UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DIANE RIGO

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE LIPASE EM PALITO RESIDUAL DE ERVA-MATE (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

ERECHIM, RS – BRASIL
MARÇO DE 2020

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE LIPASE EM PALITO RESIDUAL DE ERVA-MATE (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

Diane Rigo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2020

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE LIPASE EM PALITO RESIDUAL DE ERVA-MATE (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

Diane Rigo

Dissertação submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.
Comissão Julgadora:

_____

Profª. Jamile Zeni, D. Sc.
Orientadora (URI-Erechim)

_____

Prof. Rogério Marcos Dallago, D. Sc.
Orientador (URI-Erechim)

_____

Profª. Natália Paroul, D. Sc.
Banca (URI-Erechim)

_____

Profª. Cátia Santin Zanchett Battiston, D. Sc.
Banca (IFRS–Erechim)

Erechim, Março de 2020.

R572i Rigo, Diane
Imobilização covalente de lipase em palito residual de erva-mate (Ilex Paraguariensis A. St. – Hil.) / Diane Rigo. - 2020.
49 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2020.

"Orientação: Dra Jamile Zeni, Dr. Rogério Marcos Dallago."

1. Enzima 2. Suporte orgânico 3. Erva-mate 4. Metal pesado I. Título

C.D.U.: 664

Catalogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

A Deus, e aos meus anjos protetores, que me guiaram sempre para o melhor caminho.

Aos meus pais Vilson e Neide pela motivação, pelo apoio incondicional, por acreditarem nos meus sonhos e pela compreensão dos momentos difíceis.

Aos meus nonos Zélida e Fortunato por sempre rezarem e torcerem por mim e pela minha felicidade.

À minha madrinha Clélia, por ser minha segunda mãe, que sempre me ouve, me apoia a seguir meus sonhos e me compreende.

À minha irmã Elaine e meu cunhado Diego por todo o apoio e compreensão.

À minha sobrinha/afilhada, minha filha do coração, Isabella, por ser o meu motivo pra sorrir e por lutar pelos meus objetivos, a minha estrela guia, meu tudo. Te amo infinitamente. Desculpa pelas vezes que não pude estar presente e não pude brincar contigo, mas tudo isso é por você.

Ao meu amor e companheiro que o destino colocou no meu caminho, Natan, por sempre me apoiar, motivar, por acreditar no meu potencial e por toda a ajuda que me deu desde os primeiros experimentos. Sem você eu não teria conseguido. Obrigada por me ajudar a ser mais forte, confiante e por todo o seu amor por mim. Te amo muito.

Aos meus queridos orientadores Tuca e Jami por me apoiarem, por toda a ajuda, incentivo, motivação, por todos os aprendizados e pela paciência que tiveram comigo. Minha imensa gratidão. Também peço desculpas pelas vezes que errei e que não atendi suas expectativas.

À Prof. Alini, que acreditou em mim, que me deu a oportunidade de ir para Aracaju realizar parte deste trabalho, agradeço imensamente por tudo. Isso só foi possível graças aos seus conhecimentos, à sua paciência e amizade comigo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-ERECHIM, Geci, Cansian, Juli, Clari, Ale, Eunice, Natália e Mignoni pelos os conhecimentos compartilhados e amizade.

Às minhas amigas, irmãs do coração, Rosi e Sandy o meu agradecimento especial por toda a ajuda, por todos os puxões de orelha, pelos ensinamentos, risadas, pelas cuias de chimarrão, almoços e muitos bons momentos compartilhados. Agradeço por terem sido meus dois braços nesses 2 anos de batalha.

Meu agradecimento muito especial para a Mar (Marceli), pois foi graças a você que aprendi a trabalhar no laboratório, que tive tantas oportunidades de trabalhos e de pesquisas, que tenho o currículo tenho hoje. Você me inspira e tenha certeza que jamais esquecerei tudo o que fez por mim, principalmente durante meu IC. Sou imensamente grata.

Às minhas amigas e colegas Micheli, Angélica, Sandrinha, Vanessa e Simone por toda a ajuda, aprendizados, companheirismo, carinho e por todos os momentos de alegria que pudemos compartilhar.

À galera da Termo, Paulo, Renan, Tatá e em especial ao Bruno, meu Mano do coração, por estar sempre me apoiando, me ajudando, me ensinando, por todos os momentos de alegria, por ser meu confidente, por tudo.

À todos os meus amigos e colegas do lab, em especial, à Marília, Karine, Bruna S., Bruna P., Pati, Roberta, Carol, Dani, Adri, Janine, Anne, Glaci, Karine C. e Keli por toda a ajuda, amizade, companheirismo e boas risadas, e aos bolsistas, Leo, Gabi, Lucas, Taís C. Gabi B.

À todos os meus amigos do Lab (Unit), Gabi, Tamara, Igor, Nandinha, Jéssica, Flávia, Micael, Milena, Lucas, Milsinho e aos bolsistas Alessandro e Lavínia, meu muito obrigada por tudo. Vocês são a minha família nordestina. Agradeço por toda a receptividade, amizade, pelo apoio, por me fazerem sentir em casa, pelas risadas e momentos maravilhosos.

Às meninas da central de materiais, Rosi e Verinha por toda a ajuda de sempre.

À Liane, que sempre nos orienta nas documentações, matrículas, nos motiva e torce pra que tudo dê certo.

À URI- Erechim, Unit e Itp, que forneceram todas as ferramentas para a realização deste trabalho. À CAPES e Promob, órgãos de fomento.

À empresa de óleos que gentilmente cedeu a enzima utilizada neste trabalho e à empresa ervateira Barão Erva Mate e Chás pela doação dos resíduos de palito de erva-mate.

À todos os meus amigos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho. Minha gratidão.

Dedicatória

À minha sobrinha/afilhada Isabella.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE LIPASE EM PALITO RESIDUAL DE ERVA-MATE (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

Diane Rigo

Orientadores: Prof.ª Drª. Jamile Zeni e Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

O uso de enzimas imobilizadas é uma alternativa para a aplicação industrial, demonstrando vantagens econômicas e ambientais, principalmente pela possibilidade de reutilização. O método de imobilização por ligação covalente é um dos mais utilizados, pois há formação de ligações fortes entre a enzima e o suporte. Suportes orgânicos são constituídos por fibras lignocelulósicos, apresentando hidroxilas reativas acessíveis. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma espécie nativa de alguns países da América do Sul e durante sua coleta são descartados aproximadamente 5 toneladas por hectare de ramos de erva-mate de maior diâmetro. Por isso, o objetivo deste trabalho é imobilizar lipase Eversa® Transform 2.0 em palito residual de erva-mate. O palito de erva-mate foi cedido por uma ervateira do norte do Rio Grande do Sul, posteriormente passou por um pré-tratamento alcalino, foram realizadas diferentes ativações, imobilização utilizando os solventes hexano ou tampão nitrato de amônia pH 10, após foi feito a atividade de esterificação, a caracterização da enzima imobilizada, a estabilidade operacional e caracterização do suporte. A caracterização realizada pelo MEV demonstrou que os tratamentos para maior exposição dos grupamentos hidroxila do palito de erva-mate foram eficientes, possibilitando a ligação da enzima ao suporte. A imobilização da lipase em suporte ativado com APTS/glutaraldeído apresentou rendimento de 225,52% e utilizando o suporte ativado com metaperiodato de sódio o valor obtido foi de 162,76%, ambos utilizando o hexano como meio reacional. A lipase imobilizada apresentou boa reutilização, onde o suporte ativado com APTS/glutaraldeído apresentou um reuso de até 8 vezes, mantendo atividade de 65,62% e o suporte ativado com metaperiodato apresentou reuso de até 5 vezes, com uma atividade de 52% em relação a atividade inicial. A temperatura reacional ótima da enzima livre e imobilizada foi de 40 °C. Os valores de constante de

afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) foram de 16,55 μmol/g e 5555,56 μmol/g.min para a enzima livre e 33,52 μmol/g 4761,9 μmol/g.min para enzima imobilizada. Os parâmetros de inativação térmica (K_d, $t_{1/2}$ e D) confirmaram uma melhor termoestabilidade da lipase enquanto livre. A proposta deste trabalho mostrou-se promissora para a obtenção de um derivado imobilizado com potencialidade e os resultados obtidos podem ser uma base de referência para pesquisas posteriores que visem à otimização do processo de imobilização e sua posterior aplicação.

Palavras-chave: Enzima, ativação, suporte orgânico.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

COVALENT IMMOBILIZATION OF LIPASE IN RESIDUAL YERBA MATE STICK (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

Diane Rigo

Advisors: Prof. Dr.ª Jamile Zeni and Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

The use of immobilized enzymes is an alternative for industrial application showing economic and environmental advantages, mainly due to the possibility of reuse. The covalent bonding method is one of the most used, as there is the formation of strong bonds between the enzyme and the support. Organic supports are made up of lignocellulosic fibers, with accessible reactive hydroxyls. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) is a species native to some countries in South America and during its collection approximately 5 tons per hectare of larger yerba mate branches are discarded. Therefore, the objective of this work is to immobilize Eversa® Transform 2.0 lipase on a residual mate herb stick. The yerba mate stick was provided by an herb industry from the north of Rio Grande do Sul, later underwent an alkaline pretreatment, different activations were carried out, immobilization using hexane solvents or pH10 ammonium nitrate buffer, after the activity was carried out of esterification, the characterization of the immobilized enzyme, the operational stability and characterization of the support were made. The characterization carried out by MEV demonstrated that the treatments for greater exposure of the hydroxyl groups of the mate herb stick were efficient, allowing the enzyme to be attached to the support. The immobilization of the lipase on support activated with APTS / glutaraldehyde showed a yield of 225,52 % and using the support activated with sodium metaperiodate the value obtained was 162,76 %, both using hexane as the reaction medium. However, the immobilized lipase showed good reuse, where the support activated with APTS/glutaraldehyde presented a reuse of up to 8 times, maintaining activity of 65,62 % and the support activated with metaperiodate showed reuse of up to 5 times, with an activity of 52 % in relation to the initial activity. The optimal reaction temperature of the free and immobilized enzyme was 40 °C. Affinity constant (K_m) and (maximum speed) $V_{máx}$ values were 16,55 μmol/g and 5555,56 μmol/g.min for free enzyme

and 33,52 μmol/g 4761,9 μmol/g.min for immobilized enzyme. The parameters of thermal inactivation (Kd, t1/2 and D) confirmed a better thermostability of the lipase while free. The purpose of this work was promising for obtaining a potentially immobilized derivative and the results obtained can be a reference base for further research aimed at optimizing the immobilization process and its subsequent application.

