

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química

BRUNA JEANNE SOARES PACHECO

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *PICHIA PASTORIS* EM ÓXIDO DE GRAFENO:
UMA ABORDAGEM INTEGRADA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM
SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA EMPREGANDO BIORREATOR DE MEMBRANA

Uberlândia - MG
Dezembro de 2024

BRUNA JEANNE SOARES PACHECO

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *PICHLIA PASTORIS* EM ÓXIDO DE GRAFENO:
UMA ABORDAGEM INTEGRADA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM
SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA EMPREGANDO BIORREATOR DE MEMBRANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Engenharia Química da Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Engenharia
Química.

Área de concentração: Engenharia Bioquímica.

Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso

Coorientador: Rafael Bruno Vieira

Uberlândia - MG

Dezembro de 2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P116 2024	Pacheco, Bruna Jeanne Soares, 1995- IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE PICHIA PASTORIS EM ÓXIDO DE GRAFENO: UMA ABORDAGEM INTEGRADA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA EMPREGANDO BIORREATOR DE MEMBRANA [recurso eletrônico] / Bruna Jeanne Soares Pacheco. - 2024. Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso. Coorientador: Rafael Bruno Vieira. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.783 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Engenharia química. I. Cardoso, Vicelma Luiz, 1960-, (Orient.). II. Vieira, Rafael Bruno, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título. CDU: 66.0
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG,
CEP 38400-902

Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 9/2024, PPGEQ				
Data:	10 de dezembro de 2024	Hora de início:	8:30	Hora de encerramento:	12:00
Matrícula da Discente:	12123EQU001				
Nome da Discente:	Bruna Jeanne Soares Pacheco				
Título do Trabalho:	Imobilização da lipase de <i>Pichia pastoris</i> em óxido de grafeno: uma abordagem integrada da hidrólise enzimática com separação simultânea empregando biorreator de membrana				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				
ODS-ONU:	ODS 12 - Consumo e Produção Responsáveis				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Ariela Veloso de Paula - FCFar/Unesp, Eliana Setsuko Kamimura - FZEA/USP, José Roberto Delalibera Finzer - PPGEQ/UNIUBE, Carla Zanella Guidini - FEQUI/UFU, Rafael Bruno Vieira - PPGEQ/UFU, coorientador, e Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Prof^a Dr^a Vicelma Luiz Cardoso, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, a presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carla Zanella Guidini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Bruno Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Delalibera Finzer, Usuário Externo**, em 10/12/2024, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Setsuko Kamimura, Usuário Externo**, em 10/12/2024, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariela Veloso de Paula, Usuário Externo**, em 10/12/2024, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5946768** e o código CRC **7C6E81BB**.

Ao meu pai (*in memoriam*), que me dava
o título de “minha doutora” antes mesmo
de eu o ter. E a minha mãe, que me
amparou para essa nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder viver do extraordinário. Sou grata pelas bênçãos que me permitiram seguir até aqui.

A minha querida mãe, Vicentina e meu amado e saudoso pai, Braulio, que são o meu motivo. Mais importante que o porquê, é o por quem. Agradeço profundamente pelo amor incondicional, apoio inabalável e sacrifícios ao longo desta jornada, que foram fundamentais para eu alcançar este marco em minha vida.

Ao meu amor Igor Matheus, agradeço por estar ao meu lado, pelo seu apoio, compreensão e paciência infinita. Sua presença tornou os desafios mais leves e as conquistas mais significativas.

Expresso minha gratidão aos demais membros da minha família, minhas irmãs e família, pelo constante incentivo, palavras de encorajamento e apoio emocional durante todo o percurso.

Aos amigos de curso, cuja amizade e companheirismo tornaram cada desafio mais fácil de superar, agradeço por compartilharem essa jornada comigo, pelas horas de estudo conjunto e momentos de descontração que ficarão para sempre em minha memória.

Aos professores que guiaram meus passos e compartilharam seu conhecimento e experiência. Especialmente a professora orientadora Vicelma, agradeço por sua dedicação incansável, orientação sábia e inspiração constante. Suas contribuições foram inestimáveis para o meu crescimento acadêmico e pessoal. E ao professor coorientador Rafael, pelo grande auxílio prestado.

Por fim, expresso minha gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro fornecido, o qual foi essencial para a realização deste trabalho, e a Universidade Federal de Uberlândia, em especial o NUCBIO.

A todos vocês, meu mais sincero obrigada. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio, amor e encorajamento de cada um de vocês.

RESUMO

A tecnologia enzimática tem experimentado um notável avanço no campo da bioquímica, evidenciando as enzimas como catalisadores biológicos altamente eficientes para impulsionar reações bioquímicas. Paralelamente, a tecnologia de separação por membranas tem suscitado considerável interesse, em virtude de suas vantagens frente aos métodos de separação tradicionais. Operações de separação do bioproduto concomitante a operação de hidrólise enzimática se torna interessante para a escala industrial tanto em ganhos de produtividade como no custo final do produto. O estudo propõe o uso do Óxido de grafeno como suporte para imobilização da lipase de *Pichia pastoris*, empregando o biocatalisador imobilizado e livre, integrado à investigação da produção de membranas de acetato de celulose aplicada na hidrólise enzimática com separação simultânea do óleo de soja residual. Foram identificados o melhor carregamento enzimático, temperatura e pH ótimos e tempo de imobilização, também, a estabilidade térmica e os parâmetros de Cinética e Termodinâmica de desativação foram definidos para a enzima livre e imobilizada. O complexo ainda foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de absorção da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As membranas foram fabricadas em diferentes tempos de pré-evaporação e espessura e sua morfologia analisada por MEV e a molhabilidade através do Ângulo de contato. Os resultados revelam a melhor membrana de acetato de celulose produzida em 30 seg e 1 mm de espessura, resultando em $55,58\% \pm 2,78$ de ácidos graxos livres (AGL) na hidrólise enzimática em biorreator de membrana e 100% de rejeição do óleo na membrana, utilizando a lipase em forma livre, em 4h. Por fim, empregando o biocatalisador imobilizado, o processo com separação simultânea resultou em $35,67\% \pm 1,02$ de AGL e $0,82\% \pm 0,05$ no permeado, também com 100% de rejeição do óleo na membrana. Os produtos foram avaliados por FTIR e os triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos quantificados através de Cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Pós 5 ciclos, a atividade de hidrólise da lipase imobilizada permaneceu em $75,62\% \pm 5,14$. O estudo amplia o entendimento sobre a imobilização de enzimas, enfatizando a viabilidade do óxido de grafeno como suporte e a eficiência da separação por membrana simultânea da hidrólise enzimática, beneficiando-se de eficiência e economia.

Palavras-chave: Imobilização. Enzima. Óxido de grafeno. Membrana de acetato de celulose. Biorreator com membrana.

