hora
HDL	Hidroxiduplólamelar
Lip	Lipase
LabMult-LD	Laboratório Multiusuário do Campus Londrina
Lamap	Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Campus Apucarana

LBBIO	Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Campus de Assis
L	Litro
m	Massa do suporte HDL
M	concentração do NaOH (mol L^{-1})
M^{2+}	Íons metálicos divalentes
M^{3+}	Íons metálicos trivalentes
M_a	Massa da enzima imobilizada (g)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mol L^{-1}	Mol por litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
n	Número total de experimentos
n_{AG}	Número de mols de ácidos graxos produzidos (μmol)
nm	Nanômetro
PAG^a	Produção de ácido graxo (μmol)
pNP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenol
$pNPP$	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
RAD	Resíduos ácidos de decapagem
Rpm	Rotações por min
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i>
U	Unidade de atividade enzimática- 1 U é a quantidade de μmol do produto liberado na reação
U g^{-1}	Unidade de atividade enzimática por grama de suporte
U mL^{-1}	Unidade de atividade enzimática volumétrica
μmol	Micromol
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-vis	Espectrofotometria ultravioleta e visível
V	Volume da solução enzimática (mL) ou Volume gasto de NaOH durante a titulação do meio reacional com enzima (L)
V_c	Volume gasto de NaOH durante a titulação do meio reacional sem enzima (L)

y^+	Níveis dos parâmetros +
y^-	Níveis dos parâmetros -
y_i^+	Valores obtidos para a variável resposta (μmol de ácido graxo produzido) 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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (HDLs)	18
2.1.1 Processo de Decapagem e Resíduos Ácidos de Decapagem	21
2.2 LIPASES	22
2.2.1 Imobilização de Lipases	24
2.2.1.1 Imobilização de lipases em HDLs	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 SUPORTE HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL)	27
3.2 LIPASE	27
3.3 REAGENTES	28
3.4 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	28
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	30
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	32
3.7 CARACTERIZAÇÃO DO HDL-LIP	32
3.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO HDL-LIP	33
3.8.1 Estabilidade ao pH e à Temperatura	33
3.8.2 Estabilidade ao Armazenamento	33
3.8.2.1 Análise estatística através do teste Tukey	33
3.9 APLICAÇÃO DO HDL-LIP EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE ÓLEOS DE FRITURA	34
3.9.1 Método Titulométrico	35
3.10 ESTUDO DE REUTILIZAÇÕES	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA HDL-LIP	38
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.2.2 Análise Termogravimétrica (ATG)	39

4.2.3 Difractometria de Raios X (DR-X)	40
4.2.4 Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (FTIR)	41
4.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE	42
4.3.1 Estabilidade ao pH e à Temperatura	42
4.3.2 Estabilidade ao armazenamento	45
4.4 APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE	46
4.5 ESTUDO DE REUTILIZAÇÕES	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são materiais formados pelo empilhamento de unidades em camadas resultantes da combinação de diferentes íons metálicos e ânions interlamelares intercambiáveis que unem o empilhamento. Comumente, uma camada HDL é formada por íons metálicos divalentes e trivalentes (M^{2+} e M^{3+}) coordenados a grupos hidroxila. A presença de cátions trivalentes produz um resíduo de carga que é neutralizado por ânions interlamelares. Esses ânions podem ser trocados em meio líquido ou em reações no estado sólido.

Podem ser sintetizados em laboratório, sendo a coprecipitação o método mais usual (CAVANI et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2020), devido à simplicidade e baixo custo de matéria prima (THEISS; AYOKO; FROST, 2016), tornando-se adequado para produção em larga escala (FARIAS, 2020).

As características apresentadas pelos HDLs os tornam utilizáveis como catalisadores e suporte para enzimas, adsorventes, veículo para liberação de fármacos entre outros (MALLAKPOUR; RADFAR; HUSSAIN, 2021; GONÇALVES et al., 2023).

No que diz respeito ao reaproveitamento de resíduos, para a síntese de HDLs, há poucos estudos relatados na literatura. Abed e Faisal (2023), extraíram íons de cálcio de cascas de ovos e misturaram com ferro, produzindo nanopartículas de hidróxidos duplos (LDHs) lamelares cálcio/ferro (Ca/Fe), com posterior imobilização das nanopartículas com alginato de sódio. O material foi utilizado como adsorvente do antibiótico tetraciclina. Farias et al. (2021), sintetizaram HDLs de cloreto de ferro-zinco-alumínio, utilizando resíduos ácido de decapagem (RAD) e aluminato de sódio ($NaAlO_2$) de fontes secundárias usando uma solução de hidróxido de sódio como regulador de pH.

Quando se trata de imobilização de enzimas, as lipases têm sido empregadas para serem imobilizadas em diferentes tipos de suportes e os HDLs obtidos a partir de resíduos industriais pode ser uma alternativa a fim de reduzir custos do processo.

Lipases [Glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3)] são enzimas atuantes na interface orgânico-aquosa, que catalisam a clivagem de ligações éster em triglicerídeos, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. Além disso, em meios não aquosos, agem catalisando também reações de esterificação, transesterificação,

intersterificação, aminólise e lactonização, constituindo uma classe especial de esterases (BORELLI; TRONO, 2015). Em relação às aplicações biotecnológicas, são empregadas em áreas como processamento de gordura/óleo, alimentos, cosméticos, oleoquímicos, preparações farmacêuticas e gestão ambiental (GIRELLI; CHIAPPINI; AMADORO, 2023; KIM; HWANG; AKOH, 2023).

Na área ambiental, são utilizadas para biorremediação de ambientes contaminados por óleos vegetais, gorduras e algumas substâncias de origem petrolífera, auxiliando, portanto, na despoluição, seja ocasionada pelo crescimento populacional, desenvolvimento e industrialização ou por incidentes, como derramamentos acidentais de óleo (MARCHUT-MIKOLAJCZYK; DROŹDŹYŃSKI; STRUSZCZYK-ŚWITA, 2020; BASHA, 2021; NIMKANDE; BAFANA, 2022). Além disso, a utilização de lipases em reações de hidrólise de óleos vegetais e gorduras, permite empregar os produtos gerados, ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, na produção de diversos bioprodutos nas indústrias oleoquímicas (SOUZA et. al, 2022).

Apesar da eficiência catalítica, o uso de enzimas em geral e das lipases na forma livre, possui como desvantagens, custos elevados, baixa estabilidade operacional (desnaturação) e não podem ser facilmente recuperadas ou reutilizadas ao final da reação. Dessa forma, o processo de imobilização de enzimas é uma alternativa para minimizar tais limitações (ALMEIDA et al., 2021).

Nas últimas décadas, houve um crescente aumento envolvendo estudos utilizando biomateriais, bem como o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais, para obtenção de suportes na imobilização de enzimas. Por exemplo, Zhang et al. (2023) usaram a lignina, derivada do resíduo agrícola da espiga de milho para imobilizar lipase de *Candida antarctica* (CALB), sendo um sistema biocatalítico verde e sustentável. Borrás de café foram tratadas para obtenção de veículos adequados para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* (GIRELLI; CHIAPPINI; AMADORO, 2023). A mesma enzima também foi imobilizada em compósito de óxido de grafeno magnético-celulose via glutaraldeído para produzir um bionanocompósito (MAHMOUD; EL-SHARKAWY; IBRAHIM, 2022). Em relação à HDLs obtidos a partir de resíduos industriais, não há relatos na literatura até o presente momento, para aplicação como suportes em imobilização de lipases.

Considerando o aumento da geração de resíduos industriais, interligado a progressiva preocupação com os impactos ambientais e a carência em estudos relacionados à utilização de suportes, obtidos a partir de resíduos industriais, para

imobilizar enzimas, o presente estudo contribuiu com os estudos de imobilização enzimática, utilizando lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, em suporte HDL obtido a partir de resíduos ácidos de decapagem (RAD) que é gerado durante a remoção de camadas de óxido de ferro da superfície do aço bruto, conforme descrito por Farias et al. (2021). Além disso, o biocatalisador heterogêneo, HDL-Lip foi utilizado em reações de hidrólise enzimática de óleos de fritura adquiridos do município de Assis - SP.

1.1 JUSTIFICATIVA

As lipases livres demonstram baixa estabilidade operacional, possuem custos elevados e baixa recuperação ou reutilização. Uma solução para esses inconvenientes seria imobilizá-las em suportes sólidos. Os procedimentos de imobilização de enzimas têm aumentado nos últimos anos, sobretudo como tática de ampliar e facilitar a recuperação/reutilização do biocatalisador (ALMEIDA et al., 2021).

Recentemente, Farias et al. (2021) obtiveram um HDL de cloreto de Ferro-Zinco-Alumínio a partir de resíduos ácidos de decapagem (RAD) de aço bruto. Dados apontam que a produção global de aço bruto cresceu 10 vezes de 1950 a 2019 (atingindo 1,8 bilhão de toneladas no ano). Estima-se que a quantidade de RAD aumente simultaneamente à produção de aço, estando intimamente ligada ao crescimento econômico dos países. Em contrapartida, os descartes incorretos desses materiais acarretam danos ao meio ambiente, principalmente os metais pesados, que são poluentes considerados bioacumulativos, quando relacionado aos tratamentos aplicados a esses resíduos, não há propostas de reutilização ou reaproveitamento. Para isso, tecnologias de valorização de resíduos, transformando-os em materiais úteis, fazem-se necessárias para diminuir os impactos da poluição e auxiliar a economia (FARIAS et al., 2021).

O HDL em estudo ainda não foi empregado como suporte para imobilização de lipases, sendo assim, justifica-se a realização desse projeto, como uma possibilidade de se obter um biocatalisador heterogêneo com a simultânea valorização de resíduos industriais e colaborar com a possibilidade de minimização da poluição causada pelo setor industrial e municipal.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Imobilizar por adsorção física, lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em hidróxido duplo lamelar formado por zinco, ferro e alumínio, contendo cloreto a partir de ácidos de decapagem de/do aço bruto e aplicar a HDL-Lip em reações de hidrólise de óleos de fritura obtidos de distintas localidades do município de Assis - SP.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética de imobilização;
- Verificar a eficiência da imobilização (E) e a retenção da atividade (R);
- Avaliar mudanças morfológicas no suporte antes e após a imobilização, por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Verificar a decomposição, estabilidade e transições térmicas do HDL antes e após a imobilização por análise termogravimétrica (ATG);
- Analisar a estrutura cristalográfica, composição química e propriedades físicas do material através da difração de raios X (DR-X);
- Investigar a estabilidade da HDL-Lip, em relação ao armazenamento (temperatura ambiente e 4°C), em diferentes pHs (2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) e temperaturas (30, 40, 60, 80, 100 °C);
- Comparar a reação de hidrólise de óleo de fritura da HDL-Lip e lipase livre;
- Averiguar a possibilidade de reutilizações do HDL-Lip.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (HDLs)

Os hidróxidos duplos lamelares são materiais naturais ou sintéticos, conhecidos como argilas aniônicas em virtude da sua morfologia lamelar e capacidade de troca aniônica. Possuem alta estabilidade química e térmica, métodos de síntese simples, área de superfície elevada e excelente biocompatibilidade (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2021).

Existem diferentes formas de obtenção de HDLs, para o HDL do presente trabalho, a síntese considerada eco-amigável foi realizada por coprecipitação tendo zinco, ferro, alumínio e íons cloreto, a partir de resíduos industriais denominado resíduos ácidos de decapagem. O HDL obtido é um material lamelar, com baixa organização de lamelas, áreas específicas entre 50 e 79 m² g⁻¹, com todo resíduo industrial adicionado à reação, não restando quantidade significativa de metais dissolvidos no meio de reação (FARIAS, 2020).

Atualmente, estudos a fim de promover a valorização dos resíduos contendo metais, estão sendo realizados (Tabela 1). Em se tratando da síntese de HDLs a partir de resíduos, Zhang et al. (2019), por exemplo, obtiveram hidróxido duplo trimetálico de MgFeAl (HDL) preparado a partir de resíduos sólidos industriais de lama vermelha e escória de ferroníquel. Xiao et al. (2021) prepararam hidróxido duplo de carboneto de cálcio e lama vermelha (CR-HDL) usando resíduos industriais como matéria-prima e Ahmed et al. (2020) produziram hidróxidos duplos (HDLs) de magnésio/ferro (Mg/Fe) imobilizadas em areia de fundição residual, um subproduto da indústria de fundição de metais. Já como trabalho de revisão, Jiang et al. (2023) apresenta um compilado de pesquisas para síntese de HDL a base de resíduo de bauxita, cinzas volantes, escória e água residuais.

TABELA 1 – Síntese de HDLs a partir de resíduos metálicos.

HDL	Materiais Utilizados	Ref.
Ti/(Mg/Al)-LDH	Escória de alto forno contendo titânio	Song et al. (2022)
(Zn-Fe)/As-LDH	Águas residuais contendo As (III)	Wang et al. (2021)
(Ca-Mg)/(Fe-Al)-LDH	Cinzas volantes	Wajima e Suhara (2021)
Hidróxido duplo de carboneto de cálcio e lama vermelha (CR-LDH)	Escória de metal (carboneto de cálcio) e lama vermelha de uma fábrica de acetileno e alumínio, respectivamente	Xiao et al. (2021)
Hidróxidos duplos de magnésio/ferro (Mg/Fe)	Areia de fundição residual (subproduto da indústria de fundição de metais)	Ahmed et al. (2020)
Fe ₂ O ₃ -Zn/Al-LDH	Resíduo de bauxita	Li et al. (2020)
(Ca-Mg)/Al-LDH	Escória de alto forno	Jiang et al. (2019)
(Cu-Zn)/Al-LDH	Águas residuais	Wu et al. (2019)
Hidróxido duplo trimetálico de MgFeAl (HDL)	Resíduos sólidos industriais de lama vermelha e escória de ferroníquel	Zhang et al. (2019)
Ca/Al-LDH	Cinzas volantes da África do Sul	Muriithi et al. (2017)
Mg/Al-LDH	Resíduo de bauxita e lama de boro	Hu et al. (2017)
Zn/Al-(As)-LDH	águas residuais alcalinas contendo arsênico	Meng et al. (2016)
(Zn-Cu-Mg)/Al-LDH	Águas residuais de minas	Peligro et al. (2016)
Mg/Al-LDH	Cinzas volantes indianas	Volli e Purkait, (2016)
Ca/Al-LDH	Escória de alto forno	Kuwahara e Yamashita (2015)
Ca/Al-LDH	Resíduo de bauxita e escória de carboneto	Zhu et al. (2015)
(Ni / Al)-LDH	Águas residuais de galvanoplastia	Zhu et al. (2015)
Hidróxido duplo em camadas de zinco-ferro intercalado com dodecil sulfato (DS-Zn / Fe-LDH)	Águas residuais de galvanoplastia contendo Zinco	Ruan et al. (2012)
Zn/Al-CrO ₄ -LDH	Águas residuais de galvanoplastia	Zhang et al. (2012)
(Ni-Zn)/Cr-LDH	Águas residuais de galvanoplastia contendo multimetais	Zhou et al., 2010

FONTE: Autoria própria (2023).