Keywords: Enzyme, activation, organic support.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 16
OBJETIVOS 18
OBJETIVO GERAL 18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 18
TÍTULO DO ARTIGO 19
1 Introdução 19
2 Material e métodos 21
2.1 Enzima 22
2.2 Palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil.) 22
2.3 Funcionalização do Suporte 22
2.3.1 Pré-tratamento do suporte com NaOH 22
2.3.2 Silanização e ativação do suporte pré-tratado com NaOH 22
2.3.3 Ativação do suporte com metaperiodato de sódio 23
2.4 Caracterização do suporte – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 23
2.5 Imobilização 23
2.6 Atividade de esterificação 24
2.7 Estabilidade operacional (reuso) 25
2.8 Caracterização da enzima imobilizada 25
2.8.1 Avaliação da temperatura reacional 25
2.8.2 Determinação dos parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) 26
2.8.3 Perfil de estabilidade térmica 26
2.8.4 Estimativa dos parâmetros cinéticos de inativação 27
2.8.5 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos 28
2.9 Análise Estatística 28
3 Resultados e discussão 29
3.1 Caracterização física do suporte 29
3.2 Imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 em palito residual de erva-mate 30
3.3 Estabilidade operacional (reuso) 32
3.4 Avaliação da temperatura reacional ótima 33
3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) 34
3.6 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos e de inativação 36
4 Conclusões 39
Agradecimentos 39

Referências.....40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....46
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....46
Material suplementar.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas realizadas no presente trabalho.....21
Figura 2: Aspecto visual do palito residual de erva-mate *in natura* (a); palito ativado com APTS/glutaraldeído (b) e palito ativado com metaperiodato de sódio (c) 29
Figura 3: Processo de silanização e ativação, utilizando APTS e glutaraldeído, do palito residual de erva-mate para imobilização enzimática.....31
Figura 4: Processo de ativação, utilizando metaperiodato de sódio no palito residual de erva-mate para imobilização enzimática.....32
Figura 5: Capacidade de reuso/ciclos da lipase imobilizada no suporte funcionalizado com APTS/glutaraldeído e no suporte funcionalizado com metaperiodato de sódio.....33
Figura 6: Temperatura reacional ótima da enzima livre e imobilizada.....34
Figura 7: Termoestabilidade da lipase livre (a) e imobilizada (b) nas temperaturas de 40,50, 60 e 70°C 37
Figura 8: Curva de saturação da enzima livre (a); gráfico de Lineweaver-Burk da enzima livre (b); curva de saturação da enzima imobilizada (c) e gráfico de Lineweaver-Burk da enzima imobilizada 47
Figura 9: Linearização dos parâmetros termodinâmicos (a) e de inativação (b) da enzima livre 48
Figura 10: Linearização dos parâmetros termodinâmicos (a) e de inativação (b) da enzima imobilizada 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento do processo de imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 30
Tabela 2: Parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) da enzima livre e imobilizada.....35
Tabela 3: Perfil termodiâmico e de inativação térmica da lipase livre e imobilizada.....37

INTRODUÇÃO

Desde o início de suas investigações, a tecnologia empregando enzimas vem sendo utilizada em diversas áreas da indústria como a farmacêutica, de alimentos, para produção de biodiesel e indústria de detergentes. Porém, a utilização destes biocatalisadores em sua forma livre não possibilita a sua separação do meio reacional gerando altos custos.

Neste contexto, a imobilização enzimática apresenta inúmeras vantagens, como a facilidade de recuperação nos meios reacionais, facilitando a sua reutilização. O suporte pode oferecer uma proteção térmica para a enzima, aumentando a estabilidade da mesma em relação ao calor ou solventes e, além disso, podem proporcionar aumento da atividade catalítica tornando-se uma excelente alternativa para o emprego industrial diminuindo os custos de processos biocatalíticos.

Para o processo de imobilização existem inúmeros métodos e deve-se escolher o que melhor se adapta com a enzima para que a atividade catalítica seja mantida ou até mesmo aumentada. As técnicas podem ser físicas (através de interações hidrofóbicas ou por forças de van de Waals), químicas (ligação covalente e iônica), por confinamento em matriz ou por ligação cruzada.

A técnica de imobilização por ligação covalente é um método que proporciona ligações fortes entre os grupos funcionais da enzima e do suporte. Este processo é realizado contendo agentes ativadores como, por exemplo, glutaraldeído e metaperiodato de sódio que promovem a baixa dessorção das enzimas, são de fácil manipulação e possibilitam a utilização das enzimas imobilizadas em reatores contínuos, sendo esta a mais interessante do ponto de vista industrial.

Quanto aos suportes, existe uma grande quantidade e variedade disponíveis para o processo de imobilização enzimática, podendo estes ser sintéticos ou orgânicos, porosos ou não porosos. Sua estrutura pode ser em forma de gel (alginato, álcool polivinílico, quitosana), poliuretano, carragena, estruturas rígidas (vidro poroso, alumina) entre outros.

Os suportes orgânicos vêm recebendo uma atenção especial devido a sua constituição por lignina, celulose e hemicelulose que possuem hidroxilas reativas acessíveis, tornando possível a ligação com a enzima. Estes suportes são provenientes de resíduos agroindustriais que geralmente são acumulados no meio ambiente e por isso, a utilização dos mesmos, além de apresentar um baixo custo, promove a redução de estresse ambiental.

A erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil) é uma espécie de planta nativa das regiões sul do Brasil e de países da América do Sul, como o Paraguai e Argentina. Durante a sua coleta e processamento, são descartados no meio ambiente aproximadamente 5 toneladas por hectare de ramos de erva-mate de maior diâmetro, utilizado como adubo orgânico.

Diante deste contexto, esse trabalho propõe imobilizar a lipase Transform Eversa® 2.0 em palito residual de erva-mate funcionalizado. Além disso, por este suporte ser de origem agroindustrial e nunca ter sido estudado anteriormente, este, destaca-se por ser um trabalho inovador na área de imobilização enzimática.

O formato deste trabalho será apresentado como artigo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo é imobilizar lipase Eversa® Transform 2.0 (Novozyme) em palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. St.- Hil.).

Objetivos específicos:

- Caracterizar o suporte quanto à superfície utilizando o mesmo *in natura* e ativado com APTS/glutaraldeído e com metaperidoto de sódio (MEV).
- Avaliar diferentes metodologias de ativação do suporte;
- Imobilizar a lipase Eversa® Transform 2.0 no suporte tratado;
- Avaliar o rendimento de imobilização;
- Avaliar temperatura ótima reacional da enzima livre e da enzima imobilizada;
- Determinar os parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$);
- Avaliar a termoestabilidade da enzima livre e imobilizada e determinar os parâmetros de inativação;

Imobilização covalente de lipase em palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. st.-Hil)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi imobilizar lipase Eversa® Transform 2.0 em palito residual de erva-mate. O palito de erva-mate passou por um pré-tratamento alcalino e diferentes ativações (APTS/glutaraldeído e metaperiodato de sódio). A imobilização da lipase foi realizada utilizando o solvente hexano e tampão nitrato de amônia pH 10. Foram realizadas caracterização do suporte, a atividade de esterificação, a caracterização da enzima imobilizada e a estabilidade operacional. A caracterização realizada pelo MEV demonstrou que as ativações foram eficientes. A imobilização da lipase em suporte ativado com APTS/glutaraldeído apresentou rendimento de 225,52 % e utilizando metaperiodato de 162,76 %, ambos utilizando o hexano como solventes. A lipase imobilizada apresentou boa estabilidade operacional, onde o suporte ativado com APTS/glutaraldeído apresentou um reuso de até 8 vezes, mantendo atividade de 65,62 % e o suporte ativado com metaperiodato apresentou reuso de até 5 vezes, com uma atividade de 52 % em relação a atividade inicial. A temperatura reacional ótima da enzima livre e imobilizada foi de 40 °C. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram de 16,55 μmol/g e 5555,56 μmol/g.min para a enzima livre e 33,52 μmol/g 4761,9 μmol/g.min para enzima imobilizada, respectivamente. Os parâmetros de inativação térmica (K_d, $t_{1/2}$ e D) confirmaram uma melhor termoestabilidade da lipase enquanto livre.

Palavras-chave: Eversa® Transform 2.0, ativação, suporte orgânico.

1. Introdução

A biocatálise representa uma estratégia crucial em processos sustentáveis, com o uso da síntese por via enzimática sendo comum em diversos processos industriais, incluindo suas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de síntese química fina. Devido à ampla versatilidade de reações que catalisam, e sua especificidade em relação ao substrato, as lipases (EC 3.1.1.3) são as enzimas mais empregadas em processos biocatalíticos, sendo produzidas por diversos organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias (MATTE et al., 2016; GIRELLI, ASTOLFI E SCUTO, 2019; XIE, XIONG e XIANG, 2019).

Em geral, as lipases, apresentam massa molecular entre 20 e 75 kDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, atuam na faixa de pH entre 4 a 9 e na temperatura entre 25 e 70 °C.

Estes biocatalisadores apresentam importantes aplicações indústrias, tais como: de síntese orgânica, de produtos farmacêuticos, de detergentes, de alimentos, de panificação, de bebidas, de cosméticos, de couro, de papel, de tratamento de resíduos, entre outras (REMONATTO, 2017).

A maioria das lipases comerciais é de uso único e difíceis de reutilizar, resultando em custos elevados de uso, desta forma, a imobilização enzimática atraiu um crescente interesse devido à sua capacidade de facilitar a reciclabilidade, além de possibilitar um aumento de atividade, especificidade e seletividade do biocatalisador, devido à maior proteção conferida ao sítio ativo da enzima (CAI et al., 2018; BILAL e IQBAL, 2019; INGENBOSCH et al., 2019, ZAITSEV; SAVINA e ZAITSEV, 2019).

O processo de imobilização enzimática baseia-se em ligações físicas e/ou químicas entre a enzima e o suporte. Entre as técnicas mais utilizadas, vale destacar a adsorção física (interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals), ligação química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada. Devido à forte ligação entre o suporte de imobilização e a enzima, a técnica de ligação covalente é talvez o método mais interessante do ponto de vista industrial (COSTA, 2015; GIRELLI, ASTOLF e SCUTO, 2019; JANGI, AKHOND e DEHGHANI, 2019).

A técnica de imobilização enzimática pode ser conduzida empregando suportes naturais ou sintéticos (VARGAS, 2017). Dentre os suportes naturais destaca-se a utilização de resíduos agroindustriais, os quais se caracterizam por apresentarem grupos funcionais, como hidroxila e carbonila em sua superfície, que possibilitam a inserção covalente das enzimas, sejam de forma direta ou após prévia ativação, além disto, estes apresentam grande disponibilidade e baixo custo econômico (ALMEIDA, 2015).

Na maioria dos suportes de material lignocelulósico faz-se necessário seu pré-tratamento com o objetivo de quebrar/desestruturar a lignina e hemicelulose, permitindo uma melhor acessibilidade à celulose. Dentre os diversos métodos de pré-tratamentos destaca-se o método alcalino, no qual são aplicadas condições menos severas quando comparadas a outros métodos como, por exemplo, os pré-tratamentos ácidos (QUEIROZ et al., 2018).

Neste contexto, destaca-se a indústria ervateira, a qual durante o processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) gera como subproduto palito residual, o qual é atualmente, devido a seu baixo poder calorífico, descartado na própria lavoura, servindo como adubo orgânico. Salienta-se que aproximadamente 2 % da erva-mate empregada no processamento (10.000 toneladas/ano) se transformam em palito residual (ALMEIDA, 2015;

ROSSA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2007; INSTITUTO BRASILEIRO DE ERVA MATE, 2018; PIMENTEL et al., 2019).