ABSTRACT

Enzyme technology has experienced notable advancement in the field of biochemistry, highlighting enzymes as highly efficient biological catalysts to drive chemical reactions. At the same time, membrane separation technology has aroused considerable interest, due to its advantages over traditional separation methods. The study proposes the use of graphene oxide as a support for the immobilization of lipase from *Pichia pastoris*, using the immobilized and free biocatalyst, integrated into the investigation of the production of cellulose acetate membranes applied in enzymatic hydrolysis with simultaneous separation of residual soybean oil. The best enzyme loading, optimum temperature and pH and immobilization time were defined, as well as thermal stability and deactivation. Kinetic and Thermodynamic parameters were defined for the free and immobilized enzyme. The complex was further characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Infrared Absorption Spectroscopy (FTIR). The membranes were manufactured at different pre-evaporation times and thicknesses and their morphology was analyzed by SEM and wettability through the contact angle. The results reveal the best cellulose acetate membrane produced in 30 sec and 1 mm thick, resulting in $55.58\% \pm 2.78$ free fatty acids (FFA) in enzymatic hydrolysis in a membrane bioreactor and 100% rejection of oil in the membrane, using lipase in free form, in 4h. Finally, using the immobilized biocatalyst, the process with simultaneous separation resulted in $35.67\% \pm 1.02$ of FFA and $0.82\% \pm 0.05$ in the permeate, also with 100% oil rejection in the membrane. The products were evaluated by FTIR and triglycerides, diglycerides and monoglycerides were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). After 5 cycles, the hydrolysis activity of the immobilized lipase remained at $75.62\% \pm 5.14$. The study expands the understanding of enzyme immobilization, emphasizing the viability of graphene oxide as a support and the efficiency of simultaneous membrane separation of enzymatic hydrolysis, benefiting from efficiency and economy.

Keywords: Immobilization. Enzyme. Graphene oxide. Cellulose acetate membrane. Membrane bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas.....	10
Figura 2. Linha do tempo na evolução dos métodos de separação.....	14
Figura 3. Esquema do processo de produção da membrana de acetato de celulose (espalhamento I, pré-evaporação II, imersão em banho III) e da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea, IV.	27
Figura 4. Espectro Raman do OG sintetizado (vermelho) e grafite (preto).....	31
Figura 5. Gráficos das análises termogravimétricas (TGA) das amostras preparadas de grafite, OG, enzima e enzima imobilizada em OG.....	32
Figura 6. AFM das amostras do OG sintetizado.....	33
Figura 7. AFM das amostras do complexo imobilizado, OG+enzima.	35
Figura 8. MEV do OG sintetizado (a, b), da lipase de <i>Pichia pastoris</i> (c, d) e da lipase de <i>Pichia pastoris</i> imobilizada em OG (e, f).....	37
Figura 9. Atividade relativa da lipase de <i>Pichia pastoris</i> livre em diferentes temperaturas.....	39
Figura 10. Atividade relativa da lipase de <i>Pichia pastoris</i> livre em diferentes pH.....	39
Figura 11. Atividade relativa em diferentes temperaturas da lipase de <i>Pichia pastoris</i> imobilizada em óxido de grafeno.	41
Figura 12. Atividade relativa em diferentes pHs da lipase de <i>Pichia pastoris</i> imobilizada em óxido de grafeno.	41
Figura 13. Proteína residual no sobrenadante da imobilização em função do tempo.....	42
Figura 14. Estabilidade térmica da enzima livre (círculo e linha pontilhada) e imobilizada (quadrado e linha sólida) nas temperaturas de 35 (preto), 45 (vermelho), 55 (verde) e 65 (azul) °C durante 720 minutos.....	44
Figura 15. FTIR do Grafite (preto), Óxido de grafeno (vermelho), Enzima (azul) e Enzima imobilizada em OG (verde).	48
Figura 16. Imagens por MEV das diferentes membranas de AC produzidas: superfície (a) e seção transversal (b, c) da M0 membrana de 0,7 mm de espessura e 0 s de evaporação; superfície (d) e seção transversal (e, f) da M30 membrana de 0,7 mm de espessura e 30 s de evaporação; superfície (g) e seção transversal (h, i) da M60 membrana de 0,7 mm de espessura e 60 s de evaporação; superfície (j) e seção transversal (k, l) da M1-30 membrana de 1 mm de espessura e 30 s de evaporação.	50
Figura 17. Ângulo de contato da membrana de AC frente à água, óleo e emulsão em 22 °C (completo) e 45 °C (listrado).....	53
Figura 18. Percentual de AGL nas hidrólises do óleo de soja residual a 45 °C e pH 7 sem separação por membrana de AC (quadrado preto) e centrifugado (triângulo azul); com separação simultânea por membrana de AC (círculo vermelho) e permeado (triângulo verde).	54
Figura 19. Cromatograma dos MAG, AGL, DAG e TAG presentes no produto (diluído em 2000x) da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea.	56
Figura 20. Cromatograma dos MAG, AGL, DAG e TAG presentes no permeado da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea.	56
Figura 21. FTIR do óleo de soja residual (a), do produto da hidrólise (b) e do permeado na membrana de AC (c).....	58

