

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAMILA SILVA SAMPAIO

SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS PARA A LIPASE PRODUZIDA DE
Geotrichum candidum

ALFENAS/MG

2022

CAMILA SILVA SAMPAIO

SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS PARA A LIPASE PRODUZIDA DE
Geotrichum candidum

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Battaglia Hirata

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Sampaio, Camila Silva .
Síntese de agregados reticulados para a lipase produzida de
Geotrichum candidum / Camila Silva Sampaio. - Alfenas, MG, 2022.
79 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Battaglia Hirata.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de
Alfenas, Alfenas, MG, 2022.
Bibliografia.

1. Lipases. 2. *Geotrichum candidum*. 3. Imobilização. 4. CLEAs. I.
Hirata, Daniela Battaglia , orient. II. Título.

SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS PARA A LIPASE PRODUZIDA DE *Geotrichum candidum*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 26 de maio de 2022

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2022, às 10:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olga Luisa Tavano, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Longevidade**, em 26/05/2022, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0732157** e o código CRC **CFA176AD**.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, aos meus irmãos que me deram força e coragem para estar trilhando este caminho e a todos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da minha vida e pela sabedoria dada a mim em todos os momentos desta trajetória.

Aos meus pais Aparecido e Marli, aos meus irmãos, familiares e amigos por todo amor, compreensão, força, entendimento e coragem dadas a mim para realização deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Daniela Battaglia Hirata, por todo incentivo, paciência, força, compreensão, orientação dadas a mim neste trabalho e por acreditar em mim, me apoiando nos momentos difíceis dessa trajetória. Seu apoio e compreensão foi fundamental para realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório de Bioprocessos, pelas palavras de força, otimismo e encorajamento, demonstrações de carinho e cuidado e por todo auxílio para realização deste trabalho. O apoio de vocês foi muito importante durante a realização deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Joelise de Alencar Figueira Angelotti pela coorientação neste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todo ensinamento fornecido durante o mestrado.

E a todos que me incentivaram, apoiaram e deram forças para realização deste trabalho.

Ao PIB-Pós (Programa Institucional de Bolsas de Pós-Graduação da Universidade Federal de Alfenas) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa durante a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Aleluia! Celebrai a Javé, pois ele é bom, porque eterno é seu amor.”

(BÍBLIA, Salmo 106:1)

RESUMO

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases; E.C.3.1.1.) são enzimas responsáveis pela hidrólise de óleos e gorduras, podendo ser obtidas através de micro-organismos. Elas possuem aplicação em diversos setores industriais, uma vez que apresentam como características serem renováveis, biodegradáveis, seletivas e específicas. Entretanto, as lipases também possuem algumas limitações que precisam ser superadas, e desta forma a imobilização enzimática é uma boa alternativa para minimizar essas limitações. Dentre os vários tipos de imobilização enzimática existentes, destacam-se os agregados enzimáticos reticulados (CLEAs). Os CLEAs são obtidos a partir da precipitação da lipase por um agente precipitante e posteriormente são reticulados através de um agente reticulante como o glutaraldeído. O fungo *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) é um produtor de lipases, as quais possuem a propriedade de hidrolisar as ligações ésteres presentes em ácidos graxos de cadeia longa com duplas ligações na posição *cis* no carbono 9. Neste contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar alguns parâmetros fundamentais para formação dos CLEAs como a escolha do agente precipitante, a concentração de glutaraldeído, (5, 10, 20 e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína), a proporção de aditivo empregada em relação a quantidade de lipase presente no extrato enzimático (1:1; 1:2; 1:3; 1:7 e 1:10 m/m), sendo que foram usados os aditivos albumina de soro bovino (BSA), polietilenoimina (PEI) e proteína de soja (PSH), a porcentagem do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,10, 0,50, 1,00, 1,50 e 2,00 % m/v), o tempo de reticulação (60, 120 e 240 min) e o pH para o extrato enzimático (6,0 e 7,0). Os melhores resultados para o agente precipitante foram obtidos para a acetona, com uma atividade recuperada de $46,82 \pm 1,21$ %. Os CLEAs com o melhor valor de atividade global (cerca de 18 %) e menor lixiviação da lipase nas etapas de lavagem foram obtidos utilizando-se o PEI como aditivo (PEI-CLEAs), para a condição na qual foi empregada 20 μmol de grupos aldeídos por mg/ proteína, a proporção de 1:7 (m/m) de lipase por aditivo, tempo de reticulação de 120 min e pH 6,0 para o extrato enzimático. O estudo de surfactante na preparação dos CLEAs demonstrou que a utilização do SDS não aumentou o rendimento global para os CLEAs formados com os aditivos utilizados (BSA-CLEAs; PEI-CLEAs e PSH-CLEAs).

Palavras-chaves: Lipases; *Geotrichum candidum*; imobilização; CLEAs.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases; E.C.3.1.1.) are enzymes responsible for the hydrolysis of oils and fats, and can be obtained by microorganisms. They have application in several industrial sectors, since they have the characteristics of being renewable, biodegradable, selective, and specific. However, lipases also have some limitations that need to be overcome, and so enzyme immobilization is a good alternative to minimize these limitations. Among the several types of enzyme immobilization, the cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) stand out. The CLEAs are obtained from the lipase precipitation by a precipitating agent and then are cross-linked using a cross-linking agent such as glutaraldehyde. *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) is a producer of lipases, which have the property of hydrolyzing the ester bonds present in long-chain fatty acids with double bonds in cis-position at carbon 9. In this context, this work aimed to evaluate some fundamental parameters for the formation of CLEAs such as the choice of precipitating agent, the concentration of glutaraldehyde, (5, 10, 20 and 30 μmol of aldehyde groups/mg of protein), the proportion of additive used in relation to the amount of lipase present in the enzymatic extract (1:1; 1:2; 1:3; 1:7 and 1:10 m/m), and additives used were bovine serum albumin (BSA), polyethyleneimine (PEI) and soy protein (PSH), the percentage of the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) (0.10, 0.50, 1.00, 1.50 and 2.00 % m/v), the crosslinking-time (60, 120 and 240 min) and the pH for the enzymatic extract (6.0 and 7.0). The best results for the precipitating agent were for acetone obtaining a recovered activity of 46.82 ± 1.21 %. The CLEAs with the best global activity value (about 18%) and the lowest lipase leaching in the washing steps were obtained using PEI as an additive (PEI-CLEAs). The conditions used were 20 μmol of aldehyde groups/ mg of protein, ratio of 1:7 (m/m) of lipase per additive, crosslinking time of 120 min and pH 6.0 in the enzymatic extract. The study of surfactant in the preparation of CLEAs showed that the use of SDS did not increase the global yield for CLEAs formed with the additives BSA, PEI and PSH.

Keywords: Lipases; *Geotrichum candidum*; immobilization; CLEAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de hidrólise de uma ligação éster por lipases.....	19
Figura 2 - Esquema geral de reações catalisadas por lipases não específicas e lipases 1,3 – específicas, onde TG é triglicerídeo, G é glicerol, DG é diacilglicerol e MG monoacilglicerol.	20
Figura 3 - <i>Geotrichum candidum</i> no meio de cultura ágar extrato malte (MEA).	22
Figura 4 - Estrutura 3D da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	23
Figura 5 - Métodos de imobilização enzimática.....	25
Figura 6 - Ativação interfacial da lipase.....	26
Figura 7 - Esquema de preparação de CLEAs.....	29
Figura 8 - CLEA convencional (A); CLEA com utilização de polímero ou proteína alimentadora (B).....	30
Figura 9 - Atividade recuperada relativa (%) obtida para os precipitados ressuspendidos.....	41
Figura 10 - Atividade recuperada relativa (%) obtida para os sobrenadantes.	42
Figura 11 - Porcentagem relativa de proteína detectada no sobrenadante após a precipitação.....	43
Figura 12 - Atividade recuperada relativa para o precipitado ressuspendido e o sobrenadante após a precipitação.	44
Figura 13 - (a) Albumina de soro bovino (BSA); (b) Polietilenoimina (PEI); (c) Isolado de proteína de soja.....	46
Figura 14 - Rendimento de imobilização para os CLEAs, obtidos a partir das lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo).....	47
Figura 15 - Rendimento global para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo).....	48
Figura 16 - Rendimento de imobilização para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes proporções de BSA, PEI e PSH e concentração fixa de glutaraldeído (20 μ mol para BSA e PEI e 30 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH).....	51
Figura 17 - Rendimento global para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes	

- proporções de BSA, PEI e PSH e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol para BSA e PEI e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH).....52
- Figura 18 - Rendimento Global para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs com a lipase de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol /mg de proteína para BSA e PEI e 30 μmol /mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m para PEI, lipase: aditivo).....55
- Figura 19 - Comparação entre os rendimentos globais para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs para a lipase de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol /mg de proteína para BSA e PEI e 30 μmol /mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 para BSA E PSH e 1:7 para PEI, lipase:aditivo).....57
- Figura 20 - Rendimento de imobilização (%) para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes tempos de entrecruzamento e proporção fixa de lipase e glutaraldeído. BSA-CLEAs preparados na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. PEI-CLEAs na proporção de 1:7 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e PSH-CLEAs na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e concentração de 30 μmol de grupos aldeídos/ mg de proteína.....60
- Figura 21 - Rendimento Global (%) para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAS e PSH-CLEAS da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes tempos de entrecruzamento e proporção fixa de lipase e glutaraldeído. BSA-CLEAs preparados na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. PEI-CLEAs na proporção de 1:7 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e PSH-CLEAs na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e concentração de 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína.....61
- Figura 22 - Rendimentos de imobilização (RI) e Rendimento global (RG) para os PEI-CLEAs da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes pHs do extrato enzimático, para a proporção de 1:7 m/m (lipase:PEI) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 120 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos PEI-CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM. ...64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações das lipases em diferentes setores indústrias.....	18
Tabela 2 - Especificidade de lipases obtidas de diferentes fontes.....	20
Tabela 3 - Substratos utilizados para obtenção de lipases.....	24
Tabela 4 - Vantagens e limitações da imobilização por adsorção física e cross-linking.....	25
Tabela 5 - Imobilização de lipases por adsorção física e suas aplicações.....	27
Tabela 6 - Imobilização de lipases por CLEAs e suas aplicações.....	31
Tabela 7 - Atividade recuperada relativa para os sobrenadantes e primeira e segunda solução de lavagem, obtidos a partir dos CLEAs de lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo).....	49
Tabela 8 - Atividade recuperada relativa (%) para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs, obtidos a partir das lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes proporções de BSA, PEI e PSH (1:1,1:3, 1:5, 1:7 e 1:10 (lipase:aditivo) e concentração fixa de glutaraldeído (20 µmol/mg de proteína para BSA e PEI e 30 µmol/mg de proteína para PSH).	54
Tabela 9 - Comparação entre as atividades recuperadas relativas (%) para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs para as lipases de <i>G. candidum</i> preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 µmol de grupos aldeídos/mg de proteínas para BSA e PEI e 30 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m para PEI, lipase:aditivo).....	58
Tabela 10 - Comparação entre as atividades relativas para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs para lipases de <i>G. candidum</i> em diferentes tempos de entrecruzamento e concentração fixa de glutaraldeído (20 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para BSA e PEI e 30 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m lipase:aditivo para PEI).	63
Tabela 11 - Comparação entre as atividades relativas para os sobrenadante e primeira e segunda lavagem dos PEI-CLEAs da lipase de <i>G. candidum</i> , avaliando o pH 6,0 e 7,0 e concentração de glutaraldeído (20 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína) e proporção de lipase:aditivo de 1:7 m/m.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	micromolar
BSA	Albumina de soro bovina
CLEA	Agregados enzimáticos reticulados (Cross-linked Enzymes Aggregates)
CLECs	Cristais de enzima reticulados
kDa	quilodalton
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
PEG	Polietileno glicol
PEI	Polietilenoimina
PSH	Proteína de soja hidrolisada
rpm	rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
U/mL	Atividade enzimático por mL
v/v	volume/volume
μL	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	LIPASES	18
3.1.1	Lipases de <i>Geotrichum candidum</i>.....	21
3.2	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	24
3.2.1	Adsorção física para imobilização de lipases	26
3.2.2	Reticulados enzimáticos (Cross-linking)	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS.....	34
4.2	METODOLOGIA.....	34
4.2.1	Micro-organismo	34
4.2.2	Produção de lipases	34
4.2.3	Escolha do agente precipitante.....	36
4.2.4	Preparação dos CLEAs.....	36
4.2.5	Otimização da preparação dos CLEAs.....	37
4.2.6	Determinação da atividade enzimática.....	38
4.2.7	Determinação da quantidade de proteínas.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1	PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTIVO SUBMERSO	40
5.2	ESCOLHA DO AGENTE PRECIPITANTE	40
5.3	PREPARAÇÕES DOS CLEAs	45
5.3.1	Variação da concentração do agente reticulante	46
5.3.2	Variação da proporção de aditivos (BSA, PEI e PSH).....	50
5.3.3	Variação da concentração de surfactante (SDS)	54
5.3.4	Avaliação do tempo de entrecruzamento	59
5.3.5	Avaliação do pH do extrato enzimático.....	63

6	CONCLUSÕES	67
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A busca por processos indústrias mais sustentáveis, proporcionou o aumento da utilização de enzimas como catalisadores, uma vez que elas podem apresentar alta eficiência catalítica, especificidade, seletividade, condições de reação medianas (temperatura e pressão), além da ausência de subprodutos indesejáveis (CASTRO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Dentre as enzimas existentes, as lipases (triacilglicerol acil-hidrolases; E.C.3.1.1.3) são responsáveis por catalisar *in vivo* reações de hidrólise dos triacilgliceróis formando os monogliceróis, digliceróis, gliceróis e os ácidos graxos livres, podendo ser encontradas em plantas, animais e micro-organismos. *In vitro* essas enzimas podem catalisar reações de síntese como reações de esterificação e interesterificação. Por esse motivo, elas podem ser utilizadas em inúmeras aplicações industriais em diferentes setores, tais como alimentício, farmacêutico, químico, de biocombustíveis entre outros. (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; KAPOOR; GUPTA, 2012; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016).

As lipases obtidas a partir de micro-organismo são mais utilizadas nos processos industriais, por apresentarem altos rendimentos de produção, rápido crescimento em meios de cultivo, suportando melhor as variações de pH e temperatura, podendo ainda possuir seletividade frente às misturas racêmicas e diferentes tipos de substratos. Além das vantagens citadas, soma-se ainda que os micro-organismos são mais fáceis de serem manipulados geneticamente (DE MORAIS *et al.*, 2016; ROMANO *et al.*, 2020).

O *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) é um micro-organismo produtor de lipases. Essas lipases podem possuir diferentes especificidades pelos substratos a partir da utilização de diferentes tipos de indutores no meio de produção, sendo que as lipases mais interessantes deste micro-organismo podem apresentar especificidades para hidrolisar as ligações ésteres presentes em ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas em posição *cis* no carbono 9, sendo utilizadas em diferentes aplicações industriais, tais como a resolução de misturas racêmicas e a modificação de triacilgliceróis para a construção de lipídeos estruturados (BURKERT *et al.*, 2005; CASTRO H. F. de *et al.*, 2004, CASTRO P.F. de 2016; MALDONADO *et al.*, 2016)

Com a finalidade de tornar os processos industriais não agressivos ao meio ambiente, pode-se fazer a utilização de lipases em substituição à catálise química, pois se trata de uma fonte renovável e biodegradável. Entretanto, a utilização de enzimas livres possui algumas desvantagens como a baixa estabilidade da lipase fora de suas condições ótimas de atuação

(em meios orgânicos) e difícil recuperação e reutilização ao final da reação, elevando o custo do processo, uma vez que o biocatalisador não pode ser reutilizado. Assim, buscando-se viabilizar o processo enzimático do ponto de vista econômico, a imobilização se torna uma opção muito atrativa, pois permite uma maior estabilização da lipase em meios orgânicos e a sua reutilização ao final do mesmo (ATIROGLU, 2020; SHELDON, 2011a).

Dentre os vários métodos descritos para a imobilização de enzimas, destaca-se a imobilização via CLEAs, sigla em inglês de *Cross-linked Enzymes Aggregates* (agregados enzimáticos reticulados), para o qual não há a necessidade de utilização de enzima previamente purificada, possibilitando que a purificação, precipitação e reticulação sejam realizadas em uma única etapa, tornando a imobilização mais vantajosa, devido à sua simplicidade, resultando em uma metodologia de baixo custo (MULEY *et al.*, 2021; ZERVA *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é a produção de CLEAs utilizando-se a lipase produzida por cultivo submerso pelo fungo *G. candidum* e a otimização do processo de imobilização.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho estão todos de acordo com o objetivo geral e podem ser descritos como:

- a) Cultivo em modo submerso do *G. candidum* para a obtenção da lipase;
- b) Seleção de agentes precipitantes;
- c) Avaliação da concentração do agente reticulante;
- d) Avaliação da proporção dos aditivos utilizados;
- e) Avaliação da utilização de surfactante;
- f) Avaliação do tempo de reticulação dos CLEAs;
- g) Avaliação do pH do extrato enzimático.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, E.C. 3.1.1.3) pertencem à classe das hidrolases, catalisando naturalmente as reações de hidrólise para óleos e gorduras na presença de água, gerando ácidos graxos livres, monoacilglicerois, diacilglicerois e glicerol, e em baixa atividade de água podem realizar reações de síntese (MIRANDA *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As lipases podem ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos, sendo que as lipases encontradas em micro-organismo possuem diferentes propriedades físicas, químicas e especificidades, podendo ser aplicadas em diversos setores industriais conforme mostrado na Tabela 1 (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; RAFIEE; REZAEI, 2021).