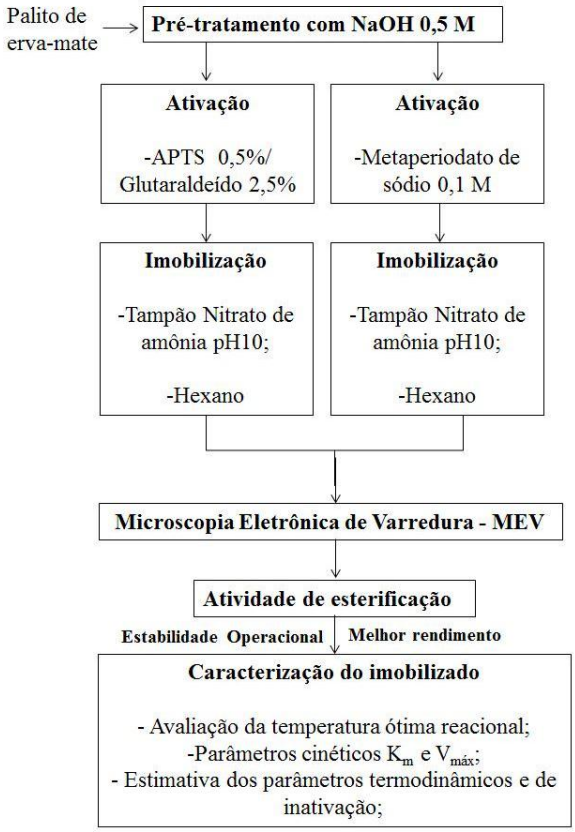
Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo utilizar o palito residual do processo de beneficiamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) como suporte para a imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0. Também foram avaliados o rendimento de imobilização, temperatura ótima reacional, parâmetros cinéticos e de inativação da enzima livre e imobilizada.

Apesar de a literatura apresentar uma ampla variedade de estudos com imobilização enzimática em suportes orgânicos, não foi encontrado nenhum trabalho utilizando o palito residual de erva-mate como suporte, tornando esta pesquisa inovadora.

2. Material e Métodos

A Figura 1 apresenta um fluxograma das etapas realizadas no presente trabalho, as quais serão detalhadas a seguir.

Figura 1: Etapas realizadas no presente trabalho.



Fonte: O autor (2020).

2.1 Enzima

A lipase Eversa® Transform 2.0 (Novozyme) foi doada por uma empresa de óleos localizada no norte do estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. St.-Hil.)

O palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* A. St.- Hil.) foi doado pela empresa ervateira Barão Erva Mate e Chás, localizada no norte do estado do Rio Grande do Sul.

2.3 Funcionalização do Suporte

2.3.1 Pré-tratamento do suporte com NaOH

Para o pré-tratamento do palito residual de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*), foi utilizada a metodologia descrita por Santos et al. (2008), com modificações, onde utilizou-se 5 g do suporte *in natura* em erlenmeyer contendo 250 mL de NaOH (Vetec) 0,5 M. O sistema foi mantido em agitação constante (150 rpm) empregando agitador magnético (Fisatom - Mod. 752A), por 24 h a temperatura ambiente (25 ºC). Posteriormente o suporte foi lavado com água destilada até pH neutro, filtrado e seco em estufa (Crhomos) a 100 ºC até atingir massa constante.

2.3.2 Silanização e ativação do suporte com APTS/glutaraldeído

O suporte foi silanizado conforme metodologia descrita por Queiroz et al. (2018), com modificações, utilizando-se 12 mL de uma solução de γ–aminopropiltrietoxilano (APTS) (Sigma-Aldrich, 98 %) 0,5 % (v/v) em heptano (Sigma-Aldrich) e 1 g de palito residual de erva-mate. O sistema foi mantido em agitação constante (40 rpm) a 75 °C, por 3 h. Posteriormente o sistema foi filtrado e o suporte lavado com 10 mL de hexano (P.A. - Química Moderna) por 3 vezes para retirada do excesso de APTS. O palito lavado foi mantido em estufa (Crhomos) a 100 °C por 15 h para secagem completa.

Na sequência, o palito silanizado foi ativado com 10 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (Vetec, 25 %) a 2,5 % (v/v). A mistura foi mantida por 1 h em temperatura

ambiente (25 °C). Posteriormente foi filtrada, lavada por 3 vezes com 10 mL de água destilada e seca em estufa a 100 ºC por 1 h para remoção do excesso de água.

2.3.3 Ativação do suporte com metaperiodato de sódio

A ativação com metaperiodato de sódio seguiu a metodologia descrita por Coradi (2018), onde 1 g do suporte tratado com NaOH 0,5 M foi ativado com 10 mL de metaperiodato de sódio 0,1 M. O sistema foi mantido estático, ao abrigo de luz, por 48 h para formação de grupos aldeídos. Após foi filtrado, lavado com água destilada por 3 vezes (100 mL cada) e mantido em estufa (Crhomos) a 100 °C por 1 h para retirada da umidade.

2.4 Caracterização do suporte – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI/ Erechim, utilizando um microscópio marca Zeiss, modelo EVO LS25. Para o recobrimento da superfície das amostras com ouro foi utilizado um metalizador Quorum, SC 7620. As micrografias foram obtidas na tensão de 30 KV. As amostras analisadas foram as seguintes: suporte *in natura*; suporte pré-tratado com NaOH e ativado com APTS/glutaraldeído; suporte pré-tratado com NaOH e ativado com metaperiodato de sódio.

2.5 Imobilização

A imobilização da lipase nos palitos residuais de erva-mate funcionalizados (APTS/glutaraldeído e metaperiodato de sódio) foi realizada de acordo com metodologia proposta por Queiroz et al. (2018), onde 1 g de palito funcionalizado foi suspenso em 10 mL de solvente (hexano ou tampão nitrato de amônia pH 10 (NH_4NO_3)). Os sistemas foram mantidos sob agitação mecânica, a temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, adicionou-se 0,3 g de enzima, que corresponde a 30 % (m/m) da massa de suporte, mantendo o sistema em agitação (100 rpm) por 3 h a 25 °C para homogeneização, seguido de armazenamento em condição estática, a 4 °C, por 24 h.

Posteriormente, o suporte contendo a enzima imobilizada, foi filtrado e lavado 2 vezes com 10 mL de solvente (hexano ou tampão nitrato de amônia) para retirada de enzimas não

ligadas. Após uma filtração a vácuo (MARTE – mod. 131) a enzima imobilizada foi mantida em dessecador por 24 h para retirada do excesso de umidade e armazenada em geladeira até o momento das análises.

2.6 Atividade de esterificação

A atividade enzimática foi avaliada através do método de esterificação utilizando a metodologia de Hildebrand et al. (2009), com modificações, onde utilizou-se como substrato o ácido láurico e etanol, com uma razão molar de 1:1, livre de solvente. A reação foi conduzida empregando 0,3g da enzima livre e/ou da enzima imobilizada, a 40 °C, 150 rpm, por 5 minutos a enzima livre e 10 minutos a enzima imobilizada, conforme testes prévios. Alíquota de 150 µL do meio reacional foram diluídas em 2 mL de solução acetona-etanol (1:1 v:v) em erlenmeyer e analisadas volumetricamente empregando NaOH 0,1 M com o titulante e fenolftaleína como indicador.

Para o branco o procedimento foi o mesmo, porém não foi acrescentado a enzima (livre ou imobilizado).

Foi realizada a atividade de esterificação do suporte de palito de erva-mate antes do processo de imobilização para verificação de que não haveria nenhum interferente na medida de atividade.

Uma unidade de atividade de esterificação (U/g de enzima livre ou imobilizada) foi definida como a quantidade de ácido láurico (µmol) consumido por min, por massa de enzima (g), definida pela Equação 1.

$$AE = \frac{(V_{NaOH\ branco} - V_{NaOH\ amostra})\ x\ 0{,}1}{t.m} \text{ x } 1.000 \qquad (1)$$

Onde: *AE*: atividade de esterificação (U/g); $V_{NaOHbranco}$: Volume de NaOH gasto com o ensaio em branco (mL); $V_{NaOHamostra}$: Volume de NaOH gasto após a reação de esterificação de cada amostra (Enzima livre ou imobilizada) (mL); *t*: Tempo (minutos); *m*: Massa da enzima livre ou da enzima imobilizada utilizada (g).

O rendimento de imobilização *{R(%)}* foi calculado de acordo com a equação 2.

$$R(\%) = \frac{m_{(EI)}\ .\ Ae_{(EI)}}{Ae_{(L)}\ .\ mE}\ x\ 100 \qquad (2)$$

Onde: *R (%)*= Rendimento obtido da imobilização; $M_{(EI)}$ é a massa da enzima imobilizada utilizada para a esterificação, em g; $Ae_{(EI)}$ é a atividade de esterificação (U/g) da enzima imobilizada; $Ae_{(L)}$ é a atividade de esterificação (U/g) da enzima livre; *m* é a massa da enzima livre oferecida na imobilização, em g.

2.7 Estabilidade operacional (reuso)

A reutilização da lipase imobilizada em palito residual de erva-mate foi determinada empregando 0,3 g da enzima imobilizada, em sucessivos ciclos, em batelada, para a esterificação de ácido láurico/etanol (1/1 (m/m)) a 40 ºC por 10 min. Após cada batelada, as amostras foram removidas do meio reacional, filtradas através de bomba a vácuo (MARTE – mod. 131) e adicionadas em uma nova solução de ácido láurico/etanol. A atividade do primeiro ciclo foi considerada como 100%. A eficiência do reuso foi calculada conforme apresentado na Equação 3.

$$ER\ (\%) = \frac{Atividade\ lipolítica_{ciclo\ n}}{Atividade\ lipolítica_{ciclo\ 1}} . 100 \qquad (3)$$

Onde: *ER (%)*= eficiência do reuso; Atividade lipolítica $_{\text{ciclo n}}$= atividade lipolítica de cada ciclo; Atividade lipolítica $_{\text{ciclo 1}}$= atividade lipolítica inicial.

2.8 Caracterização da enzima imobilizada

2.8.1 Avaliação da temperatura reacional

Visando verificar a temperatura reacional foram conduzidos experimentos com a lipase livre e imobilizada no palito de erva-mate. Como reação modelo empregou-se a determinação de atividade de esterificação descrita por Hildebrand et al. (2009) com modificações (Equação 1), a 35, 40, 45, 50, 55 e 60 ºC, sob agitação de 150 rpm, por 5 min para a enzima livre e 10 min para a enzima imobilizada, conforme testes prévios, pois acima de 5 min de reação a enzima livre já começa perder atividade.