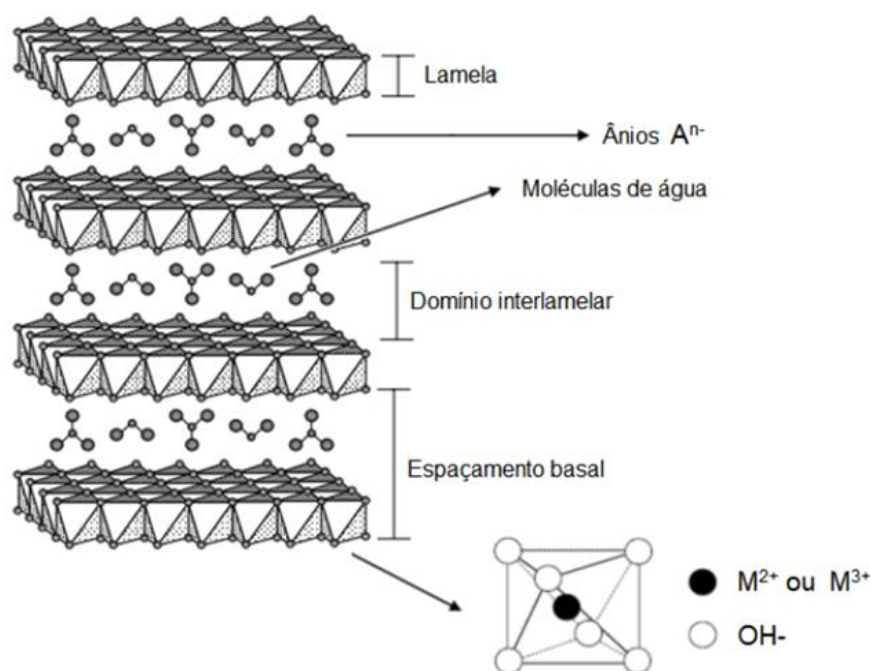
Os HDLs (Figura 1) são materiais que apresentam características físico-químicas, estruturais e morfológicas versáteis. Há crescente interesse na exploração

comercial dos HDLs, tanto no âmbito industrial, quanto em estudos realizados por pesquisadores, devido seu preço acessível, serem materiais biocompatíveis e não tóxicos e as características significativas e propriedades multifuncionais, como, resistência a mudanças térmicas e variações de pH, efeito memória, retenção das moléculas hóspedes dentro das intercamadas, estrutura ajustável, preparação simples e biologicamente correta, flexibilidade de composição química, propriedades de intumescimento, alta propriedade de troca iônica e área superficial, entre outros (ARRABITO et al., 2019; MALLAKPOUR; HATAMI; HUSSAIN, 2020; ROY; PILLAI; RAY, 2022; NETO et al., 2022; ZUO, et al., 2022; AHMAD, et al., 2023).

A modificação e intercalação do HDL com materiais orgânicos e inorgânicos apropriados melhoraram seu comportamento, os tornando utilizáveis em diferentes campos industriais, são exemplos as áreas: catalítica, farmacêutica, médica biológica e eletroquímica, assim como os setores: biológicos, mecânicos, ópticos, térmicos e elétricos. O uso desses nanomateriais como adsorventes e trocadores iônicos possibilitam sua aplicação na remoção de compostos orgânicos, inorgânicos, corantes, metais pesados e íons nucleares, na liberação controlada de minerais e pesticidas no solo (ARRABITO et al., 2019; MALLAKPOUR; HATAMI; HUSSAIN, 2020; ROY; PILLAI; RAY, 2022; NETO et al., 2022; ZUO, et al., 2022; AHMAD, et al., 2023).

Em relação aos HDLs provenientes de resíduos industriais, são comumente usados como adsorvente, catalisador, retardador de chama e inibidores de corrosão (JIANG et al., 2023).

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura dos HDLs.



Fonte: TRONTO (2006) e Adptado por FARIAS (2020).

2.1.1 Processo de Decapagem e Resíduos Ácidos de Decapagem

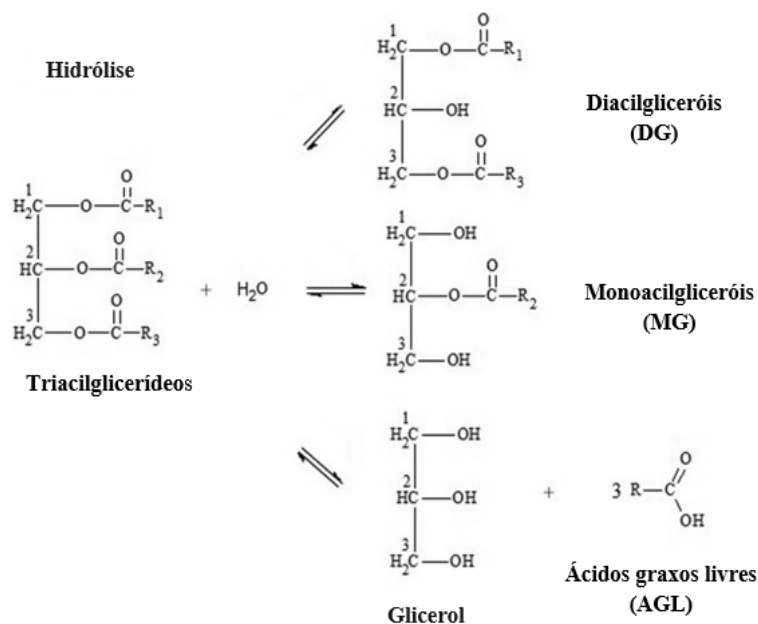
A galvanoplastia e demais execuções de acabamento metálico produzem resíduos tidos como perigosos devido a presença de ácidos e metais. No processo industrial de decapagem química, é geralmente utilizado ácidos minerais, como soluções de ácido clorídrico, nítrico e fluorídrico, agentes eficientes no propósito de remoção da carepa (camada de óxido) ou demais impurezas da superfície. Essa técnica gera líquido residual, que além do pH extremamente baixo, possui alta concentração de metais pesados (alumínio, cobre, cromo, ferro, níquel, manganês, entre outros). Devido seu impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana, esse resíduo ácido é na generalidade tratado através do processo de neutralização, sendo aplicado um composto de caráter básico, eliminando os íons metálicos e neutralizando a acidez e assim como benefício esses produtos podem ser recuperados ou reutilizados. Esse processo simples e de baixo custo normalmente acontece pela adição de cal para aumentar o pH e para a precipitação dos hidróxidos metálicos, se transformando em um lodo instável podendo esse ser encaminhado para aterros especializados e o efluente aquoso, dispensado como

esgoto urbano. (DOHARE, et al., 2017; REIS; ISMAEL, 2018; WU, et al., 2019; FARIAS, 2020; GAO, et al., 2021; WANG, et al., 2022).

2.2 LIPASES

Dentre as enzimas comerciais, as lipases (EC 3.1.1.3) são capazes de hidrolisar naturalmente as ligações éster encontradas nos triacilglicerídeos, formando diacilgliceróis (DG), monoacilgliceróis (MG) e ácidos graxos livres (AGL) (Figura 1). Catalisam também reações de esterificação, transesterificação, interesterificação ou acidólise (Figura 2) (SAMPAIO et al., 2022; SOUZA et al., 2023).

FIGURA 2 – Reações de hidrólise catalisada por lipase em meio aquoso.



FONTE: Adaptado de Sampaio et al. (2022).

Para o avanço em processos verdes, a substituição dos catalisadores químicos é considerada importante. Desta forma, busca-se sistemas biocatalíticos que apresentem características satisfatórias em termos de eficiência, estabilidade em reações de alta temperatura e na presença de solventes orgânicos, capacidade de reutilização e seja ecologicamente correto. Assim, há o interesse industrial na utilização de lipase como catalisador, já que nas reações apresenta estabilidade em

condições adversas, possibilidade de reuso e são alternativas mais sustentáveis (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021).

As aplicações de lipases como catalisadores biológicos incluem diversos setores, como: indústrias de biodiesel, alimentos e bebidas, couro, têxtil, detergentes, produtos farmacêuticos e médicos (RABBANI et al., 2023).

Na área ambiental, tem sido utilizada na biorremediação de resíduos lipídicos. Neste contexto, o óleo de cozinha usado é uma das maiores preocupações dos ambientalistas, pois é despejado em esgotos e outros corpos d'água sem tratamento, o que causa destruição não apenas ao meio ambiente, mas também à flora e à fauna (KUMAR et al., 2012; NWOBI; OFOEGBU; ADESINA, 2006). Para se ter uma ideia dos danos causados, um litro de resíduo lipídico pode comprometer aproximadamente 1 milhão de litros de água natural, principalmente quando o óleo é submetido a temperaturas elevadas, pois podem se tornar tóxicos (OKINO-DELGADO et al., 2017). Assim, investigar as possibilidades de degradar estes compostos é essencial para o tratamento de resíduos ricos em lipídeos.

Características como a possibilidade de catalisar reações em distintos meios (aquoso, orgânico, aquo-restrito), capacidade de utilização em vários substratos, estabilidade referente à temperatura, pH e solventes orgânicos, as tornam biocatalisadores relevantes (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021).

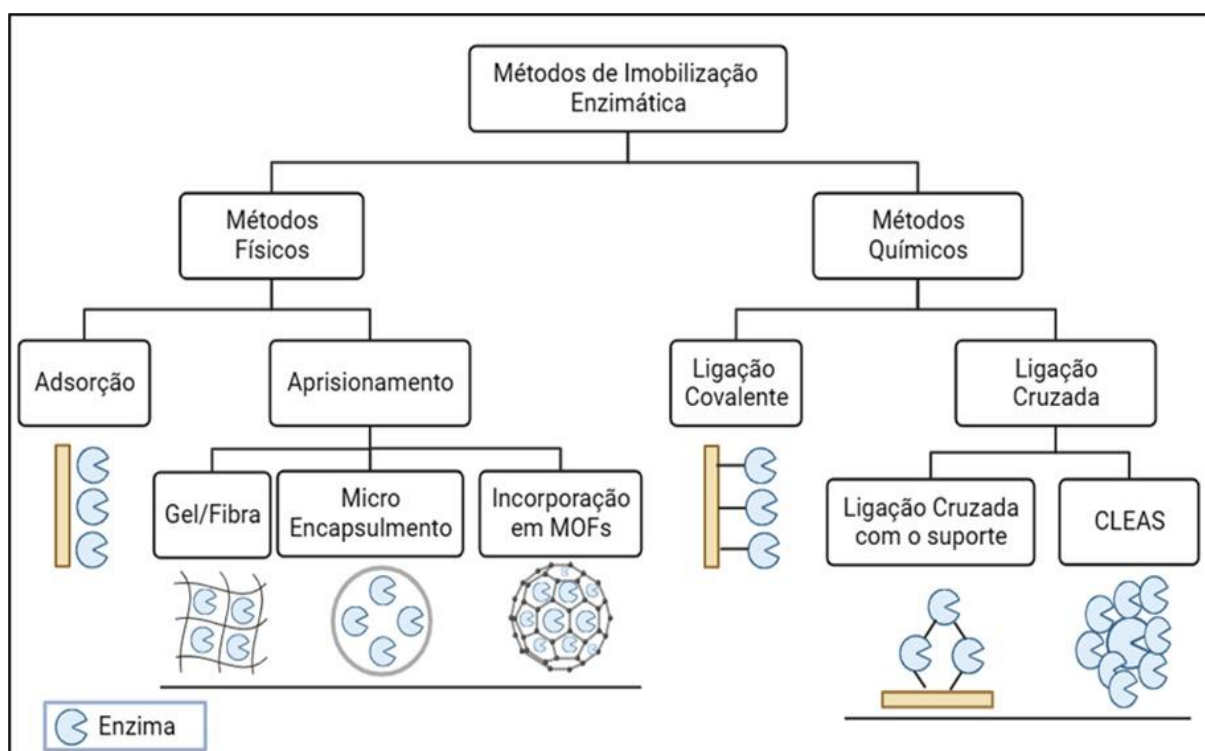
As lipases são habitualmente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de tecidos animais, vegetais e microrganismos. As microbianas são mais usadas industrialmente, devido às características como estabilidade e variedade de atividade catalítica. Quando relacionado à produção, podem ser obtidas por fermentação submersa (FS) ou em estado sólido (FES).

A fermentação submersa consiste na técnica em que os microrganismos são cultivados em meio líquido, com simples recuperação e purificação de lipases. Esse método é comumente utilizado para produzir enzimas a partir de cepas bacterianas, em fontes de carbono de petróleo, como óleos no geral e azeite. Já a fermentação em estado sólido é usada para produzir microrganismos em meio de substrato sólido, geralmente lipases fúngicas, miceliais e de levedura. A FES é empregada em várias áreas industriais, possuindo como vantagem a produção em larga escala por ser um mecanismo econômico e assim reduzir os custos de produção (BHARATI; RAJALAKSHMI, 2019).

2.2.1 Imobilização de Lipases

Enzimas imobilizadas são aquelas confinadas em um material, chamado de suporte. Os métodos de imobilização são divididos de acordo com o tipo de interação enzima-suporte, sendo eles físico (adsorção e aprisionamento ou encapsulação) e químico (ligação covalente e ligação cruzada). Dentre eles, o mais comumente utilizado é o de adsorção, sendo um procedimento simples, de baixo custo e que mantém a atividade enzimática (ISMAEL; BAEK, 2020; ALMEIDA et al., 2021; PANCHAL et al., 2022) (Figura 3).

FIGURA 3 – Métodos de imobilização enzimática.



FONTE: Adaptado de Liu; Chen; Shi (2018).