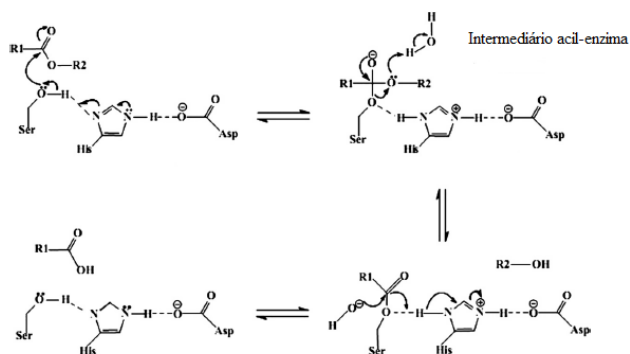
Tabela 1 - Aplicações das lipases em diferentes setores indústrias

Setor industrial	Aplicação
Alimentício	Hidrólise de gordura, obtenção de aromas e flavor em alimentos, maturação em queijo, obtenção de corantes naturais, redução de níveis de gordura saturada em alimentos, síntese de ésteres, remoção de gordura de pescado, hidrólise de triglicerídeos, preparação de leite de soja, cura de carne, fermentação de vegetais e defumação de carnes para aumento da vida de prateleira.
Químico	Hidrólise de óleos e gorduras para obtenção de ácidos graxos livres, diacilglicerois, monoacilglicerois, detergentes e emulsificantes, transesterificação de óleos naturais, remoção de gorduras e manchas, síntese de ésteres, herbicidas e novos polímeros e resolução cinética de misturas racêmicas.
Cosméticos	Síntese de ésteres e substâncias específicas e ingrediente ativo na formulação.
Médico	Determinação de níveis de triglicerídeos no sangue, composição de biossensores e tratamento de tumores malignos.
Papeleiro/têxtil/couro	Branqueamento e como limpador de couro para remoção de componentes hidrofóbicos.
Farmacêutico	Obtenção de auxiliares digestivos, síntese de compostos intermediários, resolução de enantiômeros, medicamentos e cremes para emagrecimento.
Ambiental	Biorremediação, tratamento de efluentes, decomposição de lipídicos, limpeza de ralos e canos que possuem lipídeos ou resíduos orgânicos.
Energético	Síntese de biodiesel e biohidrocarboneto.

Fonte: Adaptado de GANDHI, 1997; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; PAQUES; MACEDO, 2006.

O sítio ativo de uma lipase possui em sua estrutura uma tríade catalítica formada por serina (Ser), histidina (His), aspartato (Asp) ou glutamato (Glu). O mecanismo de ação da lipase consiste em etapas, onde na primeira etapa a interação dos resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu), permite que o resíduo His atue como uma base geral removendo um próton do grupo hidroxila do sítio ativo da Ser (Figura 1). Assim, a nucleofilicidade da hidroxila do resíduo Ser aumenta e ataca a carbonila presente no acil-glicerol formando um intermediário de acil-enzima. Ocorre, então, a estabilização do intermediário tetraédrico por uma função oxianônica. Na sequência, segue-se a etapa de desacilação, que é controlada pela nucleofilicidade das moléculas que se encontram na interface, dessa forma quando um nucleófilo, como por exemplo a H_2O , ataca a enzima acilada, ocorre a formação do produto (ácido graxo de cadeia longa) e a liberação e regeneração do sítio catalítico da enzima. (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Figura 1 - Mecanismo de hidrólise de uma ligação éster por lipases.



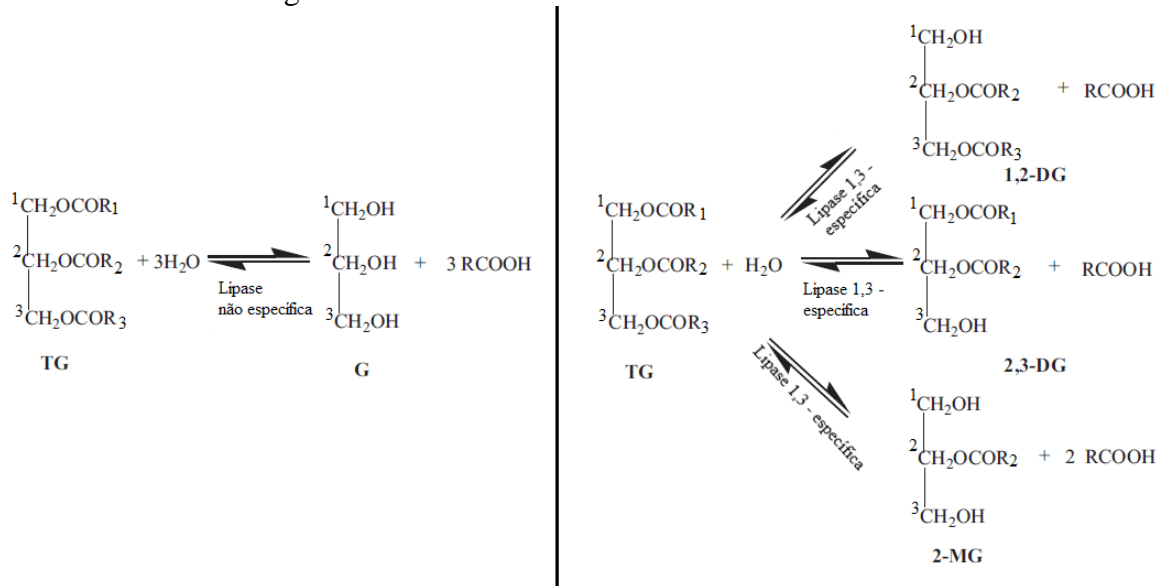
Fonte: Adaptado de MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO (2012, p.121).

As lipases podem apresentar características de especificidade, hidrolisando as ligações ésteres dos ácidos graxos em posições específicas do triacilglicerol. Para as lipases conhecidas como 1,3- específicas a formação de ácidos graxos livres ocorre a partir da hidrólise de ésteres das posições 1 e 3 da molécula do triacilglicerol. Para as lipases que não possuem tal especificidade, há a formação de ácidos graxos, monoacilgliceróis e diacilgliceróis a partir da hidrólise das ligações ésteres de posições aleatórias (Figura 2) (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO, 2006).

As lipases ainda podem possuir seletividade pelo substrato havendo a formação de ácidos graxos livres a partir da hidrólise das ligações ésteres de ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas entre os carbonos *cis-9* e *cis-10* (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; KAPOOR; GUPTA, 2012). Além disso, algumas lipases podem conseguir diferenciar o

tamanho da cadeia carbônica e o número de insaturação do grupo acila e os enantiomêros de misturas racêmicas (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; PAQUES; MACEDO, 2006).

Figura 2 - Esquema geral de reações catalisadas por lipases não específicas e lipases 1,3 – específicas, onde TG é triglicerídeo, G é glicerol, DG é diacilglicerol e MG monoacilglicerol.



Fonte: Adaptado de KAPOOR; GUPTA (2012).

Kapoor & Gupta (2012), descreveram o tipo de especificidade apresentado para lipases obtidas de diferentes fontes (Tabela 2):

Tabela 2 - Especificidade de lipases obtidas de diferentes fontes

(continua)

Fonte de Lipase	ESPECIFICIDADE			
	Não específica	1,3 -Regioespecífica	Trans específica	cis- Δ^9 (ácidos graxos insaturados)
BACTÉRIA	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	-	-
	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	-	-	-
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	-	-	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
FUNGO	-	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida antarctica A</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
	-	<i>Candida antarctica B</i>	-	-
	-	<i>Mucor javanicus</i>	-	-
	-	<i>Penicillium camembertii</i> (<i>Penicillium cyclopeum</i>)	-	-

Tabela 2 - Especificidade de lipases obtidas de diferentes fontes

Fonte de Lipase	ESPECIFICIDADE (conclusão)			
	Não específica	1,3- Regioespecífica	Trans específica	cis- Δ^9 (ácidos graxos insaturados)
FUNGO	-	<i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Mucor miehei</i>)	-	-
	-	<i>Rhizopus delemar</i>	-	-
	-	<i>Rhizopus oryzae</i>	--	-
	-	<i>Rhizopus niveus</i>	-	-
	-	<i>Thermomyces lanuginosa</i> (<i>Humicola lanuginosa</i>)-	-	-
	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-
PLANTA	-	<i>Brassica napus</i> (<i>rapeseed</i>)	-	-
ANIMAL	-	<i>Porcine pancreatic lipase</i>	-	-
	-	<i>Human pancreatic lipase</i>	-	-

Fonte: Adaptado de Kapoor & Gupta (2012).

3.1.1 Lipases de *Geotrichum candidum*

Para o gênero *G. candidum*, diferentes definições podem ser encontradas, tais como: fungo filamentoso, levedura dimórfica ou até mesmo fungo filamentoso incompleto. Esse micro-organismo pode estar presente em tecido vegetal, no leite, no solo, no ar, na água, na flora intestinal de humanos e de mamíferos (FOLTINOVÁ; TANČINOVÁ; CÍSAROVÁ, 2019; MALDONADO *et al.*, 2016; POTTIER *et al.*, 2008). As lipases de *Geotrichum* sp. apresentam peso molecular de 50–66 kDa conforme a sua origem e além disso, o *G. candidum* pode produzir diferentes tipos de lipases conforme o indutor presente no meio de produção (BRABCOVÁ *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2015). Na Figura 3 mostra o micro-organismo *G. candidum* em um meio de cultivo ágar extrato malte (MEA).

Figura 3 - *Geotrichum candidum* no meio de cultura ágar extrato malte (MEA).



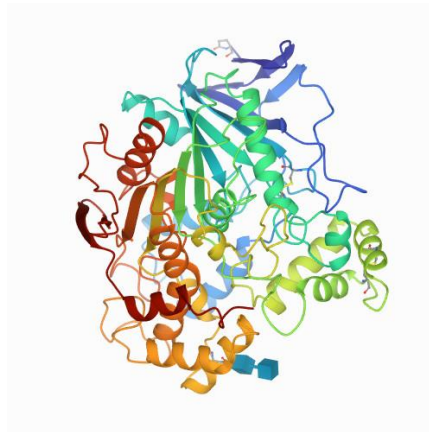
Fonte: do próprio autor (2022).

Boutrou & Guéguen (2005) relataram algumas descrições morfológicas para *G. candidum* como:

- 1 Tipo: Colônias de coloração creme, com produção de artrósporos, com temperatura ótima de crescimento de 22 a 25° C.
- 2 Tipo: Colônias de coloração brancas, com hifas vegetativas e poucos artrósporos, com temperatura de crescimento de 25 a 30 °C.
- 3 Tipo: Combinação do tipo 1 e 2.

A lipase de *G. candidum* (ATCC 34614) é uma molécula com uma única subunidade, possui dimensões de 65x60x45 Å, massa molecular de 60 kDa sendo constituída por 7% de carboidrato e 544 aminoácidos e o seu ponto isoelétrico e pH está entre os valores de 4,3 a 4,6. A tríade catalítica da lipase de *G. candidum* é Ser-His-Glu, à semelhança de outras tríades catalíticas existentes em outras lipases, mas com a substituição do aspartato pelo ácido glutâmico (SCHRAG *et al.*, 1991; SCHRAG; CYGLER, 1993; SMITH; FAUSTINELLA; CHAN, 1992; STRÁNSKÝ *et al.*, 2007).

Figura 4 - Estrutura 3D da lipase de *Geotrichum candidum*.



Fonte: RCSB/ PDB Protein data bank (2021).

As lipases produzidas pelo *G. candidum* são em sua maioria extracelulares, podendo apresentar seletividade para hidrólise de ligações ésteres de ácido graxos de cadeia longa com duplas ligações nas posições nos carbonos *cis-9* ou *cis-9,12*. Essa propriedade tornam essas lipases muito interessantes para indústria oleoquímica, pois quando utilizadas na hidrólise de óleos vegetais, que apresentam ácidos graxos com dupla ligação em sua composição, a reação de hidrólise ocorre mais rapidamente quando comparada as reações catalisadas por outras lipases que não possuem esse tipo de seletividade (BAILLARGEON *et al.*, 1989; BURKERT *et al.*, 2005; MALDONADO *et al.*, 2016, 2015; RAMOS *et al.*, 2015).

Para a produção de lipases a partir do *G. candidum* são necessários substratos que sejam fontes de nitrogênio, carbono e de lipídeos, esse último tem por finalidade induzir a produção de lipase, podendo ainda ser ao mesmo tempo a fonte de carbono. O pH do meio de produção não deve ser ácido em meios sintéticos e em meios de produção contendo peptona juntamente com glicose, trioléina ou oleato de sódio poderá ocorrer à diminuição da produção de lipases após um longo tempo de cultivo. No cultivo submerso o crescimento do fungo e a produção de lipases são favorecidos quando comparados à fermentação em estado sólido. (MALDONADO *et al.*, 2016; WOUTERS, 1966). No estudo realizado por Shimada *et al.* (1992) as lipases de *G. candidum* apresentaram uma maior produção quando foram utilizados indutores que continham ácidos graxos de cadeia longa insaturada, tais como os ácidos oleico e linoleico presentes em grande quantidade nos óleos de soja, oliva, girassol e algodão.

Na Tabela 3, têm-se alguns exemplos de substratos que podem ser utilizados para produção de lipases.

Tabela 3 - Substratos utilizados para obtenção de lipases.

Substrato fonte de Nitrogênio	Substrato fonte de Carbono	Substrato fonte de lipídica
Ureia	Glicose	Azeite de oliva
Peptona	Xilose	Óleos de algodão
Extrato de levedura	Maltose	Óleo de soja
Nitrato de amônia	Lactose	Oleína de palma
Amônia	Sacarose	Óleo de girassol
Melaço de soja	Glicerol	Tortas residuais de girassol, soja, palma, azeitona, coco, mostarda, algodão e canola
Leucina	Óleos vegetais	
Licor de maceração de milho	Tortas residuais de girassol, soja, palma, azeitona, coco, mostarda, algodão e canola	

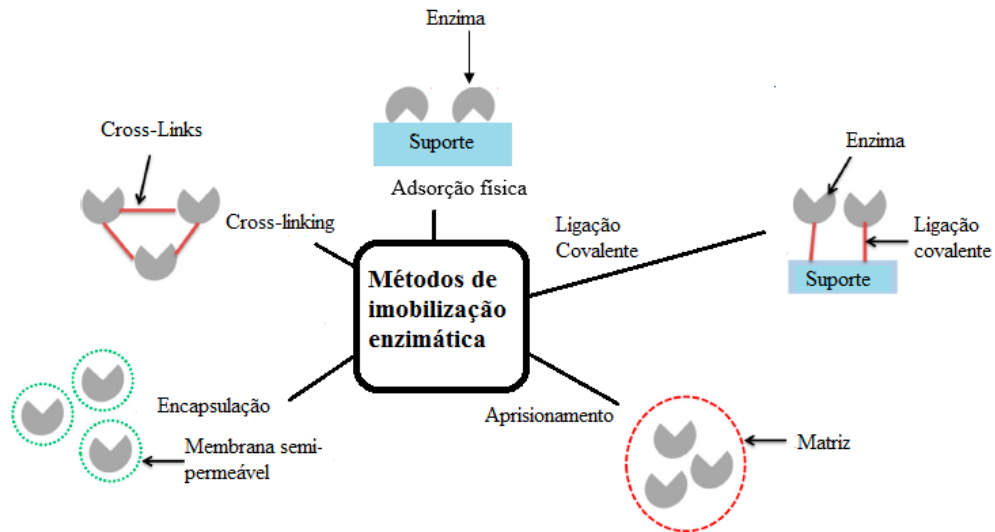
Fonte: Adaptado de MALDONADO *et al.*, 2016; DE MORAIS *et al.* 2016; RIGO *et al.*, 2010 .

3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A utilização de enzimas em processos industriais é uma alternativa a utilização da catálise química, possuindo diversas vantagens, tais como as enzimas podem ser obtidas de fontes naturais e renováveis, possuem biocompatibilidade e biodegradabilidade, são altamente seletivas, atuam em condições brandas de reações (temperatura, pressão e pH) e catalisam as reações de forma específica. Porém, algumas limitações são atribuídas utilização das enzimas na sua forma livre (solúvel), tais como instabilidade operacional e de armazenamento, maior sensibilidade a solventes e a contaminação do produto final, não sendo possível sua reutilização. Para superar estas limitações, a técnica de imobilização enzimática é uma alternativa e por isso diferentes métodos de imobilização foram propostos (ISMAIL; BAEK, 2020; SHELDON, 2011a, 2019).

Katchalski-Katzir (1993) definiu que uma enzima imobilizada é uma “enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetida e continuamente”, propiciando assim, sua recuperação e reutilização, a fim de se obter processos econômicos e viáveis industrialmente, além de conferir uma maior estabilidade impedindo a rápida desnaturação da enzima mesmo quando exposta a um meio com condições adversas (meio orgânico, temperatura e pH fora da faixa ótima) (RAFIEE; REZAEI, 2021; SHELDON, 2019). Dessa forma, a imobilização enzimática pode ser realizada de diferentes maneiras, conforme esquematizado na Figura 5.

Figura 5 - Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de MOKHTAR *et al.* (2020, p. 6).

As informações sobre as vantagens e limitações dentre os métodos de imobilização realizados por absorção física e cross-linking estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Vantagens e limitações da imobilização por adsorção física e cross-linking.

Tipo de imobilização	Vantagens	Limitações
Adsorção física	<ul style="list-style-type: none"> -Facilidade de execução; -Não são necessários reagentes de reticulação; -Regeneração do suporte; -Pouca ou nenhuma alteração da estrutura enzimática; -Barato; -Baixa toxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baixa eficiência; -Dessorção enzimática; -Distorção estrutural da enzima; -Alteração da estabilidade do pH e pH ótimo decorrente a distorção cinética; -Tamanho dos poros do suporte poderá influenciar na atividade enzimática;
Cross-linking	<ul style="list-style-type: none"> -Não há utilização de suporte; -Método simples, rápido e barato; -Alta concentração enzimática reticulada no processo; -Pouca dessorção enzimática; -Possibilidade de conciliação com outros métodos de imobilização. 	<ul style="list-style-type: none"> -Necessidade de utilização de reagentes biofuncionais; -Por ação de agentes reticuladores pode ocorrer a desnaturação ou modificação estrutural e perda da atividade enzimática.

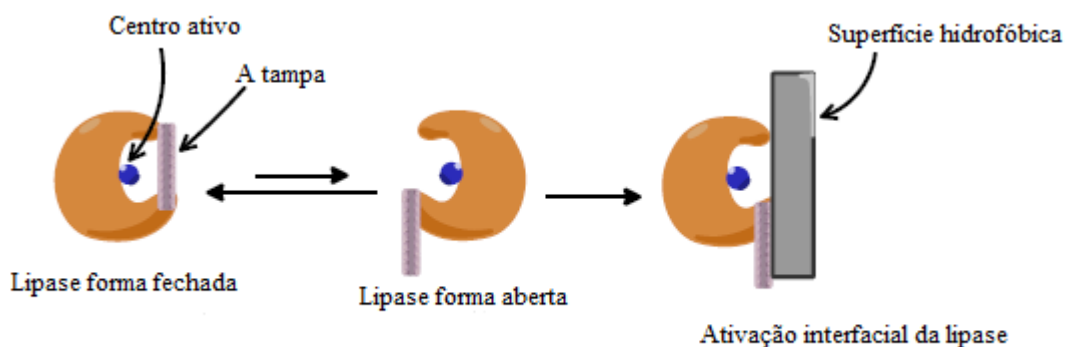
Fonte: Adaptado de VOBĚRKOVÁ *et al.* (2018) ; THANGARAJ; SOLOMON (2019, p.162) e RAFIEE; REZAEI (2021).