2.8.2 Determinação dos parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$)

Para determinação da velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) e a constante de afinidade (K_m) da enzima livre e imobilizada em palito residual de erva-mate, foram conduzidos ensaios de atividade enzimática empregando diferentes concentrações (0,668 - 3,9 M) de etanol no substrato ácido láurico/etanol. A velocidade inicial de reação (V_0) foi determinada para cada concentração do substrato [S], fixando as variáveis de tempo de reação em 5 min para a enzima livre e 10 min para a enzima imobilizada e a temperatura mantida em 40 ºC. O cálculo dos parâmetros cinéticos ($V_{máx}$ e K_m) foi realizado conforme o modelo cinético de Michaelis-Menten, apresentado na Equação 4 com a linearização de Lineweaver-Burk (Equação 5) e a eficiência catalítica foi calculada conforme a Equação 6.

$$V_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]} \tag{4}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \tag{5}$$

Onde: V_0= velocidade inicial da reação; $Vmáx$= velocidade máxima de reação; Km= constante cinética de Michaelis-Menten; [S]= concentração de substrato.

$$EC = \frac{V_{máx}}{K_m} \tag{6}$$

Onde: EC= eficiência catalítica; $Vmáx$= velocidade máxima de reação; Km= constante cinética de Michaelis-Menten.

2.8.3 Perfil de estabilidade térmica

Amostras da enzima livre e da enzima imobilizada foram incubadas em frascos de vidro (esterilizados) fechados, em estufa com temperatura controlada (40, 50, 60 e 70 ºC) por até 24 h. Periodicamente, para cada temperatura, foram retiradas alíquotas das enzimas livres

e imobilizada e submetidas à medida de atividade. Para cada tempo avaliado foram utilizadas amostras novas, que após a dosagem de atividade foram descartadas.

As atividades residuais foram calculadas como descrito na Equação 7.

$$R\ (\%) = \frac{U_F}{U_I}\ .100 \tag{7}$$

Onde: *R (%)*= é a atividade residual; U_I= atividade inicial; U_F= atividade após a incubação à temperatura avaliada.

2.8.4 Estimativa dos parâmetros cinéticos de inativação

A influência da temperatura (40, 50, 60 e 70 ºC) sobre a constante de velocidade de inativação enzimática (K_d) foi analisada pela lei de Arrhenius, representada na Equação (8). Os parâmetros E_d foram calculados por regressão não linear usando o *software* Excel.

$$Kd = Ae\ \frac{-Ed}{RT} \tag{8}$$

Onde: *Kd*= constante de velocidade de inativação térmica; *Ae*= constante pré-exponencial de Arrhenius; *Ed*= energia de energia de desativação enzimática; *R*= constante universal dos gases (8,314x10-3 $kJ.mol^{-1}K^{-1}$); *T*= temperatura absoluta (K).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e o valor de redução decimal (D), cujos valores correspondem aos tempos necessários para obter uma redução de 50 e 90 % da atividade inicial a uma dada temperatura, respectivamente foram calculados empregando as equações 9 e 10, respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{Ln\ (2)}{Kd} \tag{9}$$

Onde: *t1/2*= tempo de meia vida; *Ln (2)*= logaritmo natural; K_d= constante de desativação.

$$D = \frac{Ln\ (10)}{Kd} \tag{10}$$

Onde: *D*= redução decimal; *Ln*= logaritmo natural; *Kd*= constante de desativação.

O valor Z, especificado como a variação da temperatura requerida para que o valor D sofra uma redução de um ciclo logarítmico, foi estimado pelo inverso do coeficiente angular da reta no gráfico de log (D) versus temperatura (°C).

2.8.5 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos entalpia (ΔH^o; kJ.moL^{-1}), energia livre de Gibbs (ΔG^o; kJ.moL^{-1}) e entropia (ΔS^o; kJ.moL^{-1}.K^{-1}) do processo de desnaturação da lipase livre e imobilizada foram determinados mediante as equações 11, 12 e 13, respectivamente:

$$\Delta H° = Ed - RT \quad (11)$$

$$\Delta G° = -RTLn \frac{K_d h}{K_b h} \quad (12)$$

$$\Delta S° = \frac{(\Delta H - \Delta G°)}{T} \quad (13)$$

Onde: E_d= energia de desativação enzimática; *R*= constante universal dos gases (8,314x10-3 kJ mol^{-1}K^{-1}); *T*= temperatura absoluta (K); *Kd*= constante de velocidade da desnaturação; *h*= é a constante de Plank (1,84 x 10^{-40} kJ.h^{-1}); K_b= constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-26} kJ.K^{-1}).

2.9 Análise Estatística

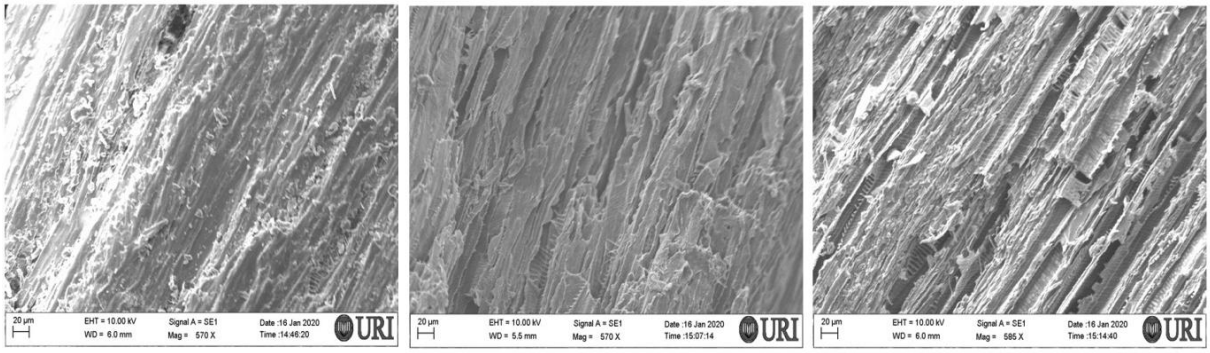
Todos os experimentos foram realizados em duplicata de reação e triplicata de titulação, a partir disto foi feito a média dos resultados obtidos através da análise estatística utilizando o *software* Excel, versão 2010.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização física do suporte

A Figura 2 apresenta as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do palito de erva-mate *in natura* e ativado com NaOH/APTS/glutaraldeído e com NaOH/metaperiodato de sódio.

Figura 2: Aspecto visual do palito residual de erva-mate *in natura* (a), palito ativado com APTS/glutaraldeído (b) e palito ativado com metaperiodato de sódio (c).



(a) (b) (c)

Fonte: O autor (2020).

Ao analisarmos a Figura 2, observa-se que o palito *in natura* apresenta uma estrutura mais rígida/lisa comparada aos palitos ativados, onde estes sofreram aberturas em suas estruturas, sendo que o palito ativado com metaperiodato de sódio ($NaIO_4$) apresentou maior alteração estrutural, como por exemplo a desestruturação da lignina, possibilitando a exposição da celulose, comparado ao ativado com APTS/glutaraldeído.

Esta tendência era esperada e foi vinculada aos diferentes mecanismos de ativação a que os suportes foram submetidos, mais especificamente, ao caráter degradativo dos reagentes empregados em cada ensaio. Ambos os suportes foram pré-tratados com NaOH, um poderoso agente alcalino, porém, a ativação com APTS/glutaraldeído é menos agressiva comparada a ativação com metaperiodato de sódio, o qual é um poderoso agente oxidativo, isto explica a maior degradação da estrutura do suporte.

3.2 Imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 em palito residual de erva-mate

Os resultados de rendimento do processo de imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0, em palito residual de erva-mate ativado com diferentes metodologias, frente à utilização do tampão nitrato de amônia pH 10 e o solvente apolar hexano, são apresentados na Tabela 1.

O teste de esterificação do suporte antes da imobilização foi realizado e não apresentou atividade, demonstrando não conter interferentes nos resultados obtidos com os suportes imobilizados.

Tabela 1. Rendimento do processo de imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0.

Enzima	**Solvente**	**Massa total (g)**	**U/g***	**(U)***	**Rendimento (%)**
Livre		0,300	941,70	282,5	-
Imobilizada APTS/Glut.	Tampão NH_4NO_3	1,485	190,64	283,1	100,21
	Hexano	1,288	494,65	637,1	225,52
Imobilizada Metaperiodato	Tampão NH_4NO_3	1,020	-	-	-
	Hexano	1,063	432,56	459,8	162,76

*(U/g)= Atividade de esterificação
*(U)= Atividade total no derivado
Fonte: O autor (2020).

O rendimento da enzima imobilizada foi comparado ao da lipase Eversa® Transform 2.0 na sua forma livre, a qual apresentou atividade de esterificação de 941,7 U/g. Podemos observar um rendimento de 225,52 % e de 100,21 % para a imobilização utilizando hexano e tampão nitrato de amônia pH 10, respectivamente, ambos ativados com APTS/glutaraldeído, respectivamente. Quando a imobilização em palito de erva-mate foi realizada utilizando o metaperiodato de sódio para ativação do suporte, os valores de imobilização obtidos foram de 162,76 % utilizando meio reacional com hexano. A imobilização em tampão nitrato de amônia pH 10, após ativação com periodato, gerou um imobilizado sem atividade, provavelmente devido ao não ancoramento químico da enzima ao suporte nesta condições experimentais.

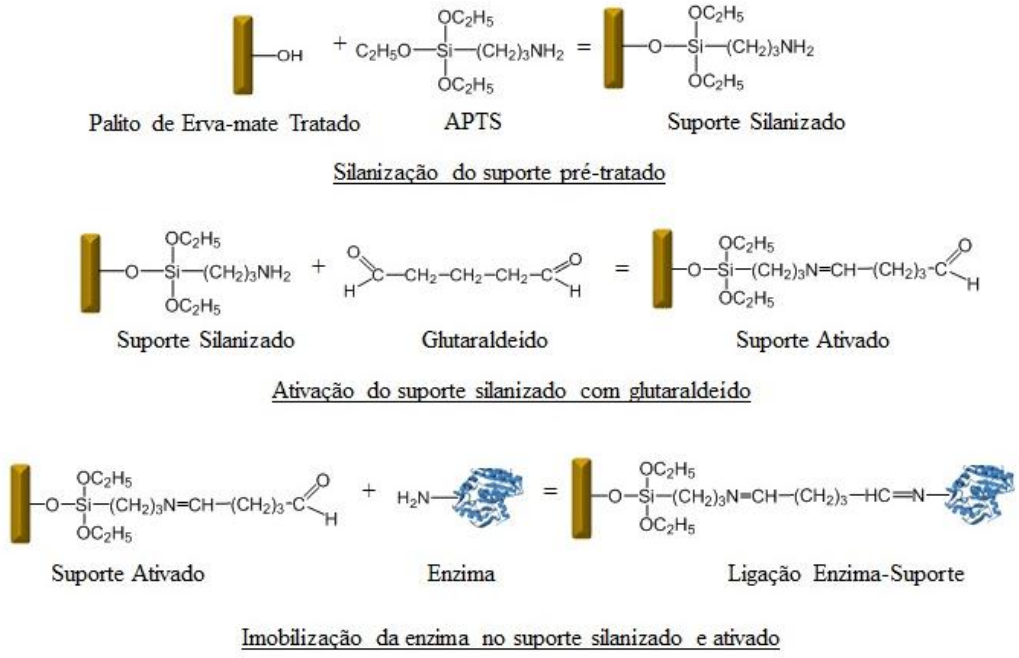
O maior rendimento observado para o imobilizado sintetizado em hexano (225,52 %), em relação a solução aquosa de tampão nitrato de amônio (100,21 %), pode estar relacionado ao efeito do solvente orgânico sobre a atividade enzimática, mais especificamente com a

manutenção da camada de hidratação, necessária para a manutenção da atividade catalítica (ARAGÃO et al., 2009). Em relação ao resultado encontrado para a solução aquosa de tampão NH_4NO_3, o efeito pode estar ligado à desprotonação de aminoácidos, que é uma condição essencial para que ocorra imobilização por ligação covalente e ocorre quando o pH do meio é superior ao ponto isoelétrico (PI) deste aminoácido. Em pH 10 há maior quantidade de aminoácidos desprotonados, caracterizando então, para a alcalinidade do meio reacional, condição favorável para imobilização enzimática (GONÇALVES, 2018).