Para seleção de suportes é necessário levar em consideração as propriedades da superfície, incluindo área superficial, volume de poros, forma, distribuição de poros, natureza da superfície, carga superficial e custo do material (PANCHAL et al., 2022).

Lipases imobilizadas são comumente utilizadas como biocatalisador na indústria, pois possui como vantagens boa estabilidade química e térmica, reutilização e fácil recuperação, possibilitando substituir catalisadores químicos.

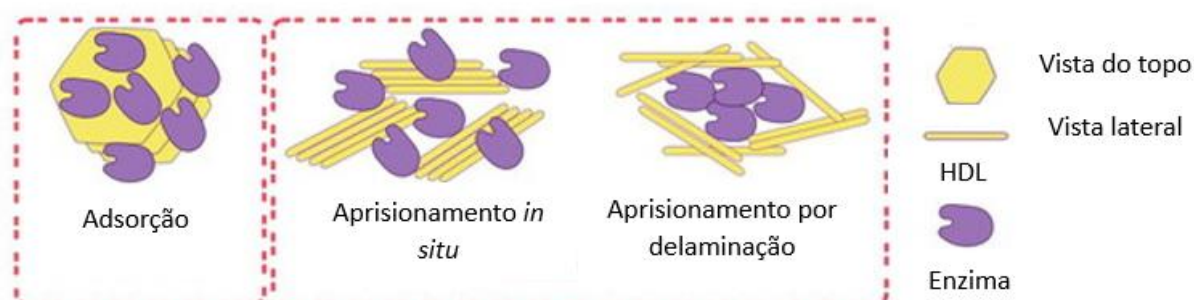
Desse modo, existe um interesse crescente no desenvolvimento de novos materiais para serem utilizados como suportes (ISMAIL; BAEK, 2020).

A imobilização enzimática alavanca as aplicações das lipases, aumentando a estabilidade, a seletividade e a meia-vida. Para tal, é necessária otimização das condições reacionais, como presença ou ausência de solventes orgânicos, temperatura, viscosidade do meio, tal como aprimoramento das características operacionais (REMONATTO et al., 2022).

2.2.1.1 Imobilização de lipases em HDLs

Entre as técnicas usadas na imobilização de lipases, utilizando HDL como suportes, tem-se: adsorção, aprisionamento *in situ* e aprisionamento por delaminação (Figura 4). O método de adsorção consiste basicamente na impregnação da enzima no HDL, por meio de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. No processo de imobilização por aprisionamento *in situ*, há duas variações. Na primeira técnica, conhecida como coprecipitação, a enzima é inserida durante a fase de precipitação do HDL, já na outra forma, delaminação/esfoliação, a enzima fica aprisionada no interior do suporte (AMARAL et al., 2023).

FIGURA 4 – Diferentes métodos de imobilização enzimática utilizando HDL como suporte.



FONTE: Adaptado de Amaral et al. (2023).

Poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando HDL para imobilização de lipases. A Tabela 2 descreve de forma resumida alguns trabalhos onde se utilizou HDLs para imobilizar lipases. Observa-se que o processo de imobilização por adsorção foi o mais empregado em suportes HDLs com formações

variadas, dentre eles os metais alumínio, magnésio e zinco prevalecem nas composições.

TABELA 2 – Utilização de HDLs para imobilização de lipases.

HDL/ Tipo de imobilização/lipase	Principais Resultados	Ref.
Zn ₂ Al intercalados com íons cloreto e SDS Adsorção, aprisionamento <i>in situ</i> e delaminação/ <i>Pseudomonas cepacia</i>	Reações de transesterificação do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila. Conversão de 50%, com eep maior que 99% e alta E > 200, para a lipase imobilizada por adsorção	Amaral et al. (2023)
Mg/Al-CO ₃ ⁻ e Zn/Al-CO ₃ ⁻ modificados com SDS Adsorção/ <i>Candida rugosa</i>	Reações de hidrólise do óleo de oliva. A atividade máxima para lipase imobilizada MLDH1 (0,922 U/mg) e MLDH2 (0,744 U mg ⁻¹). As atividades residuais para lipase imobilizada em MLDH1 (72%) e MLDH2 (67%) de suas atividades iniciais, após 10 reutilizações	Aghaei et al. (2020)
Zn/Al-Cl com diferentes razões molares Zn:Al Adsorção/ <i>Pseudomonas cepacia</i>	E 96% e R 188%, atividade hidrolítica em meio orgânico (279 U g ⁻¹) com uma relação molar de Zn:Al de 4:1 e proteína de 162 mg g ⁻¹ . Na transesterificação do rac-1-feniletanol com acetato de vinila em <i>n</i> -hexano, apresentou alta conversão (50%) em 1 h de reação, com ees e eep superiores a 99% e E > 200	Dias et al. (2019)
HDL calcinado Adsorção/ <i>Candida rugosa</i>	CMAN-CRL catalisou o processo de esterificação com ácidos graxos de comprimentos de cadeia média (C10-C14) de forma eficaz, CNAN-CRL e CZAN-CRL exibiram alta porcentagem de conversão em ácidos graxos com comprimentos de cadeia de carbono de C8-C12 e C10 -C18.	Rahman; Othman e Md Yunus (2016)
MgAl com SDS e superfície modificada (3-aminopropil) trietoxisilano (KH550) Adsorção eletrostática/ <i>Candida lypolitic</i>	E(%) de 56,4% e R > 69,2%	Dong et al. (2014)
HDLs de Mg/Al-NO ₃ ⁻ , Zn/Al-NO ₃ ⁻ Ni/Al-NO ₃ ⁻ Adsorção física/ <i>Candida rugosa</i>	E(%) de 71% para Mg/Al-NO ₃ ⁻ , 67% para Zn/Al-NO ₃ ⁻ e 58% para Ni/Al-NO ₃ ⁻ . As condições ótimas para produzir éster adipato até 80% foram o tempo de reação 2,5 h, 50 °C e a _w 0,53	Rahman et al. (2008)
Mg/Al-NO ₃ ⁻ Mg/Al-SDS Adsorção física/ <i>Candida rugosa</i>	E% de 70,8% para Mg/Al-SDS e 36,9% para Mg/Al-NO ₃ ⁻ . O Mg/Al-SDS apresentou melhor estabilidade, mantendo a conversão do oleato de butila acima de 50% após 10 dias de incubação em hexano.	Rahman et al. (2004)

FONTE: Autoria própria (2023).

Sendo eep: excesso enantiomérico do produto; E: razão enantiomérica; E%: Eficiência de imobilização; R: retenção da atividade; a_w: atividade de água; SDS: dodecil sulfato de sódio.

Dentre as aplicações, as lipases imobilizadas em HDLs foram empregadas em reações de transesterificação para obtenção de ésteres opticamente ativos (AMARAL et al., 2023; DIAS et al., 2019), hidrólise do óleo de oliva (AGHAEI et al., 2020) e obtenção de ésteres pelo processo de esterificação (RAHMAN; OTHMAN e Md YUNUS, 2016; DONG et al., 2014; RAHMAN et al., 2008; RAHMAN et al., 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUPORTE HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL)

Com a finalidade de agregar valor ao produto final, o suporte HDL obtido a partir de resíduos industriais (Figura 5), foi utilizado para imobilização das lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Esse material foi sintetizado pelo Grupo de Química de Materiais e Tecnologias Sustentáveis (GQMATS) da UTFPR campus Londrina. Correspondendo a produção de um HDL formado por zinco, ferro e alumínio, contendo cloreto a partir de resíduos industriais ácidos de decapagem (RAD). O método de síntese utilizado foi o de coprecipitação e o HDL foi caracterizado por meio da análise da densidade aparente, difração de Raios X (DR-X), espectroscopia vibracional de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), adsorção-dessorção de nitrogênio (BET e BJH), análise termogravimétrica (ATG), espectrometria de absorção atômica (EAA) e espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis) (FARIAS et al., 2021).

FIGURA 5 – Fotografia do hidróxido duplo lamelar (HDL) obtido a partir de resíduos ácido de decapagem (RAD).



Fonte: Autoria própria (2023).

3.2 LIPASE

As lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 (massa molecular 32 kDA) foram cedidas, na forma de extrato bruto, pela professora Dra. Valéria Marta Gomes do Nascimento - Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Campus de Assis.

Antes do processo de imobilização, dosou-se a atividade hidrolítica inicial, frente ao *p*NPP do extrato bruto (EB) (item 3.5) e a concentração de proteínas (item 3.6).

3.3 REAGENTES

Para a dosagem da atividade de hidrólise da enzima imobilizada utilizou-se palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP Sigma-Aldrich, <100%). Para a dosagem de proteínas, utilizou-se o Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich ultra pura).

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

Para a etapa de aplicação do HDL-Lip utilizou-se três óleos vegetais de fritura, todos coletados de diferentes locais do município de Assis - SP, essas amostras são de uso doméstico e foram identificadas como AM06, AM08 e AM10. A caracterização físico-químicas foi realizada no LBBIO em relação aos seguintes parâmetros: acidez, índice de peróxido, índice de iodo, quantificação de AGLs, umidade e hidrólise química das amostras (Tabela 3).

TABELA 3 – Determinações físico-químicas das amostras de óleos vegetais alimentícios residuais.

Determinação físico-química	Óleos		
	AM06	AM08	AM10
Índice de Acidez (mg KOH g ⁻¹ Óleo)	1 ± 1,1	1,5 ± 0	1,1 ± 0
Índice de peróxidos (meq kg ⁻¹)	16,03 ± 0,3	17,63 ± 0,2	14,88±0,3
Índice de Iodo (gl ₂ 100 gt ⁻¹)	46,17 ± 0	42,02 ± 0,2	34,48 ± 0,3
Ácidos graxos livres (%)	45,1 ± 0,1	45,1 ± 0,1	23,01 ± 0,1
Teor de Umidade (%)	0,02 ± 0 ^b	0,29 ± 0,1	0,42 ± 0,2

AM: amostra. Fonte: Santana (2023).

3.4 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

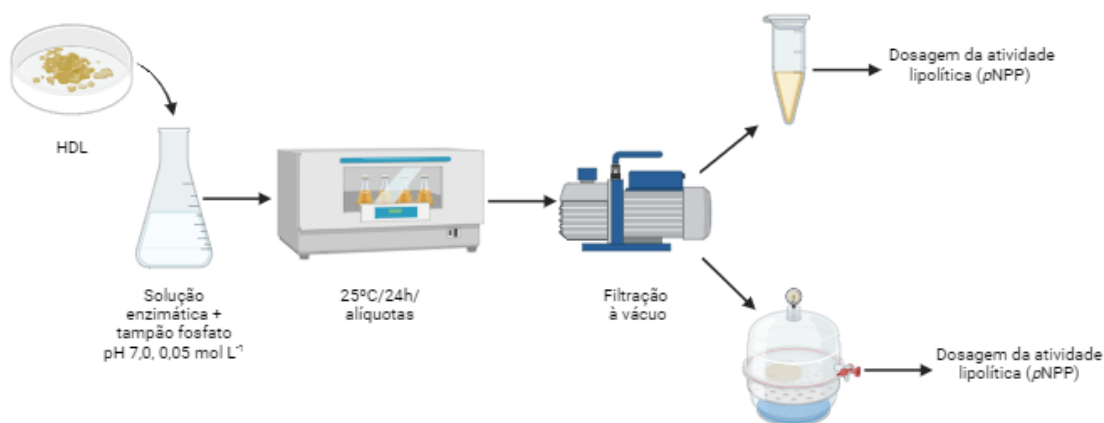
O HDL foi lavado com duas porções de 5 mL de solução de tampão fosfato pH 7,0 a 0,05 mol L⁻¹. Após secagem em dessecador, a imobilização foi realizada

conforme Al-Duri e Yong (1999). Foram colocados em um erlenmeyer 0,5 g do suporte e 77 mL do extrato bruto, diluído em tampão fosfato pH 7,0 a 0,05 mol L⁻¹. A concentração de proteína foi de 50 mg de proteína/g de suporte.

A mistura foi agitada a 100 rpm (25 °C) durante 24 h e a cinética de imobilização, em triplicata, foi acompanhada através da dosagem da atividade residual (AR) e a concentração de proteínas, retirando-se alíquotas de 0,5 mL nos intervalos de 6, 12, 18 e 24 h (AMARAL et al., 2023).

O suporte foi separado por filtração a vácuo, lavado com duas porções de 5 mL da solução de tampão fosfato (pH 7,0 0,05 mol L⁻¹), seco em dessecador por 12 h e armazenado a 4 °C (Figura 6).

FIGURA 6 – Representação esquemática do processo de imobilização por adsorção física da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em HDL ZnFeAl.



FONTE: Autoria própria (2024).

O processo de imobilização foi acompanhado pela dosagem da eficiência de imobilização (E%) e retenção da atividade (R), conforme a Equação 1 e 2 respectivamente (YADAV; JADHAV, 2005; CASTRO et al. 2021).

$$E = \frac{(A_i - A_f) \cdot 100}{A_i} \quad (1)$$

No qual:

A_i é a atividade hidrolítica (U) da solução aquosa de lipase antes da imobilização e A_f é a atividade hidrolítica (U) remanescente no sobrenadante após o procedimento de imobilização, ambas medidas em meio aquoso, em triplicata conforme item 3.5.

$$R = \frac{A_o \cdot 100}{A_T} \quad (2)$$

A_o é a atividade hidrolítica do HDL-Lip (U g⁻¹ do suporte) medida em meio aquoso; A_T é a atividade teórica da enzima imobilizada (U g⁻¹ do suporte), calculada de acordo com a Equação 3.

$$A_T = \frac{(A_i - A_f)}{m} \quad (3)$$

m é a massa do suporte HDL (0,5 g); A_i e A_f foram definidos na Equação 1.