Figura 22. Cinética da reação de hidrólise do óleo de soja residual a 55 °C durante 168 h. Condições operacionais: 1:1 óleo/água, 55°C, pH 7, 0,5% da massa de água de enzima imobilizada em OG, 168h.	62
Figura 23. Cromatograma do produto (diluído a 2.000x) da hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual.....	64
Figura 24. Cromatograma de MAG, DAG e TAG presentes no óleo de soja residual (diluído a 2.000x) (laranja), no produto (diluído a 2.000x) (preto) e no permeado (diluído a 500x) (azul) da hidrólise enzimática utilizando lipase imobilizada em OG em biorreator de membrana com separação simultânea.	66
Figura 25. Atividade relativa da lipase de <i>Pichia pastoris</i> imobilizada em GO após reuso em 5 ciclos. Condições operacionais: 1:1 óleo/água, 55°C, pH 7, 0,5% da massa de água de enzima imobilizada em OG, 4h.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espessura e tamanho lateral médios da folha de OG obtidos por AFM.....	35
Tabela 2. Carregamento enzimático da lipase de <i>Pichia pastoris</i> em OG	36
Tabela 3. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica da lipase de <i>Pichia pastoris</i> livre e imobilizada	45
Tabela 4. Aspectos gerais das membranas de AC produzidas.....	52
Tabela 5. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, AGL, DAG e TAG no produto.....	57
Tabela 6. Conteúdo percentual e concentração do grupo MAG, AGL no permeado.....	57
Tabela 7. Parâmetros reacionais otimizados de razão molar, temperatura e pH para hidrólise enzimática do óleo de soja residual	60
Tabela 8. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, DAG e TAG no produto.....	64
Tabela 9. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG e TAG no óleo de soja residual.....	66
Tabela 10. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, DAG e TAG no produto.....	67
Tabela 11. Conteúdo percentual e concentração de MAG no permeado	67
Tabela 12. Rendimentos de AGL em hidrólises de óleos vegetais e enzimas	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetato de celulose
ΔG_D	Energia livre de Gibbs de desnaturação térmica
ΔH_D	Entalpia de desnaturação térmica
ΔS_D	Entropia de desnaturação térmica
AFM	Espectroscopia de Força Atômica
AGL	Ácidos graxos livres
AI	Atividade enzimática do imobilizado
AR	Atividade Recuperada
DAG	Diglicerídeos
E_d	Energia de desativação
EIPS	Separação de fases induzida por evaporação
FE	Fator de estabilidade
FTIR	Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier
GL	Glicerol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
k_d	Constante de inativação térmica
M0	Membrana de 0,7 mm de espessura e 0 s de evaporação
M1-30	Membrana de 1 mm de espessura e 30 s de evaporação
M30	Membrana de 0,7 mm de espessura e 30 s de evaporação
M60	Membrana de 0,7 mm de espessura e 60 s de evaporação
MAG	Monoglicerídeos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaOH	Hidróxido de sódio
NIPS	Separação de fases induzida por não solvente
NMP	N-metil-2-pirrolidona
OG	Óxido de grafeno
R	Rendimento de rejeição da membrana
RAMAN	Espectroscopia Raman
RI	Rendimento de Imobilização
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
TAG	Triglicerídeos
TGA	Análises termogravimétricas, Análises termogravimétricas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Óleos vegetais	5
2.1.1 Óleos de soja residual	5
2.2 Hidrólise de triglicerídeos	7
2.3 Imobilização de enzimas	9
2.4 Suportes para imobilização	10
2.4.1 Óxido de grafeno	11
2.5 Processos de separação da mistura óleo-água	12
2.5.1 Processos de separação por membranas	14
2.5.2 Membranas de Acetato de celulose	16
3 OBJETIVOS	4
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Materiais	18
4.2 Métodos	18
4.2.1 Suporte de imobilização	18
4.2.2 Síntese do Óxido de grafeno	18
4.2.3 Caracterização do Óxido de grafeno sintetizado	18
4.2.4 Imobilização da enzima por adsorção física	19
4.2.5 Determinação da atividade hidrolítica	19
4.2.6 Teste de carregamento enzimático	20
4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4.2.8 Temperatura e pH ótimos	21
4.2.9 Determinação da quantidade de proteína imobilizada	21
4.2.10 Estabilidade térmica	22
4.2.11 Cinética e Termodinâmica de desativação térmica	23
4.2.12 Produção da membrana	24
4.2.13 Fluxo do permeado na membrana de AC	25
4.2.14 Ângulo de contato da membrana de AC	25
4.2.15 Quantificação dos ácidos graxos livres	25
4.2.16 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	26
4.2.17 Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima livre em batelada	26

4.2.18	<i>Otimização dos parâmetros reacionais para hidrólise enzimática do óleo de soja residual.....</i>	26
4.2.19	<i>Hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em OG em reator batelada</i>	27
4.2.20	<i>Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em biorreator de membrana com separação simultânea</i>	27
4.2.21	<i>Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....</i>	28
4.2.22	<i>Rendimento de rejeição de membrana</i>	29
4.2.23	<i>Reuso da enzima imobilizada</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1	Caracterização do óxido de grafeno sintetizado	30
5.2	Teste de carregamento enzimático	36
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.4	Caracterização da enzima livre e imobilizada em OG	39
5.5	Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada em OG.....	44
5.6	Cinética e Termodinâmica de desativação	45
5.7	FTIR do grafite, óxido de grafeno, enzima e enzima imobilizada em OG ...	48
5.8	Produção da membrana de acetato de celulose	49
5.9	Ângulo de contato da membrana	53
5.10	Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima livre em batelada e em biorreator de membrana com separação simultânea.....	54
5.11	FTIR do óleo de soja residual, do produto da hidrólise enzimática utilizando enzima livre em biorreator de membrana e do permeado	58
5.12	Parâmetros reacionais otimizados para reação de hidrólise enzimática utilizando enzima imobilizada em OG	60
5.13	Hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em OG em batelada	62
5.14	Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando lipase imobilizada em OG em batelada e em biorreator de membrana com separação simultânea	65
5.15	Reuso do biocatalisador imobilizado	68
6	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática tem experimentado um notável crescimento no âmbito da bioquímica, impulsionada pelo reconhecimento das enzimas como catalisadores biológicos altamente eficientes capazes de acelerar reações químicas. Entre as enzimas notáveis, as lipases (EC 3.1.1.3), classificadas como hidrolases, destacam-se como catalisadores em reações de síntese e hidrólise de óleos e gorduras. Essa classe específica de enzimas desempenha um papel crucial em diversas aplicações industriais, promovendo eficiência e sustentabilidade nos processos (PEREIRA et al., 2022).

Entretanto, a baixa estabilidade operacional e os desafios relacionados à recuperação e reutilização impõem consideráveis limitações à utilização de enzimas em sua forma livre nos processos industriais. Diante desse panorama, a imobilização das enzimas emerge como uma solução viável, contribuindo para tornar economicamente mais vantajoso o seu emprego (BILAL, et al., 2023). A etapa de imobilização proporciona uma estabilidade substancial ao biocatalisador, simplifica a sua recuperação, possibilitando o reuso, e viabiliza a implementação em processos contínuos. Ao superar as limitações inerentes à forma livre, esse método destaca-se como uma estratégia promissora para ampliar a aplicação industrial das enzimas (MEI et al., 2018).

Nos últimos anos, observa-se um aumento expressivo nos estudos que investigam diferentes suportes para a imobilização de enzimas. Os nanomateriais, com variações em termos de tamanhos e formas, têm surgido como candidatos promissores devido à sua elevada área superficial e facilidade de funcionalização, apresentando vantagens notáveis em comparação com substratos sólidos em massa (LUZARDO et al., 2022). Entre esses nanomateriais, destaca-se o óxido de grafeno (OG), uma estrutura nanoestruturada que compartilha o esqueleto carbonáceo do grafeno, porém de maneira desordenada. O diferencial reside na presença de diversos grupos funcionais em sua superfície, como grupos carboxila (-COOH), grupos hidroxila (-OH) e grupos epóxi (-C-O-C) (THANGARAJ et al., 2023). Esses grupos funcionais desempenham um papel crucial na promoção de uma interação robusta entre materiais orgânicos, incluindo enzimas, e os substratos. Além disso, suas características notáveis, como biodegradabilidade, estrutura bidimensional, alta área superficial, boa estabilidade térmica e química, e alta capacidade de adsorção, contribuem para a sua atratividade como plataforma para a imobilização enzimática (ALVES et al., 2021).