O efeito decorrente de interações hidrofóbicas entre o solvente e a enzima, pode conduzir a uma maior exposição do sítio catalítico, o que facilitaria a catálise (ANTCZAK et al., 2009). Outro fator é que o solvente apolar pode desfazer agregados de enzimas, que normalmente ocorrem por interação hidrofóbica entre as moléculas da proteína (BARON, 2008).

Segundo Melo et al. (2005), durante o processo de silanização ocorre a formação de uma ponte orgânica no suporte por meio da reação com γ–aminopropiltrietoxilano (APTS), onde o radical etil do APTS reage com o grupo silanol do suporte, gerando uma terminação amina, que será ativada com o glutaraldeido, formando grupos aldeídos necessários para a ligação enzima-suporte, conforme apresentado na Figura 3.

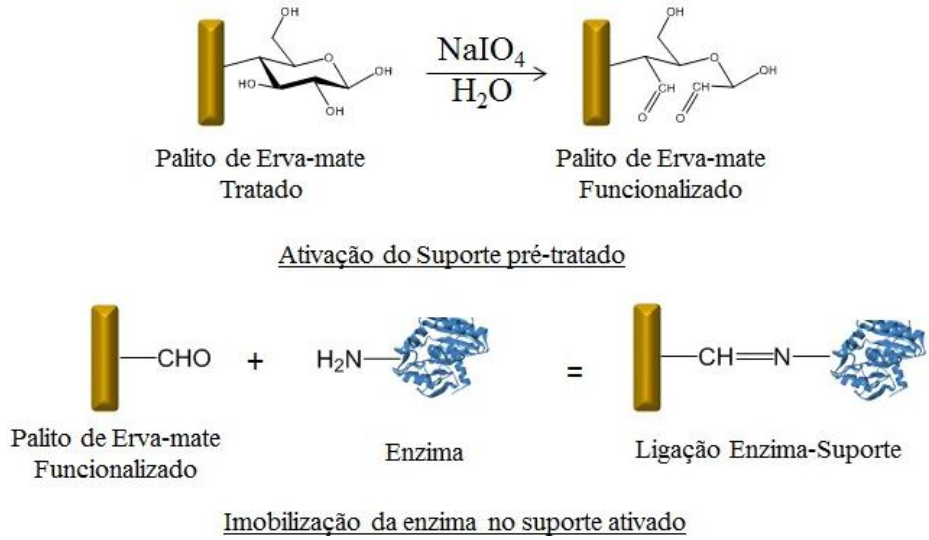
Figura 3: Processo de sinalização e ativação, utilizando APTS/glutaraldeído, do palito residual de erva-mate para imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de Melo et al. (2005).

A Figura 4 apresenta a ativação do suporte com metaperiodato de sódio, onde através do pré-tratamento com NaOH o palito residual de erva-mate tem suas hidroxilas expostas e ao adicionar o metaperiodato de sódio são formados grupos aldeídos no suporte, proporcionando assim, a possibilidade de ligação com os grupamentos amina da enzima.

Figura 4: Processo de ativação, utilizando metaperiodato de sódio no palito residual de erva-mate para imobilização enzimática.



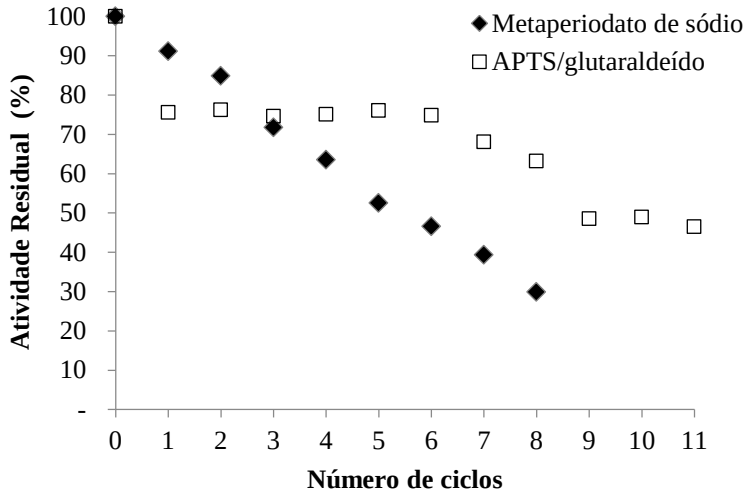
Fonte: O autor, (2020).

3.3 Estabilidade operacional (reuso)

A Figura 5 apresenta o número de ciclos da enzima imobilizada com palito residual de erva-mate funcionalizado com APTS/glutaraldeído e com metaperiodato de sódio.

Observa-se que a enzima imobilizada no suporte funcionalizado com APTS/glutaraldeído apresenta uma perda mais acentuada no primeiro ciclo, com 70 % de atividade, mantendo-se estável até o oitavo ciclo, apresentado queda de 50 % da atividade residual no décimo ciclo de utilização. A enzima imobilizada no suporte ativado com metaperiodato de sódio apresenta uma perda de atividade menos intensa nos primeiros ciclos (com atividades de 90 e 84 % para o primeiro e segundo, respectivamente). No entanto, esta perda de atividade é constante, apresentando perda de 50 % de atividade no quinto ciclo, demostrando que o imobilizado em suporte funcionalizado com APTS/glutaraldeído possuí maior estabilidade.

Figura 5: Capacidade de reuso/ciclos da lipase imobilizada no suporte funcionalizado com APTS/glutaraldeído e no suporte funcionalizado com metaperiodato de sódio.



Fonte: O autor (2020).

Os 10 ciclos observados para o imobilizado em suporte funcionalizado com APTS/ glutaraldeído são superiores aos reportados por Antunes (2015), os quais observaram um total de 6 e 4 reciclos com atividade residual de 50 % para a lipase *Candida antarctica B* imobilizada em espuma flexível de Poliuretano- D18 e D30, respectivamente. Godoy (2019) ao imobilizar a lipase Eversa® Transform 2.0 em suporte de alginato de cálcio obteve apenas 1 ciclo de reuso com atividade residual superior a 50 %. Costa (2015), que obteve 6 reciclos na reação de hidrólise do azeite de oliva utilizando lipase comercial (*Burkholderia cepacia*) imobilizada em sabugo de milho.

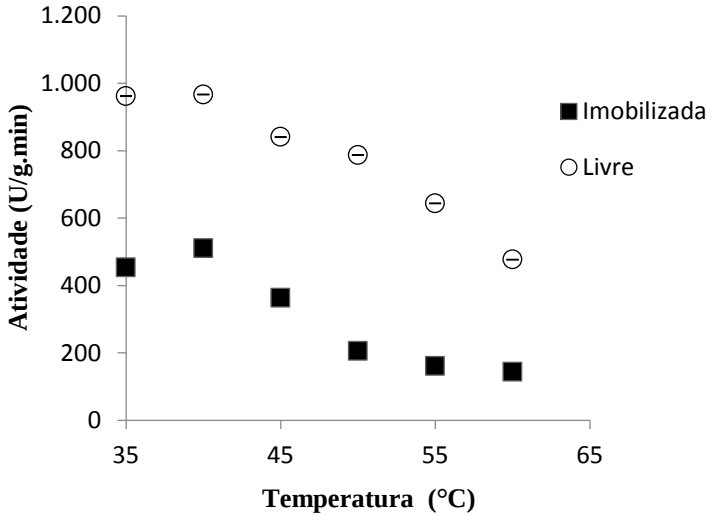
De acordo com os resultados obtidos, optou-se pela utilização do suporte ativado com APTS/glutaraldeído e imobilizado em solução contendo o solvente hexano para dar continuidade aos estudos referentes à temperatura reacional ótima, parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) e termodinâmicos e de inativação térmica.

3.4 Avaliação da temperatura reacional ótima

Os estudos realizados referente a temperatura ótima reacional da enzima, tanto para a e livre como imobilizada, demonstraram que a enzima consegue atuar e ter sua maior atividade de esterificação à temperatura de 40 °C (Figura 6), o que está coerente com a ficha técnica da enzima (NOVOZYMES, 2016) e com a literatura (CONTESINI et al., 2010; JAIN e NAIK,

2018; FRAGA et al., 2019), os quais relatam para a temperatura uma faixa ótima entre 40 e 60 ^{o}C.

Figura 6: Temperatura reacional ótima da enzima livre e imobilizada.



Fonte: O autor (2020).

3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}$ (Constate de Michaelis-Mentem) e K_m (velocidade máxima de reação)

Os parâmetros cinéticos enzimáticos K_m e $V_{máx}$ são duas constantes de suma importância no estudo das reações enzimáticas (SIQUEIRA et al., 2011). O valor do K_m para determinada enzima fornece uma indicação da força de ligação dessa enzima ao seu substrato, onde baixo K_m indica maior afinidade para o substrato. O $V_{máx}$ é definido como a velocidade máxima da quantidade total de enzima participante da reação. Essa medida é teórica e tem um valor aproximado porque, em determinado momento, exigiria que todas as moléculas enzimáticas estivessem fortemente ligadas aos seus substratos (CASTRO et al., 2015).

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da enzima livre e imobilizada foram calculados a partir do modelo de Michaelis-Mentem, utilizando a linearização de Lineweaver–Burk. A Tabela 2 apresenta os valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados neste estudo, bem como os valores de eficiência catalítica (V_{max}/K_m).

Tabela 2. Parâmetros cinéticos constante de afinidade (K_m) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) da enzima livre e imobilizada.

	Eq. da Reta	**R^2**	**K_m (µmol/g)**	**$V_{máx}$ (µmol/g.min)**	**$V_{máx}$/ K_m (min^{-1})**
Enzima livre	0,00298x + 0,00018	0,98932	16,55	5.555,56	335,6
Enzima imobilizada	0,00704x + 0,00021	0,99291	33,52	4.761,90	142

Fonte: O autor (2020).