3.2.1 Adsorção física para imobilização de lipases

Um dos métodos mais utilizados para a imobilização enzimática é a adsorção física, devido a sua simplicidade. A imobilização por adsorção física consiste em adsorver a enzima através de interações fracas, tais como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligação iônica e interações hidrofóbicas no suporte. (ISMAIL; BAEK, 2020; RAFIEE; REZAEI, 2021). Os suportes hidrofóbicos são preferencialmente utilizados na imobilização por adsorção física para lipases, pois possibilitam que o processo de imobilização ocorra pelo mecanismo da ativação interfacial (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Segundo Bastida *et al.* (1998) o conceito de ativação interfacial de lipase foi introduzida primeiramente por Sarda e Desnuelle no ano de 1958 e após a análise da estrutura de lipases por raio-X, conclui-se que a ativação interfacial é comum em diversas lipases. As lipases possuem em sua composição uma estrutura secundária chamada “tampa polipeptídica” que encobre o sítio ativo da lipase. Quando a “tampa” encobre o sítio ativo da enzima, é dito que a lipase está na sua configuração fechada, na qual não é possível o acesso ao substrato ao sítio ativo da enzima. Quando a enzima é colocada em contato com uma superfície hidrofóbica (como gotas de óleo) ocorre uma mudança conformacional, onde a “tampa” se desloca para a configuração aberta, expondo o seu sítio ativo e permitindo a ação da enzima (BASTIDA *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2011a; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019). A Figura 6 ilustra o conceito da ativação interfacial da lipase.

Figura 6 - Ativação interfacial da lipase.



Fonte: Adaptado de RAFIEE; REZAEI (2021).

As vantagens em se utilizar a adsorção física como método de imobilização é que se trata de uma metodologia simples, fácil, econômica, reversível e as alterações estruturais enzimática são pouco observadas propiciando a manutenção de uma alta atividade enzimática, porém pode ocorrer a dessorção da enzima, relacionada as alterações das condições do meio reacional como alterações do pH, da temperatura, da força iônica e do aumento das concentração de reagentes ou de produtos. Essa dessorção poderá ser reduzida ao se utilizar suportes hidrofóbicos, devido ao fortalecimento das interações hidrofóbicas entre a superfície do suporte com o sítio ativo da lipase imobilizada (ISMAIL; BAEK, 2020; MENDES *et al.*, 2011b; RAFIEE; REZAEI, 2021).

Na Tabela 5, têm-se alguns trabalhos que utilizaram a adsorção física a fim de se imobilizar lipases de diferentes fontes e a aplicação dos derivados obtidos em vários processos.

Tabela 5 - Imobilização de lipases por adsorção física e suas aplicações.

Fonte	Suporte	Aplicação	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i> – (Amano PS)	Polihidroxibutirato (PHB)	NA	CORREIA <i>et al.</i> , 2021
<i>Candida rugosa</i> – Type VII (Sigma-Aldrich)	Nanopartículas de SiO ₂	NA	MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2020
<i>Burkholderia cepacia</i>– (Amano PS)	Biocarvão de semente de goiaba	Transesterificação do óleo de coco bruto e etanol	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2020
<i>Thermomyces lanuginosus</i> – Lipozyme TL100L	Mesocarpus de babaçu (BM)	Produção de laurato de hexila	LIRA <i>et al.</i> , 2021
<i>Aspergillus niger</i> IOC 3677	Polietersulfona (PES)	NA	SOUZA <i>et al.</i> , 2019
<i>Thermomyces lanuginosus</i> – Lipozyme TL100L	Sílica funcionalizada com (3-aminopropil) trietoxissilano - 3-APTES (Amino-SiO ₂)	Síntese de ésteres cetílicos	MACHADO <i>et al.</i> , 2019
<i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-552	MANAE-agarose	Hidrólise de metilfenilacetato	FERREIRA <i>et al.</i> , 2018

NA= Não Informado

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

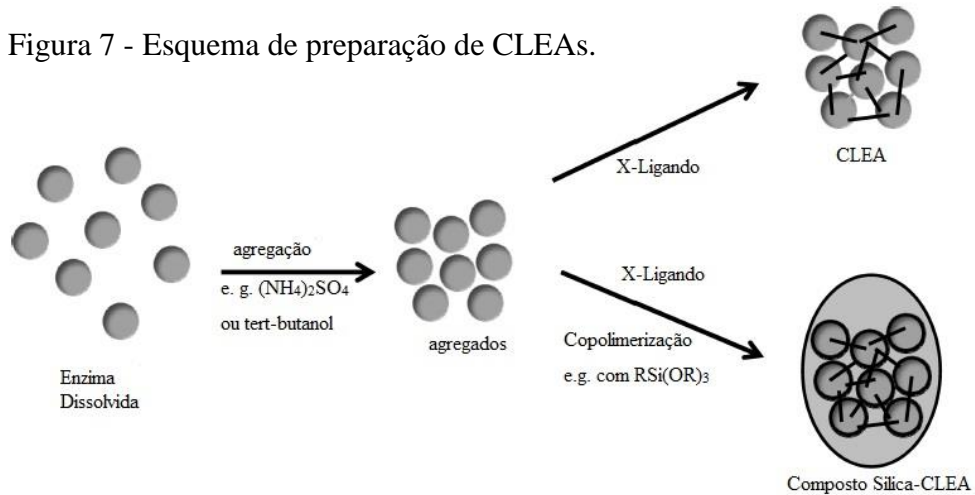
3.2.2 Reticulados enzimáticos (Cross-linking)

Os reticulados enzimáticos são conhecidos desde 1960, sendo que em 1990 os cristais de enzima reticulados (CLECs) foram incluídos em processos industriais como biocatalisadores pela Altus Biologics®, podendo ser a metodologia utilizada em diversas enzimas, tendo com vantagens para sua aplicação uma maior estabilidade térmica diante de meios com solventes orgânicos e com proteases (SHELDON, 2011a, 2011b). Os CLECs apresentam ainda, uma maior estabilidade operacional, melhor controle do tamanho da partícula, uma produtividade elevada, facilidade na recuperação e reutilização dos cristais, entretanto, a necessidade da cristalização da enzima, que é um processo difícil e oneroso, devido à necessidade de purificação da mesma, é um dos fatores limitantes para a utilização dos CLECs (SHELDON, 2011a, 2011b).

No intuito de substituir a imobilização via CLECs, desenvolveu-se os agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), que se tornaram um método de imobilização simples, barato, desenvolvido a partir de uma possível substituição da cristalização, por um processo precipitação de enzima sem a necessidade de se empregar enzimas com alto teor de pureza. No ano de 2000, houve a primeira publicação sobre CLEAs, sendo a empresa CLEA Technologies B.V, fundada em 2002, a responsável pela comercialização da tecnologia de imobilização via CLEAs (SHELDON, 2019).

Para a formação dos CLEAs é necessário a precipitação das enzimas através de adição de sais ou solventes orgânicos que sejam de preferência miscíveis em água ou polímeros não iônicos, fazendo com que o precipitado esteja ligado através de ligações, tais como, ligação iônica, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals, ou seja, ligações não covalentes. Ao se adicionar os reagentes biofuncionais, como por exemplo, glutaraldeído, bisdiazobenzidina, diisocianato de hexametileno, entre outros na solução, ocorre à formação das ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas da superfície da lipase (grupos amino livres de resíduos de lisina) tornando os agregados insolúveis. Na Figura 7, tem-se um esquema geral para preparação de CLEAs (JEGANNATHAN *et al.*, 2008; SHELDON, 2011a, 2011b).

Figura 7 - Esquema de preparação de CLEAs.



Fonte: Adaptado de SHELDON (2011a).

A imobilização de agregados por reticulação enzimática possui vantagens, tais como a possibilidade de se obter enzimas com alto grau de pureza ao final da preparação dos CLEAs, alta atividade enzimática volumétrica devido à alta concentração de enzimas, possibilidade de utilização de diferentes enzimas na reação ou utilização, estabilidade operacional e de armazenamento, baixo custo de produção decorrente da não necessidade de suportes sólidos e ainda facilidade de separação. Porém, o método de imobilização apresenta também algumas limitações como por exemplo, ao se utilizar a centrifugação ou filtração poderá ocorrer aumento dos CLEAs e a formação de um cluster, dificultando a transferência de massa e ainda, quando há pouca disponibilidade de resíduos de lisina na superfície da enzima, pode ocorrer uma baixa reticulação, ocasionando uma baixa estabilidade mecânica ou ainda a liberação da enzima no meio reacional (CRUZ *et al.*, 2012; MAFRA *et al.*, 2018; PERWEZ; AHMED MAZUMDER; SARDAR, 2019; TALEKAR *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2004).

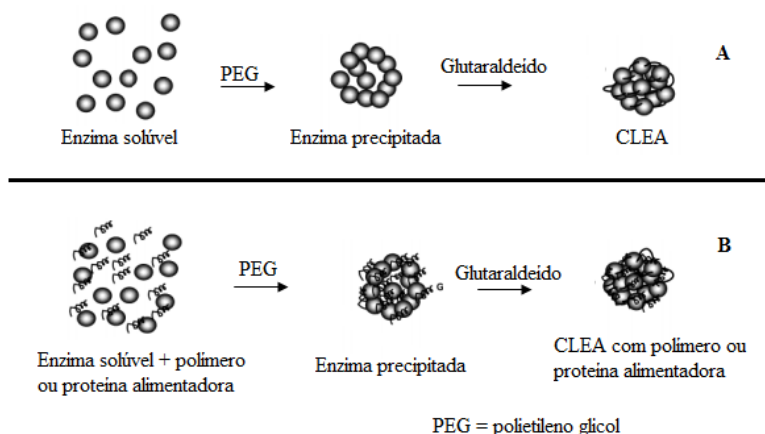
Para superar essas limitações e em situações onde há baixa concentração de proteína na solução enzimática ou alta concentração de glutaraldeído no meio, algumas estratégias foram desenvolvidas como a utilização de polímeros ricos em grupos aminos livres ou de uma proteína alimentadora rica em resíduo de lisina (co-agregados). Isso possibilita uma melhor reticulação e, conseqüentemente, uma melhor estabilidade mecânica, pois previne que a inativação enzimática ocorra devido à distorção estrutural da enzima e ainda previne a sua lixiviação. (CRUZ *et al.*, 2012; MAFRA *et al.*, 2018; MAHMUD *et al.*, 2016; PERWEZ; AHMED MAZUMDER; SARDAR, 2019; TALEKAR *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2004).

A finalidade principal da utilização de co-agregados é de melhorar a reticulação em enzimas pobres em grupos aminos. A diferença entre os polímeros e proteínas alimentadoras é que os polímeros são ricos em grupos aminos e são poli-iônicos, proporcionando maior estabilidade operacional, melhor reticulação, menor interação enzima-proteína e altas atividades aos CLEAs, evitando assim a dessorção. Estas propriedades estão relacionadas à mudança do meio reacional decorrente da partição dos solventes em volta da enzima (CRUZ *et al.*, 2012; SHELDON, 2019). Ao se utilizar proteínas alimentadoras, tem-se um aumento da atividade decorrente de uma melhor reticulação, uma melhor difusão intrapartículas, um aumento de ligações com o reagente biofuncional, e ao se utilizar resíduos agroindustriais como proteína alimentadora o processo torna-se ambiental e economicamente correto (ALVES *et al.*, 2021).

Alguns exemplos de polímeros utilizados como co-agregados são: polietilenoimina (PEI), pentaetileno-hexamina e polilisina. De proteínas alimentadoras são: albumina de soro bovina (BSA), clara de ovo de galinha, farinha de penas de galinha e proteína de soja (PSH) (GUIMARÃES *et al.*, 2018; SHELDON, 2019).

Na Figura 8, tem-se uma representação comparativa de uma preparação de agregado enzimático convencional e de um agregado enzimático com utilização de um polímero ou de uma proteína alimentadora.

Figura 8 - CLEA convencional (A); CLEA com utilização de polímero ou proteína alimentadora (B).



Fonte: Adaptado de WILSON *et al.* (2004).

Na Tabela 6 estão alguns exemplos da imobilização enzimática por CLEAs, nos quais foram utilizadas lipases de diferentes fontes e sua aplicação em processos variados.

Tabela 6 - Imobilização de lipases por CLEAs e suas aplicações

(continua)

Fonte	Agente Precipitante	Agente de reticulação	Aditivos	Aplicação	Rendimento e reutilização	Referências
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Sulfato de amônio e t-butanol	Glutaraldeído (50 mM)	BSA e amido	Síntese de ésteres de 5-hidroximetilfurfura 1 (HMF).	Conversão de 61,33%. Mais de 8 ciclos de reutilização de 12 h cada.	(SAIKIA <i>et al.</i> , 2021)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Eversa® Transform 2.0)	Etanol anidro	Glutaraldeído (50% v/v, em água)	PEI, amido e nanopartículas magnéticas	Produção de Biolubrificantes	Conversão de 90% em 72 h.	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2021)
<i>Aspergillus niger</i>	Sulfato de amônia	Glutaraldeído (25 mM)	NA	Epoxidação de óleo de capim-limão	Lipase-CLEAs reteve 65% de atividade até quatro ciclos de reutilização	(MULEY <i>et al.</i> , 2021)
<i>Aspergillus oryzae</i> ST11	Sulfato de amônia	Glutaraldeído (40 mM)	BSA	Produção de biodiesel	Conversão de 95% Retenção de atividade de 82,9% até 10 ciclos de reutilização	(PAITAID; H-KITTIKUN, 2020)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Eversa® Transform 2.0)	Etanol	Glutaraldeído (500 mM)	PEI, amido e nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos amino e octil	Produção de Biodiesel	Rendimento de 87,8 % após 12h de reação Reutilização em cinco ciclos de 12h	(MIRANDA <i>et al.</i> , 2020)

Tabela 6 - Imobilização de lipases por CLEAs e suas aplicações

(continuação)						
Fonte	Agente Precipitante	Agente de reticulação	Aditivos	Aplicação	Rendimento e reutilização	Referências
Pâncreas suíno tipo II (PPL), <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Etanol hidratado	Glutaraldeído	Proteína de soja e SDS	Etanólise do óleo de soja	Combinação CLEAs PPL e TLL rendimento de ésteres etílicos de 90,4% Reutilização em 5 ciclos de 6h	(RAMOS <i>et al.</i> , 2019)
<i>Candida antarctica</i> (CALB) expressa em <i>Pichia pastoris</i>	Isopropanol	Glutaraldeído (150 e 500 mmol L ⁻¹)	Substrato da síntese	Síntese de olvanil	Rendimento de 25%	(DIAZ-VIDAL <i>et al.</i> , 2019)
<i>Candida antarctica</i>	NA	Alginato de sódio oxidado	NA	Produção de biodiesel	Rendimento de 89 % e 5 ciclos de reutilização.	(JIN; XU; YU, 2019)
<i>Burkholderia ambifaria</i>	t-butanol	Glutaraldeído (0,25%)	NA	Resolução cinética de aminas	Produto enantiomericamente puro R-amida (ee > 99%)	(WANG; WU; HE, 2019)
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Sulfato de amônia saturado	Glutaraldeído (1,6% v/v)	Nanopartículas magnéticas modificadas com APTES	Resolução racêmica de álcoois secundários	Conversão de 50% dos ésteres e reutilização em 10 ciclos de 48 h cada	(XING <i>et al.</i> , 2019)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Acetona (4 mL)	Glutaraldeído (0,075M)	BSA e triton X-100	Produção de ésteres metílicos	Rendimento de 92,3 %	(PILIGAEV <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhizomucor miehei.</i>	Sulfato de amônio saturado	Glutaraldeído (1,6 % v/v)	Nanopartículas magnéticas funcionalizado com APTES	Síntese de biodiesel	Rendimento 93% e reutilização em 5 ciclos de 48 h cada.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2017)

Tabela 6 - Imobilização de lipases por CLEAs e suas aplicações

(conclusão)						
Fonte	Agente Precipitante	Agente de reticulação	Aditivos	Aplicação	Rendimento e reutilização	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sulfato de amônio saturado	Glutaraldeído (1,6% v/v)	Tween 80 e nanopartículas de magnetita funcionalizadas com amino	Síntese de biodiesel	Rendimento de 88% e reutilização em 10 ciclos de 48 h cada.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2015)
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	NA	NA	NA	Oxidação quimioenzimática Baeyer-Villiger de ciclohexanona para ϵ -caprolactona	Rendimento de 88%	(CHÁVEZ <i>et al.</i> , 2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Carbonato de dimetila	Glutaraldeído (3,6 % v/v)	Partículas magnéticas recobertas com silicone funcionalizados com grupos amino	Síntese de carbonato de glicerol	Rendimento de 55% e reutilização em 20 ciclos sucessivos.	(TUDORACHE <i>et al.</i> , 2013)
<i>Geotrichum sp.</i>	Acetona	Glutaraldeído (90 μ l)	PEI	Hidrolise de óleo de peixe para enriquecimento de ácidos graxos poli-insaturados	Conversão 42% e reutilização em 5 ciclos com 4 h cada.	(YAN <i>et al.</i> , 2012)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme)	PEG 600	Glutaraldeído (1,5% v/v)	D-sorbierita	Síntese de sacarose-6-acetato	Rendimento de 87,46%	(YANG <i>et al.</i> , 2012)

NA= Não informado PEI = Polietilenoimina; BSA =Albumina de soro bovino; APTES = 3-aminopropiltriétoxissilano; SDS = Dodecil sulfato de sódio.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados os materiais e as metodologias utilizados para realização dos experimentos.

4.1 MATERIAIS

A goma arábica foi adquirida da Synth® (São Paulo, SP, Brasil). O óleo de oliva foi adquirido no mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Os meios de cultivo foram adquiridos da Himedia (Sumaré, SP, Brasil). O PEI e a BSA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e a PSH foi adquirida de um mercado local. Todos os outros reagentes químicos e solventes orgânicos eram de qualidade analítica e foram adquiridos da Synth® (São Paulo, SP, Brasil).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Micro-organismo

A lipase foi obtida através do cultivo submerso de uma cepa do micro-organismo *G. candidum* da linhagem NRRL Y-552, disponível no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. O fungo foi armazenado em placas de petri de ágar extrato de malte (MEA) a temperatura de 4°C por 15 dias. Ao final deste período o mesmo foi repicado em uma nova placa de MEA de modo a não perder a sua viabilidade.