Concomitantemente, nesse contexto de estímulo à eficiência e sustentabilidade, a tecnologia de separação por membranas tem atraído considerável atenção devido às suas vantagens intrínsecas, como alta eficiência, elevada seletividade, operação simplificada, sistema compacto e menor custo de investimento (RASOULI et al., 2021). Observa-se uma crescente ênfase em membranas poliméricas, principalmente devido a preocupações ambientais. Visto que o acetato de celulose é um polímero biodegradável de natureza hidrofílica, suscetível à funcionalização por diversos grupos para alcançar as propriedades desejadas, membranas derivadas desse biopolímero têm despertado especial interesse entre os pesquisadores nessa área (ANG et al. 2021). Surge assim, a necessidade de explorar tecnologias que integrem de forma sinérgica os processos de reação e separação, visando alcançar níveis elevados de rendimento, eficiência operacional e economia.

Nesta pesquisa, o óxido de grafeno (OG) foi empregado como suporte na imobilização da lipase proveniente de *Pichia pastoris*, utilizando o método de adsorção física. A investigação dessa pesquisa está focada na utilização de um suporte de baixo custo, caracterizado por propriedades intrigantes e pouco explorado, visando aprimorar um biocatalisador de natureza distinta, destinado à aplicação em processos biotecnológicos. A singularidade deste estudo reside em produzir membranas de separação óleo-água e aplicá-la em biorreator de membrana propondo uma separação simultânea eficiente.

Foram investigados diversos aspectos, incluindo a caracterização do óxido de grafeno sintetizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de absorção da região do infravermelho (FTIR), Espectro Raman, Análise termogravimétrica (TGA), Microscopia de força atômica (AFM), a otimização do carregamento enzimático neste suporte específico, sua morfologia, a avaliação da estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada, a determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos relacionados à desativação da enzima em ambas as formas, e a identificação das condições ótimas de temperatura e pH para a atividade enzimática e para hidrólise do óleo de soja, além da produção e caracterização da membrana de acetato de celulose, e qualificação e quantificação dos produtos obtidos da hidrólise enzimática em biorreator de membrana com separação simultânea através de FTIR e Cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC).

Espera-se que esse estudo não só contribua para a ampliação do conhecimento sobre a imobilização de enzimas, mas também sobre a viabilidade da utilização do óxido

de grafeno como suporte, apresentando-se como uma estratégia promissora para otimização da eficácia e aplicabilidade de biocatalisadores em aplicações biotecnológicas. Além disso, apresentar o brilho do processo de hidrólise em biorreator de membrana, validando a proposta de separação simultânea do óleo residual, como diferencial desta pesquisa, o que permitirá economia de custos e tempo de processo.

2 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é explorar o uso do óxido de grafeno como suporte para imobilizar a lipase de *Pichia pastoris* por adsorção física, enquanto simultaneamente investiga a hidrólise enzimática e a separação do óleo residual empregando processo com membranas de acetato de celulose. O foco do estudo inclui a exploração da separação simultânea de óleo residual de soja por meio de biorreator de membrana.

Os objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar o óxido de grafeno por MEV, FTIR, Raman, TGA, AFM;
- Definir o melhor carregamento enzimático para o OG;
- Caracterizar as morfologias das superfícies do suporte e do biocatalisador imobilizado;
- Caracterizar quanto a temperatura e pH ótimos para enzima livre e imobilizada, e o tempo de imobilização ideal;
- Avaliar a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada;
- Estabelecer os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação enzimática para a enzima livre e imobilizada;
- Analisar a composição do grafite utilizado na síntese, do óxido de grafeno sintetizado, da enzima utilizada e da enzima imobilizada em óxido de grafeno, através do FTIR;
- Investigar a produção da membrana de acetato de celulose;
- Avaliar a hidrofiliabilidade da superfície da membrana através do ângulo de contato;
- Realizar a hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima livre em batelada e em biorreator de membrana com separação simultânea do óleo residual;
- Definir os melhores parâmetros reacionais para a hidrólise enzimática;
- Realizar a hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando a enzima imobilizada em biorreator de membrana com separação simultânea do óleo residual;
- Caracterizar o hidrolisado e permeado quanto a composição por HPLC e FTIR;
- Avaliar o reuso do biocatalisador imobilizado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos vegetais

Os óleos vegetais consistem principalmente em glicerídeos de ácidos graxos derivados de espécies vegetais. Podem conter pequenas quantidades de outros lipídios, como fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura. Esses óleos e gorduras são predominantemente compostos por triacilglicerídeos, triésteres de glicerol com três moléculas de ácidos graxos, sendo diferenciados principalmente pelo ponto de fusão (BRUNO; ALMEIDA, 2021).

Conforme a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os óleos vegetais se encontram no estado líquido à temperatura de 25°C, enquanto as gorduras vegetais assumem o estado sólido ou pastoso a 25°C. Esses produtos são ricos em ácidos graxos insaturados, enquanto as gorduras apresentam um maior percentual de ácidos graxos saturados em sua composição.

Os óleos vegetais desempenham uma função crucial dentre os produtos agrícolas mais relevantes. Conforme o processo a que são submetidos, esses óleos podem ser categorizados como brutos, destinados a aplicações industriais, ou refinados, amplamente utilizados na alimentação humana. As principais matérias-primas para a produção global de óleos vegetais abrangem: amendoim, azeitona (azeite de oliva), caroço de algodão, coco, colza (óleo de canola), girassol, palma (azeite de dendê), palmiste e soja (ZEFERINO; RAMOS, 2023).

United States Department of Agriculture (USDA, 2023) divulgou que a oferta mundial de óleos vegetais (estoque inicial acrescido da produção) na temporada 2022/23 foi estimada em 246,57 milhões de toneladas, com consumo mundial desses óleos previsto em 212,82 milhões de toneladas. Já no Brasil, o levantamento Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2023) divulgou os resultados da Pesquisa de Capacidade Instalada das Indústrias de Óleos Vegetais em 2023 atingindo a capacidade total de processamento de oleaginosas em 69,2 milhões de toneladas.

3.1.1 Óleos de soja residual

De acordo com o boletim da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023), a produção estimada da soja atinge em 162,4 milhões de toneladas, o que ainda consolida o Brasil como o maior produtor mundial da oleaginosa. Enquanto a produção de soja no país para 2018/19 foi estimada em 114,3 milhões de toneladas/ano (CONAB, 2019). Um aumento de quase 30% em cinco anos, já superando a estimativa da Conab (2019) que era de 151,9 milhões de toneladas para safra 2028/29. Conforme citado, o Brasil, é o maior produtor de soja em grão. No entanto, ocupa terceiro lugar no *ranking* mundial quanto a produção do óleo, com 60,21 milhões de toneladas para a temporada 2022/23. Isso decorre pelo fato de a maior parte da produção de soja em grão ser destinada à exportação, o que resulta em quantidades menores destinadas ao processamento para a fabricação de óleo no país (ZEFERINO; RAMOS, 2023).