O valor de $V_{máx}$ para a enzima livre foi 5.555,56 µmol/g.min e para a enzima imobilizada de 4.761,90 µmol/g.min. Enquanto o valor de K_m para lipase livre foi 16,55 µmol/g e para a enzima imobilizada o valor de K_m foi de 33,52 µmol/g (Tabela 2). Pode-se observar que o K_m da enzima livre foi inferior ao K_m da enzima imobilizada, indicando uma maior afinidade ao substrato.

Em termos de eficiência catalítica (V_{max}/K_m), a enzima livre com 335,6 min^{-1} apresentou melhor desempenho em relação ao imobilizado, com 142 min^{-1}.

Ambas as tendências observadas entre os valores de constante de afinidade para os sistemas avaliados ($K_{m(imobilizado)} > K_{m(livre)}$) e eficiência catalítica (livre > imobilizado) foram vinculadas a fatores como: *i)* limitações da transferência de massa entre substrato/enzima: o processo homogêneo com a enzima livre favorece o contato da enzima com o substrato em relação ao meio heterogêneo quando do emprego do imobilizado; *ii)* alterações na conformação tridimensional da enzima imobilizada em relação a livre, a qual pode estar afetando o sítio ativo da enzima imobilizada; *iii)* as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima e; *iv)* a maior massa enzimática no sistema livre em relação ao imobilizado, o qual possui em sua composição aproximadamente 20 % do equivalente em enzima livre (SIMÕES et al., 2011; COSTA, 2015).

Comportamentos semelhantes são relatados na literatura para lipase imobilizada em outros suportes. Wang et al. (2019) utilizaram lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em suporte de montmorilonita anfifílica (Mt) funcionalizada com 3-aminopropiltrietoxissilano (APTS) e encontraram valores de K_m para lipase livre e imobilizada de 0,357 e 3,406 (mM), respectivamente, e valores de eficiência catalítica (V_{max}/K_m) para a lipase livre e imobilizada de 178,4 e 91,7 $min.^{-1}$, respectivamente. Kirtikumar e Badgujar (2015), ao avaliarem lipase

imobilizada em copolímero biocompatível de álcool polivinílico e quitosana, encontraram valores de $V_{máx}$ de 50.000 μmol/g.min para a enzima livre e 36.360 μmol/g.min para a enzima imobilizada.

Tomke e Rathod, (2018) avaliaram o K_m e $V_{máx}$ de lipase livre e imobilizada em carvão ativado gerado a partir de resíduos agroindustriais de coco e casca de amendoim e obtiveram comportamentos semelhantes aos encontrados neste trabalho com valores de k_m de 0,57 e 0,64 (mg/mL) para a lipase livre e imobilizada, respectivamente e valores de $V_{máx}$ de 4,62 e 4,71 (μmol/min) para a lipase livre e imobilizada, respectivamente. Os autores sugerem que tal comportamento pode ser em função de que pode ter havido uma diminuição na flexibilidade conformacional da estrutura da enzima imobilizada.

Em 2011, Simões e colaboradores, utilizando lipase Cal B imobilizada em quitosana também encontram comportamentos semelhantes aos deste estudo, com valores de $V_{máx}$ iguais a 12050 mmol/g min (lipase livre) e 1409 mmol/g min (lipase imobilizada). Os valores de K_m encontrados foram de 534 mM (livre) e 851 mM (imobilizada). Os autores sugerem que este comportamento indica uma mudança da afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada em função dos efeitos de interacao enzima e suporte do processo de imobilização.

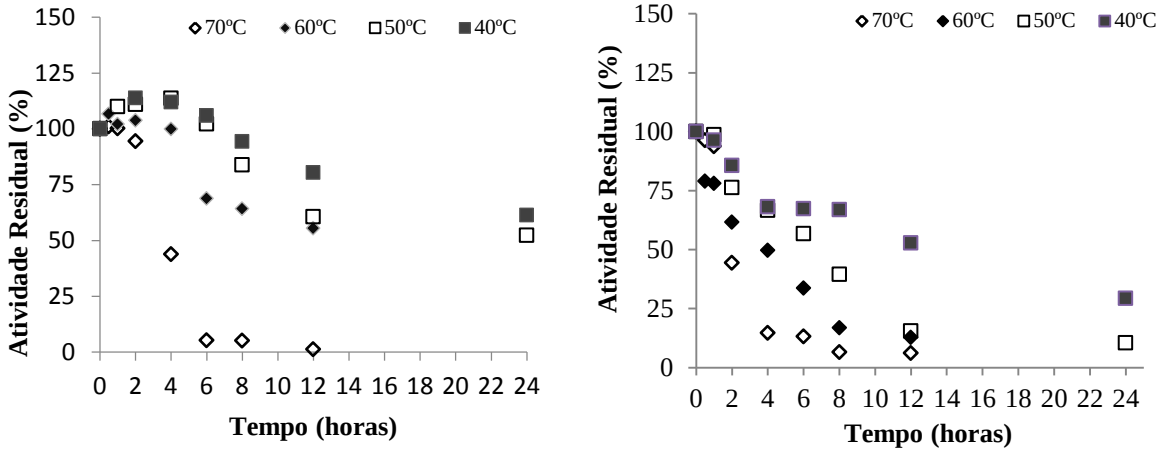
3.6 Estimativa dos parâmetros termodinâmicos e de inativação

Considerando que a faixa de temperatura reacional ótima obtida experimentalmente, a qual esta coerente com a literatura (Contesini et al., 2010; Novozymes, 2016; Jain e Naik, 2018; Fraga et al., 2019), foi entre 40 e 60^{o}C, os ensaios de termoestabilidade para as enzimas livre e imobilizada foram avaliados entre 40 e 70^{o}C.

As atividades residuais da lipase livre e imobilizada em diferentes temperaturas são apresentadas na Figura 7.

Para ambas as enzimas (livre e imobilizada), todas as temperaturas avaliadas apresentam uma mesma tendência, com perda de atividade residual em função do tempo. Esta perda de atividade varia linearmente com a temperatura, com os ensaios a 40 e 70 ^{o}C apresentando a menor e maior perda de atividade, respectivamente. Entre as enzimas, a imobilizada apresentou perdas de atividade mais acentuadas em relação a livre, indicando um efeito negativo da imobilização em relação a termoestabilidade da enzima. A dimensão deste efeito pode ser mensurada a partir dos valores apresentados na Tabela 3.

Figura 7: Termoestabilidade da lipase livre (a) e imobilizada (b) nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C.



(a) (b)

Fonte: O autor (2020).

Tabela 3. Perfil termodinâmico e de inativação térmica da lipase livre e imobilizada.

T (°C)	T (K)	K_d	R^2	½ (h)	D (h)	Z (°C)	Ed (KJ/mol)	ΔG (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)
Enzima livre										
40	313,15	0,02	0,97	35,72	118,69	48,08	81,26	10,03	0,097	-30,36
50	323,15	0,03	0,99	25,96	86,23			9,51	0,095	-30,88
60	333,15	0,05	0,97	13,72	45,59			8,08	0,097	-32,31
70	343,15	0,36	0,96	1,91	6,37			2,83	0,109	-37,56
Enzima imobilizada										
40	313,15	0,05	0,98	13,27	44,11	37,03	54,17	7,51	0,149	-46,65
50	323,15	0,10	0,98	7,18	23,86			6,14	0,148	-48,03
60	333,15	0,17	0,98	3,97	13,21			4,73	0,148	-49,44
70	343,15	0,34	0,98	2,04	6,77			3,01	0,149	-51,16

Fonte: O autor (2020).

De acordo com a Tabela 3 a temperatura acelera o processo de inativação térmica das enzimas, tanto livre quanto imobilizada. A velocidade com que acontece a inativação da lipase imobilizada, representada pela constante de desativação (K_d), é maior se comparada com a lipase livre, indicando a ausência de proteção térmica devido a imobilização.

Confrontando os K_d obtidos para às temperaturas de 40, 50 e 60 °C (Tabela 3), verifica-se que os K_d da lipase imobilizada foram 2,73; 3,69 e 3,48 vezes maior que o determinado para a lipase livre, respectivamente.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial da enzima, enquanto que o valor D (tempo mínimo de

redução) é definido como o tempo necessário para uma redução de 90 % na atividade enzimática inicial. A lipase livre mostrou-se mais estável à inativação térmica do que na forma imobilizada, obtendo-se tempos de $t_{1/2}$ na faixa de 35,72 a 1,91 h e valores de D de 118,69 a 6,37 h (Tabela 3).

Os valores de z obtidos foram de 48,08 °C e 37,03 °C para a enzima livre e imobilizada, respectivamente, ou seja, ao variar a temperatura para mais ou para menos no valor de Z, muda-se o valor D em um ciclo logarítmico. O valor Z indicou que são necessárias grandes variações de temperatura para afetar consideravelmente a estabilidade da enzima, principalmente em relação à mesma no seu estado livre.

O maior valor de energia de desativação (Ed) da lipase livre (81,26 KJ/mol) comparada com a lipase imobilizada em palito de erva-mate (54,17 KJ/mol), sugere que a lipase livre requer uma maior quantidade de energia antes de ocorrer o desdobramento da proteína e iniciar o processo de inativação térmica, em relação a enzima imobilizada, sugerindo que o suporte não foi eficiente para a proteção da enzima frente à degradação térmica.

A determinação dos parâmetros termodinâmicos (energia livre de Gibss (ΔG^o), entalpia (ΔH^o) e entropia (ΔS^o)) ajudam a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, bem como o efeito da temperatura na taxa de desnaturação enzimática, sendo comumente empregados para avaliar a estabilidade térmica das enzimas (VARGAS, 2017).

Os parâmetros de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) fornecem o número de ligações não covalentes quebradas e a mudança na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição (HEIDTMANN et al., 2012).

A energia livre de Gibbs mede a espontaneidade da reação, estando a instabilidade proteica diretamente relacionada a valores de ΔG, sendo que estes, quando elevados, indicam maior estabilidade térmica da enzima (CASTRO et al., 2015). Os valores positivos de ΔG^o para todos os derivados enzimáticos estudados mostraram que o processo de inativação térmica da lipase é termodinamicamente não espontâneo. Além disso, os maiores valores de ΔG^o registrados para a lipase livre demonstraram que o estado assumido pela enzima, após o tratamento térmico, tem maior energia disponível e a conformação estrutural original permaneceu mais ativa em comparação com a enzima imobilizada (BUSTAMANTE-VARGAS et al., 2019).

A variação de entropia (ΔS^o) representa o grau de desordem do sistema. Heidtmann et al. (2012) descreve que valores positivos de ΔS sugerem que o desdobramento da enzima

pode ser uma etapa determinante para a termoinativação irreversível da enzima. Valores baixos de ΔS sugerem uma desordem insignificante no sistema e também podem ser altamente influenciados por vários fatores, incluindo o efeito do solvente e da estrutura. Neste estudo os valores de ΔS foram positivos para ambos os casos, demonstrando que a reação é entropicamente favorável, contudo a variação de ΔS foi pequena. Para a enzima imobilizada os valores de ΔS (0,148 a 0,149 KJ/mol), foram superiores aos observados para a enzima livre (0,095 a 0,109 KJ/mol) e a temperatura não foi um fator que influenciou neste parâmetro.

