

16º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2025

Desenvolvimento de Suporte Sustentável para Imobilização de Lipase

LUCAS F. DE SOUZA¹, VANESSA C. G. CAMILLO², ARIELA V. DE PAULA³, MARIA E. J. MARQUETTI², JANE K. F. B. MACHADO², DANIELA REMONATTO^{2,4}

¹Graduando em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Matão, l.furtado@aluno.ifsp.edu.br.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Matão.

³Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

⁴Universidade Federal do ABC, Campus Santo André, Centro de Ciências Naturais e Humanas.
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.00.00-2 Bioquímica

RESUMO: Para um desenvolvimento de uma economia sustentável no setor dos alimentos é necessário adotar medidas de valorização e aproveitamento de seus resíduos. Considerando uma produção em grande escala, a quantidade de resíduos gerados pode atingir um número alarmante para o meio ambiente, o que nos leva a buscar medidas a fim de unir esses resíduos orgânicos com estratégias inovadoras. Neste contexto, resíduos da semente da goiaba (*Psidium guajava*) pode ser utilizada como biomassa para a produção de suportes enzimáticos com uma proposta renovável e economicamente promissora. Neste trabalho, foi desenvolvido o suporte híbrido a partir da semente da goiaba para a imobilização da lipase de *R. oryzae*. Após a imobilização, a atividade enzimática foi avaliada pelo método de hidrólise. O estudo foi conduzido através de um experimento 2² usando a metodologia de DCCR. Como resultados foi obtido o derivado com alta atividade catalítica por hidrólise, 605,18±42,89 U/g – 789,80±37,13 U/g. Os derivados produzidos têm grande potencial para aplicação em diversos setores agroindustriais.

PALAVRAS-CHAVE: aproveitamento de resíduos de semente de goiaba; lipases; Delineamento de Composto Central Rotacional; imobilização enzimática; suporte sustentável; hidrólise enzimática

Development of a Sustainable Support for Lipase Immobilization

ABSTRACT: In order to develop a sustainable economy in the food sector, it is necessary to adopt measures to valorize and make use of its waste. Considering large-scale production, the amount of waste generated can reach an alarming number for the environment, which leads us to look for measures to combine this organic waste with innovative strategies. In this context, *Psidium guajava* seed waste can be used as biomass for the production of enzymatic supports with a renewable and economically promising proposal. In this work, a hybrid support was developed from guava seeds for the immobilization of *R. oryzae* lipase. After immobilization, the enzymatic activity was measured using the hydrolysis method. The study of the optimum pH and temperature was carried out using a DCCR methodology. As a result, the derivative with high catalytic activity by hydrolysis was obtained, 605.18±42.89 U/g - 789.80±37.13 U/g. The derivatives produced have great potential for application in various agro-industrial sectors.

KEYWORDS: guava seed waste; lipases; Central Composite Rotational Design; enzyme immobilization; sustainable support; enzymatic hydrolysis

INTRODUÇÃO

A goiaba (*Psidium guajava*) é um fruto nativo das Américas Central e do Sul, amplamente cultivada no Brasil, alcançando cerca de 600 mil toneladas ao ano. Grande parte dessa produção é destinada para indústrias de alimentos na produção de polpas, sucos e doces em pasta. Do beneficiamento, estima-se que até 30% do volume total seja de biomassa residual, que inclui cascas, sementes e polpa residual (Danielski et al., 2023). Utilizando como estratégia para a produção de suportes sustentáveis, a biomassa residual da goiaba (BRG) é uma alternativa promissora para a produção de um suporte híbrido associado a imobilização de lipases, as quais são biocatalisadores proeminentes no campo da biotecnologia, com grande aplicação na indústria, química, farmacêutica (Remonato et al., 2022a).

A tecnologia da enzima ganhou impulso nos mais diversos setores industriais, pois as reações enzimáticas permitem a produção de produtos de valor agregado com geração reduzida de resíduos, promovendo assim a sustentabilidade (Remonato et al., 2022b).