4.2.2 Produção de lipases

O *G. candidum* foi mantido no meio ágar extrato de malte (MEA), para sua manutenção a temperatura de 5°C, sendo que o meio era constituído por 2% (m/v) de extrato de malte, 0,5% (m/v) de peptona de caseína, 1,5% (m/v) de ágar. Para sua reativação, foi feito o repique para o meio *Sabouraud* dextrose ágar (SDA) e sua incubação a temperatura de 30°C por 48 horas. Após o crescimento, foi retirado uma área circular de 5 mm de diâmetro da placa de SDA contendo o micro-organismo crescido e transferida para um erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL do meio de inóculo previamente esterilizado. Na sequência os erlenmeyers foram incubados em um shaker a temperatura de 30°C por 24 horas sob

constante agitação de 250 rpm. Na Tabela 7, tem-se a descrição dos componentes utilizados no meio de inóculo, de acordo com estudos anteriores realizados para a produção de lipases pelo *G. candidum* (CASTRO *et al.*, 2016).

Tabela 7 - Composição do meio de inóculo para a produção de lipases pelo *G.candidum*

Meio de Inóculo	Quantidade
Peptona de caseína	2,00 % (m/v)
Extrato de levedura	0,10 % (m/v)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	0,05 % (m/v)
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,05 % (m/v)
Óleo de soja	1,00 % (v/v)

Fonte: CASTRO *et al.*, 2016.

A produção de lipases foi realizada por cultivo submerso, utilizando-se erlenmeyers de 1000 mL, com 90 mL de meio de produção previamente esterilizado e 10 mL do meio de inóculo após a fermentação. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C, por 48 horas, sob agitação constante de 250 rpm em shaker orbital de piso (SOLAB). Na Tabela 8, têm-se componentes utilizados no meio de produção de lipases, previamente otimizados por Castro *et al.* (2016) para a produção da lipases pelo *G. candidum* por cultivo submerso.

Tabela 8 - Composição do meio de produção para lipases pelo *G. candidum*

Meio de produção de lipases	Quantidade
Peptona de caseína	3,0 % (m/v)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	0,1 % (m/v)
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,1% (m/v)
Óleo de soja	1,5% (v/v)

Fonte: CASTRO *et al.*, 2016.

Após 48 horas de fermentação, o caldo de cultivo foi filtrado à vácuo com papel de filtro, sendo que o caldo filtrado foi denominado extrato enzimático (pH 6,0) sendo submetido a determinação de atividade enzimática. O extrato enzimático foi ainda concentrado, utilizando-se o liofilizador (LioBrás) até alcançar um terço do seu volume inicial. Após essa etapa o extrato já concentrado foi armazenado a - 5°C para utilização posterior.

4.2.3 Escolha do agente precipitante

Os solventes, acetona, metiletilcetona, álcool n-propílico, álcool etílico absoluto, álcool isopropílico, álcool metílico, álcool n-butílico, álcool 2-butílico foram avaliados como agentes precipitantes para a lipase previamente concentrada do extrato enzimático (KARTAL; KILINC, 2012; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006; ZHAO *et al.*, 2008).

O agente precipitante foi resfriado a 8°C por 30 min. O extrato enzimático também foi resfriado a 8°C em separado. Após esse tempo, adicionou-se a proporção de 1:2 de extrato enzimático para o agente precipitante que foram então agitados em shaker a 8°C a 150 rpm por 30 min. Ao final do tempo, foi realizada a centrifugação a 14000 rpm, por 5 minutos a 8°C. Após a centrifugação, o sobrenadante e precipitado foram separados e o precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 e 100 mM. Para ambas as fases foram determinadas a atividade enzimática e a concentração de proteína presente, para o cálculo da atividade recuperada relativa.

Para o álcool iso-propílico e acetona foram realizados ainda ensaios utilizando-se a temperatura de 4°C e a proporção 1:3 de extrato enzimático:solvente (ALVES *et al.*, 2021; MIRANDA *et al.*, 2020). As demais etapas foram similares as já descritas acima.

4.2.4 Preparação dos CLEAs

A precipitação da lipase presente no extrato enzimático com acetona foi realizada a 4°C, 150 rpm por 30 min, utilizando-se a proporção de 1:3 (v/v) em relação ao extrato enzimático e o agente precipitante. Na etapa de precipitação ainda foram adicionados os aditivos, conhecidos como co-alimentadores (BSA e PSH), um co-agregador (PEI), e um surfactante (SDS) em diferentes proporções (ver item 4.2.5 Otimização da preparação dos CLEAs). Após a etapa de precipitação, o agente de reticulação (glutaraldeído) foi adicionado à mistura e mantido por 60 min sob agitação de 150 rpm e 4°C. Em seguida a centrifugação

ocorreu a 4000 rpm, por 10 min a 4°C para a separação do precipitado reticulado (CLEAs). Os CLEAs foram lavados com tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM por duas vezes seguidas, repetindo-se as etapas de centrifugação e separação do sobrenadante. Ao final os CLEAs formados foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio (pH 7,0 e 100 mM). Foram determinadas as atividades enzimáticas das soluções iniciais da enzima, dos CLEAs e do sobrenadante, e dos sobrenadantes resultantes das etapas de lavagem.

4.2.5 Otimização da preparação dos CLEAs

Para a otimização da preparação dos CLEAs da lipase de *G. candidum* com a adição de BSA, PEI e PSH foram avaliados individualmente alguns parâmetros que foram descritos como sendo importantes na formação dos CLEAs, tais como concentração do glutaraldeído, proporção dos aditivos empregados, tempo de reticulação e pH do extrato enzimático, (CUI; LI; BIAN, 2013; SHELDON, 2007).

O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração de glutaraldeído que variou de 5, 10, 20 a 30 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína total presente no sistema (lipase + co-alimentador) (RAMOS *et al.*, 2018). Assim, a concentração de glutaraldeído foi calculada e adicionada em relação à quantidade total de proteína presente em cada ensaio, observando-se as concentrações desejadas. Para esses ensaios os aditivos BSA, PEI e PSH foram fixados na proporção de 1:3 (m/m) (proteína:aditivo) em relação à proteína (lipase) presente no extrato enzimático. O tempo de reticulação foi fixado em 60 min.

Após a finalização desta etapa, a melhor concentração de glutaraldeído foi determinada e houve a variação da proporção dos aditivos de 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 a 1:10 (m/m) em relação a proteína (lipase) presente no extrato enzimático e o aditivo utilizado (ALVES *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2012). Para esses ensaios a concentração do glutaraldeído foi mantida fixa.

O estudo da adição do surfactante SDS ocorreu para os melhores resultados encontrados para os ensaios anteriores, sendo que foram estudadas as proporções de SDS de 0,10%, 0,50%, 1,00%, 1,50%, 2,00% (m/v do extrato enzimático) (GUPTA *et al.*, 2009). Nesses ensaios a concentração do glutaraldeído e a proporção dos aditivos foram mantidas fixas.

Ainda, para os melhores resultados obtidos foram estudados diferentes tempo de reticulação de 60, 120 e 240 minutos e a variação do pH do extrato enzimático de 6,0 para 7,0, (SAMPATH; BELUR; IYYASAMI, 2018).

Os cálculos dos parâmetros utilizados para medir a eficiência do processo de formação dos CLEAs foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Guimarães *et al.* (2018) e Ramos *et al.* (2018). Os parâmetros de rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada relativa (AR) e rendimento global (RG) para os CLEAs obtidos, foram calculados pelas Equações abaixo:

Rendimento de imobilização:

$$RI (\%) = \frac{A_i - (A_{sobrenadante} + A_{lavagem\ do\ sobrenadante})}{A_i} \times 100 \quad (1)$$

Atividade recuperada relativa para o sobrenadante da precipitação:

$$AR (\%) = \frac{A_{sobrenadante}}{A_i} \times 100 \quad (2)$$

Atividade recuperada relativa para o sobrenadante das etapas de lavagem:

$$AR (\%) = \frac{A_{lavagem\ do\ sobrenadante}}{A_i} \times 100 \quad (3)$$

Rendimento global para os CLEAs formados:

$$RG (\%) = \frac{A_{CLEAs}}{A_i} \times 100 \quad (4)$$

Onde A_i é a atividade inicial, $A_{sobrenadante}$ é a atividade do sobrenadante, $A_{lavagem\ do\ sobrenadante}$ é a atividade da lavagem do sobrenadante e A_{CLEAs} é a atividade dos CLEAs.

4.2.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática dos extratos enzimáticos e dos CLEAs foi determinada utilizando-se o método de hidrólise da emulsão com azeite de oliva descrito por Soares *et al.* (1999). O substrato era constituído por goma arábica e azeite de oliva na proporção de 1:1 sendo adicionado 7% (m/v) de goma arábica em relação à proporção de azeite. Foram adicionados 5,0 mL do substrato, 4,0 mL de tampão fosfato de sódio a pH 7,0 e 100 mM e 1,0 mL do extrato enzimático, sobrenadantes ou dos CLEAs em um erlenmeyer de 125 mL, sendo o mesmo incubado em shaker orbital no tempo de 5 minutos a 37°C e 200 rpm de agitação. Para interromper o processo de hidrólise, foram adicionados 10 mL de solução de acetona:etanol, na proporção de 1:1, que tem por finalidade desnaturar as enzimas presentes,

parando a reação. A determinação da atividade enzimática foi realizada a partir da titulação dos ácidos graxos liberados na reação com NaOH 20 mM usando a fenolftaleína como indicador de pH da reação. A solução de NaOH havia sido previamente padronizada com biftalato de potássio. O branco da reação foi realizado utilizando-se o tampão fosfato ou o meio de produção da lipase previamente autoclavados.

A atividade enzimática foi determinada pela Equação (5), onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições descritas do ensaio.

Atividade enzimática:

$$A \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(V_a - V_b) \times M_{NaOH} \times 1000}{t \times V} \quad (5)$$

Sendo V_a o volume de NaOH utilizado para amostra (mL); V_b o volume de NaOH utilizado para branco (mL); M_{NaOH} é a concentração molar do NaOH (M); t é o tempo da reação (min); V o volume da amostra (mL).

4.2.7 Determinação da quantidade de proteínas

A determinação da quantidade de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, (1976).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, estão apresentados os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados.

5.1 PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTIVO SUBMERSO

As lipases foram produzidas por cultivo submerso e ao final de 48 h, apresentaram uma atividade hidrolítica de 22,10 U/mL. Após a concentração do extrato enzimático, o mesmo apresentou atividade de 49,71 U/mL e pH 6,0, sendo este utilizado para os ensaios subsequentes.

5.2 ESCOLHA DO AGENTE PRECIPITANTE

Geralmente, a formação de CLEAs inclui duas etapas distintas. A primeira envolve a agregação física da enzima por um agente precipitante e a segunda visa estabelecer ainda mais as ligações químicas entre as enzimas por meio da reticulação, utilizando agentes reticulantes. A adição nas soluções enzimáticas de sais, solventes orgânicos ou polímeros não iônicos pode induzir a agregação das moléculas de proteína, alterando o estado de hidratação das moléculas ou alterando a constante eletrostática da solução. Entretanto, devido às diferentes propriedades bioquímicas e estruturais das enzimas, o melhor precipitante pode variar de uma enzima para outra, sendo necessário a realização de ensaios para a busca do melhor agente precipitante para cada processo de preparação dos CLEAs (CUI; JIA, 2015).

Dessa forma, os solventes, acetona, metiletilcetona, álcool n-propílico, álcool etílico absoluto, álcool isopropílico, álcool metílico, álcool n-butílico e álcool 2-butílico foram estudados como agentes precipitantes para a lipase de *G. candidum*. Os resultados obtidos, expressos em atividade recuperada relativa (%) tanto para o precipitado ressuspendido quanto para o sobrenadante, encontram-se nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

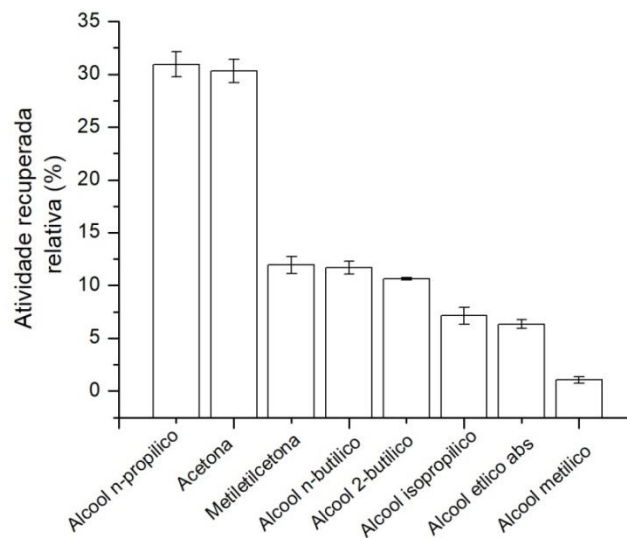
Os solventes, álcool n-propílico e acetona apresentam uma maior atividade recuperada relativa para os precipitados ($30,96 \pm 1,20$ e $30,32 \pm 1,10$ %, respectivamente) dentre os solventes estudados. Os diferentes rendimentos de precipitação podem ser explicados pelos diferentes mecanismos de agregação de cada precipitante (alterações no estado de hidratação das moléculas, ou alterações na constante dielétrica da solução) (CUI; JIA, 2015).

Praticamente não foi encontrada nenhuma atividade recuperada ($< 0,05$ %) na fase sobrenadante, resultante do processo de precipitação. É bem conhecido que os solventes

orgânicos miscíveis em água podem acarretar a desnaturação das enzimas, levando à perda de sua atividade e, também à redução do rendimento da atividade recuperada dos precipitados resultantes (LIMA; ANGNES, 1999).

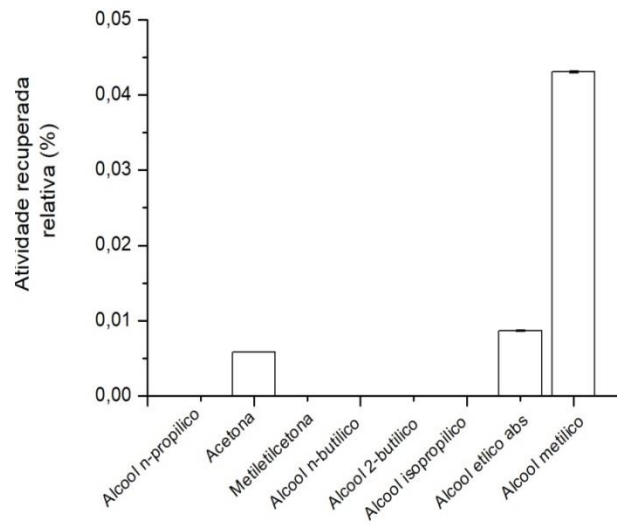
O mesmo comportamento também foi observado quando foram utilizados os solventes imiscíveis em água (sistema bifásico líquido-líquido). Uma possível explicação para isso é que a enzima na fase aquosa poderia entrar em contato com o solvente orgânico na interface do sistema líquido-líquido, causando assim a sua desnaturação (SCOPES, 1994).

Figura 9 - Atividade recuperada relativa (%) obtida para os precipitados ressuspensos. Foi utilizada a proporção de 1:2 de extrato enzimático:solvente e a precipitação ocorreu à 8°C por 30 min sob agitação, seguida por centrifugação à 8°C a 14000 rpm por 5 min.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

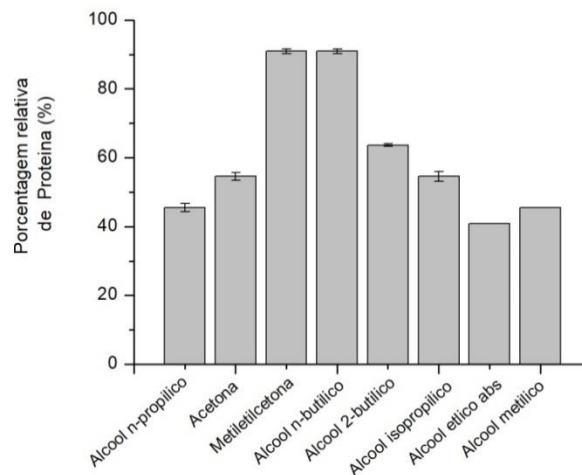
Figura 10 - Atividade recuperada relativa (%) obtida para os sobrenadantes. Foi utilizada a proporção de 1:2 de extrato enzimático:solvente e a precipitação ocorreu à 8°C por 30 min sob agitação, seguida por centrifugação à 8°C a 14000 rpm por 5 min.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para os sobrenadantes resultantes da etapa de precipitação foi ainda determinada a porcentagem relativa de proteína, que correspondeu a quantidade de proteína que não precipitou com a ação do agente de precipitação (Figura 11).

Figura 11 - Porcentagem relativa de proteína detectada no sobrenadante após a precipitação. Foi utilizada a proporção de 1:2 de extrato enzimático:solvente e a precipitação ocorreu à 8°C por 30 min sob agitação, seguida por centrifugação à 8°C a 14000 por 5 min.

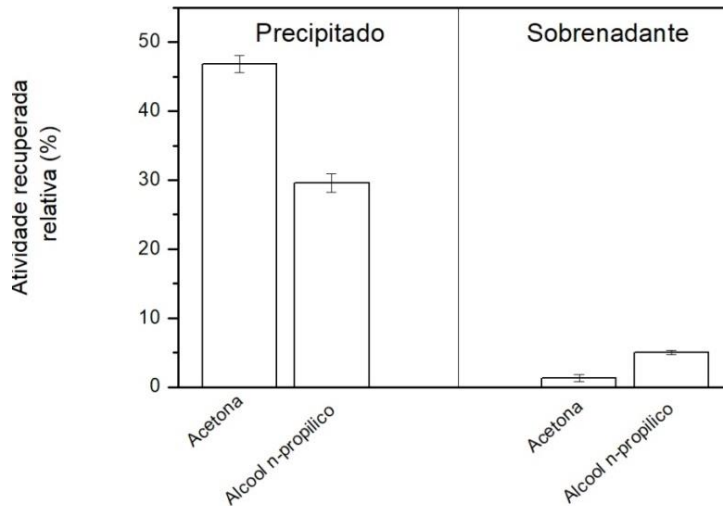


Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Observou-se que à exceção dos álcoois n-propílico, etílico e metílico, para os demais solventes utilizados, mais de 50% das proteínas permaneceram na fase do sobrenadante após a precipitação. Entretanto, apesar dos sobrenadantes possuírem uma elevada quantidade de proteína verificou-se que não havia praticamente atividade enzimática nessa fase (ver Figura 10). Conforme explicado anteriormente, a diminuição da atividade enzimática da lipase na fase sobrenadante pode estar relacionada à inativação ou desnaturação enzimática, decorrentes da ação do solvente orgânico empregado (KAMAL *et al.*, 2013; LIMA; ANGNES, 1999).