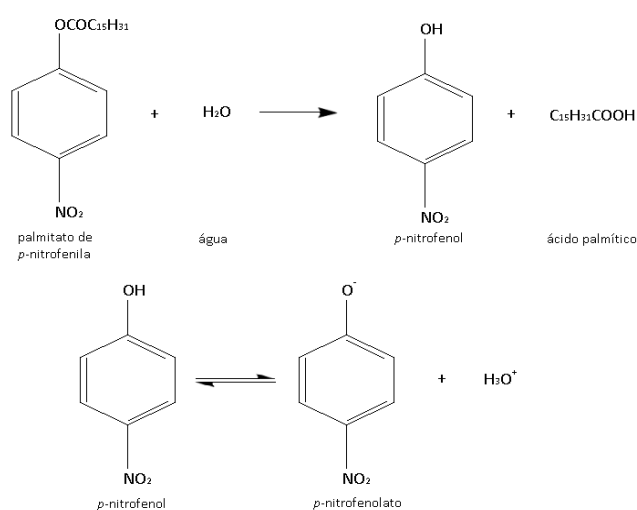
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

O método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979), foi empregado para determinar a atividade lipolítica da solução enzimática antes (A_i) (Extrato bruto, EB) e após a imobilização (A_f) e a atividade enzimática da enzima imobilizada (A_o). O método baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima, em meio aquoso, contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, é acompanhada por UV-vis a 410 nm (Figura 7).

Para a atividade das soluções utilizou 0,9 mL de meio reacional, preparado a partir da mistura de 0,1 mL da solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila em 1 mL de isopropanol) com 0,9 mL da solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0). Aos 0,9 mL do meio reacional, adicionou-se 0,1 mL de tampão (para o branco) ou 0,1 mL da solução enzimática para as amostras. A reação foi acompanhada em cubeta de plástico de 1

mL em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-vis, Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Campus Apucarana- Lamap), por 1 minuto (55°C, 410 nm). A atividade, realizada em triplicata, foi calculada conforme a Equação 4. A unidade foi definida como (U mL⁻¹), onde U é 1 μmol de *p*NP produzido por minuto por mL da solução enzimática.

FIGURA 7 – Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipase.



Fonte: Autoria própria (2023).

$$A = \frac{CA \cdot FD}{\epsilon \cdot V} \quad (4)$$

Em que:

CA: coeficiente angular da reta (Abs x tempo em min);

FD: fator de diluição;

ε: coeficiente de absorvidade molar para tampão fosfato pH 7: 0,8.10⁴ (L mol⁻¹ cm⁻¹);

V: volume da solução enzimática (mL).

Para a atividade da enzima imobilizada usou-se 5 mL de meio reacional e aproximadamente 1 mg da enzima imobilizada, a reação ocorreu em erlenmeyer de 25 mL sob agitação em ultrassom (Schuster L200, 55°C) e retiradas alíquotas a

cada minuto, por 5 minutos, para leitura em espectrofotômetro (410 nm). A atividade, realizada em triplicata, foi calculada conforme Equação 5. A unidade foi definida como (U g⁻¹), onde U é 1 μmol de pNP produzido por minuto por grama de HDL-Lip.

$$A = \frac{CA \cdot V}{\epsilon \cdot Ma} \quad (5)$$

Em que:

CA: coeficiente angular da reta;

V: volume do meio reacional (mL);

ε: coeficiente de absorvidade molar para tampão fosfato pH 7: 0,8.10⁴ (L mol⁻¹ cm⁻¹);

Ma: massa da enzima imobilizada (g).

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas (65,1 ± 1,3 μg mL⁻¹) na solução enzimática (inicial) foi determinada a partir do método de Bradford (1976) (triplicata), usando BSA (soro albumina bovina) como proteína padrão e expressa em μg mL⁻¹ (miligramas de proteína por mL do extrato bruto contendo lipase).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DO HDL-LIP

O HDL antes e após a imobilização foram analisados por Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise termogravimétrica (ATG) e Difração de raios X (DR-X).

Nas análises por MEV foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA, Tescan, disponível no Laboratório Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina (LabMult-LD).

Para a ATG foi utilizada para avaliar as propriedades térmicas do HDL antes e após a imobilização e da lipase livre. Para essas análises, foi empregado o equipamento Shimadzu modelo TGA-50. As amostras foram aquecidas de 20 a 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (razão de

fluxo – 50 mL min⁻¹). A estabilidade térmica das amostras foi avaliada com base nas curvas de TG e DTG. As análises de TGA foram realizadas no Lamap.

A análise de DR-X foi realizada em difratômetro de Raios X modelo D2 PHASER, Bruker, com janela de 5 a 80° (2 θ) e incremento de 2 min⁻¹, disponível no LabMult-LD.

3.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO HDL-LIP

3.8.1 Estabilidade ao pH e à Temperatura

A estabilidade ao pH do HDL-Lip foi determinada pela incubação do HDL-Lip em tampões com valores de pH entre 2,5 e 10 por 1 h à 25 °C.

A estabilidade à temperatura foi determinada pela incubação do HDL-Lip, por 1 h, em temperaturas entre 30 e 100 °C na ausência de substrato.

Para ambos os casos, a atividade do HDL-Lip residual foi determinada a 55 °C pela hidrólise do *p*NPP. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8.2 Estabilidade ao Armazenamento

A estabilidade ao armazenamento do HDL-Lip e da lipase livre em temperatura ambiente e 4 °C foi avaliada. Estas temperaturas foram selecionadas pois são condições mais comuns de armazenamento para biocatalisadores. Para tal, a atividade hidrolítica residual, frente ao *p*NPP, foi dosada a cada 15 dias por um período de 2 meses. As atividades residuais foram calculadas como porcentagem em relação à atividade inicial. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8.2.1 Análise estatística através do teste Tukey

A análise estatística através do teste Tukey foi empregada para verificar diferenças significativas entre amostras independentes após a etapa de imobilização, para os estudos de estabilidade ao pH e à temperatura. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (TUKEY, 1953).

3.9 APLICAÇÃO DO HDL-LIP EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE ÓLEOS DE FRITURA

Para verificar a eficiência catalítica do HDL-Lip, reações de hidrólise de óleos de fritura (descritos como M06, M08 e M10), foram realizadas utilizando um delineamento fatorial 2^2 com repetição em quadruplicata no ponto central, totalizando 8 ensaios (BOX e BEHNKEN, 1960). As variáveis independentes estudadas foram: concentração da enzima (em termos de unidades de atividade) (x_1) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (x_2). As variáveis, seus níveis e valores reais estão apresentados na Tabela 4. A variável resposta (ou dependente) investigada neste estudo foi a produção de ácidos graxos (μmol) dosado através do método titulométrico (3.9.1).

TABELA 4 – Variáveis e níveis para o delineamento fatorial com 2 níveis e 2 variáveis para estudos de hidrólise do óleo de fritura catalisada por HDL-Lip.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 – Temperatura (T, $^{\circ}\text{C}$)	40	47,5	55
x_2 – Unidades Totais (U)	50	75	100

Fonte: Autoria própria (2024).

Os dados experimentais (Tabela 6) foram analisados através da regressão polinomial de segunda ordem representada pela Equação 6 (SHIH et al., 2007):

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{kij} x_i x_j \quad (6)$$

Em que:

Y: a variável resposta (μmol de ácidos graxos);

β_{k0} , β_{ki} , e β_{kij} : os coeficientes constantes;

x_i e x_j as variáveis independentes não codificadas (x_1 e x_2).

O modelo matemático foi testado para a falta de ajuste pelo teste F através da análise de variância (ANOVA) usando o programa STATISTICA® (Data Analysis Software System), versão 5.0.

3.9.1 Método Titulométrico

O método titulométrico proposto por Stuer et al. (1986), com modificações foi utilizado para quantificar a produção de ácidos graxos na hidrólise dos óleos de fritura catalisada pela *B. lata* imobilizada e livre. O método baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis presentes no óleo, com hidróxido de sódio (NaOH). As reações foram realizadas em erlenmeyer de 50 mL, constituído de 5 mL de óleo, HDL-Lip ou lipase livre (Tabela 4, referentes às unidades Totais). Em ambos os casos, utilizou-se a mesma quantidade de unidades de atividade, dosadas anteriormente pelo método do pNPP.

A atividade do HDL-Lip foi de $6,5 \pm 0,58 \text{ U mg}^{-1}$ e da enzima livre, de $100,8 \pm 0,68 \text{ U mL}^{-1}$. Para as reações onde se utilizou HDL-Lip, adicionou-se 1,0 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Às reações com enzima em solução (livre), adicionou-se tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 na quantidade necessária a fim de completar 1,0 mL.

A razão molar óleo:água (tampão) foi fixada na proporção 1:3,5. Esta razão molar foi selecionada pois sabe-se que um excesso de água além do valor estequiométrico (1:3) pode deslocar o equilíbrio da reação para a formação do produto (ZENEVICZ, et. al, 2016). A reação teve duração de 30 min de 40 a 55 °C e 150 rpm. Após, 8 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol são adicionados e esta solução é titulada com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando fenolftaleína como indicador.

Um controle contendo o meio reacional sem enzima foi realizado nas mesmas condições. A padronização do NaOH foi realizada utilizando 0,0102 g ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) de biftalato de potássio seco em estufa (90 °C /12 horas), levado ao dessecador até chegar em temperatura ambiente, após, é adicionado 10 mL de água destilada no erlenmeyer. A solução é agitada até a dissolução completa do biftalato e então titulada com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, gotejando fenolftaleína como indicador, até a coloração rosa característica persistir.

Para o cálculo do número de mols de ácidos graxos produzidos (μmol), utilizou-se a Equação 7.

$$n_{AG} = (V - V_C) * M * 10^6 * F_C \quad (7)$$

No qual:

V: volume gasto de NaOH durante a titulação do meio reacional com enzima (L);

V_C: volume gasto de NaOH durante a titulação do meio reacional sem enzima (L);

M: concentração do NaOH, (mol L^{-1});

F_C: fator de correção do NaOH

O fator de correção do NaOH foi calculado através da Equação 8.

$$F_C = \frac{C_R}{C_i} \quad (8)$$

Onde:

C_i: Concentração inicial de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$;

C_R: Concentração real de NaOH $0,04916 \text{ mol L}^{-1}$.

3.10 ESTUDO DE REUTILIZAÇÕES

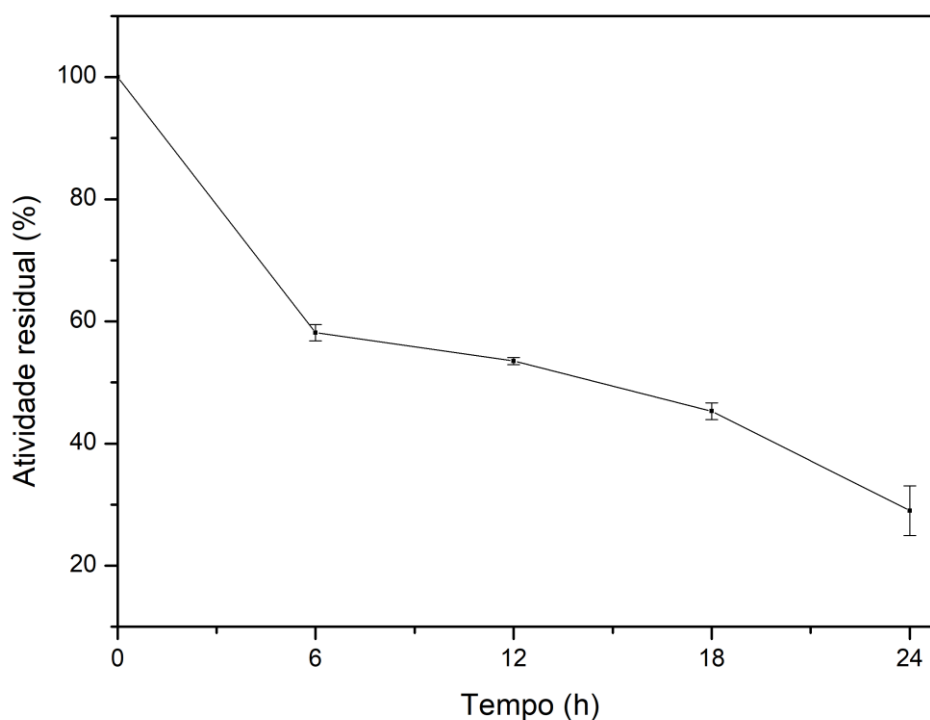
Para os estudos de reutilização do HDL-Lip, a hidrólise do óleo de fritura (junção AM06 e AM10) foi realizada em um frasco Erlenmeyer de 50 mL sob às condições de maior produção de ácido graxo (Experimento 5, Tabela 5): 0,0154 g do HDL-Lip ($6,5 \pm 0,58 \text{ U mg}^{-1}$), 5 mL de óleo, 1 mL de tampão fosfato pH 7, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm (agitador orbital) e 30 min. Após cada batelada, o biocatalisador foi recuperado por filtração, utilizando gaze, lavado com 5 mL de n-hexano por 3 vezes e seco em dessecador a vácuo por 16 horas (temperatura ambiente). Este procedimento deve ser repetido até que o HDL-Lip apresente 50% da eficiência catalítica. As produções de ácido graxo, após cada reação, são comparadas com a produção obtida no primeiro ciclo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Inicialmente realizou-se a cinética de imobilização. Com o objetivo de determinar o tempo de contato entre o extrato enzimático e o suporte para atingir o maior percentual de enzima imobilizada. Observa-se um decréscimo da atividade no sobrenadante em relação ao tempo de imobilização, indicando imobilização da enzima no suporte. Em 24 h a eficiência de imobilização (E) foi de 71% (Figura 8). É possível que tenha havido a saturação do suporte pela enzima.

FIGURA 8 – Cinética de imobilização da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em HDL ZnFeAl utilizando tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L⁻¹. Atividade residual no sobrenadante determinada pelo método pNPP aquoso.



FONTE: Autoria própria (2023).