O óleo de cozinha empregado nas indústrias alimentares é comumente reaproveitado por motivos econômicos; entretanto, sua reutilização, ao longo do tempo, propicia a oxidação do óleo. Este fenômeno se manifesta devido à absorção de oxigênio pelo óleo em decorrência de repetidas sessões de fritura (GOH et al., 2020). A prática de reutilização do óleo de cozinha na produção de alimentos eleva o risco de câncer e de doenças cardiovasculares devido ao seu conteúdo oxidado e tóxico. Além da oxidação, a fritura repetida ocasiona também a acidificação do óleo, representando um perigo para a saúde e a segurança alimentar, o que restringe sua reutilização tanto na indústria alimentar quanto nos lares (HOSSEINZADEH-BANDBAFHA et al., 2022).

O desafio substancial reside na provisão de uma gestão adequada para o descarte do mencionado óleo residual. A significativa quantidade de óleos e gorduras de origem alimentar gerada provoca impactos prejudiciais, não apenas na saúde humana e animal quando consumidos em excesso, mas também no meio ambiente, quando não dispostos de maneira apropriada (LOPES et al., 2020). Em muitas instâncias, esse resíduo é descartado em sistemas de esgoto, áreas abertas, corpos d'água e ecossistemas florestais, resultando na emissão de odores desagradáveis, obstrução de sistemas de drenagem e contaminação de habitats terrestres e aquáticos. Essa prática compromete os processos de tratamento de águas residuais, ocasionando a formação de espuma e aumento da carga orgânica em fontes hídricas, provocando a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e desequilibrando o ecossistema (LOPES et al., 2020).

Esse cenário incentiva o desenvolvimento de tecnologias para a sua reutilização na produção de produtos de elevado valor econômico. Inúmeros pesquisadores têm direcionado esforços para identificar abordagens acessíveis e inovadoras na recuperação

e otimização de recursos durante a conversão de resíduos em matérias-primas valiosas e produtos de valor acrescentado, por meio de estratégias de remediação de resíduos. O desafio central consiste em fornecer recursos que sejam economicamente viáveis e ecologicamente sustentáveis para atender às demandas de novos processos de produção. (AWOGBEMI et al., 2021).

3.2 Hidrólise de triglicerídeos

A hidrólise dos triglicerídeos é baseada em três etapas consecutivas: os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos que são convertidos em monoglicerídeos e finalmente em glicerol, resultando em três ácidos graxos formados individualmente em cada etapa (LV et al., 2018).

As gorduras são chamadas de triglicerídeos, triglicérides ou triacilgliceróis (TAG). Podem manifestar-se em estados sólido ou líquido à temperatura ambiente, dependendo intrinsecamente de sua estrutura e composição. Convencionalmente, utiliza-se o termo "gordura" para se referir aos triglicerídeos em estado sólido, enquanto "óleo" refere-se à fase líquida (MORETTO; FETT, 1986). Essas moléculas constituem cerca de 98% da composição química dos óleos. Cada molécula de triglicerídeo é composta por três cadeias de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol. Os triglicerídeos mais prevalentes em óleos e gorduras derivam estruturalmente de ácidos graxos com cadeias carboníferas variando de 6 a 24 carbonos. Os grupos acila, geralmente lineares, apresentam número par de carbonos e podem ser classificados como saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. No último caso, as ligações duplas não são conjugadas (BRAUN et al., 2020).

Os diglicerídeos, assim como os monoglicerídeos, encontram aplicação em diversos setores industriais, tais como alimentício, cosmético (atuando como estabilizantes de emulsões) e farmacêutico (utilizados como ligantes em comprimidos e emolientes) (TAN; CHE MAN, 2002). Estudos indicam que produtos lipídicos contendo mais de 80% de diglicerídeos, quando incorporados aos alimentos, proporcionam diversos benefícios à saúde, contribuindo para a gestão do colesterol, a prevenção da obesidade e a redução do acúmulo de gordura corporal (FREITAS et al., 2008).

Os monoglicerídeos (MAG) destacam-se como emulsificantes amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (BUCHORI et al., 2019). Considerados uma alternativa promissora para substituir surfactantes químicos, esses

biossurfactantes são geralmente reconhecidos como seguros, possuindo o *status* GRAS (Generally Recognized as Safe) (MO et al., 2019). Além de suas propriedades emulsionantes, tem-se observado um crescente interesse no estudo do efeito antimicrobiano dos monoglicerídeos (KYEONG YOON et al., 2018).

Por fim, os ácidos graxos são encontrados na natureza, tanto na forma livre quanto esterificada, apresentando-se como ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas longas, com um número variável de carbonos, que pode oscilar entre 4 e 22 átomos (RAMALHO; SUAREZ, 2013). Amplamente empregados na produção de sabões, surfactantes, lubrificantes, margarinas, cosméticos, produtos farmacêuticos, entre outras aplicações (TAN; CHE MAN, 2002).

Os métodos frequentemente utilizados para a produção de ácidos graxos são os químicos e enzimáticos. O processo de hidrólise química é caracterizado por sua natureza homogênea, empregando catalisadores químicos, temperaturas elevadas, diferentes tempos de residência e altas pressões. Os produtos resultantes desse processo exibem considerável diversidade em termos de natureza e pureza. Já a hidrólise enzimática, por sua vez, opera em temperaturas mais baixas, empregando lipases, meios reacionais específicos e variáveis controladas, com os ácidos graxos sofrendo mínimas modificações (NITBANI et al., 2020).

No contexto da sustentabilidade e práticas ambientalmente amigáveis, os métodos que empregam biocatalisadores oferecem múltiplas vantagens. Esses processos contribuem significativamente para a minimização da geração de resíduos, uma vez que os biocatalisadores são obtidos de fontes renováveis e operam em meios não tóxicos, como a água (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020).

Consideradas catalisadores naturais ou biocatalisadores, as enzimas são proteínas que desempenham o papel de catalisadores, reduzindo assim a energia necessária para a ocorrência das reações que facilitam (UGO et al., 2017). As lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases – EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (óleos e gorduras) em meios aquosos. Em ambientes não-aquosos, essas enzimas promovem a síntese de ésteres industriais por meio de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (BASSO e SERBAN, 2019). Tais enzimas desempenham um papel valioso no pré-tratamento de efluentes com elevado teor de lipídios, comumente gerados pelas indústrias de alimentos (UGO et al., 2017).