Uma vez que a quantidade de proteína precipitada e a atividade recuperada relativa para o precipitado ressuspendido estavam abaixo de 50%, novos ensaios foram realizados para os solventes acetona e álcool n-propílico, que foram os solventes para os quais foram encontradas as melhores atividades recuperadas relativas. A nova temperatura utilizada foi de 4°C para a etapa de precipitação e aumentou-se a quantidade de solvente empregado (proporção 1:3 de extrato enzimático:solvente). A Figura 12 apresenta a atividade recuperada relativa encontrada para os novos ensaios.

Figura 12 - Atividade recuperada relativa para o precipitado ressuspensionado e o sobrenadante após a precipitação. Foi utilizada a proporção de 1:3 de extrato enzimático:solvente e a precipitação ocorreu à 4°C por 30 min sob agitação, seguida por centrifugação à 4°C a 14000 rpm por 5 min.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Conforme explicado anteriormente, as interações do solvente com as zonas hidrofóbicas da proteína causam por vezes uma desnaturação irreversível da mesma. A redução da temperatura de precipitação até valores próximos a 0°C pode ajudar a manter a estrutura proteica, pois em temperaturas baixas a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo assim a capacidade de penetração do solvente (KAMAL *et al.*, 2013; LIMA; ANGNES, 1999; SCOPES, 1994).

Verificou-se que somente para a acetona houve um aumento da atividade recuperada relativa nas novas condições empregadas que chegou a $46,82 \pm 1,21$ % e houve a precipitação de $53,50 \pm 1,10$ % da quantidade inicial de proteína. Para o álcool n-propílico a atividade recuperada relativa de $29,59 \pm 1,34$ % permaneceu muito próxima da obtida no ensaio anterior ($30,96 \pm 1,20$ %) sendo obtida a precipitação de $43,58 \pm 1,12$ % da quantidade inicial de proteína presente no extrato enzimático. Assim a acetona por apresentar melhor atividade recuperada e maior precipitação de proteína, foi escolhida como agente precipitante na proporção de 1:3 de extrato enzimático: solvente sendo a temperatura de 4°C utilizada para os experimentos posteriores.

5.3 PREPARAÇÕES DOS CLEAs

A precipitação da lipase de *G. candidum* foi realizada utilizando-se a acetona como agente precipitante e glutaraldeído como agente reticulante. Após a precipitação, os CLEAs formados foram lavados por duas vezes com tampão fosfato pH 7,0, 100 mM. Embora tenha sido observada a formação de CLEAs, os precipitados formados não apresentaram atividade, tampouco o sobrenadante ou as soluções de lavagem (dados não mostrados). Acredita-se que a alta concentração de glutaraldeído utilizada (75 μmol de grupos aldeídos/ mg de proteína) tenha sido a responsável pela perda da atividade enzimática nos precipitados.

O processo de reticulação ocorre por meio da reação dos grupos amino livres de resíduos de lisina na superfície de moléculas enzimáticas vizinhas (SHELDON, 2011a). Em alguns casos, no entanto, descobriu-se que a concentração de glutaraldeído em excesso pode modificar alguns grupamentos amino que são essenciais, resultando em CLEAs com perda de atividade (MATEO *et al.*, 2004). Shah; Sharma; Gupta (2006) relataram que os CLEAs preparados com a lipase de *Pseudomonas cepacia* e glutaraldeído retiveram apenas 0,4 % da atividade relativa inicial (enzima livre). Ramos *et al.* (2018) reportaram que os CLEAs da lipase pancreática suína entrecruzado com glutaraldeído retiveram somente 3,5 % da atividade relativa inicial (enzima livre).

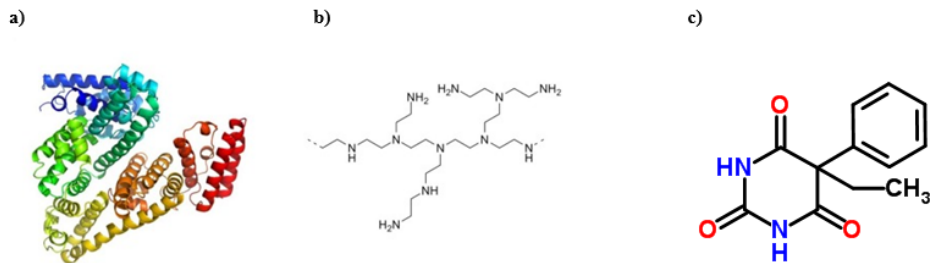
Além disso, a falta de resíduos de lisina em quantidade suficiente para uma correta reticulação com o glutaraldeído pode também resultar em CLEAs instáveis e/ou inativos. A lipase de *G. candidum* possui 462 resíduos de aminoácidos, incluindo 16 resíduos de lisina (TSUJISAKA; IWAI; TOMINAGA, 1973), o que é considerado pouco para a reticulação. É bem documentado que proteínas ricas em lisina (chamadas de co-alimentadores) ou polímeros ricos em grupos aminos livres podem facilitar a preparação de CLEAs de enzimas que apresentam baixa concentração de grupos amino superficiais (necessários para o entrecruzamento) evitando sua inativação e prevenindo sua lixiviação (CRUZ *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2018; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006). Ainda as proteínas adicionadas podem auxiliar na formação dos CLEAs no caso de uma baixa concentração de proteínas no extrato enzimático (SHELDON, 2011b).

A imobilização e a atividade enzimática dos CLEAs depende fortemente do tempo de incubação da etapa de reticulação, da razão glutaraldeído/enzima, do pH e da temperatura do meio (SHELDON, 2011a; SHELDON, 2011b). Além disso, na literatura existe apenas um único estudo de Yan *et al* (2012) para a lipase de *Geotrichum* sp., utilizando o polímero PEI,

para a formação de CLEAs. Os autores ressaltaram que a utilização deste aditivo possibilitou a formação de CLEAs mais ativos e estáveis.

Dessa forma, decidiu-se que seria adicionado um aditivo (BSA, PSH ou PEI) para a formação dos CLEAs para a lipase de *G. candidum* e que seriam avaliados individualmente os fatores: concentração do agente reticulante, proporção de adição de BSA, PSH e PEI, adição de surfactante (SDS), tempo de reticulação e pH do extrato enzimático. Na Figura 13, tem-se a representa em 3D do BSA e das estruturas moleculares do PEI e PSH.

Figura 13 - (a) Albumina de soro bovino (BSA); (b) Polietilenoimina (PEI); (c) Isolado de proteína de soja.



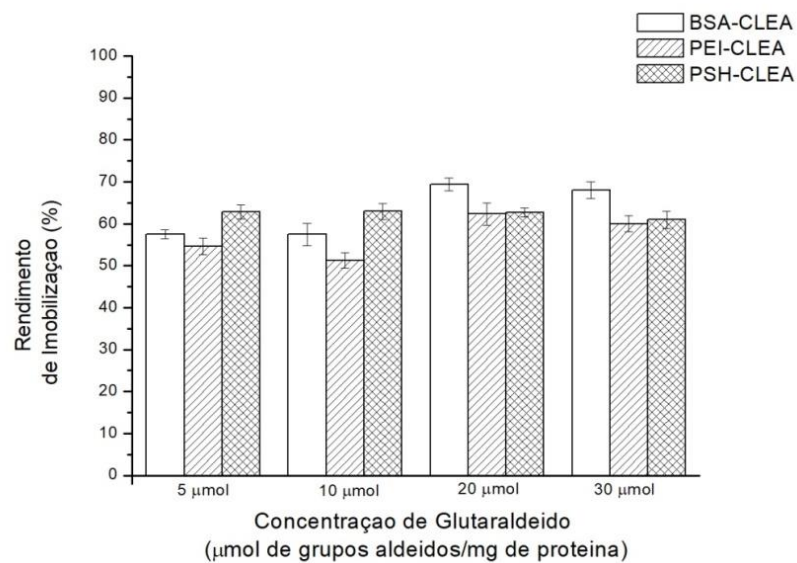
Fonte: (ORIŇAKOVÁ *et al.*, 2020; ChemSrc, 2022).

5.3.1 Variação da concentração do agente reticulante

A variação da concentração do agente reticulante (glutaraldeído) foi avaliada para a formação de CLEAs, sendo utilizadas diferentes concentrações de glutaraldeído 5, 10, 20, 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína total. Uma vez que os CLEAs obtidos apenas com as lipases presentes no extrato enzimático não apresentaram atividade recuperada, e que a quantidade de proteína presente no extrato era pequena (0,24 mg de proteína/mL de caldo) foram utilizados dois co-alimentadores distintos (BSA, PSH) e um polímero (PEI) para aumentar a quantidade inicial de proteínas no caso dos co-alimentadores e/ou de resíduos de lisinas. A proporção de BSA, PSH e PEI foi fixa em 1:3 m/m de lipase:aditivo.

Na Figura 14 observa-se que os CLEAs obtidos com 20 e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína apresentam os melhores resultados de rendimento de imobilização utilizando-se a BSA e o PEI. Para os CLEAs com PSH não houve variação significativa do rendimento de imobilização com a variação da concentração de grupos aldeídos, pois os resultados obtidos foram muito similares.

Figura 14 - Rendimento de imobilização para os CLEAs, obtidos a partir das lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



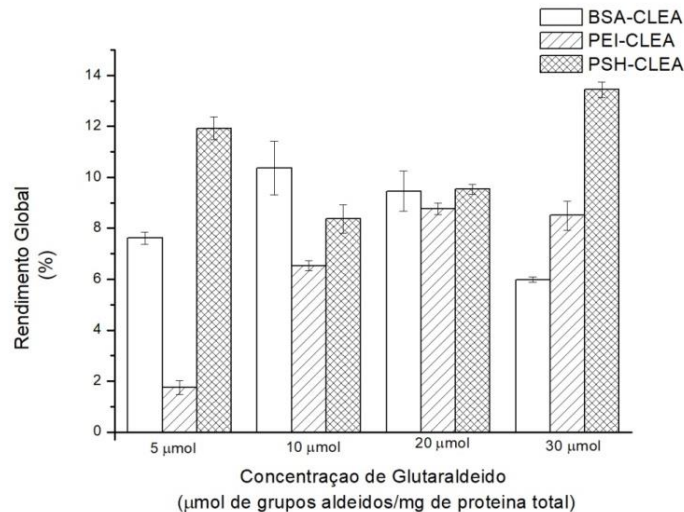
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os menores valores de rendimento de imobilização, foram observados nas concentrações de 5 e 10 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para formação de BSA-CLEAs e de PEI-CLEAs. Isto pode estar relacionado a um menor número de ligações cruzadas intermoleculares entre os grupos aminos livres presente na superfície de moléculas enzimáticas, dificultando a formação das estruturas dos CLEAs (AMARAL-FONSECA *et al.*, 2018; JEGANNATHAN *et al.*, 2008; SHELDON, 2011b). Dessa forma, uma menor quantidade de proteínas reticuladas, trouxe consequentemente, uma maior lixiviação das enzimas na primeira lavagem (Tabela 7).

Para todos os CLEAs também foi calculado o rendimento global (RG), que é a atividade retida pelos CLEAs em relação à atividade total inicial do extrato enzimático utilizada para cada ensaio. Analisando a Figura 15 observa-se que o melhor rendimento global dos BSA-CLEAs foi obtido para a concentração de 10 µmol de grupos aldeídos/mg de

proteína ($10,36 \pm 1,05$ %). Para os PEI-CLEAs, o melhor rendimento global observado foi para a concentração de 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína ($8,77 \pm 0,23$ %) e por fim, para os PSH-CLEAs o melhor rendimento global foi obtido para a concentração de 30 μmol ($13,44 \pm 0,30$ %).

Figura 15 - Rendimento global para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A introdução dos agentes aditivos proporcionou a formação de CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs) com atividade enzimática para todas as concentrações de glutaraldeído estudadas, o que foi um bom resultado uma vez que no ensaio anterior não foram obtidos CLEAs com atividade para o extrato enzimático contendo apenas a lipase de *G. candidum*. Entretanto, foi possível observar que para as menores concentrações de glutaraldeído (5 e 10 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína) houve uma maior perda de

enzimas na primeira lavagem (Tabela 7), por lixiviação, sendo obtidas atividades recuperadas relativas significativas da ordem de 32 a 43% em relação a atividade presente no extrato enzimático utilizado em cada ensaio. A perda de atividade por lixiviação na primeira lavagem decresceu para os ensaios com BSA e PEI à medida que se aumentou a concentração de glutaraldeído empregado, mas ainda assim as atividades encontradas foram elevadas (24 a 34 %).

Uma possível explicação para esse comportamento é o tempo utilizado para a etapa de entrecruzamento. Essa etapa é muito importante na preparação de CLEAs, e uma vez que um pequeno tempo de reticulação pode permitir a lixiviação da enzima, um tempo superior pode promover um excesso de entrecruzamento e conseqüente diminuição do rendimento global (SHELDON, 2011b), devendo o mesmo ser avaliado na seqüência deste estudo.

Ainda foi possível observar que para todos os ensaios realizados não foi detectado a atividade recuperada relativa no sobrenadante após a etapa de entrecruzamento, pois conforme discutido anteriormente o solvente empregado como agente precipitante favorece a desnaturação das proteínas que não precipitaram.

Levando-se em consideração os resultados obtidos para o rendimento de imobilização e rendimento global, novos ensaios variando-se a proporção de aditivos para a formação dos CLEAs foram realizados visando diminuir a lixiviação da lipase e aumento do rendimento global, utilizando-se as concentrações de 20 ou 30 μmol de grupos aldeídos/ mg de proteína total.

Tabela 7 - Atividade recuperada relativa para os sobrenadantes e primeira e segunda solução de lavagem, obtidos a partir dos CLEAs de lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo).

Concentração de Glutaraldeído (grupos aldeídos/mg de proteína)		Atividade Recuperada Relativa (%)		
		BSA	PEI	PSH
5 μmol	Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	1ª lavagem	39,46 \pm 0,37	42,71 \pm 2,53	33,94 \pm 0,08
	2ª lavagem	2,97 \pm 0,04	2,68 \pm 0,31	3,23 \pm 0,29
10 μmol	Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	1ª lavagem	36,09 \pm 1,23	43,47 \pm 2,22	32,35 \pm 2,17
	2ª lavagem	6,50 \pm 0,37	5,25 \pm 0,58	4,70 \pm 0,70
20 μmol	Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	1ª lavagem	24,24 \pm 1,04	32,82 \pm 2,13	32,72 \pm 0,16
	2ª lavagem	6,39 \pm 0,11	4,85 \pm 1,51	4,58 \pm 0,41

(continua)

Tabela 7 - Atividade recuperada relativa para os sobrenadantes e primeira e segunda solução de lavagem, obtidos a partir dos CLEAs de lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de glutaraldeído e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 de lipase:aditivo).

Concentração de Glutaraldeído (grupos aldeídos/mg de proteína)		Atividade Recuperada Relativa (%)		
		BSA	PEI	PSH
30 μ mol	Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	1 ^a lavagem	26,18 \pm 1,93	33,39 \pm 0,84	34,07 \pm 0,86
	2 ^a lavagem	3,38 \pm 0,23	8,40 \pm 0,27	6,67 \pm 0,04

(conclusão)

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.3.2 Variação da proporção de aditivos (BSA, PEI e PSH)

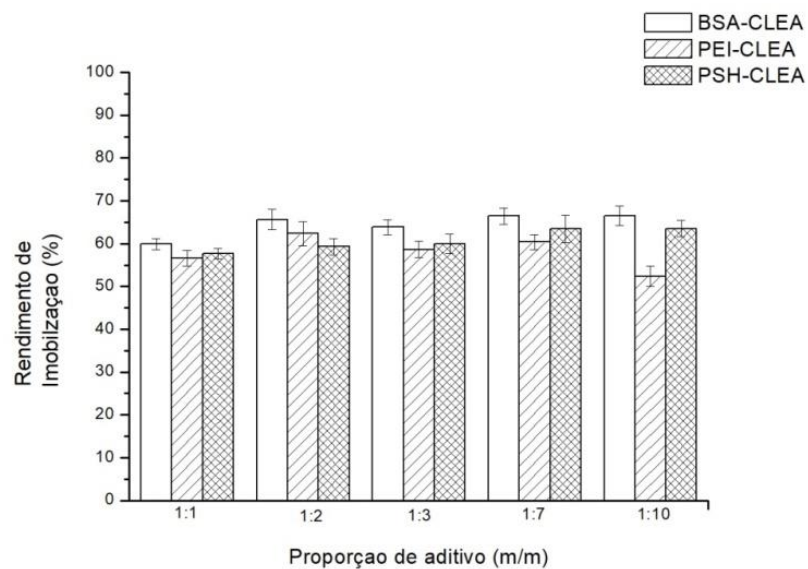
A influência da proporção dos aditivos em relação à quantidade de proteína (lipase) presente no extrato enzimático foi avaliada para a formação dos CLEAs. Foram utilizados como co-alimentadores a BSA e o PHS e o polímero PEI (co-agregador) nas seguintes proporções 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10 m/m (lipase:aditivo).

A concentração de glutaraldeído contida no sistema foi mantida fixa. Para os BSA-CLEAs e PEI-CLEAS foi utilizado a concentração de 20 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína e para os PHS-CLEAs, 30 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína. Esta escolha ocorreu a partir das análises dos melhores rendimentos globais e atividade relativa para as etapas de lavagem, para os dados obtidos na seção 5.3.1.

Analisando a Figura 16, observou-se que o rendimento de imobilização utilizando-se a BSA para a formação de CLEAs não foi influenciado para as proporções de 1:2 a 1:10 m/m, pois os valores encontrados são similares levando-se em conta a barra de erros. Na menor proporção de BSA utilizada (1:1 m/m) foi observado um menor rendimento de imobilização (59,91 \pm 1,30 %). Entretanto, observou-se que o rendimento global (Figura 17) foi afetado pelas proporções estudadas. O melhor rendimento global para os BSA-CLEAs foi de 9,47 \pm 0,11 % na proporção de 1:3 m/m (lipase: BSA). Para proporções maiores que 1:3 houve um decréscimo do rendimento global, esse resultado está de acordo com Cui, Lui e Li (2016) que estudaram a formação de CLEAs da lipase pancreática suína com BSA e com Sampath *et al.* (2018) que estudaram a influência da BSA na formação de CLEAs para a lipase de *Candida rugosa*. Ambos reportaram que um aumento na proporção de BSA levaram à diminuição da recuperação da atividade dos CLEAs formados, possivelmente devido à formação de clusters com limitações de transferência de massa.