Para analisar se a enzima estava ativa após a imobilização, foram feitos os ensaios de atividade da enzima imobilizada (A_0), utilizando-se o método da hidrólise do pNPP em meio aquoso para comparação com a atividade teórica (A_T) e cálculo

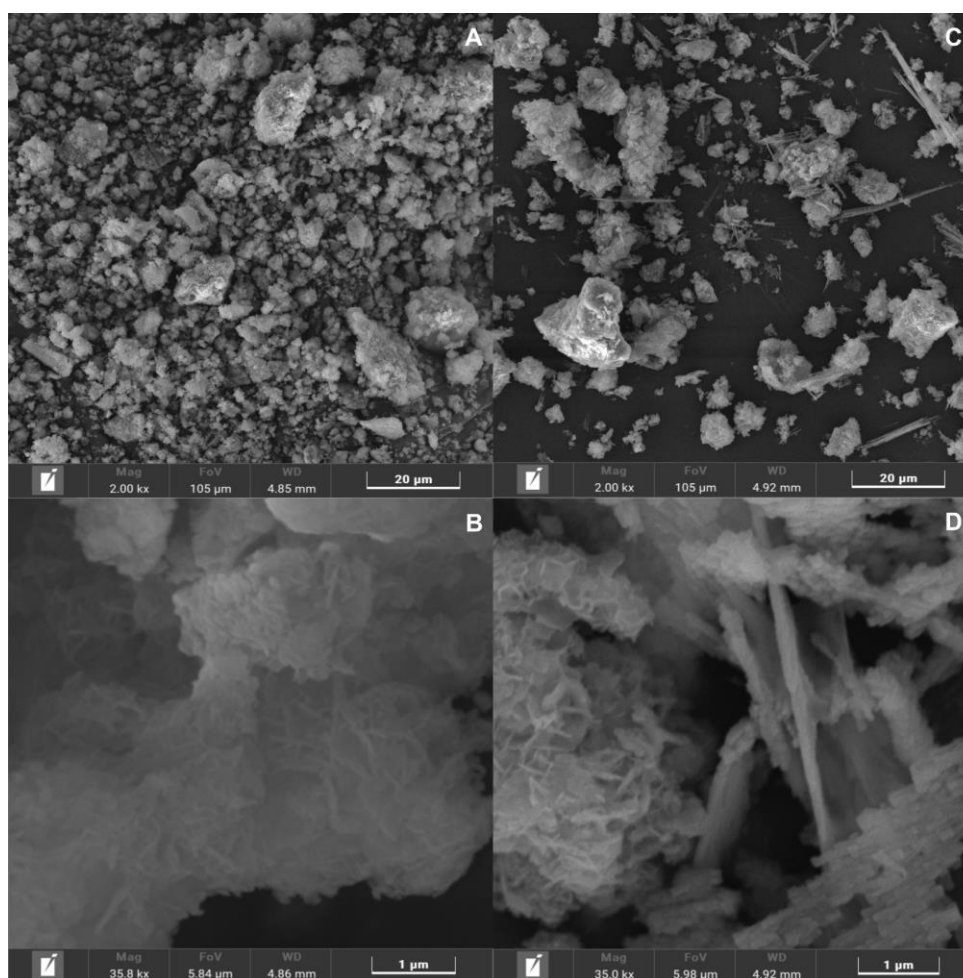
de retenção de atividade (R). Observou-se A_0 de $7,72 \text{ U mg}^{-1}$ e a A_T foi de 4 U mg^{-1} , sendo a R de 193%. Estes resultados indicam que as mudanças conformacionais da enzima foram favoráveis à catálise quando a mesma foi imobilizada em HDL.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA HDL-LIP

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias obtidas das superfícies do HDL antes e após o processo imobilização (HDL-Lip) são apresentadas na Figura 9.

FIGURA 9 – Micrografias do HDL antes (A, 2000x; B, 35000x) e após (C, 2000x; D 35000x) a imobilização enzimática.



FONTE: Autoria própria (2023).

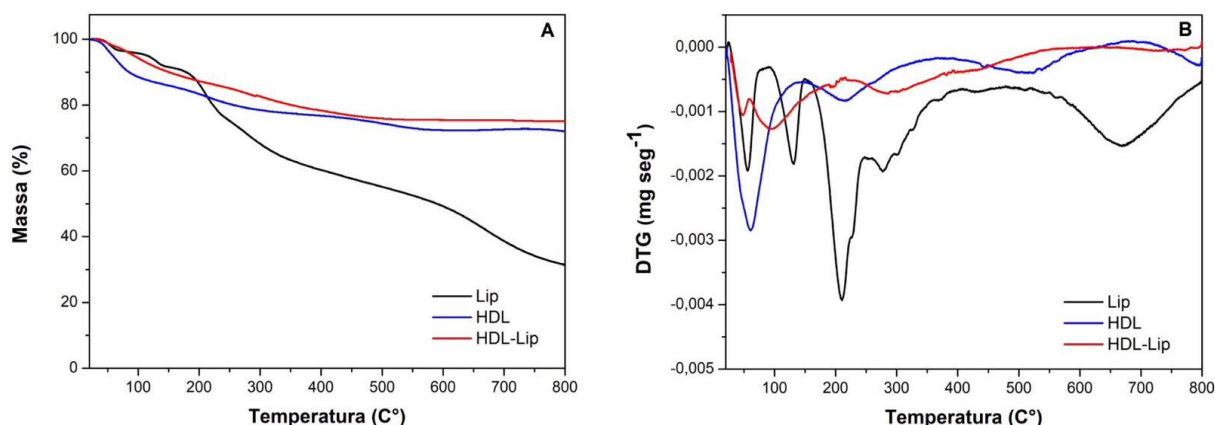
Ao analisar as micrografias do HDL (Figura 9 A e B) percebe-se um material estruturado em lamelas, aglomeradas e com pouca organização.

Ao comparar com as imagens do HDL-Lip (Figura 9 C e D), nota-se que essa estrutura lamelar se manteve, porém, com modificações, um composto com morfologia menos agrupada e com a presença de cristalitos agulhosos, provavelmente devido a solubilização parcial de ferro e alumínio e dos íons fosfato do tampão, que geram fases minerais que cristalizam desse jeito.

4.2.2 Análise Termogravimétrica (ATG)

O comportamento térmico do HDL antes e após a imobilização foi comparado com a lipase livre (Lip) por análise de ATG e DTG (Figuras 10 A e B).

FIGURA 10 – Resultados da análise termogravimétrica (ATG) e da análise térmica diferencial (DTG), expostos nas figuras A e B, respectivamente.



FONTE: Autoria própria (2023).

Quando comparados os comportamentos térmicos da Lip e HDL-Lip, percebe-se que a decomposição da lipase livre é mais rápida, o que pode estar relacionado à desnaturação da conformação proteica da enzima. A análise de TGA para as amostras exibiu dois estágios principais de perda de massa. Para a Lip, a perda de massa inicial, que ocorreu entre 60-150 °C na análise TGA com uns picos endotérmicos correspondentes no DTA, pode ser atribuída principalmente devido à evaporação da água e compostos voláteis (ANSARI; HUSSAIN, 2011; ASMAT; HUSAIN; KHAN, 2018). Comportamento semelhante acontece para o HDL-Lip (80-150 °C) e HDL (60-100 °C) em que há perda de água fracamente adsorvida na

estrutura da proteína adsorvida sobre o HDL e superfície externa das lamelas. Já a próxima perda em aproximadamente em 150°C a 250°C (Lip), 200-350 °C (HDL-Lip) e 400-500 °C (HDL) pode estar associada à decomposição da proteína e para o HDL corresponde à desidroxilação das lamelas, assim como à decomposição de ânions intercalados (FARIAS, 2020).

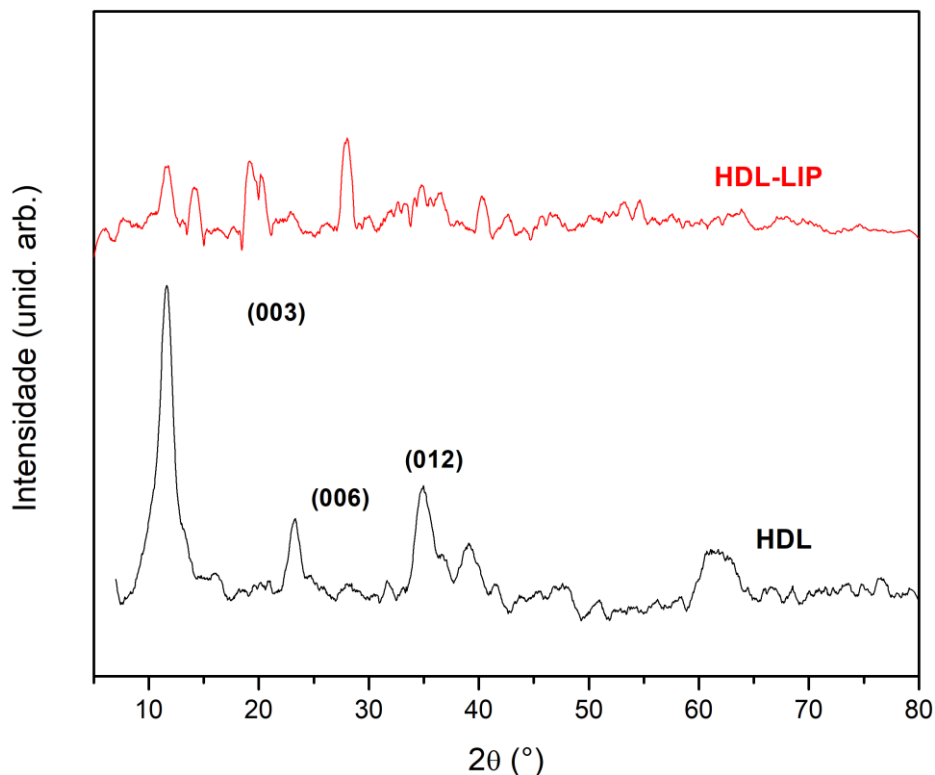
Observa-se através da DTG que o segundo evento térmico da HDL-Lip (~100°C) tem temperatura inferior ao segundo evento térmico tanto da Lip (~150°C) quanto do HDL (>200°C). Assim, a HDL-Lip apresentou menor estabilidade térmica para os ensaios de ATG.

Alguns resultados envolvem a perda de massa nas temperaturas finais, não acarretando grandes modificações do material e da enzima no processo de imobilização.

4.2.3 Difratomia de Raios X (DR-X)

A Figura 11 apresenta os difratogramas de raios X para o HDL-Lip e HDL. Observa-se os padrões de DR-X do material estudado antes (HDL) e após a imobilização da enzima (HDL-Lip). Os picos de difração do HDL coincidiram com o perfil de estrutura lamelar de HDLs conforme padrão número 22-0700 do International Crystallography Diffraction Database (ICDD) e foram identificados como os planos cristalográficos (003), (006) e (009). Por meio da equação de Bragg, a distância baseada no plano (003) calculada foi de ~75 pm, consistente com os raios iônicos do Zn^{2+} e Fe^{2+}/Fe^{3+} em coordenação octaédrica e spin baixo, os maiores cátions da mistura metálica. Além disso, a distância interlamelar calculada a partir do plano (003) centrado em 11,4° (2θ) pela equação de Bragg foi de 7,76 Å, indicando a intercalação por íons cloreto (ZHANG; EVANS, 2012). Após imobilização da lipase, o HDL perdeu cristalinidade, porém manteve os picos de difração referenciais praticamente nas mesmas posições citadas anteriormente. Como não houve deslocamento desses picos, apenas diminuição de sua intensidade e surgimento de alguns picos de baixa intensidade, pode-se inferir que não houve modificações importante do espaço interlamelar, e que o processo de imobilização favoreceu a destruição parcial dos cristalitos na forma de flocos, bem como o surgimento de novas fases cristalinas, confirmando as imagens de MEV.

FIGURA 11 – Difratoograma de raios X do HDL e HDL-Lip.



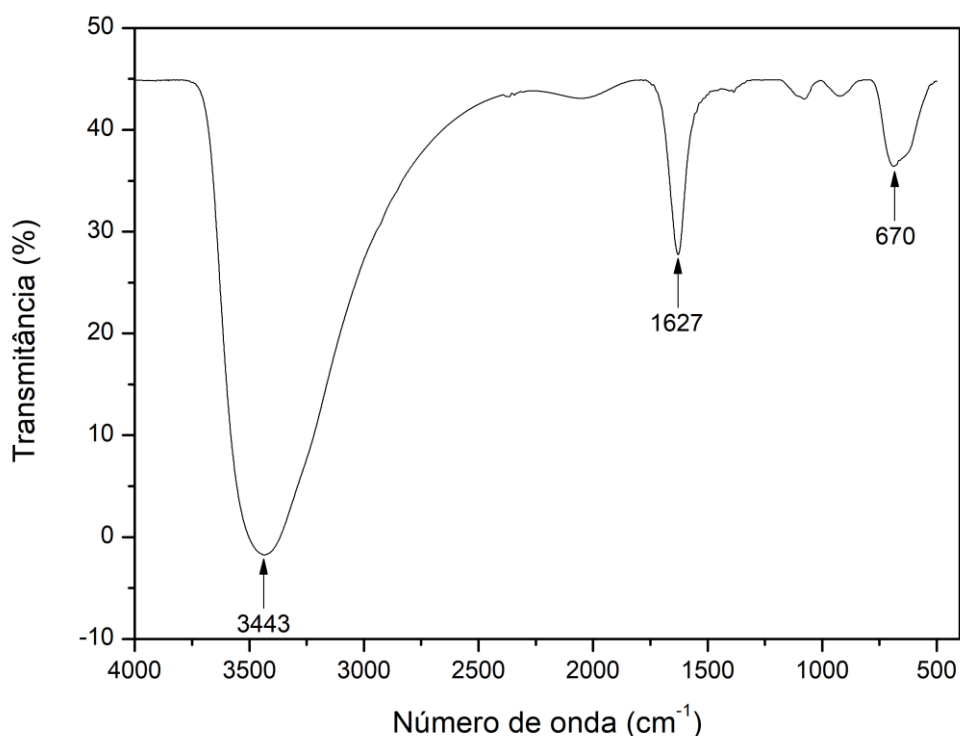
FONTE: Autoria própria (2024).

4.2.4 Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (FTIR)

Em relação ao espectro de FTIR do HDL-Lip (Figura 12) e comparando com o espectro do HDL antes da imobilização (FARIAS, 2020) nota-se similaridade entre os espectros das duas amostras, ou seja, bandas encontradas nas regiões: 1627 cm^{-1} , referentes aos modos vibracionais das moléculas de água intercaladas, 3443 cm^{-1} , banda larga pertencente aos grupos hidroxilas do HDL e 670 cm^{-1} , banda de baixa intensidade atribuída às vibrações dos metais divalente e trivalente com o oxigênio das ligações O-M-O, M-O-M e M-OH (MAK YU et al., 2019).

Não foi possível identificar as bandas de amida I e II (entre 1750 e 1500 cm^{-1}) relacionadas à lipase, pois coincidem com as bandas de deformação angular das moléculas de água presentes no HDL. Amaral et al. (2023) observaram resultado semelhante na imobilização da lipase de *P. cepacia* em HDL Zn₂Al.