Dentre esses biocatalisadores, as lipases têm se destacado por sua versatilidade e aplicabilidade em diferentes meios, sendo amplamente utilizadas em processos de hidrólise. Contudo, para garantir maior atividade catalítica, a imobilização enzimática tem se mostrado uma estratégia eficaz, especialmente quando associada na produção de suportes híbridos (Do Nascimento et al., 2024). Nesse contexto, o uso de materiais derivados de resíduos agroindustriais representa uma alternativa promissora, alinhando conceitos de sustentabilidade ambiental com economia circular, por conta de seu reaproveitamento (Barbosa et al., 2021).

Com isso, o presente trabalho buscou a produção de suportes híbridos por meio da biomassa residual da goiaba (BRG) para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* e avaliação do pH e temperaturas ótimas dos imobilizados produzidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção dos derivados foi utilizada a lipase solúvel de *R. oryzae*, gentilmente cedida pela empresa Prozyn BioSolutions for Life, São Paulo-SP. As sementes de goiaba (*Psidium guajava*) foram obtidas de resíduos coletados das agroindústrias da região de Matão-SP. Hexano grau HPLC (CHROMASOLV, Honeywell Riedel de HaenTM, Muskegon, MI, US). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

Preparação biomassa residual de semente de goiaba (BRG)

As sementes de goiaba (*Psidium guajava*) foram primeiramente secas em estufa com recirculação de ar (Marconi, modelo MA035, Piracicaba-SP) durante 50°C/48 h, para retirada do excesso de umidade. Em seguida, foram trituradas em moinho de rotor (Marconi, modelo MA090/CF, Piracicaba-SP) e peneiradas (60 mesh) (Abrozinox, São Paulo-SP). Na sequência o material sólido passou pelo extrator de Soxhlet (68 °C/8 h, em um sistema de refluxo com hexano), para retirada do conteúdo lipídico. Após desengordurada a biomassa residual da semente de goiaba (BRG) foi novamente triturada e peneirada (mesh entre 120 e 140) (Barbosa et al., 2021).

Produção de suportes pela técnica sol-gel

A matriz híbrida (SiO₂+BRG) foi obtida a partir da fração residual sólida de goiaba (BRG), conforme o protocolo descrito por Barbosa et al. (2021) com adaptações. Inicialmente, 15 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) 98% (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 18 mL de etanol PA (Honeywell Riedel de HaenTM, Muskegon, MI, USA), sob agitação constante a 200 rpm em agitador magnético (Satra, Modelo AMCC-5L, Araucária-PR), a 35 °C. Em seguida, foi adicionada uma solução pré-hidrolisante, preparada com 0,11 mL de ácido clorídrico (HCl) (Labsynth, Diadema-SP) diluído em 2,5 mL de água destilada, e a mistura foi mantida sob agitação por 90 minutos na mesma temperatura. Posteriormente, adicionou-se 1 g da BRG à solução. Após homogeneização, foi acrescentada uma

solução contendo 0,5 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) (Vetec, Jaraguá do Sul – SC) diluído em 3 mL de etanol, mantendo-se a agitação a 35 °C por mais 60 minutos. Finalizada essa etapa, a mistura foi mantida a 4 °C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado, lavado com hexano e seco em dessecador por 72 horas. Por fim, o suporte foi peneirado para obtenção da fração granulométrica entre 30 e 65 mesh.

Imobilização Enzimática

A imobilização de enzimas é definida como a restrição ou o confinamento de enzimas em uma matriz ou na superfície de um material de suporte por meio de interações químicas ou físicas sem interromper a atividade catalítica (Remonato et al., 2022). A lipase *Rhizopus oryzae* então, foi imobilizada via adsorção física no suporte híbrido (SiO₂+RSG) pela técnica desenvolvida por de Paula et al. (2010). Primeiramente, 1 g de suporte foi imerso em 10 mL de hexano e mantido a 25 °C sob agitação de 100 rpm por 15 min. Em seguida, 0,2 mL de PEG 1500 (0,5mg/mL) e 250 mg de lipase, que foram adicionados e agitados por um período de 3 h a 25 °C. Em seguida, o biocatalisador foi lavado com hexano e recuperado por filtração sob vácuo. Finalmente, o biocatalisador imobilizado foi seco com acetona PA (Vetec, Jaraguá do Sul – SC) e armazenado a 4 °C.