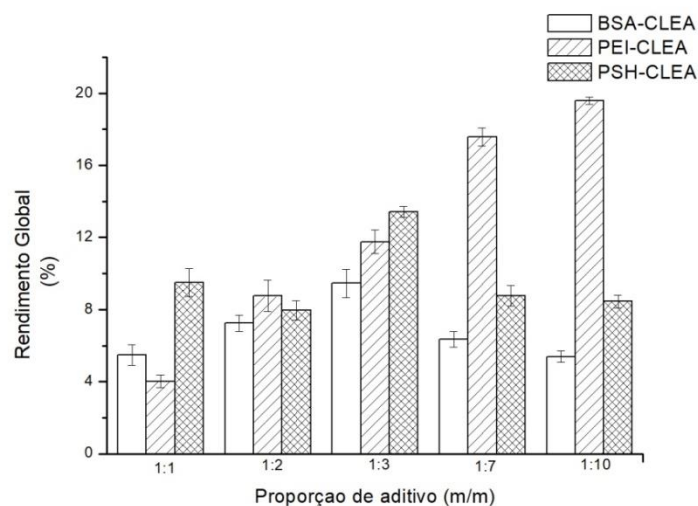
A BSA é formada por 583 aminoácidos, sendo um polipeptídeo de cadeia única, possuindo massa molecular de 66 kDa (HUANG *et al.*, 2022; ORIŇAKOVÁ *et al.*, 2020). A lipase de *G. candidum* possui massa molecular de 60 kDa, reforçando assim a hipótese de limitação por transferência de massa.

Figura 16 - Rendimento de imobilização para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de *G. candidum* preparados com diferentes proporções de BSA, PEI e PSH e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol para BSA e PEI e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 17 - Rendimento global para os CLEAs (BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs), obtidos a partir das lipases de *G. candidum* preparados com diferentes proporções de BSA, PEI e PSH e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol para BSA e PEI e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O rendimento de imobilização para os PEI-CLEAs, nas proporções estudadas de 1:1 a 1:7 m/m obtiveram resultados similares com exceção da proporção 1:10 m/m na qual foi observada um menor valor de rendimento de imobilização ($52,39 \pm 2,3$ %). Uma possível explicação para esse comportamento é que o PEI, sendo um polímero rico em grupos aminos quando presente em excesso poderia de certa forma concorrer com os resíduos de lisina da enzima no momento de entrecruzamento, resultando em uma maior lixiviação da lipase durante as etapas de lavagens e conseqüentemente gerando um menor rendimento de imobilização (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; SAMPATH *et al.*, 2018). Na Tabela 08

verifica-se que enquanto para os demais ensaios há uma pequena liberação de lipases na segunda etapa de lavagem (menos de 7 %) para o PEI à medida que aumenta a sua proporção, observa-se que aumenta também a quantidade de atividade recuperada relativa perdida na segunda etapa de lavagem: de 9 % para a proporção 1:7 (m/m) e de 15% para a proporção de 1:10 (m/m).

Em relação ao rendimento global, para os PEI-CLEAs, o melhor resultado foi obtido para a proporção de 1:10 m/m (lipase:PEI) ($19,59 \pm 0,21$ %), embora nessa proporção tenha sido encontrado o menor valor de imobilização. Uma possível explicação é que os grupos aminos do PEI protegem a lipase dos solventes orgânicos presentes no meio reacional no momento da precipitação, devido a formação de um microambiente hidrofílico, melhorando assim a atividade recuperada do CLEA (AMARAL-FONSECA *et al.*, 2018; CUI; LIU; LI, 2016).

O rendimento de imobilização para os PSH-CLEAs também não sofreu diferenças significativas com a variação da proporção da proteína de soja. Entretanto, o rendimento global foi afetado, sendo que o melhor resultado foi obtido para a proporção de 1:3 m/m ($13,44 \pm 0,30$ %), sendo que os rendimentos globais diminuíram com o aumento da proporção de PSH. A PSH possui um alto teor de grupos aminos livres de resíduos de lisina (70 mg de resíduos de lisina por grama de proteína), que proporciona estabilidade aos CLEAs e uma menor lixiviação enzimática, devido a um aumento da reticulação através das ligações covalentes (RAMOS *et al.*, 2018). Entretanto, à medida que se aumenta a proporção de PSH, aumenta-se também a densidade do agregado formado o que pode diminuir a atividade do CLEA formado por problemas difusionais (RAMOS *et al.*, 2018).

Na Tabela 08 verifica-se que mesmo na maior proporção de PSH a atividade relativa da primeira lavagem foi de $30,79 \pm 0,46$ %, demonstrando que talvez o tempo de entrecruzamento tenha sido insuficiente para a retenção de toda a proteína precipitada.

Embora a variação da proporção dos aditivos BSA, PEI e PSH na faixa estudada não tenha melhorado expressivamente o rendimento de imobilização, verificou-se que ela influenciou no rendimento global para todos os aditivos empregados, sendo que para o PEI este aumento foi mais pronunciado.

Tabela 8 - Atividade recuperada relativa (%) para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs, obtidos a partir das lipases de *G. candidum* preparados com diferentes proporções de BSA, PEI e PSH (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:10 (lipase:aditivo) e concentração fixa de glutaraldeído (20 µmol/mg de proteína para BSA e PEI e 30 µmol/mg de proteína para PSH).

Proporção de aditivo		Atividade Recuperada Relativa (%)		
		BSA	PEI	PSH
1:1	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	39,93 ± 0,92	39,63 ± 1,16	38,14 ± 1,51
	2ª lavagem	0,16 ± 0,92	3,82 ± 1,31	4,20 ± 1,00
1:2	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	24,24 ± 0,30	32,82 ± 2,13	34,07 ± 0,86
	2ª lavagem	6,39 ± 0,11	4,85 ± 1,51	6,67 ± 0,74
1:3	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	35,70 ± 1,01	38,61 ± 0,15	36,81 ± 0,00
	2ª lavagem	0,44 ± 1,01	2,76 ± 1,13	3,29 ± 0,91
1:7	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,15	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	33,55 ± 2,54	29,97 ± 0,61	31,52 ± 0,91
	2ª lavagem	0,00 ± 0,00	9,66 ± 1,48	5,02 ± 0,82
1:10	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	33,33 ± 3,03	32,11 ± 0,31	30,79 ± 0,46
	2ª lavagem	0,22 ± 0,61	15,42 ± 0,39	5,71 ± 0,23

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.3.3 Variação da concentração de surfactante (SDS)

A ativação de lipases por surfactantes é bem documentada na literatura e geralmente o fenômeno é atribuído à conformação mais ativa que a lipase é induzida a adotar na presença destes aditivos (CALVO; PLOU; BALLESTEROS, 1996). Sheldon (2007) descreveu que a adição de surfactantes na precipitação de lipases seguida de reticulação, poderia trazer um aumento de atividade para os CLEAs formados, pois a lipase no momento da precipitação assumiria uma conformação mais favorável.

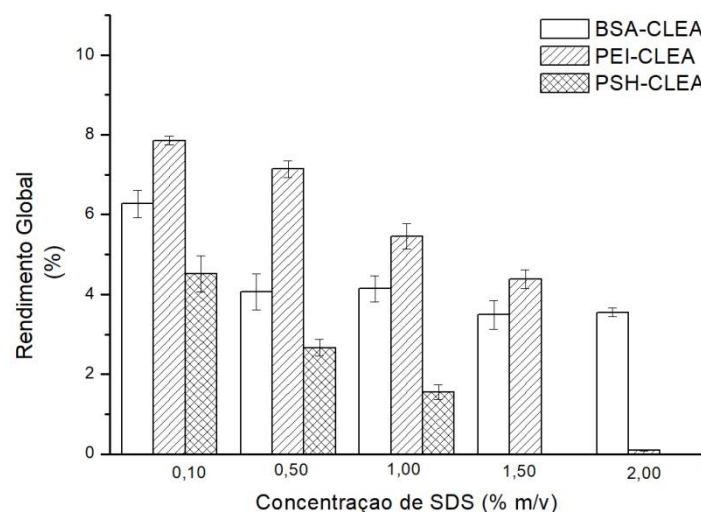
Assim, no intuito de melhorar o rendimento global para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs, a variação de surfactante foi avaliada utilizando-se diferentes concentrações de SDS (0,10%, 0,50%, 1,00%, 1,50% e 2,00% m/v).

Para realização dos ensaios com SDS foram escolhidas as condições levando-se em consideração os resultados obtidos nas seções anteriores. Dessa forma, para os BSA-CLEAs foi utilizada a proporção de 1:3 m/m lipase:co-alimentador e 20 µmol de grupos aldeídos/mg

de proteína. Para os PSH-CLEAs foi utilizada a proporção de 1:3 m/m lipase:co-alimentador e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e para os PEI-CLEAs a proporção de 1:7 m/m lipase:aditivo e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteínas.

O rendimento global (RG) obtido encontra-se na Figura 18. Observou-se que o melhor rendimento global dos BSA-CLEAs foi obtido para a concentração de SDS de 0,10 % m/v ($6,20 \pm 0,34$ %). Para os PEI-CLEAs e PSH-CLEAs o melhor rendimento global foi também obtido para a concentração de SDS de 0,10 % m/v ($7,86 \pm 0,11$ % e $4,52 \pm 0,45$ %, respectivamente).

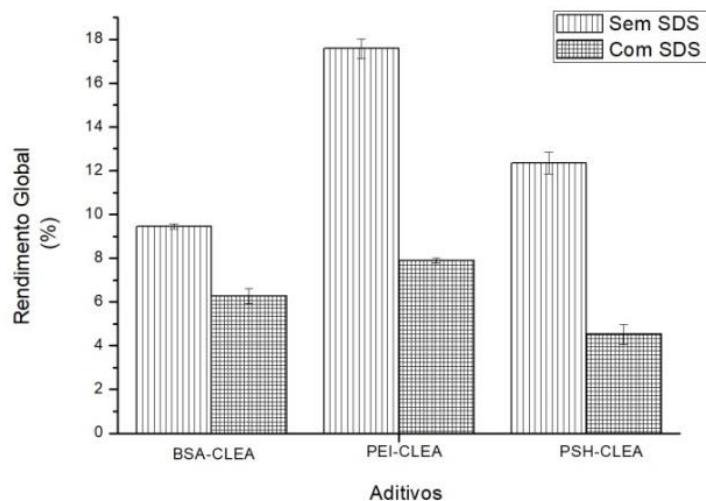
Figura 18 - Rendimento Global para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs com a lipase de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol /mg de proteína para BSA e PEI e 30 μmol /mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m para PEI, lipase: aditivo). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Como explicado anteriormente, a utilização de surfactantes como o SDS, tem por finalidade proporcionar maleabilidade e aumento da atividade enzimática através da ativação interfacial da lipase (MORI *et al.*, 2005; ØSTERGAARD RASMUSSEN *et al.*, 2022). A ativação interfacial ocorre devido aos surfactantes serem moléculas anfifílicas e substâncias tensoativas, possuindo partes hidrofóbicas e hidrofílicas, imitando a interface lipídio-água, permitindo assim que a lipase assumira a configuração aberta, expondo o seu sítio ativo e facilitando a catálise (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; ZHANG R. *et al.*, 2018, ZHANG, W. 2017). A Figura 19 compara os rendimentos globais obtidos com e sem a adição de SDS para ensaios realizados nas mesmas condições. Observou-se que a adição de SDS (em qualquer % dentro da faixa estudada) não favoreceu o aumento do rendimento global para nenhum dos aditivos utilizados (BSA, PEI e PSH), pelo contrário, a adição do surfactante promoveu uma perda da atividade para os CLEAs, quando comparado com os ensaios realizados nas mesmas condições, mas sem a adição do SDS.

Figura 19 - Comparação entre os rendimentos globais para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs para a lipase de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutraldeído (20 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína para BSA e PEI e 30 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 para BSA E PSH e 1:7 para PEI, lipase:aditivo). A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 60 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A explicação para as interações que ocorrem entre detergentes e proteínas, essencialmente no que diz respeito SDS não é simples. Vários modelos foram propostos para as estruturas desses complexos (IBEL *et al.*, 1990), mas há um consenso de que os surfactantes aniônicos inicialmente se ligam aos sítios catiônicos (resíduos de lisina, arginina e/ou histidina) presentes na superfície da enzima por interações iônicas. Além disso, as cadeias alquílicas do surfactante ligam-se as regiões hidrofóbicas da proteína próximas aos sítios catiônicos. Essas ligações promovem a exposição do sítio ativo ao meio aquoso, o que no caso das lipases pode auxiliar na catálise ocorrendo a hiperativação (CALVO; PLOU; BALLESTEROS, 1996). Entretanto, uma maior exposição do sítio ativo, inicialmente

protegidos dentro da estrutura terciária, poderia favorecer a desnaturação da enzima, ainda mais se no mesmo ambiente houvesse a presença de agentes desnaturantes, como os solventes orgânicos.

A perda da lipase na etapa de lavagem ocorre por lixiviação da enzima, decorrente de um entrecruzamento ineficiente, e assim a lipase em sua forma livre volta a apresentar atividade catalítica. Observando-se a atividade recuperada para as etapas de lavagem (Tabela 09) nota-se que à medida que há um aumento da concentração de SDS há também uma diminuição da atividade recuperada, o que não aconteceu para os ensaios anteriores, nos quais o SDS não foi utilizado. Calvo; Plou; Ballesteros (1996) descreveu que a lipase B de *Candida rugosa* perdeu cerca de 60 % de sua atividade inicial após incubação com 1 % m/v de SDS, enquanto a lipase A também de *Candida rugosa*, não perdeu sua atividade inicial, incubada nas mesmas condições. Os autores concluíram que cada enzima reage muito diferente na presença de SDS, mesmo quando são isoenzimas que possuem semelhança na composição de aminoácidos (Lipases A e B de *Candida rugosa*).

Guauque Torres; Foresti; Ferreira (2013) produziram CLEAs da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como precipitante e glutaraldeído como agente de reticulação. Os autores estudaram o efeito da adição de diferentes aditivos como co-alimentador de proteína, ácido oleico, n-heptano, SDS, polietilenoglicol (PEG) e etilenodiamina em proporções selecionadas em relação à massa de TLL. Eles verificaram que a adição de SDS e PEG trouxe um impacto indesejável na conformação TLL, propiciando a sua desnaturação e potencial inibição.

Tabela 9 - Comparação entre as atividades recuperadas relativas (%) para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs para as lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteínas para BSA e PEI e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m para PEI, lipase:aditivo).

(continua)

Concentração SDS		Atividade Recuperada Relativa (%)		
		BSA	PEI	PSH
0,10%	Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	1ª lavagem	38,09 \pm 2,62	13,5 0 \pm 1,41	30,97 \pm 0,51
	2ª lavagem	4,10 \pm 0,70	2,13 \pm 0,52	4,06 \pm 0,56

Tabela 9 - Comparação entre as atividades recuperadas relativas (%) para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs para as lipases de *G. candidum* preparados com diferentes concentrações de SDS e concentração fixa de glutaraldeído (20 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para BSA e PEI e 30 µmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m para PEI, lipase:aditivo).

(conclusão)

Concentração		Atividade Recuperada Relativa (%)		
SDS		BSA	PEI	PSH
0,50%	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	33,58 ± 2,38	13,26 ± 0,27	19,82 ± 0,42
	2ª lavagem	2,38 ± 0,29	0,31 ± 0,71	3,73 ± 1,72
1,00%	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	19,23 ± 0,82	9,69 ± 0,67	18,10 ± 1,12
	2ª lavagem	1,28 ± 1,08	0,36 ± 0,27	1,55 ± 0,84
1,50%	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	15,14 ± 0,20	3,71 ± 1,03	15,63 ± 0,70
	2ª lavagem	0,24 ± 0,12	5,72 ± 1,07	0,71 ± 0,09
2,00%	Sobrenadante	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1ª lavagem	17,30 ± 0,36	8,13 ± 0,36	16,61 ± 0,09
	2ª lavagem	2,16 ± 0,36	4,29 ± 0,45	1,74 ± 0,65

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.3.4 Avaliação do tempo de entrecruzamento

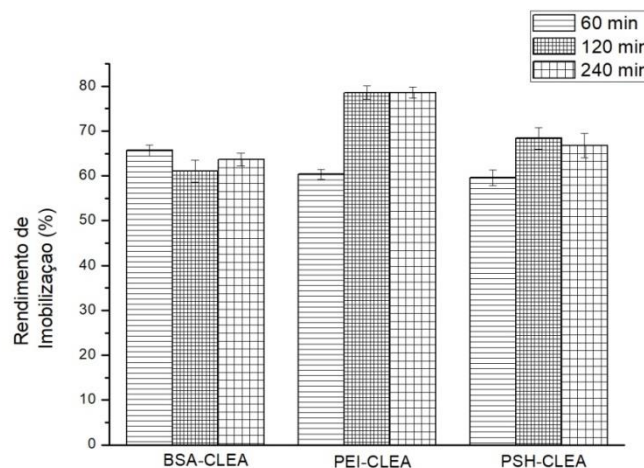
A etapa de entrecruzamento é dependente do tempo de reação, assim esta é uma variável considerada importante para a formação de CLEAs (CUI; JIA, 2015), e por esse motivo foram avaliados os tempos de entrecruzamento variando de 60 a 240 min para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs da lipase de *G. candidum*.

Para os BSA-CLEAs, o tempo de entrecruzamento não interferiu no rendimento de imobilização (Figura 20), mas afetou significativamente o rendimento global (Figura 21), que decresceu à medida que o tempo de entrecruzamento aumentou. Um menor rendimento global decorrente da perda de atividade recuperada ao longo do tempo de entrecruzamento pode estar relacionado ao excesso de entrecruzamento entre as lipases, ocasionando uma limitação na transferência de massa para os CLEAs, decorrente do aumento dos agrupamentos formados, ou ainda pela perda de flexibilidade da lipase (DIAZ-VIDAL *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022).