FIGURA 12 – Espectro de FTIR do HDL-Lip.



FONTE: Autoria própria (2023).

A análise por FTIR foi importante para verificar possíveis alterações na composição química do suporte após a imobilização, não sendo possível confirmar a imobilização através da técnica.

4.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

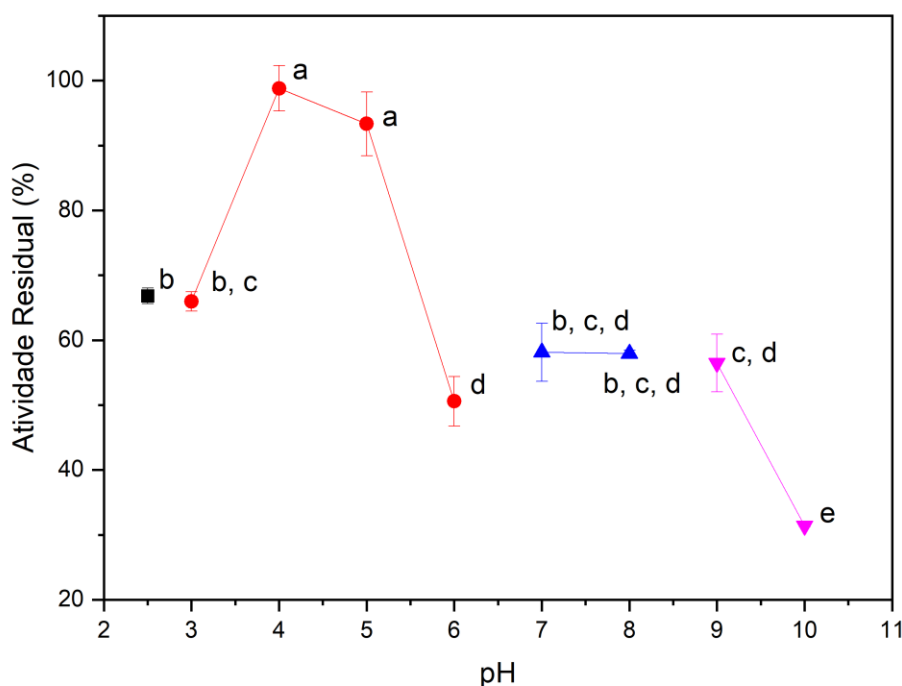
4.3.1 Estabilidade ao pH e à Temperatura

Conforme descrito no item 3.8.2 o estudo de estabilidade ao pH e à temperatura foi conduzido com o HDL-Lip e os resultados podem ser observados nas Figuras 13 e 14, que retratam a atividade residual (AR) em termos percentuais do HDL-Lip após os tratamentos.

Os resultados apontam, alta atividade residual em pHs ácidos para o HDL-Lip, destacando a faixa de 4,0 a 5,0 (acima de 90%), entre pH 6 e 9 a atividade residual foi próxima de 50% e em pH alcalino, a atividade residual decresceu à

medida que a basicidade aumentou, porém, a enzima ainda se manteve ativa (Figura 13).

FIGURA 13 – Estabilidade ao pH do HDL-Lip. Condições: Atividade residual em reações de hidrólise do pNPP, 55 °C, após incubação em diferentes pH por 1 h a 25 °C. Tampões usados para os ensaios (0,05 mol L⁻¹): Glicina-HCl pH 2,5 (■), Citrato pH 3,0 a 6,0 (●), Fosfato pH 7,0 e 8,0 (▲) e Glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0 (▼). A atividade foi comparada com a atividade determinada em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0, sem prévia incubação (15,5 ± 2,1 U mg⁻¹, 100 %).



FONTE: Autoria própria (2023).

^{a,b,c} letras diferentes indicam diferenças significativas no teste Tukey com 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Oliveira et al. (2015) avaliaram a estabilidade ao pH da lipase de *B. lata* na sua forma livre, observando alta estabilidade em pHs ácidos. Comumente, lipases produzidas por bactérias, tem maior estabilidade em pH neutro ou básicos.

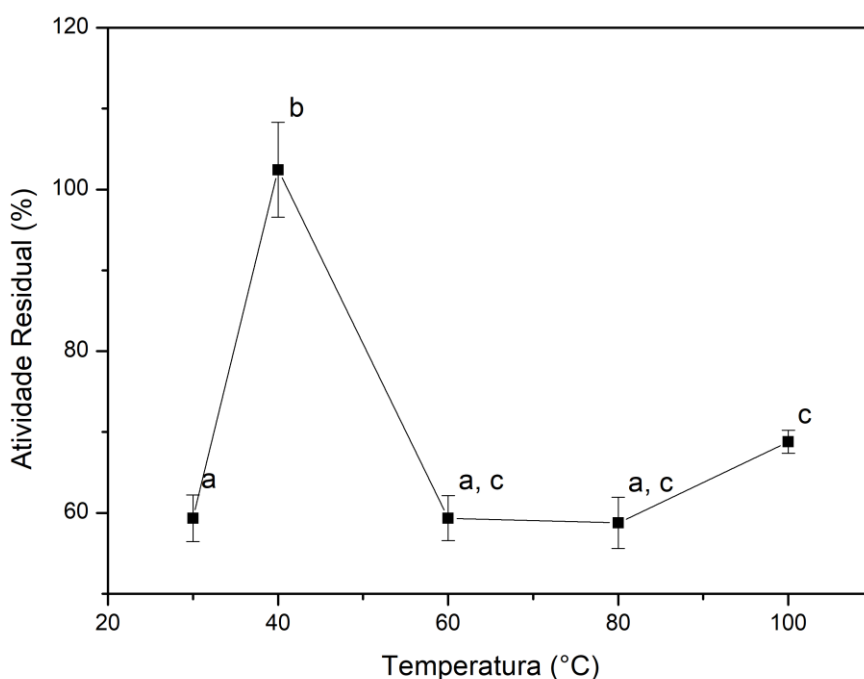
A avaliação da estabilidade de enzimas ao pH é parâmetro importante a ser estudado pois possibilita relacionar com possíveis aplicações na biocatálise. Por exemplo, lipases que apresentam estabilidade em condições ácidas podem ser úteis para as indústrias de laticínios, alimentícias e no tratamento de óleos usados. Na indústria de laticínios, a lipase hidrolisa a gordura do leite, isso poderia melhorar o sabor dos produtos lácteos e aumentar seu valor nutricional. Além disso, também pode ser usada para refinar o óleo e remover ácidos graxos livres, este método

também pode ser usado para modificar óleos de qualidade inferior para obter um produto de alto valor agregado (KONKIT; KIM, 2016).

Quanto ao teste Tukey, a atividade relativa do HDL-Lip foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em pH 10, onde houve menor estabilidade ($31,4 \pm 0,16$ %). As atividades relativas dos conjuntos pH 2,5 e 3, pH 4 e 5, pH 3, 7 e 8, pH 6, 7, 8 e 9 não apresentam diferenças significativas entre si, porém, são significativamente diferentes das atividades relacionadas aos demais pHs.

Em relação a estabilidade à temperatura (Figura 14), observa-se que o HDL-Lip foi estável à 40°C ($102,4 \pm 5,9\%$) e manteve aproximadamente 60% da atividade residual para as demais temperaturas. A alta estabilidade à temperatura após a imobilização é um resultado importante e indica que as mudanças estruturais por resistência térmica acarretam no aumento da atividade catalítica, impactando positivamente na velocidade das reações químicas e em suas aplicações biocatalíticas (BILAL; IQBAL, 2019).

FIGURA 14 – Estabilidade à temperatura do HDL-Lip. Condições: Atividade residual em reações de hidrólise do *p*NPP, 55°C , após incubação em diferentes temperaturas por 1 h. A atividade foi comparada com a atividade determinada em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, sem prévia incubação ($13,2 \pm 3,8 \text{ U mg}^{-1}$, 100 %).



FONTE: Autoria própria (2023).

^{a,b,c} letras diferentes indicam diferenças significativas no teste Tukey com 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

O teste Tukey apontou que a atividade média residual obtida em 40°C possui diferença significativa em relação às atividades residuais determinadas nas outras temperaturas. Não há diferença significativa para as atividades residuais determinadas à 30, 60, 80 e 60, 80 e 100 °C.

Em relação a outras lipases imobilizadas em HDL, Aghaei et al. (2020) observaram, para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Mg/Al-CO₃-HDL (LDH1) e Zn/Al- CO₃-HDL (LDH2), modificados com Dodecil sulfato de sódio (SDS), uma atividade enzimática decrescente com o aumento da temperatura, mesmo que a resistência térmica em suportes hidrofóbicos seja mais considerável do que as lipases ligadas covalentemente. Ressaltaram que a ruptura da lipase e consequentemente a perda da atividade, pode ocorrer nos sítios ativos por calor, presença de íons metálicos e pH, assim como em altas temperaturas a liberação de enzima do suporte hidrofóbico pode diminuir a atividade enzimática. Apesar de enzimas imobilizadas normalmente serem mais estáveis que as livres, os autores observaram um ligeiro aumento na estabilidade, próxima de 10%, para a lipase imobilizada em relação à livre.

4.3.2 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade no tempo de armazenamento da enzima imobilizada é relevante para uso em processos biotecnológicos e industriais (AMERI et al., 2020).

TABELA 5 – Estabilidade em relação ao armazenamento, 4°C e temperatura ambiente, da lipase de *Burkholderia lata* em solução e HDL-Lip. Atividade residual (%) dosada pela hidrólise do pNPP, pH 8,0.

Atividade Residual (%)				
Período	Lip		HDL-Lip	
	4°C	Temperatura ambiente	4°C	Temperatura ambiente
Inicial	100 ± 18,47	100 ± 18,47	100 ± 10,75	100 ± 10,75
1º Mês	100 ± 8,79	70 ± 7,48	100 ± 16,78	100 ± 35,23
2º Mês	100 ± 0,48	70 ± 5,69	85 ± 8,92	27 ± 18

Fonte: Autoria própria (2024).

Para fins de comparação, o HDL-Lip foi avaliado quanto à estabilidade em relação ao armazenamento ou tempo de prateleira e comparado com a lipase livre, em duas condições distintas, refrigerador 4°C e temperatura ambiente. As atividades residuais foram calculadas como porcentagem em relação à atividade inicial. A Tabela 5 apresenta o percentual de atividade residual da lipase de *B. lata* na forma livre (solução enzimática, Lip) e imobilizada, respectivamente, por 2 meses.

Observa-se que a Lip foi mais estável em refrigerador (4°C) que em temperatura ambiente, havendo perda de 30% da atividade para a segunda condição, após 60 dias de armazenamento. Para o HDL-Lip não houve perda da atividade em ambos os meios de armazenamento, no primeiro mês. Após 60 dias, o HDL-Lip armazenado em geladeira demonstrou perda da atividade em aproximadamente 15%, já em temperatura ambiente a redução foi aproximadamente 73%.

Aghaei et al. (2020) afirmam a relevância da estabilidade ao armazenamento dos biocatalisadores imobilizados para avaliar o sucesso do processo de imobilização, tal como a importância na fabricação deles. Em sua pesquisa, a lipase imobilizada apresentou melhor estabilidade, em 4°C, mantendo 92% de atividade após 15 dias e 87% após 25 dias.

4.4 APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Reações de Lip e HDL-Lip como catalisador na hidrólise de óleos de fritura, foram realizadas utilizando um delineamento fatorial 2² (item 3.10), com dois níveis e duas variáveis, para verificar se a variação dos parâmetros temperatura e unidades totais enzimáticas poderia influenciar na produção de ácidos graxos. As respostas (brutas) das variáveis dependentes (resposta) estão mostrados na Tabela 6. Na Tabela 7 estão inseridos os coeficientes de regressão para a resposta polinomial. As curvas de níveis estão expostas nas Figuras 15 e 16.

TABELA 6 – Delineamento fatorial 2² aplicado no estudo da hidrólise de diferentes óleos de fritura, utilizando HDL-Lip. A quantidade de suporte foi expressa em unidades totais dosadas através da hidrólise do pNPP.

Ensaio	Variáveis independentes codificadas ^a e valores reais		Variáveis Dependentes (respostas)					
	X ₁	X ₂	AM6_L ^b	AM8_L	AM10_L	AM6_I ^b	AM8_I	AM10_I
1	-1 (40)	-1 (50)	245,8	344,1	304,8	73,7	49,2	29,5
2	+1 (55)	-1 (50)	432,6	624,3	516,2	103,2	78,7	34,4
3	-1 (40)	+1 (100)	388,4	521,1	496,5	98,3	63,9	68,8
4	+1 (55)	+1 (100)	821,0	958,6	860,3	132,7	122,9	132,7
5	0 (47,5)	0 (75)	521,1	604,7	545,7	108,2	68,8	98,3
6	0 (47,5)	0 (75)	526,0	580,1	496,5	98,3	63,9	83,6
7	0 (47,5)	0 (75)	540,8	614,5	570,3	98,3	59,0	88,5
8	0 (47,5)	0 (75)	506,3	585,0	589,9	113,1	68,8	83,6

FONTE: Autoria própria (2024).

Notas:

^aX₁: Temperatura (°C) e X₂: Unidades enzimáticas (U mg⁻¹)

^bL: lipase livre; I: lipase imobilizada

Respostas em µmol de ácidos graxos produzidos.

TABELA 7 – Coeficiente de Regressão para as variáveis independentes e Análise de Variância (ANOVA) dos modelos polinomiais.