Determinação do pH e temperaturas ótimas

Para determinação do pH e temperatura ótima da lipase imobilizada foi utilizado DCCR (fatorial 2² com 3 repetições no ponto central). As variáveis independentes estudadas foram temperatura (23,79 a 66,21 °C) e pH (4,17 a 9,83), similar ao trabalho produzido por Remonato et al. (2021). As respostas foram a atividade de hidrólise de cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando 27 experimentos. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado por meio do *software Protimiza Experimental Design*.

Determinação de Atividade Enzimática por Hidrólise

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de retrotitulação com ácido clorídrico, empregando-se emulsão de azeite de oliva e goma arábica (Paula et al., 2011). A unidade de atividade hidrolítica da enzima foi calculada como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação. A atividade enzimática foi expressa em µmol/g min (U/g). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Remonato et al., 2023). A atividade foi calculada a partir da Eq. 1:

$$A(u / g) = \frac{(v_a - v_b) \cdot M \cdot 1000}{(t \cdot m_s)} \quad (1)$$

onde: V_b = volume gasto de titulante no branco, em mL; V_a = volume gasto de titulante na amostra, em mL; M = molaridade do titulante; t = tempo de incubação, em min; m_s = massa seca de lipase, em g.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a produção da matriz híbrida (SiO₂+BRG) a lipase *R. oryzae* foi imobilizada pelo método de adsorção física. Por meio das atividades de hidrólise, verificou-se que o derivado apresentou relevante atividade enzimática, ~700 U/g. O DCCR foi escolhido porque oferece vantagens significativas para estudos de bioprocessos. Ele requer um número relativamente pequeno de experimentos em comparação com um projeto de estudo “um de cada vez” e permite a investigação de efeitos lineares e quadráticos, fornecendo uma compreensão mais abrangente da superfície de resposta e capturando os efeitos de uma reação (Do Nascimento et al., 2024)

Com isso, através de um DCCR 2² foram estudados pH e temperatura ótimos para a atuação da lipase imobilizada. Na tabela 1 pode ser observada a matriz do 2² DCCR realizado, com suas variáveis independentes reais e codificadas (entre parênteses), além das respostas obtidas em termos de atividade hidrolítica. Os maiores valores de atividade hidrolítica, ~750 U/g, foram obtidos nos ensaios 25, 26 e 27 definidos como pontos centrais na matriz do 2² do DCCR, com temperatura de 45°C e pH 7. Temperatura (x₁) e pH (x₂) nos seus termos lineares e quadráticos, assim como suas interações, exerceram efeitos negativos e significativos (p < 0,05) na atividade enzimática do imobilizado.

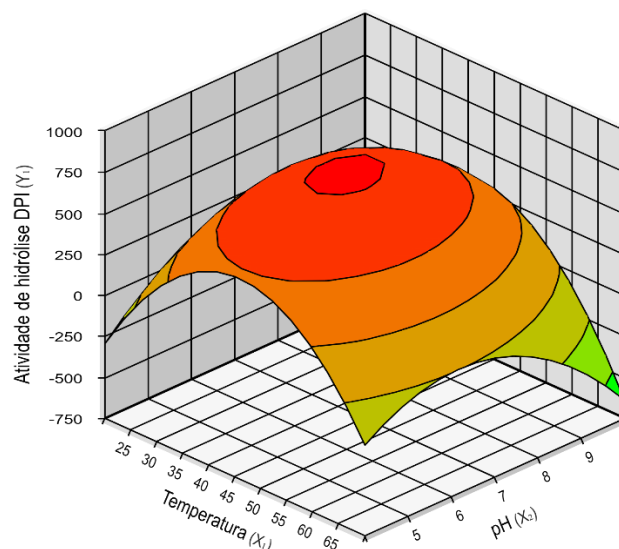
TABELA 1. Matriz do 2² DCCR com variáveis independentes reais e codificadas (entre parênteses) e respostas obtidas em termos de atividade hidrolítica.