Em relação a entalpia (ΔH) todos os valores foram negativos, tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada, indicando que a reação é exotérmica, com uma maior liberação de energia para o meio para a enzima imobilizada (-46,65 a -51,16 KJ/mol) em relação a enzima livre (-30,36 a -37,56 KJ/mol).

Resultados similares foram observados por Antunes (2019) para a lipase CALB imobilizada em xerogel empregando álcool polivinílico (PVA) como aditivo, apresentando valores de K_d superiores e t ½ inferiores em relação a enzima livre, para a faixa de temperatura avaliada (40 – 80 °C). De acordo com a autora a menor estabilidade térmica pode estar relacionada a funcionalidade do suporte, aliada a temperatura, interferindo de forma negativa sobre a estabilidade da enzima, conduzindo a perda de atividade da mesma e, consequentemente, potencializando a inativação térmica da enzima imobilizada em relação a livre.

4. Conclusões

A proposta de imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 em palito residual de erva-mate ativado com APTS/glutaraldeído e metaperiodato de sódio, utilizando como meio reacional de imobilização o hexano, mostrou-se promissora com 225,5 e 162,7 % de rendimento e possibilidade de até 8 e 5 ciclos de utilização com atividade residual de 65,62 % e 52 %, respectivamente. Além disso, os resultados obtidos podem ser uma base de referência para pesquisas posteriores envolvendo a utilização de matérias lignocelulósicos como suportes em processos de imobilização enzimática.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES - código financeiro 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L. C. de. Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* Em biochar derivado de semente de goiaba (*Psidium guajava* L). **Dissertação.** Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos – Pep, Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju, SE, 2015. https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/handle/set/1523.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S.; Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v.34, p.1185-1194, 2009. https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.11.013.

ANTUNES, A. Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CALB) *in situ* em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades. **Dissertação.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim/RS, 2015. http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2702.pdf.

ANTUNES, A. Imobilização de lipase de *Candida antarctica B in situ* em matriz hidrofóbica de xerogel e sonogel usando tmos como precursor da sílica com diferentes aditivos. **Tese.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim/RS, 2019. http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3800.pdf.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; CARLOS BURKERT, A. V.; BURKERT, J. F. M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, Vol. 32, No. 9, 2268-2272, 2009. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900005**.**

BARON, A. M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. **Tese**. Programa de Pós-graduação em Química – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, 2008. https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/17166/Tese%20Alessandra%20Machado%20Baron.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

BILAL, M.; IQBAL, H, M, N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules** 130, 462–482. 2019. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; JUNGES, A., VENQUIARUTO, L. D.; ORO, C. E. D.; JULIO- OROZCO, D. J.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; PAROUL, N.; BACKES, G. T; DALLAGO, R. M.. Thermal inactivation kinetics and thermodynamic properties of immobilised *Aspergillus niger* pectinase in rigid polyurethane foam. **International Food Research Journal 26 (5): 1535 - 1545, 2019.** http://www.ifrj.upm.edu.my/26%20(05)%202019/14.pdf.

CAI, Q,; HUC, C.; YANGA, N.; WANGA, Q.; WANGD, J.; PANA, H.; HUA, Y.; RUANA, C. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized ontospherelike bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules** 109, 1174–1181. 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.100.

CASTRO, R. J.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H., SATO, H. H. A newapproachforproteasesproductionby Aspergillus niger based on thekineticandthermodynamicparametersofthe enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** 4, 199–207, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.001.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. Aspergillus sp. lipase: potencial biocatalyst for industrial use**. Journal Molecular Catalysis B:Enzymatic** 67:163-171, 2010. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.021.

CORADI, M. Têxteis antimicrobianos produzidos pela modificação superficial de tecidos de algodão e imobilização de enzima pectinolítica. **Dissertação.** Programa de Pós-graduação em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis/ SC, 2018. https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/194380.

COSTA, D. M. Sabugo de milho Como suporte para imobilização de lipase. **Tese**. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos – Pep, Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju/SE, 2015. https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/bitstream/handle/set/1127/SABUGO-DE-MILHO-COMO-SUPORTE-PARA-IMOBILIZA%C3%87%C3%83O-DE-LIPASE.pdf?sequence=1.

FRAGA, F. C.; VALERIO, A.; DE OLIVEIRA, V. A; DI LUCCIO, M.; DE OLIVEIRA, D. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 653-658, 2019. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.171.

GIRELLI, A. M.; ASTOLF, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere.** 125368. 2019. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368.

GODOY, M. A. Estudo da lipase *Eversa® Ttransform 2.0* nas formas livre e imobilizada e sua aplicação na reação de transesterificação da triacetina. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2019. https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/25141/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; BIANCHI, M. L.; OLIVEIRA, L. C. A.; PEREIRA, E. I.; DALLAGO, R. M. Produção de carvão a partir de resíduo de erva-mate para a remoção de contaminantes orgânicos de meio aquoso. **Ciência e Agrotecnologia.** Lavras, v. 31, n. 5, p. 1386-1391, set./out., 2007. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000500017**.**

GONÇALVES, T. dos S. Produção e funcionalização "*in situ"*de espuma de poliuretano sintetizado na presença de glutaraldeído. **Dissertação**, Programa dde Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, 2018.http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3760.pdf.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; de PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; Caracterização cinética e termodinâmica de β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal Food Technology**., Campinas, v. 15, n. 1, p. 41-49, jan./mar. 2012. http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012000100005.

HILDEBRAND, C.; DALLA ROSA, C.; FREIRE, . M. G.; DESTAIN, J.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Fatty acid ethyl esters production using a non-commercial lipase in pressurized propane medium. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, 29(3): 603-608, jul.-set. 2009. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300023.

INGENBOSCH, K. N.; ROUSEKA, A.; WUNSCHIKA, D. S.; HOFFMANN-JACOBSENA, K. A fluorescence-based activity assay for immobilized lipases in non-native media. **Analytical Biochemistry** 569, 22–27, 2019. 10.1016/j.ab.2019.01.005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE ERVA - Mate (Ibramate). Disponível em: https://ibramate.com.br, acesso em 2018.

JAIN, R.; NAIK, S. N. Adding value to the oil cake as a waste from oilprocessing industry:Production of lipase in solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** n. 15, p 181-184, 2018. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.010.

JANGI, S. R. H.; AKHOND, M.; DEHGHANI, Z. High throughput covalent immobilization process for improvement of shelflife, operational cycles, relative activity in organic media and enzymatic kinetics of urease and its application for urea removal from water samples. **Process Biochemistry,** 10.1016, 2019. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.001.

KIRTIKUMAR, C.; BADGUJAR, B. M. B. Imobilização de lipase em copolímero biocompatível de álcool polivinílico e quitosana para síntese de compostos de laurato em dióxido de carbono supercrítico usando metodologia de superfície de resposta. **Process Biochemistry,** 50, 224–1236, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.019.

MATTE, C.R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J.K.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using Thermomyces lanuginosus lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 127, p. 67-75, 2016. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.016.

MELO, A. F.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B.; FERREIRA, A. L. DE O. Imobilização de Tanase em Suportes Vítreos Utilizando γ–aminopropiltrietoxilano (ATPS). **Comunicado Técnico**, Fortaleza, CE, 2005. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.010.

NOVOZYMES. New enzyme technology converts waste oils into biodiesel. Disponível em: https://www.novozymes.com/pt/news/news-archive/2014/12/new-enzymetechnology-converts-waste-oil-into-biodiesel, 2016.

PIMENTEL, N.; LENCINAII, K. H.; KIELSEII, P.; RODRIGUES, M. B.; SOMAVILLA, T. M.; BISOGNIN. D. A. Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de clones de erva-mate *(Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 559-570, abr./jun. 2019. http://dx.doi.org/10.5902/1980509827009.

QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C. DA; MELO, M. N.; SÁNCHEZ, O. C.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T. Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, Vol. 41, No. 9, 1019-1024, 2018. http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170279.

REMONATTO, D. Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases Eversa Transform e Eversa Transform 2.0. **Tese**

(Programa de Pós-Graduação em Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis/SC, 2017. https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/178307/347196.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

ROSSA B. Ü.; ANGELO, A. C.; MAZUCHOWSKI, J. Z.; WESTPHALEN, D. J.; FRIZON, C, N, T.; MARTINS, C. E. N. Influência da luminosidade e fertilizantes nos teores de metilxantinas e compostos fenólicos em folhas de erva-mate. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 4, p. 1365-1374, out.-dez, 2017. http://dx.doi.org/10.5902/1980509830217.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cells immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**. 2008, *86*, 542. http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.004.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; DE CASTRO, H. F.**;** MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO_2-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa***. Química Nova**, Vol. 34, n°. 1, 33-38, 2011. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000100007.

SIQUEIRA, A. J. S.; AZEVEDO, A.M.P.; MATTOS-DUTRA, A.; FIN, C. A.; LANDO, V. R.; ROTTA, L. N.; WINK, M.R.; BJERK, R. L.; FERRACINI, M.S. Determinação do Km e V Max: revisão e uma nova proposta. **Ciência em Movimento** | Ano XIII | Nº 27 | 2011/2. 10.15602/19839480/cmbs.v13n27p47-52.

TOMKE, P, D.; RATHOD, V, K. A novel step towards immobilization of biocatalyst using agro waste and its application for ester synthesis. International Journal of Biological Macromolecules, 117, 366–376, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.005.

VARGAS, C. E. B. IMOBILIZAÇÃO *in situ* DA PECTINASE COMERCIAL (Rohapect® DA6L) DE *Aspergillus niger* EM ESPUMA RÍGIDA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE GOIABA. **Tese.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim/RS, 2017. http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3361.pdf.

WANG, K.; SUN, S.; MA, B.; DONG, F.; HUO, T.; LI, X.; ZHAO, Y.; YU, H.; HUANG, Y. Construction and characterization of a nanostructured biocatalyst consisting of immobilized lipase on aminopropyl-functionalized montmorillonite. **Applied Clay Science**. 183, 105329, 2019. https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105329.

XIE, W., XIONG, J., & XIANG, G. Enzyme immobilization on functionalized monolithic CNTs-Ni foam composite for highly active and stable biocatalysis in organic solvent. **Molecular Catalysis**, 110714. 2019. https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110714.

ZAITSEV, S. Y.; SAVINA', A. A.; ZAITSEV, I. S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. **Advances in Colloid and Interface Science**, 272, 102016, 2019. https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo a enzima lipase foi imobilizada em palito residual de erva-mate, e as informações apresentadas contribuem para a ciência e tecnologia de imobilização de enzimas. Há um grande interesse na imobilização de lipases, devido ao seu amplo potencial de aplicação reações de interesse da indústria (combustível, detergentes, alimentos, fármacos e cosméticos). Além disso, a possibilidade de se utilizar suportes oriundos de resíduos agroindustriais que seriam descartados junto ao meio ambiente, faz com que seja uma ótima alternativa para redução dos custos envolvidos no processo.

Em comparação com a enzima livre, a enzima imobilizada não apresentou uma termoestabilidade tão eficiente, entretanto o processo de imobilização por ligação covalente deste trabalho conferiu um bom rendimento (até 225,52 %), com uma temperatura ótima reacional branda (40 °C) e possibilitando até 10 reciclos, demonstrando ser uma pesquisa promissora.