Coeficientes	Variáveis Dependentes ^a					
	AM6_L	AM8_L	AM10_L	AM6_I	AM8_I	AM10_I
β ₀	497,75*	604,05*	547,53*	103,23*	71,90*	77,43*
β ₁	154,85*	179,43*	143,80*	15,98*	22,13*	17,20*
β ₂	132,75*	127,83*	133,95*	13,53*	14,73*	34,40*
β ₁₂	61,45*	39,33*	38,10*	1,23	7,38	14,75*
R ²	0,97	0,99	0,97	0,91	0,88	0,86

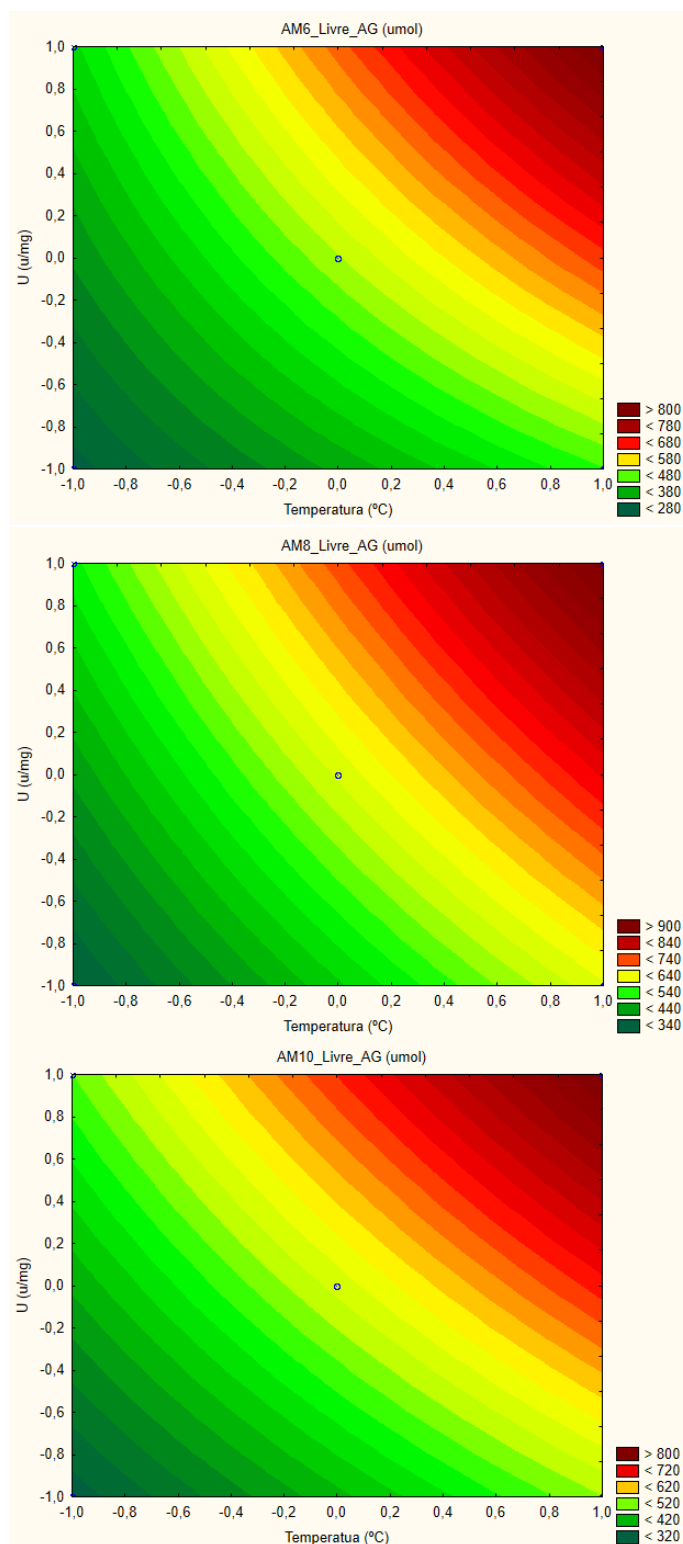
FONTE: Autoria própria (2024).

Notas: (*) coeficientes significativos com p ≤ 0,05. R²: coeficiente de regressão (estimativa do quanto os dados experimentais podem ser ajustados ao modelo proposto. Ideal R² > 0,8)

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 7) indicou que o modelo polinomial de segunda ordem [Eq. (6)] é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre a resposta (produção de ácidos graxos) e as variáveis significativas, pois os coeficientes de regressão são satisfatórios (ideal R² > 0,8). O que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais (Figura

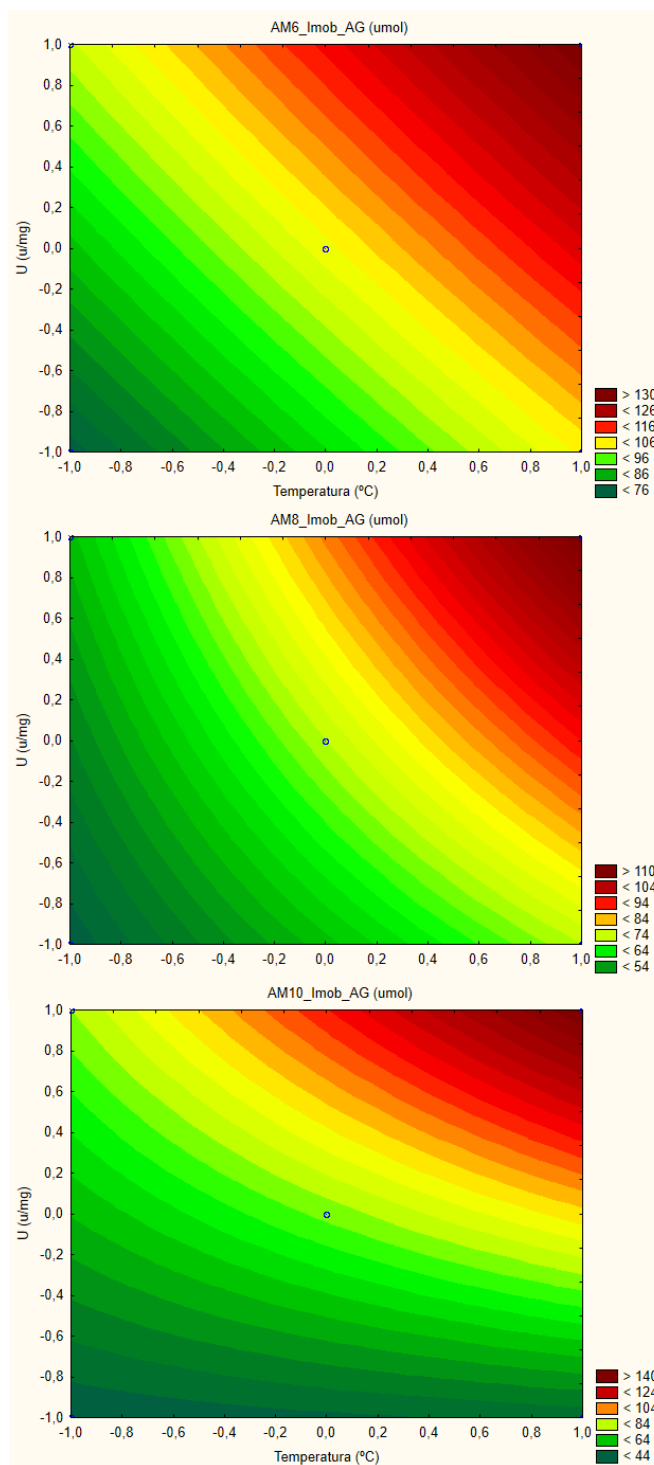
15 e 16). Além disso, ($p \leq 0,05$) aponta que o efeito da variável é significativo para o modelo.

FIGURA 15 – Superfície de contorno para produção de ácidos graxos a partir de reações com a enzima livre.



Fonte: Autoria própria (2024).

FIGURA 16 – Superfície de contorno para produção de ácidos graxos a partir de reações com a enzima imobilizada.



Fonte: Autoria própria (2024).

Para a lipase livre, o óleo onde a reação de hidrólise foi maior foi o AM8, sendo produzidos 959 μmol de ácidos graxos a 55°C e 100 U. Para a lipase imobilizada, os óleos mais hidrolisados foram o AM6 e AM10 (Tabela 6).

Os coeficientes de regressão (Tabela 7) mostram que a variável mais influenciável (β_1), dentro da faixa estudada, foi a temperatura, para todos os óleos. Tanto a temperatura quanto as unidades totais enzimáticas (β_2) exerceram efeito positivo na produção de ácido graxo, indicando que um aumento na T ou na U, para qualquer que seja óleo avaliado, provoca um aumento na quantidade de ácido graxo produzido pela hidrólise da lipase livre ou imobilizada em HDL.

Analisando-se os efeitos de segunda ordem, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, houve interação significativa entre a temperatura (X_1) e concentração de enzimas (X_2). A interação influenciou de forma positiva a produção de ácidos graxos.

A partir destes resultados foi possível obter-se algumas conclusões deste conjunto de experimentos, que mostram as tendências previstas pelo modelo matemático.

Nas Figuras 15 e 16, observa-se que a relação entre concentração de enzima e temperatura, sobre a resposta (produção de ácidos graxos) indicou que a região de máxima produção de ácidos graxos pode ser alcançada com níveis maiores em relação aos intervalos estudados.

Mesmo com o aumento da estabilidade da enzima após imobilização, fatores adicionais podem desempenhar menor eficiência catalítica em reações específicas para enzimas imobilizadas em relação a livre, como por exemplo na hidrólise de óleos e gorduras residuais. Tais fatores incluem a interação dos reagentes com o suporte, a área interfacial entre os reagentes imiscíveis, a acessibilidade dos reagentes aos sítios ativos, a estabilidade e atividade das enzimas e os efeitos potenciais das impurezas. Mesmo para suportes mesoporosos, o que não é o caso de HDLs convencionais, existe a hipótese da potencial adsorção de impurezas dos óleos e gorduras residuais levarem ao entupimento dos poros e desativação dos sítios ativos (BAENA, et al., 2022).

A Tabela 8 traz alguns estudos onde foram realizadas reações de hidrólise de diferentes óleos, com lipases livres e imobilizadas.

TABELA 8 – Aplicações de lipases livres e imobilizadas em reações de hidrólise de óleos vegetais e animais.

Enzima/Óleo	Condições reacionais	Quantidade de enzima	Óleo/ Água	Principais resultados	Ref
Lipase livre da mamona/ óleo de peixe	Solução tampão fosfato 0, 1 M pH 4,5 hexano como solvente 35 °C; 6 h	-	1:4	53,55 ± 2,03% mmol L ⁻¹	Machado et al. (2021)
Lipase livre de <i>Candida rugosa</i> / óleo de peixe bruto	Solução tampão fosfato pH 7,0 45 °C; 6 h	-	-	23,45% U mL ⁻¹	Silva et al. (2020)
Lipase livre de <i>Aspergillus niger</i> / óleo de fritura residual	Ultrassom, tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0, NaOH 0,05 M pH 11,0 45 °C; 12 h	15% de enzima purificada	18 mL de emulsão; 1:3 (v/v) óleo:solvente	753,07 µmol mL ⁻¹	Preczeski et al. (2018)
Lipase de <i>Pseudomonas gessardii</i> imobilizada em carvão ativado mesoporoso/ óleo de fritura residual	Tampão acetato 0,1 M pH 3,5 35 °C; 4 h	0,25 g	-	100%	Ramani et al. (2012)

FONTE: Autoria própria (2024).

Machado et al. (2021), alcançou melhor resultado na reação utilizando Lipase da mamona em óleo de peixe, considerando que a taxa de hidrólise foi influenciada pelo tipo de óleo, composição de ácidos graxos e concentração de óleo no meio reacional.

Silva et al. (2020), aplicou lipase de *Candida rugosa* no óleo de peixe bruto, porém não obteve respostas significativas para produção de ácidos graxos.

Preczeski et al. (2018), estudou as reações em diferentes equipamentos, alegando melhor valor de conversão usando lipase de *Aspergillus niger* e óleo de

cozinha residual no ultrassom e apontando que no shaker não foi observada liberação de ácidos graxos.

Ramani et al. (2012), avaliou a hidrólise com a lipase de *Pseudomonas gessardii* imobilizada em carvão ativado mesoporoso no óleo de cozinha residual, obtendo resultados satisfatórios, os autores relatam que a mesma lipase tem atividade hidrolítica diferente em relação a diferentes tipos de lipídios de diferentes fontes.

Como pode-se notar cada enzima possui suas características específicas, sendo necessário otimização das condições para obtenção de melhores resultados.

Em relação aos resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a HDL-Lip não foi interessante para ser aplicada em reações de hidrólise de óleos. É possível que por conta das grandes cadeias dos triacilgliceróis, tenha havido um aumento dos efeitos difusionais e estéricos diminuindo a interação enzima imobilizada e substrato.

4.5 ESTUDO DE REUTILIZAÇÕES

O processo de reutilização é economicamente vantajoso, sendo que o uso de enzimas imobilizadas é uma particularidade não presente nas enzimas livre (AGHAEI, et al. 2020; REMONATTO, et al. 2022).

Os resultados mostraram que não houve produção de ácidos graxos na reutilização após o primeiro ciclo. Para verificar se houve perda na eficiência catalítica da enzima, dosou-se a atividade de hidrólise em *pNPP* e os resultados mostraram que não houve perda na atividade de hidrólise. Portanto é possível que a lavagem enzimática com hexano antes da reutilização tenha deixado resíduos de óleo que contribuíram para a inibição da enzima. Como o método do *pNPP* utiliza uma emulsão, não houve prejuízos na eficiência catalítica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos realizados neste trabalho que visou a imobilização e aplicação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, pode-se concluir que:

- Foi possível imobilizar lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em hidróxido duplo lamelar formado por zinco, ferro e alumínio, contendo cloreto a partir de ácidos de decapagem; obtendo-se um produto de maior valor agregado, com o reaproveitamento de um resíduo industrial, reduzindo assim os custos;
- Ao imobilizar, houve 71% de desaparecimento da atividade residual, em 24 h e a retenção da atividade da HDL-Lip foi de 193%;
- As micrografias (MEV) mostraram um material estruturado em lamelas, porém, após a imobilização, o composto apresentava morfologia menos agrupada e cristалitos agudos;
- As curvas da ATG E DTG indicaram maior estabilidade para o HDL-Lip, e menor da lipase livre;
- Os picos de difração (DR-X) indicou que o HDL-Lip perdeu cristalinidade, porém manteve os picos de difração referenciais praticamente nas mesmas posições do HDL;
- Houve um aumento de estabilidade da HDL-Lip em pHs ácidos e temperatura de 40 °C;
- Observa-se estabilidade ao armazenamento em geladeira (4°C) sem perda da atividade durante 30 dias, quando imobilizada;
- O delineamento fatorial indica maiores produções de ácidos graxos em maiores temperaturas e maiores concentrações de lipase.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho produziu resultados relativos à imobilização e aplicação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em hidrólise de óleos de fritura, gerando novas perspectivas do uso desta enzima em prol da sustentabilidade. Recomenda-se para trabalhos futuros os seguintes tópicos:

- Variações dos parâmetros para estudo da hidrólise, visando otimização do processo;
- Pré-hidrólise: com utilização da enzima livre ou uso de diferentes porcentagens de enzima livre e enzima imobilizada simultaneamente nas reações;
- Realizar teste de toxicidade para os óleos de fritura antes e após a adição do HDL-Lip (JIANG et al., 2023).