Ensaio	Temperatura (°C) (x ₁)	pH (x ₂)	Atividade de hidrólise (U/g) (y ₁)
1	-1 (30)	-1 (5)	289,86
2	-1 (30)	-1 (5)	388,8
3	-1(30)	-1 (5)	401,8
4	1 (60)	-1 (5)	274
5	1 (60)	-1 (5)	362
6	1 (60)	-1 (5)	424,2
7	-1 (30)	1 (9)	376
8	-1 (30)	1 (9)	324
9	-1(30)	1 (9)	356,5
10	1 (60)	1 (9)	168,23
11	1 (60)	1 (9)	93,4
12	1 (60)	1 (9)	149,5
13	-1,41 (23,79)	0 (7)	438,35
14	-1,41 (23,79)	0 (7)	302,5
15	-1,41 (23,79)	0 (7)	345
16	1,41 (66,21)	0 (7)	209,23
17	1,41 (66,21)	0 (7)	304,3
18	1,41 (66,21)	0 (7)	180,3
19	0 (45)	-1,41 (4,17)	586,22
20	0 (45)	-1,41 (4,17)	510
21	0 (45)	-1,41 (4,17)	558,1
22	0 (45)	1,41 (9,83)	340,3
23	0 (45)	1,41 (9,83)	417,6
24	0 (45)	1,41 (9,83)	360,7
25	0 (45)	0 (7)	789,8
26	0 (45)	0 (7)	778,17
27	0 (45)	0 (7)	748

Através do tratamento estatístico, foi obtido o modelo o modelo polinomial de segundo grau (Eq. 2). A partir da análise dos valores de R^2 (89,78%) e F_{calc} (36,9) > F_{tab} (2,68) concluiu-se que modelo conseguiu descrever a atividade de hidrólise mediante aos intervalos de pH e temperatura estudados. Na equação 2 é descrita a atividade hidrolítica (y₁), em função dos fatores codificados x₁ (T °C) e x₂ (pH), através dela foi obtida a superfície de resposta (figura 1).

$$y_1 = 771,99 - 50,83 \cdot x_1 - 257,36x_1^2 - 59,61x_2 - 174,59x_2^2 - 52,09x_1x_2 \quad (2)$$

FIGURA 1: Superfície de resposta da atividade de hidrólise em função das variáveis de independentes temperatura (x₁) em °C e pH (x₂). A figura indica através das cores as condições ideais da atividade enzimática nos diferentes valores expressos nos eixos.



Na Figura 1 é possível observar que, com a combinação da temperatura e do pH nos ensaios (Tabela 1) influenciam na atividade enzimática. Em vermelho no topo, consideramos como sendo as condições ideais obtidas, na faixa de 750U/g sendo o ponto máximo de resposta, em condições de pH e temperatura próximas ao ponto central.

Em temperatura mais alta, 60° C, associado a valores altos de pH, como pH 9, foram fatores em que se afetou a atividade enzimática, resultando em valores inferiores a 200 U/g nos ensaios 10, 11 e 12. Segundo o modelo matemático, o pH em valores mais elevados é o fator que mais afeta a atividade enzimática em comparação com a temperatura. Na tabela 1, valores de aproximadamente 500 U/g, considerados valores de alta atividade enzimática, foram expressos nos ensaios 19, 20 e 21, os quais tinham o menor valor de pH estudado, 4,17, corroborando o que foi determinado pelo modelo matemático e a análise dos efeitos das variáveis. A tolerância a um aumento no pH e na temperatura é importante para a aplicação de catalisadores em reações de hidrólise (Domingues et al., 2022).

Em síntese, a superfície de resposta na Figura 1 em conjunto com os ensaios apresentados na Tabela 1, evidenciam uma forte influência das variáveis de temperatura e pH, em que, nos valores de atividade enzimática, refletindo sua eficiência catalítica, conforme indicado pela distribuição dos níveis de resposta. Nas condições estudadas no ponto central, temperatura de 45 °C e pH 7, a enzima apresentou melhor desempenho tendo sua atividade de hidrólise em torno de 750 U/g, resultados considerados promissores e indicados como os mais adequados para avanços nos estudos de aplicação da lipase imobilizada produzida.