Esses resultados estão de acordo com Sampath; Belur; Iyyasami (2018) que relataram que a máxima atividade recuperada para os CLEAs da lipase de *Cândida rugosa* se deu aos 45 min de entrecruzamento com glutaraldeído. Quando foram usados tempos de

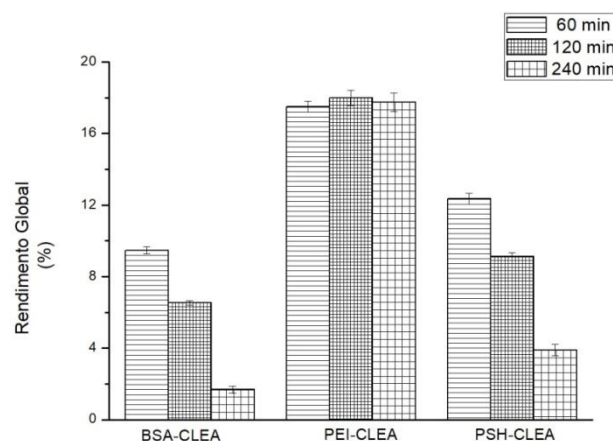
entrecruzamento maiores houve um decréscimo da atividade para os CLEAs formados. Yang *et al.*, (2012) reportaram que o melhor tempo de entrecruzamento com glutaraldeído para os CLEAs da lipase de *T. lanuginosus* foi de 4 h, e que para maiores tempos de entrecruzamento também foi observado um decréscimo da atividade dos CLEAs formados.

Figura 20 - Rendimento de imobilização (%) para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes tempos de entrecruzamento e proporção fixa de lipase e glutaraldeído. BSA-CLEAs preparados na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. PEI-CLEAs na proporção de 1:7 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e PSH-CLEAs na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e concentração de 30 μmol de grupos aldeídos/ mg de proteína. A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 21 - Rendimento Global (%) para os BSA-CLEAs, PEI-CLEAs e PSH-CLEAs da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes tempos de entrecruzamento e proporção fixa de lipase e glutaraldeído. BSA-CLEAs preparados na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. PEI-CLEAs na proporção de 1:7 m/m (lipase:aditivo) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e PSH-CLEAs na proporção de 1:3 m/m (lipase:aditivo) e concentração de 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para os PEI-CLEAs os tempo de entrecruzamentos de 120 e 240 min possibilitaram um maior rendimento de imobilização (em torno de 80%), fazendo com que a atividade

recuperada relativa para a primeira lavagem (Tabela 10) fosse menor (entre 13 e 14%) em relação ao tempo de entrecruzamento de 60 min ($33,55 \pm 2,54$ %), indicando que houve uma menor lixiviação da lipase possivelmente devido a maior quantidade de ligações realizadas pelo glutaraldeído. O rendimento global obtido para os três tempos de entrecruzamento foi praticamente o mesmo para todos os ensaios, em torno de 18,00 %. Este resultado é muito positivo, pois foi possível aumentar o rendimento de imobilização sem que houvesse uma diminuição do rendimento global. López-Galego *et al.* (2005) descreveram que a utilização do PEI previne a lixiviação da enzima do agregado, auxiliando a tornar os PEI-CLEAs mais estáveis. Ainda a utilização do PEI foi descrita por Wilson *et al.*, (2006) como vantajosa para a formação de CLEAs de lipases, uma vez que a introdução do polímero propicia uma alteração do microambiente da enzima o que pode auxiliar na manutenção da sua estrutura, e conseqüentemente de seu poder catalítico. Os resultados encontrados no presente trabalho, para os PEI-CLEAs da lipase de *G. candidum*, confirmam as observações realizadas pelos autores citados acima.

Um aumento do tempo de entrecruzamento (120 e 240 min) também favoreceu um aumento do rendimento de imobilização para os PSH-CLEAs ($68,4 \pm 2,4$ e $64,7 \pm 2,7$ %, respectivamente). Verificou-se que a atividade recuperada relativa obtida para o sobrenadante das etapas de lavagem foram menores para os tempos de entrecruzamento maiores, indicando que houve uma menor lixiviação da lipase após a etapa de entrecruzamento, corroborando com os dados encontrados para um maior rendimento de imobilização para esses tempos. Entretanto, assim como ocorreu para os BSA-CLEAs, os PSH-CLEAs também tiveram o seu rendimento global reduzido à medida que houve o aumento do tempo de reticulação com o glutaraldeído. É possível que o aumento das ligações formadas com o glutaraldeído possa ter levado a uma rigidificação da enzima, levando a perda de mobilidade e conseqüentemente de atividade pela lipase (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

Tabela 10 - Comparação entre as atividades relativas para os sobrenadantes e primeira e segunda lavagem dos CLEAs para lipases de *G. candidum* em diferentes tempos de entrecruzamento e concentração fixa de glutaraldeído (20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para BSA e PEI e 30 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína para PSH) e proporção fixa de BSA, PEI e PSH (1:3 m/m para BSA e PSH e 1:7 m/m lipase:aditivo para PEI).

Aditivos	Tempo de entrecruzamento (min)	Atividade Recuperada Relativa (%)		
		Sobrenadante	1ª Lavagem	2ª Lavagem
BSA	60	0,00 \pm 0,00	24,24 \pm 0,30	6,39 \pm 0,11
	120	0,00 \pm 0,00	25,68 \pm 1,52	3,57 \pm 1,60
	240	0,00 \pm 0,00	22,40 \pm 2,13	1,44 \pm 1,65
PEI	60	0,00 \pm 0,00	33,55 \pm 2,54	0,00 \pm 0,00
	120	0,00 \pm 0,00	13,22 \pm 1,06	1,14 \pm 0,08
	240	0,00 \pm 0,00	14,05 \pm 0,71	0,85 \pm 3,39
PSH	60	0,00 \pm 0,00	34,07 \pm 0,86	6,67 \pm 0,04
	120	0,00 \pm 0,00	25,28 \pm 2,09	2,58 \pm 0,61
	240	0,00 \pm 0,00	22,24 \pm 2,13	0,81 \pm 0,08

Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

5.3.5 Avaliação do pH do extrato enzimático

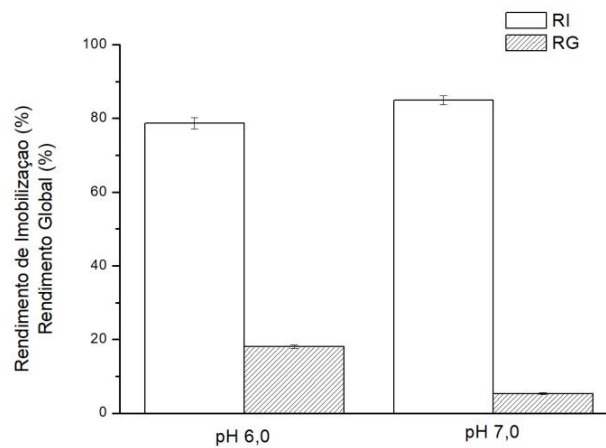
As bases de Schiff formadas entre o glutaraldeído e os resíduos de amina são instáveis em condições ácidas e tendem a se decompor para regenerar o aldeído e amina, podendo prejudicar a ligação e levar a lixiviação da enzima quando encubada em soluções tamponadas (WANG *et al.*, 2011). Assim, a formação dos PEI-CLEAs foi estudada para o pH neutro (7,0), no intuito de se verificar se haveria uma melhoria para o rendimento de imobilização e para o rendimento global, uma vez que para pHs básicos a lipase livre de *G. candidum* apresenta elevada perda de atividade (FERREIRA *et al.*, 2018), não sendo indicado portanto, o estudo de pH para valores mais básicos.

Para a preparação dos PEI-CLEAs foi utilizado a proporção de 1:7 m/m (lipase:PEI) em pH 6,0 ou 7,0, 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína e 120 min para o entrecruzamento. Em ensaios anteriores, o melhor rendimento global (18,00 \pm 0,43 %) foi encontrado para o aditivo PEI e o tempo de entrecruzamento de 120 min, justificando a escolha deste ensaio para o estudo da variação do pH do extrato enzimático.

A Figura 22 mostra os resultados obtidos para a o rendimento de imobilização e rendimento global. Verificou-se que a alteração do pH do extrato enzimático para 7,0 possibilitou um aumento do rendimento de imobilização (84,95 \pm 1,23) quando comparado ao

rendimento obtido para o pH 6,0 ($78,60 \pm 1,50$ %), corroborando com os valores encontrados para as atividades recuperadas relativas das águas de lavagem (Tabela 11).

Figura 22 - Rendimentos de imobilização (RI) e Rendimento global (RG) para os PEI-CLEAs da lipase de *G. candidum* preparados em diferentes pHs do extrato enzimático, para a proporção de 1:7 m/m (lipase:PEI) e 20 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína. A precipitação ocorreu por 30 min em shaker agitado (150 rpm) a 4°C seguida pela reticulação com glutaraldeído por 120 min. A centrifugação ocorreu à 4°C, 4000 rpm por 10 minutos para obtenção dos PEI-CLEAs, que foram lavados ainda duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



Fonte: Elaborada pelo do autor (2022).

Tabela 11 - Comparação entre as atividades relativas para os sobrenadante e primeira e segunda lavagem dos PEI-CLEAs da lipase de *G. candidum*, avaliando o pH 6,0 e 7,0 e concentração de glutaraldeído (20 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína) e proporção de lipase:aditivo de 1:7 m/m.

	Atividade Recuperada Relativa (%)	
	pH 6,0	pH 7,0
Sobrenadante	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
1ª Lavagem	13,22 \pm 1,06	09,29 \pm 0,87
2ª Lavagem	1,14 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Entretanto, o melhor resultado para o rendimento global obtido foi para o pH 6,0 (18,00 \pm 0,43 %). Para o pH 7,0 foi observado o valor de 5,32 \pm 0,28 %, cerca de três vezes inferior ao rendimento global obtido para o pH 6,0. Este resultado pode ser explicado novamente devido ao maior entrecruzamento entre os grupos de amino desprotonados de resíduo de lisina levando a perda de sua mobilidade, resultando em uma menor atividade catalítica. Como explicado anteriormente, na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, a reação com o glutaraldeído pode se tornar reversível, levando a liberação das lipases do aglomerado por lixiviação, porém na faixa de pH entre 7,0 à 9,0, esta reversibilidade é mínima, ocorrendo assim a totalidade do entrecruzamento dos grupos de amino de resíduo de lisina. (MIGNEAULT *et al.*, 2004; TALEKAR *et al.*, 2013).

Dessa forma, o melhor resultado encontrado para a formação de PEI-CLEAs utilizando a lipase de *G. candidum* foi para o pH 6,0 do extrato enzimático, a proporção de PEI (1:7 m/m) e 20 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína.

Yan *et al.*, (2012), produziram CLEAs com lipases obtidas de *Geotrichum sp.*, utilizando como agente precipitante a acetona, o PEI como aditivo (1:10 m/m enzima:aditivo) e o glutaraldeído (4,5 μ mol de grupos aldeídos/mg de proteína) como agente reticulante. Os autores relataram que os PEI-CLEAs foram mais eficientes que os CLEAs sem aditivo e que a lipase livre, diante os parâmetros avaliados como estabilidade térmica, tolerância a solventes orgânicos e nos ciclos de reutilização na hidrólise de óleo de peixe. Os PEI-CLEAs mantiveram 72% de hidrólise relativa para o óleo de peixe após quatro ciclos de reutilização, demonstrando que o PEI auxiliou na manutenção da atividade da lipase.

O presente trabalho está de acordo com o que os autores acima reportaram, pois a acetona como agente precipitante e o aditivo PEI, também favoreceram a formação dos

CLEAs para a lipase de *G. candidum*. Ainda, os resultados encontrados demonstraram que para a lipase de *G. candidum* a obtenção de CLEAs com atividade catalítica não foi trivial, sendo observado, para a melhor condição estudada, uma recuperação de cerca de 18,00 % de sua atividade inicial (rendimento global). A imobilização dessa mesma lipase por outros métodos de imobilização tais como ligação covalente, adsorção por ativação interfacial e adsorção física por ligação iônica foi estudada previamente por Ferreira *et al.* (2018). Os autores verificaram a melhor atividade recuperada foi obtida para a adsorção iônica utilizando o suporte MANAE-agarose obtendo-se 22,80 % de atividade recuperada. Assim, os resultados obtidos neste trabalho, embora possam parecer não muitos expressivos quando comparado as CLEAs obtidos por outras lipases, estão dentro da faixa ótima obtida para a lipase de *Geotrichum candidum* da linhagem NRRL Y-552, produzida por fermentação submersa.

6 CONCLUSÕES

Dentre os solventes orgânicos analisados para se utilizar como agente precipitante, a acetona foi a que apresentou maior atividade recuperada ($46,82 \pm 1,21$ %) sendo utilizada a proporção de 1:3 de extrato enzimático:solvente a 4°C . Observou-se que os CLEAs formados somente com a lipase de *G. candidum* não apresentaram atividade e por esse motivo foram utilizados três aditivos, a BSA, o PEI e o PSH para a preparação dos CLEAs. Para os CLEAs formados com estes aditivos foram estudados os parâmetros: concentração de glutaraldeído, proporção de ativos empregados, concentração de SDS, tempo de entrecruzamento e pH para o extrato enzimático.

Em relação aos aditivos estudados, o PEI foi o que apresentou um maior rendimento global de cerca de 18,00 % para os PEI-CLEAs formados para todos os tempos de entrecruzamento avaliados. Observou-se que a grande quantidade de grupos amino deste polímero não só favoreceu a formação de CLEAs da lipase de *G. candidum*, mas também possibilitou a proteção do seu sítio ativo, auxiliando na recuperação da atividade da lipase aglomerada e entrecruzada.

Ainda o uso do SDS não proporcionou um aumento do rendimento global para nenhum dos CLEAs avaliados (BSA-CLEA, PEI-CLEA e PSH-CLEA). Já a mudança de pH do extrato enzimático favoreceu o rendimento de imobilização sendo de $84,95 \pm 1,23$ para pH 7,0 e de $78,60 \pm 1,50$ % para pH 6,0, entretanto observou-se um menor rendimento global para o pH 7,0 de $5,32 \pm 0,28$ % onde para o pH de 6,0 foi de $18,00 \pm 0,43$ %.

Assim, foi possível a imobilização da lipase produzida, presente no extrato enzimático (sem purificação previa) via CLEAs, resultando em um biocatalisador com atividade catalítica.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes sugestões visam cooperar com a continuidade deste trabalho:

- a) Utilização de nanopartículas magnéticas para formação dos CLEAs;
- b) Utilização de amido como agente formador de poros;
- c) Caracterização dos CLEAs;
- d) Determinação da estabilidade operacional dos CLEAs;
- e) Aplicação dos CLEAs em uma reação de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Lays C.; BARBOSA, Milson S.; DE JESUS, Felipe A.; SANTOS, Roberta M.; FRICKS, Alini T.; FREITAS, Lisiane S.; PEREIRA, Matheus M.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M. F. Enzymatic transesterification of coconut oil by using immobilized lipase on biochar: An experimental and molecular docking study. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], p. 1–8, 2020.
- ALVES, Nanda R.; PEREIRA, Matheus M.; GIORDANO, Raquel L. C.; TARDIOLI, Paulo W.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M. F.; SOUZA, Ranyere L. Design for preparation of more active cross-linked enzyme aggregates of *Burkholderia cepacia* lipase using palm fiber residue. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 44, p. 57–66, 2021.
- AMARAL-FONSECA, Murilo; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Preparation of magnetic cross-linked amyloglucosidase aggregates: Solving some activity problems. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1–21, 2018.
- ATIROGLU, Vesen. Lipase immobilization on synthesized hyaluronic acid-coated magnetic nanoparticle-functionalized graphene oxide composites as new biocatalysts: Improved reusability, stability, and activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 145, p. 456–465, 2020.
- BAILLARGEON, Mary Welch; BISTLINE, Raymond G.; SONNET, Philip E.; COLMER, Arthur R.; JENSEN, Robert G.; SMITH, James L. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 30, p. 92–96, 1989.
- BASTIDA, Agatha; SABUQUILLO, Pilar; ARMISEN, Pilar; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberta; HUGUET, Joan; GUISÁN, José M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.
- BHARATHI, Devaraj; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. October, p. 101368, 2019.
- BOUTROU, R.; GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 1–20, 2005.
- BRABCOVÁ, Jana; DEMIANOVÁ, Zuzana; VONDRÁŠEK, Jiří; JÁGR, Michal; ZAREVÚCKA, Marie; PALOMO, Jose M. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 98, p. 62–72, 2013.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.
- BURKERT, Janaína Fernandes de Medeiros; MALDONADO, Rafael Resende; MAUGERI FILHO, Francisco; RODRIGUES, Maria Isabel. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 61–67, 2005.

CALVO, María V.; PLOU, Francisco J.; BALLESTEROS, Antonio. Effect of surfactants on activity and stability of native and chemically modified lipases A and B from *Candida rugosa*. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 271–285, 1996.

CARVALHO, Tamires; FINOTELLI, Priscilla V.; BONOMO, Renata C. F.; FRANCO, Marcelo; AMARAL, Priscilla F. F. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 53, p. 259–266, 2017.

CASTRO, Heizir F. De; MENDES, Adriano A.; SANTOS, Júlio C. Dos; AGUIAR, Cláudio L. De. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

CASTRO, Patrícia F. De *et al.* High Lipase Production from *Geotrichum candidum* in Reduced Time using Cottonseed Oil: Optimization, Easy Purification and Specificity Characterization. **Journal of Chemical Engineering Research Updates**, [S. l.], v. 3, p. 60–69, 2016.

CHÁVEZ, Georgina; HATTI-KAUL, Rajni; SHELDON, Roger A.; MAMO, Gashaw. Baeyer-Villiger oxidation with peracid generated in situ by CaLB-CLEA catalyzed perhydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 89, p. 67–72, 2013.

ChemSrc. Soy protein isolate, 2022. Disponível em: <https://www.chemsrc.com/en/cas/9010-10-0_1198690.html>. Acesso em: 02 de março de 2022.

CORRÊA, Wellington Moreira; BORTOLOZO, Ausdinir Danilo; OSÓRIO, Wislei Riuper; DA SILVA PADILHA, Giovana. Physical adsorption used to the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase into powder polymeric supports. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], n. 0123456789, p. 15–17, 2021.

CORTEZ, Daniela V.; CASTRO, Heizir F. De; ANDRADE, Grazielle S. S. POTENCIAL CATALÍTICO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO. **Química Nova**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

CRUZ, Jenniffer; BARBOSA, Oveimar; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TORRES, Rodrigo; ORTIZ, Claudia. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 80, p. 7–14, 2012.