REFERÊNCIAS

- ABED, M. F.; FAISAL, A. A. H. Calcium/iron-layered double hydroxides-sodium alginate for removal of tetracycline antibiotic from aqueous solution. **Alexandria Engineering Journal**, v. 63, p. 127-142, 2023.
- AGHAEI, H. et al. Utilization of two modified layered double hydroxides as supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 74-83, nov. 2020.
- AHMED, D. N. et al. Waste foundry sand/MgFe-layered double hydroxides composite material for efficient removal of Congo red dye from aqueous solution. **Scientific Reports**, fev. 2020.
- AHMAD, S. et al. Recent advancement in ionic liquid modified layered double hydroxide (IL-LDH): Progress, challenges, and future prospects. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 158, p. 111591, dez. 2023.
- AKHLAGHI, N.; NAJAFPOUR-DARZI, G. Preparation of immobilized lipase on Co²⁺-chelated carboxymethyl cellulose based MnFe₂O₄ magnetic nanocomposite particles. **Molecular Catalysis**, v. 519, p. 112118, fev. 2022.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase Immobilization: an equilibrium study on lipases immobilized on hydrophobic supports. **Bioscience Biotechnol. Biochem.** v. 69, p. 833-835, 2005.
- ALMEIDA, F.L.C., et al. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 37-51, 2021.
- AMARAL, L. F. M. do. *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized on Zn₂Al layered double hydroxides: Evaluation of different methods of immobilization for the kinetic resolution of (R,S)-1-phenylethanol. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2023.
- AMERI, A. et al. Immobilization of Thermoalkalophilic Lipase from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 on Amine-Modified Graphene Oxide Nanostructures: Statistical Optimization and Its Application for Pentyl Valerate Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 579–604 jun. 2020.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN Q. Immobilization of *Kluyveromyces fragilis* galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles-its future aspects in biosensors applications. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 70, p. 119–126, 2011.
- ARRABITO, G. et al. Layered Double Hydroxides: A Toolbox for Chemistry and Biology. **Crystals**, v. 9, p. 361, jul. 2019.
- ASMAT, S.; HUSAIN, Q.; KHAN, M. S. A polypyrrole–methyl anthranilate functionalized worm-like titanium dioxide nanocomposite as an innovative tool for

immobilization of lipase: preparation, activity, stability and molecular docking investigations. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 91–102, 2018.

BAENA, A. et al. Enzymatic hydrolysis of waste fats, oils and greases (FOGs): Status, prospective, and process intensification alternatives. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 175, p. 108930, mai. 2022.

BASHA, P. A. **Chapter 25- Oil degrading lipases and their role in environmental pollution**. 2021. v. 2, p. 269-277.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, nov. 2019.

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, abr. 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, set. 2015.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, v. 2, p. 455-475, 1960.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVANI, F.; TRIFIRO, F; VACCARI, A. Hydrotalcite type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis today**, v. 11, n. 2, 1991.

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

DIAS, G. S. et al. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, nov. 2019.

DOHARE, P. et al. Pyranpyrazole derivatives as novel corrosion inhibitors for mild steel useful for industrial pickling process: Experimental and Quantum Chemical study. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, p. 197-210, ago. 2017.

DONG, L. et al. Immobilization and catalytic properties of *candida lipolytic* lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

FARIAS, Larissa Bello Neves. **Obtenção de compostos lamelares a partir de resíduos industriais**, 2020. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

FARIAS, L. B. N. de. et al. Nanoflakes of chloride zinc–iron–aluminum-based layered double hydroxides obtained from industrial waste: a green approach to mass-scale production. **RSC Advances**, v. 11, n.29, p. 17760–17768, mai. 2021.

GIRELLI, A. M.; CHIAPPIN, V.I; AMADORO, P. Immobilization of lipase on spent coffee grounds by physical and covalent methods: A comparison study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 192, mar. 2023.

GAO, Y. et al. Acid recovering and iron recycling from pickling waste acid by extraction and spray pyrolysis techniques. **Journal of Cleaner Production**, v. 312, p. 127747, ago. 2021.

GONÇALVES, R. G. L. et al. Highly porous CuZnAl layered double hydroxides prepared by biochar-templated co-precipitation method as catalysts for the preferential oxidation of CO reaction. **Applied Clay Science**, v. 232, fev. 2023.

HU, P. et al. Preparation of layered double hydroxides using boron mud and red mud industrial wastes and adsorption mechanism to phosphate. **Water Environ. J.**, v. 31, p. 145–157, mai. 2017.

ISMAIL, A.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **Int J Biol Macromol.**, v. 163, p. 1624-1639, nov. 2020.

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

JIANG, H.J. et al. Preparation of CaMgAl-LDHs and mesoporous silica sorbents derived from blast furnace slag for CO₂ capture. **RSC Adv.**, v.9, p. 6054–6063, fev. 2019.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, B. A. et al. Adsorption of selenium (iv) oxoanions on calcined layered double hydroxides of Mg-Al-CO₃ from aqueous solution. Effect of calcination and reconstruction of lamellar structure. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, dez. 2021.

KIM, B. H.; HWANG, J.; AKOH, C.C. Liquid microbial lipase — recent applications and expanded use through immobilization. **Current Opinion in Food Science**, v. 50, abr. 2023.

KONKIT, M.; KIM, W. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 4999-5007, jul. 2016.

KUMAR, S. et al. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300–304, 2012.

KUWAHARA, Y.; YAMASHITA, H. Synthesis of Ca-based layered double hydroxide from blast furnace slag and its catalytic applications. **ISIJ Int.**, v. 55, p. 1531–1537, 2015.

LI, Q., et al. Mechanochemical synthesis of Fe₂O₃/Zn-Al layered double hydroxide based on red mud. **J. Hazard. Mater.**, v. 394, p. 122566, 2020.

LIU, M.; D. CHEM, J.; SHY, P. Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p.332-242, 2018.

MACHADO, S. A. et al. Hydrolysis of vegetable and microbial oils catalyzed by a solid preparation of castor bean lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102188, 2021.

MAHMOUD, M. E.; EL-SHARKAWY, R. M.; IBRAHIM, G. A. A. A novel bionanocomposite from doped lipase enzyme into magnetic graphene oxide-immobilized-cellulose for efficient removal of methylene blue and malachite green dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 368, dez. 2022.

MALLAKPOUR, S.; HATAMI, M.; HUSSAIN, C. M. Recent innovations in functionalized layered double hydroxides: Fabrication, characterization, and industrial applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 102216, set. 2020.

MALLAKPOUR, S.; RADFAR, Z.; HUSSAIN, C. M. Current advances on polymer-layered double hydroxides/metal oxides nanocomposites and bionanocomposites: Fabrications and applications in the textile industry and nanofibers. **Applied Clay Science**, v. 206, jun. 2021.

MAK YU, T. et al. Exploring the surface reactivity of the magnetic layered double hydroxide lithiumaluminum: an alternative material for sorption and catalytic purposes. **Applied Surface Science**, v. 467, p. 1195-1203, 2019.

MARCHUT-MIKOLAJCZYK, O.; DROŹDŹYŃSKI, P.; STRUSZCZYK-ŚWITA, K. Biodegradation of slop oil by endophytic *Bacillus cereus* EN18 coupled with lipase from *Rhizomucor miehei* (Palatase®). **Chemosphere**, v. 250, jul. 2020.

MENG, Z.L. et al. Simultaneous arsenate and alkali removal from alkaline wastewater by in-situ formation of Zn-Al layered double hydroxide. **Microporous Mesoporous Mater**, v. 227, p. 137–143, jun. 2016.

MURIITHI, G.N. et al. Synthesis and characterization of hydrotalcite from South African Coal fly ash. **Powder Technol.**, v. 312, p. 299–309, 2017.

NETO, L. D. da S. et al. Chapter 11 - Fundamentals of layered double hydroxides and environmental applications. **Advanced Materials for Sustainable Environmental Remediation**, p. 301-323, abr. 2022.

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

NWOBI, B. E.; OFOEGBU, O.; ADESINA, O. B. Extraction and qualitative Assessment of African sweet orange seed oil. **Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev**, v. 6, p. 1–11, 2006.

OKINO-DELGADO, C. H. et al. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, 2017.

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, dez. 2022.

PELIGRO, F.R. et al. Removal of heavy metals from simulated wastewater by in situ formation of layered double hydroxides. **Chem. Eng. J.**, v. 306, p. 1035–1040, dez. 2016.

PRECZESKI, K. P. et al. Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2018.

RABBANI, G. et al. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 225, p. 822-839, jan. 2023.

RAHMAN, M. B. A. et al. Immobilisation of lipase from *Candida rugosa* on layered double hydroxides of Mg/Al and its nanocomposite as biocatalyst for the synthesis of ester. **Catalysis Today**, v.93-95, p.405-410, set. 2004.

RAHMAN, M. B. A. et al. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilised on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides (LDHs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, p. 33-39, jan. 2008.

RAHMAN, M. B.; OTHMAN, A. S.; Md YUNUS, N. M. Selectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized onto layered double hydroxides as catalyst in synthesis of fatty acid esters. **Jurnal Teknologi**, v. 78, 2016.

RAMANI, K. et al. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 435-445, 2012.

REIS, M. T. A.; ISMAEL, M. R. C. Electroplating wastes. **Physical Sciences Reviews**. 2018.

REMONATTO, D. et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1-20, mar. 2022.

RODRIGUEZ, L. E., et al. Removal and Extraction of Carboxylic Acids and Non-ionic Compounds with Simple Hydroxides and Layered Double Hydroxides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 6, 2020.

ROY, A. S.; PILLAI, S. K.; RAY, S. S. Layered Double Hydroxides for Sustainable Agriculture and Environment: An Overview. **ACS Omega**, v. 7, p. 20428-20440, jun. 2022.

RUAN, X.X. et al. Synthesis of organic-intercalated Zn/Fe layered double hydroxides from the electroplating wastewater. **Adv. Mater. Res.** 610-613, 538–541 (Jilin, Peoples R China), 2012.

SAMPAIO, C. S. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, p. 434-449, ago. 2022.

SANTANA, Raquel Marques de. **Caracterização de óleo vegetal residual alimentício para aplicação de lipase microbiana**, 2023. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras – UNESP. Assis. 2023.

SHIH, I.-L. et al. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1223-1228, 2007.

SONG, N.N. et al. Efficient recycling blast furnace slag by constructing Ti-embedded layered double hydroxide as visible-light-driven photocatalyst. **Materials**, v. 15, p. 1514, fev. 2022.

SILVA, C. M. et al. Evaluation of enzymatic hydrolysis applied to fish by-product oil through chemical parameters. **Ital. J. Food Sci.**, v. 32, 2020.

SOUZA, G. P. R., et. al. Enzymatic Hydrolysis of Waste Cooking Oil by Lipase Catalysis: Simplex Mixture Design Optimization. **Catalysis Letters**, v. 153, p. 689-697, mai. 2022.

SOUZA, I. G. de., et al. Renewable processes of synthesis of biolubricants catalyzed by lipases. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, fev. 2023.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070 – 1074, 1986.

TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton, NJ: Mimeographs Princeton University, 1953.

THEISS, F. L., AYOKO, G. A., & FROST, R. L. Synthesis of layered double hydroxides containing Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ and Al³⁺ layer cations by co-precipitation methods - A review. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 200-213, 2016.

VOLLI, V.; PURKAIT, M.K. Preparation and characterization of hydrotalcite-like materials from flyash for transesterification. **Clean Techn. Environ. Policy.**, v. 18, p. 529–540, fev. 2016.

WANG, Q.W. et al. As (III) removal from wastewater and direct stabilization by in-situ formation of Zn-Fe layered double hydroxides. **J. Hazard. Mater.** v. 403, p. 123920, fev. 2021.

WAJIMA, T.; Suhara, A. Synthesis of layered double hydroxide from biomass combustion ash and coal fly ash for phosphate removal. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing**, v. 626, p. 012018, 2021.

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. 3, p. 663-670, 1979.

WU, L.Y. et al. Formation of high crystalline LDH sludge for removing Cu and Zn from wastewater by controlled double-jet precipitation. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 26, p. 19665–19675, jul. 2019.

WU, M. T. et al. Harmless treatment and resource utilization of stainless steel pickling sludge via direct reduction and magnetic separation. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118187, dez. 2019.

WHANG, X. et al. Modified chemical mineralization-alkali neutralization technology: Mineralization behavior at high iron concentrations and its application in sulfur acid spent pickling solution. **Water Research**, v. 218, p.118513, jun. 2022.

XIAO, L. et al. From wastes to functions: preparation of layered double hydroxides from industrial waste and its removal performance towards phosphates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 11893-11906, 2021.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215-222, nov. 2005.

ZENEVICZ, M. C. P. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.

ZHANG, J. et al. Chromium (VI) and zinc (II) waste water co-treatment by forming layered double hydroxides: mechanism discussion via two different processes and application in real plating water. **J. Hazard. Mater.**, v. 205, p.111–117, 2012.

ZHANG, Y.; EVANS, J. R. G. Colloids Surf. A: Physicochem. **Eng. Asp.**, v. 408, p. 71-78, 2012.

ZHANG, S. et al. MgFeAl layered double hydroxide prepared from recycled industrial solid wastes for CO₂ fixation by cycloaddition to epoxides. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 34, p. 395-403, dez. 2019.

ZHANG, H. et al. Lipase immobilization using scalable and biocompatible lignin-based material as a carrier. **Industrial Crops and Products**, v. 197, mar. 2023.

ZHOU, J.Z. et al. Effective self-purification of polynary metal electroplating wastewaters through formation of layered double hydroxides. **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, p. 8884–8890, dez. 2010.

ZHU, X.-H. et al. Simultaneously recover Ni, P and S from spent electroless nickel plating bath through forming graphene/NiAl layered double-hydroxide composite. **J. Environ. Chem. Eng.**, v. 3, p. 1055–1060, 2015.

ZUO, J. D. et al. In situ growth of corrosion resistant Mg-Fe layered double hydroxide film on Q235 steel. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 610, p. 202-212, mar. 2022.