CONCLUSÕES

A imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* na matriz híbrida (SiO₂+BRG) por adsorção física demonstrou ser eficaz, evidenciada pela atividade hidrolítica relevante (~700 U/g). O uso do planejamento experimental DCCR 2² mostrou-se adequado para a otimização do processo, permitindo a análise das interações entre as variáveis pH e temperatura sobre a atividade enzimática. Ainda, permitiu a determinação de uma faixa ótima de atuação da lipase imobilizada, que, nas condições de 45 °C e pH 7, apresentou atividade de hidrólise de aproximadamente 750 U/g.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

LFS: escrita e ensaios laboratoriais. VCG: reagentes e metodologia. MEJM: ensaios laboratoriais. AVP: projeto. JKFBM: reagentes e metodologia. DR: projeto, edição e supervisão.

AGRADECIMENTOS

Esse projeto recebeu apoio financeiro de: Instituto Federal de Educação, Ciência e

Tecnologia de São Paulo (IFSP); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (PIBIFSP); Programa de Apoio à Ciência e Tecnologia do IFSP (PACTec).

REFERÊNCIAS

BARBOSA MS, FREIRE CCC, BRANDÃO LMS, EB PEREIRA, AA MENDES, MM PEREIRA, AS LIMA, CMF SOARES. Biolubricant production under zero-waste Moringa oleifera Lam biorefinery approach for boosting circular economy. **Ind Crops Prod**, v. 167, p. 113542, 2021.

DANIELSKI R, SHAHIDI F. Guava processing waste: Biological activity profile of a natural and sustainable source of phenolic antioxidants. **Food Biosci**, v. 56, p. 103294, 2023.

DO NASCIMENTO, J. V; CORRÊA, F; FURTADO, L; ROSA, J; MARQUES, M. E; VENTURA, S. P. M. Obtenção de ésteres a partir do óleo essencial de laranja por catálise enzimática utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*. **Anais do Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIU)**, Botucatu, v. 39, p. 1–6, 2024.

DOMINGUES, O; PAULA, A. V. de; NUNES, G. F. M.; JUNIOR, A. F. G.; SANTOS, J. C. dos; MENDES, A. A. Evaluation of *Candida rugosa* lipase immobilized on magnetic nanoparticles in enzymatic/chemical hydroesterification for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.l.], v. 194, p. 1–18, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04046-9>. Acesso em: 5 ago. 2025.

PAULA, A. V.; NUNES GFM; FREITAS L; CASTRO HF DE; SANTOS JC. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **J Mol Catal B Enzym**, v. 65, p. 117–121, 2010.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. de. Interesterification of milkfat with soybean oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilised on SiO₂-PVA on packed bed reactor. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2124–2130, 2011.

REMONATTO, D; DE PAULA, A. V.; GOMES, J. C; SILVA, C; AMARO, B; VENTURA, S. P. M; CASTRO, H. F; GIORDANO, R. C; GIORDANO, R. C. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 114, p. 1–20, 2022a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.

REMONATTO, D.; DE PAULA, A. V.; GOMES, J. C.; SILVA, C.; AMARO, B.; VENTURA, S. P. M.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. C. Utilization of clay materials as support for *Aspergillus japonicus* lipase: an eco-friendly approach. **Catalysts**, Basel, v. 11, n. 10, p. 1173, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11101173>.

REMONATTO, D.; DE PAULA, A. V.; GOMES, J. C.; SILVA, C.; AMARO, B.; VENTURA, S. P. M.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. C. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in batch and fed-batch reactors and evaluation of its larvicidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 120, p. 287–300, 2022b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.06.012>.

REMONATTO, D.; SANTAELLA, N.; LERIN, L. A.; BASSAN, J. C.; CERRI, M. O.; DE PAULA, A. V. Solvent-free enzymatic synthesis of dietary triacylglycerols from cottonseed oil in a fluidized bed reactor. **Molecules**, v. 28, p. 5384, 2023.