CUI, Jian Dong; JIA, Shi Ru. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 15–28, 2015.

CUI, Jian Dong; LI, Lian Lian; BIAN, Hong Jie. Immobilization of cross-linked phenylalanine ammonia lyase aggregates in microporous silica gel. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

CUI, Jian Dong; LIU, Rong Lin; LI, Lin Bo. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 610–615, 2016.

DE MORAIS, Wilson Galvão; KAMIMURA, Eliana Setsuko; RIBEIRO, Eloízio Júlio; PESSELA, Benevides Costa; CARDOSO, Vicelma Luiz; DE RESENDE, Miriam Maria. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 123, p. 26–34, 2016.

DIAZ-VIDAL, Tania; ARMENTA-PEREZ, Vicente Paul; ROSALES-RIVERA, Luis Carlos; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; RODRÍGUEZ, Jorge A. Cross-linked enzyme aggregates of recombinant *Candida antarctica* lipase B for the efficient synthesis of olvanil, a nonpungent capsaicin analogue. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 1–11, 2019.

FERREIRA, Matheus M.; SANTIAGO, Fernanda L. B.; SILVA, Nádia A. G. d.; LUIZ, Jaine H. H.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A.; HIRATA, Daniela B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 67, p. 55–63, 2018.

FOLTINOVÁ, Denisa; TANČINOVÁ, Dana; ČÍSAŘOVÁ, Miroslava. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Geotrichum candidum*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [S. l.], v. 9, n. Specialissue, p. 380–384, 2019.

GANDHI, Neena N. Applications of lipase. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 621–634, 1997.

GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 72, p. 18–23, 2013.

GUIMARÃES, José Renato; DE LIMA CAMARGO GIORDANO, Raquel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 13–16, 2018.

GUIMARÃES, José Renato; MIRANDA, Letícia Passos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 193, 2021.

GUPTA, Pritesh; DUTT, Kakoli; MISRA, Swati; RAGHUWANSHI, Shailendra; SAXENA, R. K. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 100, n. 18, p. 4074–4076, 2009.

HUANG, Liurong; QU, Lulu; JIA, Shifang; DING, Shuang; ZHAO, Jun; LI, Feng. The interaction of allicin with bovine serum albumin and its influence on the structure of protein. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 112, n. September 2021, p. 139–144, 2022.

IBEL, Konrad; MAY, Roland P.; KIRSCHNER, Kasper; SZADKOWSKI, Halina; MASCHER, Erik; LUNDAHL, Per. Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate–protein complexes as determined by neutron scattering. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 190, n. 2, p. 311–318, 1990.

ISMAIL, Abdallah R.; BAEK, Kwang Hyun. Lipase immobilization with support materials,

preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 163, p. 1624–1639, 2020.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; ABANG, Sariah; PONCELET, Denis; CHAN, Eng Seng; RAVINDRA, Pogaku. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008.

JIN, Wenbin; XU, Yan; YU, Xiao Wei. Formation lipase cross-linked enzyme aggregates on octyl-modified mesocellular foams with oxidized sodium alginate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 184, n. July, p. 110501, 2019.

KAMAL, Zahid; YEDAVALLI, Poornima; DESHMUKH, Mandar V.; RAO, Nalam Madhusudhana. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. **Protein Science**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 904–915, 2013.

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KARTAL, Funda; KILINC, Ali. Crosslinked aggregates of *Rhizopus oryzae* lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 937–945, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, Ephraim. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 471–478, 1993.

LI, Tiantian; GONG, Xiaowu; YANG, Gaoshan; LI, Qin; HUANG, Jin; ZHOU, Na; JIA, Xin. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of cellulase with improved catalytic activity, adaptability and reusability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], n. 0123456789, 2022.

LIMA, Antonio William Oliveira; ANGNES, Lúcio. Biotálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, [S. l.], v. 22, n.2, p.229-245, 1999.

LIRA, Regiane K. de S.; ZARDINI, Rochele T.; DE CARVALHO, Marcela C. C.; WOJCIESZAK, Robert; LEITE, Selma G. F.; ITABAIANA, Ivaldo. Agroindustrial wastes as a support for the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Synthesis of hexyl laurate. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 1–15, 2021.

LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; BETANCOR, Lorena; HIDALGO, Aurelio; ALONSO, Noelia; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, Jose M. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 1839–1842, 2005.

MACHADO, Natália B. *et al.* Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 128, n. April, p. 9–21, 2019.

MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; BELTRAME, Maisa Bontorin; ULRICH, Letícia Gazzotto; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; RIBEIRO, Marcelo Perencin de Arruda; TARDIOLI, Paulo Waldir. Combined CLEAs of invertase and soy protein for economically feasible conversion of sucrose in a fed-batch reactor. **Food and Bioprocess Processing**, [S. l.], v. 110, p. 145–157, 2018.

MAHMUD, Safa Senan; YUSOF, Faridah; JAMI, Mohamed Saedi; KHANAHMADI, Soofia. Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease. **Bioresources and Bioprocessing**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2016.

MALDONADO, R. R.; LOPES, D. B.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E. S.; MACEDO, G. A.; PAULO, São. A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 439–454, 2016.

MALDONADO, Rafael Resende; OLIVEIRA, Elizama Aguiar; FOGAÇA, Felipe Massiero; RAMOS, Gabriela Giolo; MACEDO, Gabriela Alves; RODRIGUES, Maria Isabel. Evaluation of partial purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 321–326, 2015.

MATEO, Cesar; PALOMO, José M.; VAN LANGEN, Luuk M.; VAN RANTWIJK, Fred; SHELDON, Roger A. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.

MENDES, Adriano A.; DE CASTRO, Heizir F.; DE S. RODRIGUES, Dasciana; ADRIANO, Wellington S.; TARDIOLI, Paulo W.; MAMMARELLA, Enrique J.; DE C. GIORDANO, Roberto; DE L. C. GIORDANO, Raquel. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 1055–1066, 2011 a.

MENDES, Adriano A.; DE OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F.; GIORDANO, Raquel De L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011 b.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 78, p. 119–134, 2012.

MIGNEAULT, Isabelle; DARTIGUENAVE, Catherine; BERTRAND, Michel J.; WALDRON, Karen C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MIRANDA, Letícia Passos; GUIMARÃES, José Renato; GIORDANO, Roberto Campos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Composites of crosslinked aggregates of eversa® transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 9–11, 2020.

MOHAMMADI, Najmeh Sabahi; KHIABANI, Mahmood Sowti; GHANBARZADEH, Babak; MOKARRAM, Reza Rezaei. Improvement of lipase biochemical properties via a two-step immobilization method: Adsorption onto silicon dioxide nanoparticles and entrapment in a polyvinyl alcohol/alginate hydrogel. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 323, n. August, p. 189–202, 2020.

MOKHTAR, Nur Fathiah; RAJA NOOR ZALIHA, Raja Noor Zaliha Raja; MUHD NOOR, Noor Dina; MOHD SHARIFF, Fairolniza; ALI, Mohd Shukuri Mohamad. The immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrophobic interaction

method. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1–17, 2020.

MORI, Shuichi; YUMOTO, Hiromi; MATSUMI, Rina; NISHIGAKI, Tomohiro; EBARA, Yasuhito; UEJI, Shin Ichi. A method to greatly improve the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis using sodium dodecyl sulfate (SDS) as an additive. **Tetrahedron Asymmetry**, [S. l.], v. 16, n. 22, p. 3698–3702, 2005.

MULEY, Abhijeet Bhimrao; AWASTHI, Sneha; BHALERAO, Prasanna Prakash; JADHAV, Nilesh Lakshaman; SINGHAL, Rekha Satishchandra. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *Aspergillus niger*: process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], n. 0123456789, 2021.

ORIŇAKOVÁ, Renáta *et al.* Influence of albumin interaction on corrosion resistance of sintered iron biomaterials with polyethyleneimine coating. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 509, n. December 2019, 2020.

ØSTERGAARD RASMUSSEN, Helena; WELTZ WOLLENBERG, Daniel T.; WANG, Huabing; ANDERSEN, Kell K.; L. P. OLIVEIRA, Cristiano; ISAK JØRGENSEN, Christian; J. D. JØRGENSEN, Thomas; OTZEN, Daniel E.; SKOV PEDERSEN, Jan. The changing face of SDS denaturation: Complexes of *Thermomyces lanuginosus* lipase with SDS at pH 4.0, 6.0 and 8.0. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], 2022.

PAITAIID, Pattarapon; H-KITTIKUN, Aran. Enhancing immobilization of *Aspergillus oryzae* ST11 lipase on polyacrylonitrile nanofibrous membrane by bovine serum albumin and its application for biodiesel production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 51, n. 6, p. 536–549, 2020.

PAQUES, Fernanda Wiermann; MACEDO, Gabriela Alves. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PERWEZ, Mohammad; AHMED MAZUMDER, Jahirul; SARDAR, Meryam. Preparation and characterization of reusable magnetic combi-CLEA of cellulase and hemicellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 131, n. July, p. 109389, 2019.

PILIGAEV, A. V.; SOROKINA, K. N.; SAMOYLOVA, Y. V.; PARMON, V. N. Lipid production by microalga *Micractinium* sp. IC-76 in a flat panel photobioreactor and its transesterification with cross-linked enzyme aggregates of *Burkholderia cepacia* lipase. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 156, n. August 2017, p. 1–9, 2018.

POTTIER, Ivannah; GENTE, Stéphanie; VERNOUX, Jean Paul; GUÉGUEN, Micheline. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 327–332, 2008.

RAFIEE, F.; REZAEE, M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 179, p. 170–195, 2021.

RAMOS, Elisa Z.; MIOTTI, Rodney H.; CASTRO, Patrícia F. De; TARDIOLI, Paulo W.; MENDES, Adriano A.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, Roberto; HIRATA, Daniela B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**,” [S. l.], v. 118, p.

43–51, 2015.

RAMOS, Margarita D.; MIRANDA, Letícia P.; GIORDANO, Raquel L. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; KOPP, William; TARDIOLI, Paulo W. 1,3-Regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 910–920, 2018.

RAMOS, Margarita Díaz; MIRANDA, Letícia Passos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; KOPP, William; TARDIOLI, Paulo Waldir. Improving the yields and reaction rate in the ethanolysis of soybean oil by using mixtures of lipase CLEAs. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 1–16, 2019.

RCSB/ PDB. Protein data bank. Disponível em :<<https://www.rcsb.org/structure/1thg>>. Acesso: 28 de jan. 2021.

RIGO, Elisandra; NINOW, Jorge Luiz; DI LUCCIO, Marco; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; POLLONI, André Eliezer; REMONATTO, Daniela; ARBTER, Francieli; DE OLIVEIRA, Débora; TREICHEL, Helen. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 43, n. 7, p. 1132–1137, 2010.

RODRIGUES, Rafael C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; DOS SANTOS, José C. S.; BERENQUER-MURCIA, Ángel; ALCANTARA, Andres R.; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

ROMANO, Israel P. ; SANTOS, Vanderlei S. dos.; LOUZADA, Ana Carolina de Lima. Paes; PEREIRA JUNIOR, Raimundo C. ; CARMO, Edson J. do; MOTA, Adolfo José da; BARROSO, Hiléia dos S. ; ITABAIANA JUNIOR, Ivaldo.; PEREIRA, José Odair; ASTOLFI FILHO, Spartaco; ZANOTTO, Sandra Patrícia. Avaliação da biomassa de fungos amazônicos como fonte de lipase para biocatálise. **Química Nova**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 146–154, 2020.

SAIKIA, Kongkona; RATHANKUMAR, Abiram Karanam; VAITHYANATHAN, Vasanth Kumar; CABANA, Hubert; VAIDYANATHAN, Vinoth Kumar. Preparation of highly diffusible porous cross-linked lipase B from *Candida antarctica* conjugates: Advances in mass transfer and application in transesterification of 5-Hydroxymethylfurfural. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 170, p. 583–592, 2021.

Salmo. Português. In: BÍBLIA Sagrada de Aparecida. Aparecida - São Paulo: Editora Santuário, 2013. p 876.

SAMPATH, Charanyaa; BELUR, Prasanna D.; IYYASAMI, Regupathi. Enhancement of n-3 polyunsaturated fatty acid glycerides in Sardine oil by a bioimprinted cross-linked *Candida rugosa* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 110, n. November 2017, p. 20–29, 2018.

SCHRAG, Joseph D.; CYGLER, Miroslaw. 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 230, p. 575–591, 1993.

SCHRAG, Joseph D.; LI, Yunge; WU, Shan; CYGLER, Miroslaw. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, [S. l.], v. 351, p. 761–764,

1991.

SCOPES, R.K. Protein Purification: principles and practice. New York: SpringerVerlag, p.329 1994.

SETHI, Bijay Kumar; NANDA, Prativa Kumari; SAHOO, Santilata. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.

SHAH, Shweta; SHARMA, Aparna; GUPTA, Munishwar N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 351, n. 2, p. 207–213, 2006.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1583–1587, 2007.

SHELDON, Roger A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts Abstract : **Organic Process Research & Development**, [S. l.], v. 213, n. 1, p. 213–223, 2011 a.

SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], p. 467–477, 2011 b.

SHELDON, Roger A. Cleas, combi-cleas and ‘smart’ magnetic cleas: Biocatalysis in a bio-based economy. **Catalysts**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–31, 2019.

SHIMADA, Yuji; SUGIHARA, Akio; NAGAO, Toshihiro; TOMINAGA, Yoshio. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 77–80, 1992.

SMITH, Louis C.; FAUSTINELLA, Fabrizia; CHAN, Lawrence. Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 490–496, 1992.

SOARES, Cleide M. F.; DE CASTRO, Heizir F.; DE MORAES, Flávio F.; ZANIN, Gisella M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 77–79, p. 745–757, 1999.

SOUZA, Fernanda Martins De; SOARES, Cleide Mara Faria; LIMA, Alvaro Silva; SANTANA, Luciana Cristina Lins de Aquino. Characterisation of a “green” lipase from *Aspergillus niger* immobilised on polyethersulfone membranes. **Acta Scientiarum - Technology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–13, 2019.

STRÁNSKÝ, Karel; ZAREVÚCKA, Marie; KEJÍK, Zdenek; WIMMER, Zdenek; MACKOVÁ, Martina;; DEMNEROVÁ, Katerina. Substrate specificity , regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum sp* . **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 34, p. 209–216, 2007.

TALEKAR, Sachin; GHODAKE, Vishal; GHOTAGE, Trupti; RATHOD, Pavan; DESHMUKH, Priyant; NADAR, Shamraja; MULLA, Mosin; LADOLE, Mayur. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 123, p. 542–547, 2012.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013.

THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 157–166, 2019

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **MICROBIOLOGIA**. 12. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017.

TSUJISAKA, Yoshio; IWAI, Mieko;; TOMINAGA, Yoshio. Purification, Crystallization and Some Properties of Lipase from *Geotrichum candidum* Link. **Agr. Biol.Chem.**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1457–1464, 1973.

TUDORACHE, Madalina; NAE, Andreea; COMAN, Simona; PARVULESCU, Vasile I. Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 12, p. 4052–4058, 2013.

VOBĚRKOVÁ, Stanislava; SOLČÁNY, Veronika; VRŠANSKÁ, Martina; ADAM, Vojtěch. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. **Chemosphere**, [S. l.], v. 202, p. 694–707, 2018.

WANG, Anming; ZHANG, Fangkai; CHEN, Feifei; WANG, Meizhang; LI, Haifeng; ZENG, Zhaowu; XIE, Tian; CHEN, Zhenming. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using p-benzoquinone as cross-linking agent. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1090–1095, 2011.

WANG, Bin; WU, Bin; HE, Bingfang. Efficient resolution of 3-aryloxy-1,2-propanediols using CLEA-YCJ01 with high enantioselectivity. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 24, p. 13757–13764, 2019.

WILSON, Lorena; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; ILLANES, Andrés; GUISÁN, José M.; PALOMO, José M. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 750–755, 2006.

WILSON, Lorena; ILLANES, Andrés; ABIÁN, Olga; PESSELA, Benevides C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 852–857, 2004.

WOUTERS, J. T. M. Factors affecting lipase production by *Geotrichum candidum*. **netherlands society of microbiology meeting**, [S. l.], v. 4–6, p. 456, 1966.

XING, Xiu; JIA, Jun Qi; ZHANG, Jing Fan; ZHOU, Zi Wen; LI, Jun; WANG, Na; YU, Xiao Qi. CALB immobilized onto magnetic nanoparticles for efficient kinetic resolution of racemic secondary alcohols: Long-term stability and reusability. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 9–12, 2019.

YAN, Jinyong; GUI, Xiaohua; WANG, Guilong; YAN, Yunjun. Improving stability and activity of cross-linked enzyme aggregates based on polyethylenimine in hydrolysis of fish oil for enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.

l.], v. 166, n. 4, p. 925–932, 2012.

YANG, Xu'e; ZHENG, Pu; NI, Ye; SUN, Zhihao. Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L. **Journal of Biotechnology**, [*S. l.*], v. 161, n. 1, p. 27–33, 2012.

ZERVA, Anastasia; ANTONOPOULOU, Io; ENMAN, Josefine; IANCU, Laura; ROVA, Ulrika; CHRISTAKOPOULOS, Paul. Cross-linked enzyme aggregates of feruloyl esterase preparations from *Thermothelomyces thermophila* and *Talaromyces wortmannii*. **Catalysts**, [*S. l.*], v. 8, n. 5, 2018.

ZHANG, Rui; LIU, Yang; HUANG, Xinran; XU, Mengchen; LIU, Rutao; ZONG, Wansong. Interaction of a digestive protease, *Candida rugosa* lipase, with three surfactants investigated by spectroscopy, molecular docking and enzyme activity assay. **Science of the Total Environment**, [*S. l.*], v. 622–623, p. 306–315, 2018.

ZHANG, Wei Wei; YANG, Xian Ling; JIA, Jun Qi; WANG, Na; HU, Cheng Li; YU, Xiao Qi. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [*S. l.*], v. 115, p. 83–89, 2015.

ZHANG, Weiwei; YANG, Huixia; LIU, Wanyi; WANG, Na; YU, Xiaoqi. Improved performance of magnetic cross-linked lipase aggregates by interfacial activation: A robust and magnetically recyclable biocatalyst for transesterification of jatropha oil. **Molecules**, [*S. l.*], v. 22, n. 12, 2017.

ZHAO, Lifang; ZHENG, Liangyu; GAO, Gui; JIA, Fei; CAO, Shugui. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas sp.* Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [*S. l.*], v. 54, n. 1–2, p. 7–12, 2008.