Os notáveis avanços na tecnologia enzimática decorrem do reconhecimento das enzimas como catalisadores biológicos altamente eficientes, capazes de acelerar reações

químicas (PEREIRA et al., 2022). Contudo, a baixa estabilidade operacional e os desafios relacionados à recuperação e reutilização impõem limitações significativas à aplicação de enzimas em sua forma livre nos processos industriais. Diante desse cenário, a imobilização das enzimas surge como uma solução viável, contribuindo para tornar economicamente mais vantajoso o seu emprego (BILAL et al., 2023).

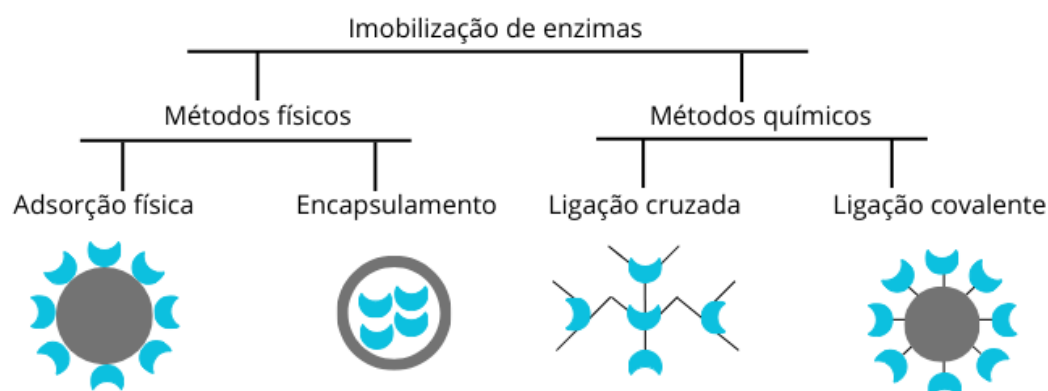
3.3 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas representa uma ferramenta crucial para a ampliação das aplicações de biocatalisadores, proporcionando benefícios como a possibilidade de reutilização e a redução da inativação frente a variações de temperatura e solventes orgânicos. Essa abordagem visa aprimorar a estabilidade operacional da enzima, contribuindo para a eficiência do processo. Além disso, a imobilização favorece a separação das enzimas do meio reacional, eliminando o risco de contaminação do produto (MEI et al., 2018).

A técnica de imobilização de biomoléculas consiste na ancoragem de uma entidade de origem biológica, como uma enzima, anticorpo ou DNA, na superfície de uma matriz insolúvel, também conhecida como suporte (LEI et al., 2018). Os procedimentos de imobilização de proteínas exploram as propriedades físico-químicas das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem essas biomoléculas, tais como acidez, basicidade e polaridade. Dessa forma, o método de imobilização fundamenta-se na diversidade de ligações e interações que podem ser estabelecidas com o suporte (FURLANI et al., 2020).

Os métodos de imobilização de proteínas podem ser categorizados em métodos químicos e físicos. Nos métodos químicos, ocorre a formação de ligações covalentes, estabelecendo éter, tio-éter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte. Alternativamente, podem-se utilizar ligações cruzadas, onde as proteínas são imobilizadas por meio da reação direta com um agente reticulante. Já nos métodos físicos, as interações são caracterizadas por ligações mais frágeis, como ligações de hidrogênio, afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações iônicas entre a enzima e o suporte. Adicionalmente, as proteínas podem ser encapsuladas ou aprisionadas no suporte (MOHAMAD et al., 2015). A Figura 1 ilustra exemplos dos tipos de imobilização empregados.

Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: A autora. Adaptado de Furlani et al. (2020).

O método de adsorção para a imobilização enzimática destaca-se por sua rapidez e simplicidade, caracterizando-se por interações físicas entre o suporte e a enzima, sem mudança conformacional no sítio ativo do biocatalisador. A atividade resultante é comparável à da enzima livre, tornando-se uma estratégia de imobilização de fácil execução e baixo custo. No entanto, devido às forças de ligação suscetíveis a variações de pH, força iônica e temperatura, a principal limitação desse método reside na dificuldade de controle preciso desses parâmetros, uma vez que as interações podem se desfazer com facilidade (DENTI, 2021).

3.4 Suportes para imobilização

Com o interesse e aplicabilidade cada vez maior no uso de enzimas imobilizadas, novos avanços nas técnicas e suportes para imobilização vêm sendo desenvolvidos. No que tange à seleção do suporte apropriado para a imobilização enzimática, embora não exista um suporte universal aplicável a todas as enzimas e contextos, diversos critérios devem ser considerados. Entre esses critérios destacam-se: a presença de uma superfície de contato adequada, porosidade em conformidade com a aplicação específica, prevenção de perdas de enzima devido à difusão, resistência à solubilidade, afinidade substancial com a proteína, presença de grupos funcionais reativos, estabilidade mecânica e rigidez apropriadas, capacidade de reutilização, baixa toxicidade e, sempre que possível, custo reduzido (FURLANI et al., 2020).

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, de acordo com suas características químicas, e podem ser subdivididos em naturais ou sintéticos (COSTA et al., 2018).

De maneira geral, os suportes orgânicos são amplamente utilizados devido a suas vantagens, como baixo custo, facilidade de manuseio, boa reprodutibilidade e a diversidade de grupos funcionais reativos que podem ser incorporados. No entanto, é importante destacar que apresentam uma desvantagem significativa, que é a redução de sua estabilidade mecânica ao longo do tempo de utilização (QUEISSADA; SILVA, 2020). Por outro lado, os suportes inorgânicos oferecem uma ampla gama de formas físicas e estruturas químicas, permitindo a combinação para formar um suporte ideal. Além disso, proporcionam maior flexibilidade nos parâmetros de processo devido à sua resistência superior em aspectos químicos, físicos, térmicos e microbiológicos. Contudo, é importante ressaltar que os suportes inorgânicos estão associados a custos mais elevados (DUTRA, 2019).

3.4.1 Óxido de grafeno

O óxido de grafeno (OG), semelhante ao grafite, tem uma estrutura em camadas, possuindo um mesmo esqueleto carbonáceo, podendo ser considerado como análogo isolante e desordenado do grafite cristalino. Diferentemente do grafite, o OG tem em seu plano basal e bordas grupos funcionais oxigenados, tais como grupos carboxila (-COOH), grupos hidroxila (-OH) e grupos epóxi (-C-O-C) (THANGARAJ et al., 2023), que não só expandem a distância interlamelar das camadas como também as tornam camadas atômicas espessas e hidrofílicas, facilitando a dispersão do material em água, além de contribuírem para a forte interação entre materiais orgânicos, como as enzimas (RAY; RAY, 2015). Suas características notáveis, como biodegradabilidade, estrutura bidimensional, alta área superficial e boa estabilidade térmica e química, e alta capacidade de adsorção tem feito esse material nanoestruturado ascender como suporte para imobilização, desenvolvendo catalisadores imobilizados com alta carga enzimática para diversas aplicações biotecnológicas (ALVES et al., 2021).