A proposta de imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 em resíduo de palito de erva-mate, mostrou-se promissora para a obtenção de um derivado imobilizado com boa atividade residual. Os resultados obtidos podem ser uma base de referência para pesquisas posteriores que visem à otimização do processo de imobilização de resíduos lignocelulósicos e sua posterior aplicação.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

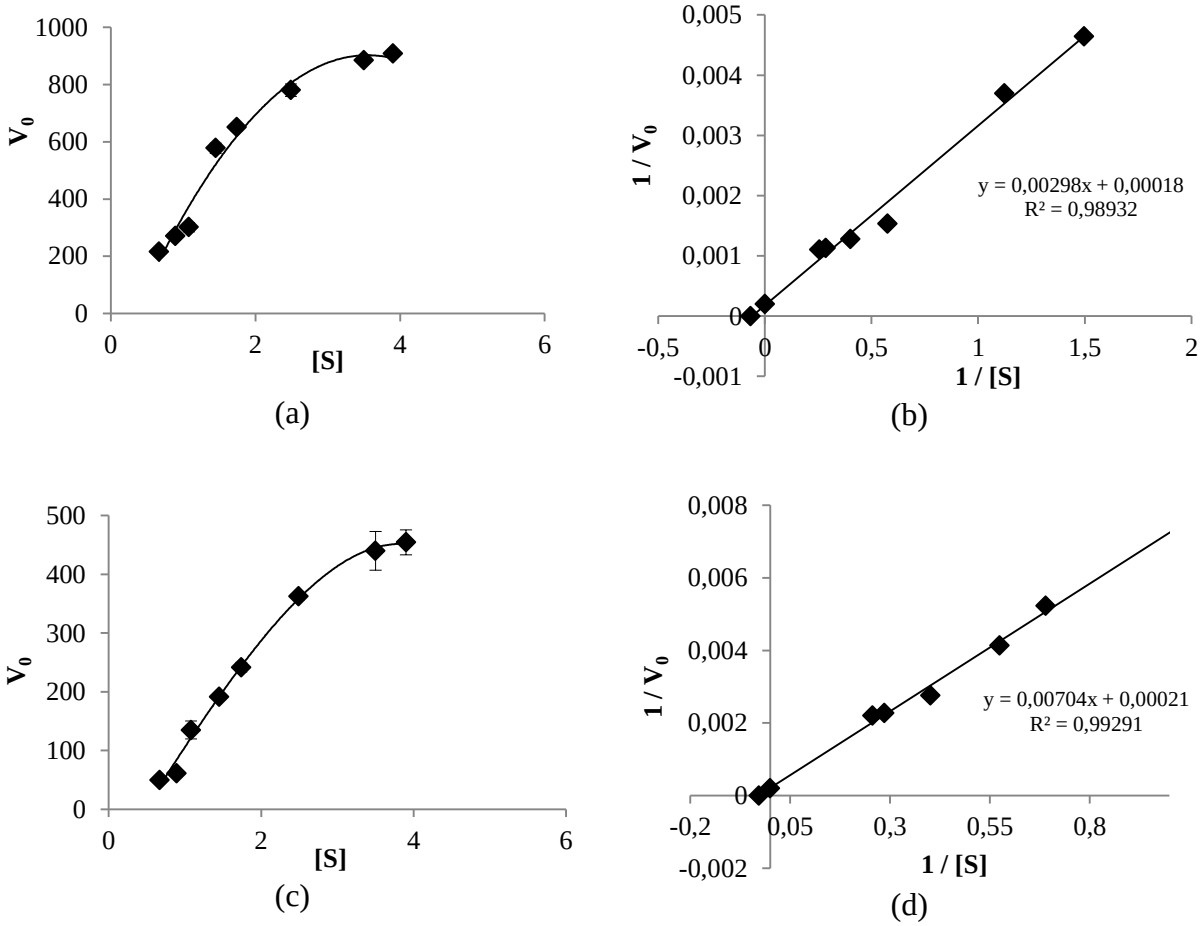
- Avaliar o uso de diferentes solventes no processo de imobilização;
- Avaliar a estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada;
- Avaliar a ativação da enzima em fluído supercrítico;
- Realizar aplicação da enzima imobilizada em reações de esterificação.
- Avaliar a atividade de esterificação tanto para a enzima livre como para a imobilizada utilizando a mesma massa para ambas as enzimas;

Material suplementar

Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_m

Os parâmetros cinéticos enzimáticos K_m e $V_{máx}$ da enzima livre e da enzima imobilizada foram calculados a partir de gráficos Lineweaver – Burk (Figura 8).

Figura 8: Curva de saturação da enzima livre (a); gráfico de Lineweaver-Burk da enzima livre (b); curva de saturação da enzima imobilizada (c) e gráfico de Lineweaver-Burk enzima imobilizada (d).

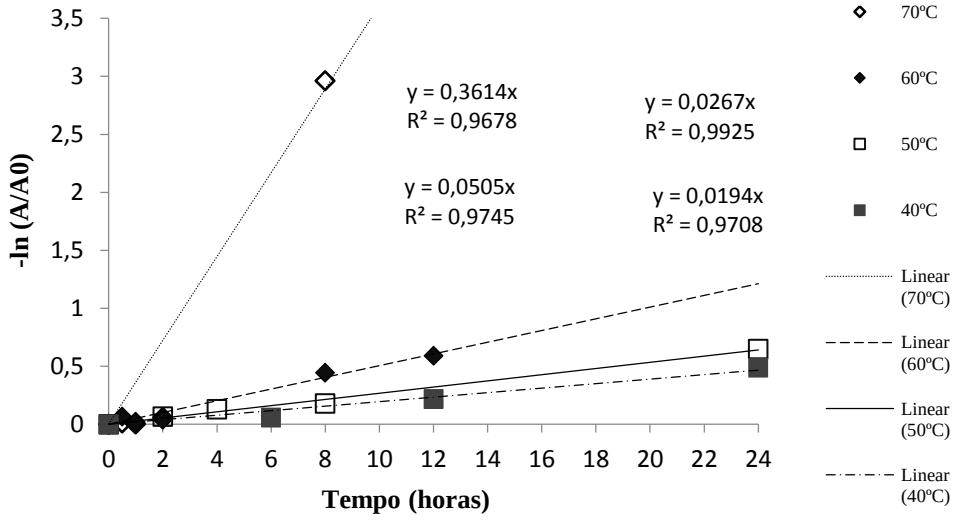


Fonte: O autor (2020)

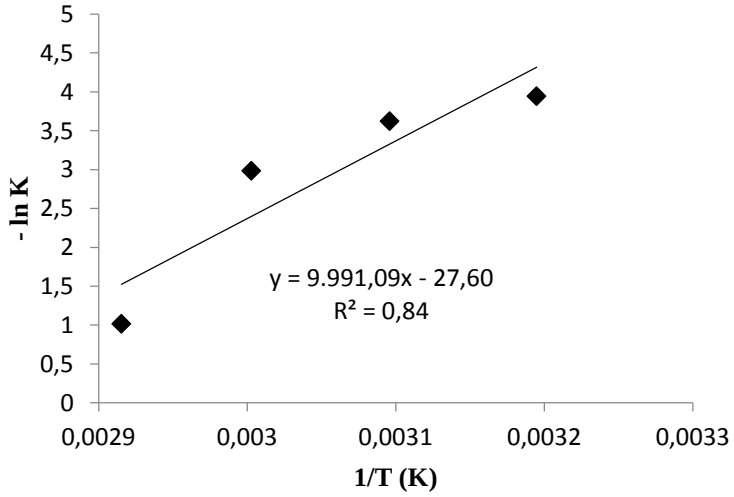
Estimativa dos parâmetros termodinâmicos e de inativação

Foram determinados os parâmetros termodinâmicos e de inativação tanto para a enzima livre (Figura 9) como para imobilizada (Figura 10).

Figura 9: Linearização dos parâmetros termodinâmicos (a) e de inativação (b) da enzima livre.



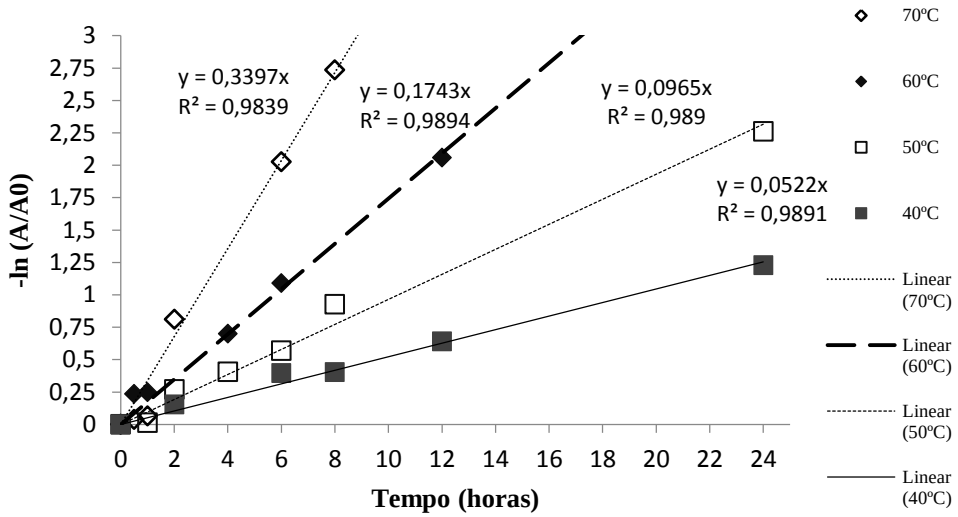
(a)



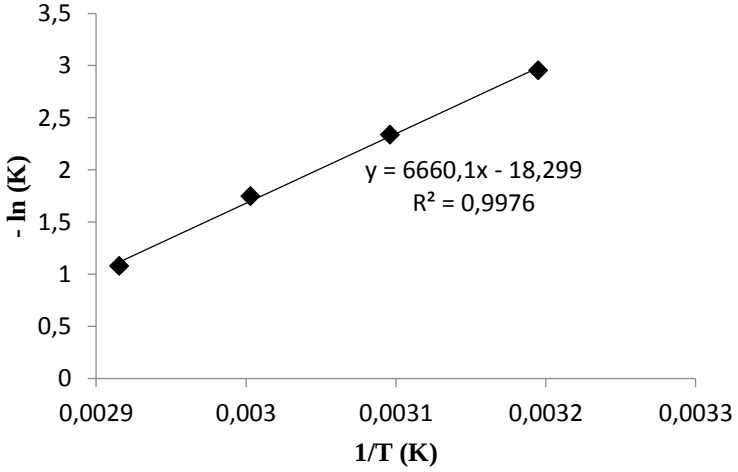
(b)

Fonte: O autor (2020).

Figura 10: Linearização dos parâmetros termodinâmicos (a) e de inativação (b) da enzima imobilizada.



(a)



(b)

Fonte: O autor (2020).