Diferentes modelos teóricos de sua estrutura têm sido propostos, dentre eles os modelos de Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima-Matsuo, sendo o modelo proposto por Hofmann o mais difundido para exemplificações. Sua estrutura ainda não é completamente elucidada, porém técnicas como a Nano-espectroscopia de Infravermelho

comprovam a disposição dos grupos funcionais oxigenados de forma desordenada ao longo das folhas (RAHIM et al., 2015).

Em geral, o GO é sintetizado pelo método de Brodie (BRODIE, 1860), Staudenmaier (STAUDENMAIER, 1898), ou Hummers (HUMMERS, 1958), ou alguma variação desses métodos. Brodie e Staudenmaier usaram uma combinação de clorato de potássio (KClO_3) com ácido nítrico (HNO_3) para oxidar grafite, e, apesar da formação de um composto carbonáceo altamente oxidado, tornou-se as rotas menos utilizadas devido a liberação de dióxido de cloro, um gás com alta toxicidade e inflamável em contato com o ar. O método de Hummers envolve o tratamento de grafite com permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Evita a liberação de gases nocivos durante a síntese, sendo suscetível a modificações de acordo com o grau de oxidação desejado (ZHU et al., 2010).

A literatura apresenta recentes aplicações do OG na imobilização de lipases. Dutta, Saha (2018) imobilizaram lipase purificada de *Brevibacillus borstelensis* NLIP05 em óxido de grafeno (GO) objetivando aumentar a estabilidade e a atividade. Na pesquisa de Badoei-dalfard e Karami (2022) a lipase Km12 foi imobilizada em nanofibras de óxido de grafeno/quitosana/acetato de celulose (OG/Chit/AC NFs). Moosavi e colaboradores (2022) imobilizaram covalentemente por mediação da sortase a lipase B *Candida antarctica* (CalB) na superfície de nanopartículas de óxido de grafeno.

3.5 Processos de separação da mistura óleo-água

Atualmente existem diversas tecnologias convencionais ou excepcionalmente utilizadas para a separação óleo-água. Dentre esses métodos, destacam-se principalmente a flotação, originalmente patenteado em 1906, (KYZAS; MATIS, 2018), a coagulação (KHAN; HISHAM; GHASEMI, 2019), o uso de hidrociclones, patenteado em 1891 por Bretney (CHINÉ et al., 2000), o tratamento biológico e as tecnologias de separação por membranas (WAN IKHSAN et al., 2017).

Muñoz (1998) conduziu investigações sobre a separação e remoção de óleos minerais emulsificados em água por meio de técnicas não convencionais de flotação. O pesquisador desenvolveu e aprimorou um equipamento de flotação de alta capacidade, conhecido como flotação a jato, e propôs um novo processo fundamentado no conceito de flotação transportadora, no qual o óleo é posteriormente removido após a sorção em

materiais sorventes. Análises comparativas em escala de bancada revelaram que o sistema FAI (flotação por ar induzido) demonstrou maior eficiência em comparação com a FAD (flotação por ar dissolvido).

O estudo de Finborud et al. (1999) introduziu o dispositivo denominado *Hidroflock*, cujo princípio operacional envolve a utilização de um agente coagulante para neutralizar as cargas eletrostáticas das gotas de óleo. Posteriormente, foi aplicado um floculante, promovendo a coalescência entre as gotas e resultando na formação de gotas maiores, tornando-as mais facilmente passíveis de separação.

No estudo conduzido por Vieira et al. (2003), empregou-se um tratamento biológico anaeróbio para o processamento da água de produção, utilizando um biorreator em escala de bancada. Os pesquisadores evidenciaram que o consórcio microbiano isolado da própria água de produção apresentou a capacidade de utilizar parte dos hidrocarbonetos como substrato, destacando a viabilidade do tratamento anaeróbio da água de produção.

Bezerra (2004) concebeu um destilador solar destinado ao tratamento da água de produção de petróleo, visando obter um efluente apto para utilização na agricultura e na produção de vapor. A água destilada obtida no experimento atendeu, em sua maioria, aos padrões estabelecidos pelo CONAMA, permitindo sua utilização, com algumas considerações, na irrigação de culturas não comestíveis, como algodão e mamona. Vale destacar que a água destilada possui características de água doce e apresenta também potencial aplicação na geração de vapor.

Lima et al. (2009) investigaram a aplicação de um surfactante derivado de óleo de coco no procedimento de recuperação de compostos orgânicos de efluentes oleosos, empregando uma coluna em pequena escala. A eficiência máxima de extração alcançada foi de 80%.

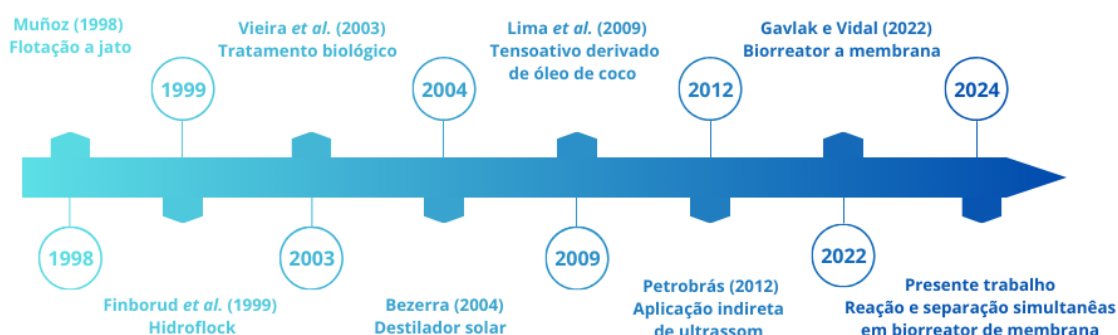
Em 2012, a Petrobrás (2012) obteve uma patente para um processo de separação de emulsões de petróleo do tipo água-em-óleo (A/O), utilizando a aplicação indireta de ultrassom (US) de baixa frequência, com uma faixa entre 10 kHz e 1.000 kHz, sem a necessidade de adição de agentes desmulsificantes. A separação ocorre pela coalescência e sedimentação das gotas da fase aquosa, permitindo a remoção eficaz de água e sais presentes no petróleo produzido.

Fortuna (2020) realizou a hidrólise e a separação de peptídeos de *buttermilk* por meio de um biorreator a membrana. Já Gavlak e Vidal (2022) conduziram uma avaliação sobre a remoção de nutrientes de efluentes provenientes da indústria de laticínios, utilizando um biorreator a membrana de leito móvel. No entanto, tanto nos estudos

mencionados quanto em diversos outros, nota-se que o processo de separação por membrana é conduzido como uma operação unitária, em uma etapa isolada e não de forma simultânea, o que acarreta um aumento de tempo e custos do processo.

A Figura 2 ilustra a linha do tempo contendo pesquisas na evolução dos métodos de separação.

Figura 2. Linha do tempo na evolução dos métodos de separação.



Fonte: A autora.

3.5.1 Processos de separação por membranas

Desde o século XVIII, os Processos de Separação por Membrana (PSM) têm evoluído, mas apenas no final da década de 50, essas investigações deixaram de ser exclusivamente uma curiosidade científica e laboratorial (DORNIER *et al.*, 2018). O avanço significativo dos PSM para a escala industrial é atribuído ao desenvolvimento de membranas anisotrópicas, realizado por LOEB e SOURIRAJAN (1960), utilizando o processo de inversão de fases. Essas membranas são compostas por uma camada superior fina, conhecida como "pele", que pode ser densa ou apresentar poros muito pequenos, responsável pela seletividade, e são suportadas por um suporte poroso que proporciona resistência mecânica à "pele" e oferece pouca resistência ao transporte. Quando a "pele" e o suporte são do mesmo material, a membrana é chamada de anisotrópica integral; caso contrário, é denominada anisotrópica composta.

Os PSM têm como propósito a separação de misturas, purificação de soluções e concentração de componentes em uma solução. Suas aplicações primárias abrangem as

áreas de tratamento de água e efluentes, medicina, além das indústrias alimentícia, de bebidas, farmacêutica e de biotecnologia (COSTER; FARAHANI; CHILCOTT, 2018).

De maneira abrangente, uma membrana desempenha a função de barreira entre duas fases, restringindo parcial ou totalmente o transporte de uma ou várias espécies químicas nas fases. Em outras palavras, as membranas podem ser caracterizadas como barreiras semipermeáveis, sendo que a seletividade para a passagem do soluto está intrinsecamente ligada ao tamanho da molécula a ser retida e à morfologia da membrana (HABERT et al., 2006).

A aplicação de membranas para efetuar uma separação eficaz entre óleo e água e/ou para o processo de dessalinização é almejada devido a diversos fatores: i - mantém uma abordagem ecologicamente mais sustentável, demandando o uso de reagentes menos tóxicos; ii - realiza uma separação energeticamente eficiente em temperatura ambiente, sem a necessidade de transferência de fases; iii - apresenta baixo custo e é suscetível a manipulações por meio de incorporações ou funcionalizações para alterar e/ou adicionar propriedades, como características anti-corrosivas e anti-incrustantes (YANG et al., 2021).

As membranas podem ser categorizadas conforme o tamanho dos poros e as partículas que são retidas por eles, tais como: Microfiltração (MF) (poros com diâmetro entre 0,1 e 10 μm ou 100 e 10.000 nm), Ultrafiltração (UF) (entre 1 e 100 nm), Nanofiltração (NF) (entre 0,5 e 2 nm), e Osmose Inversa (OI) (menos de 0,5 nm). Esse sistema opera com base na difusão das moléculas da solução filtrante com relação a composição da membrana e na diferença de peso molecular, em que componentes de maior tamanho que os poros da membrana são retidos, enquanto componentes de menor tamanho que os poros atravessam a membrana (WEN-QIONG et al., 2019).

Algumas das propriedades cruciais de uma membrana incluem a composição química da superfície, a morfologia tanto da superfície quanto da seção transversal, a distribuição de elementos na superfície e na seção transversal, a espessura, a área superficial, a rugosidade da superfície, a porosidade, a hidrofiliicidade, a seletividade e a interação da membrana com os componentes da solução de alimentação (ZHAO et al., 2020; ZOU et al., 2020). Outra propriedade de relevância que impacta no desempenho da membrana é o coeficiente de difusão, o qual guarda proporcionalidade com a espessura da membrana (XIN et al., 2020).

As propriedades da superfície da membrana que interagem com a solução a ser separada determinam a escolha entre uma membrana densa ou porosa (HABERT et al.,

1997). Membranas são consideradas densas quando o transporte dos componentes envolve uma etapa de dissolução e difusão através do material que constitui a membrana.

Uma membrana é caracterizada como porosa quando o transporte dos permeantes ocorre preferencialmente em uma fase fluida contínua, preenchendo os poros da membrana (HABERT et al., 1997). Tanto membranas densas quanto porosas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura como isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas), indicando se apresentam ou não as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (HABERT et al., 2006).

As membranas podem adotar geometrias planas, como espiral e placa e quadro, ou geometrias cilíndricas, como tubular, fibra oca e capilar (CHEN et al., 2019). Essas membranas podem ser confeccionadas a partir de diversos materiais, escolhidos com base nas propriedades específicas de cada material e nas características da solução a ser filtrada. Exemplos de materiais orgânicos incluem polímeros como polissulfona (PSf), polietileno (PE), fluoreto de polivinilideno (PVDF), celulose ($C_6H_{10}O_5$) e acetato de celulose (AC). Já os materiais inorgânicos podem ser cerâmicos ou metálicos, como alumina (Al_2O_3), dióxido de silício (SiO_2) e dióxido de titânio (TiO_2) (WEN-QIONG et al., 2019).

3.5.2 *Membranas de Acetato de celulose*

A acumulação de biomassa lignocelulósica proveniente das agroindústrias representa o principal resíduo de recursos renováveis do planeta (MOTAUNG et al., 2018). O volume da produção agrícola brasileira deve somar 308,5 milhões de toneladas em 2024, segundo o primeiro prognóstico do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), divulgado pelo IBGE (IBGE, 2024). Nesse contexto, a gestão responsável dos recursos naturais, bem como a devida prevenção da superutilização e a adequada reutilização de resíduos, têm se destacado como aspectos fundamentais para promover a sustentabilidade ambiental (TEO et al., 2020).

Os resíduos lignocelulósicos são essencialmente compostos por três biopolímeros distintos: celulose, hemicelulose e lignina. Enquanto a hemicelulose pertence a um grupo de carboidratos de cadeia ramificada, a lignina é caracterizada como um polímero tridimensional amorfo, e a celulose é um polímero de condensação linear (ZHU et al., 2022; KHAN et al., 2022). A celulose, sendo o biopolímero mais abundante no ambiente, representa o principal componente da parede celular vegetal. Essa substância é constituída

por extensas cadeias lineares de glicose, com unidades de glicose ligadas por meio de ligações éster do tipo β -1,4-glicosídicas (HASANIN, 2022).

Um derivado importante da celulose no contexto comercial é o acetato de celulose (AC). Sua obtenção resulta da reação de acetilação, um processo que promove a esterificação dos grupos hidroxila presentes na glicose. Dado que a glicose possui três hidroxilas, localizadas nos carbonos 2, 3 e 6, existe a possibilidade de obter diferentes graus de substituição. Nesse cenário, a celulose é associada a zero hidroxilas esterificadas, enquanto o triacetato de celulose é caracterizado por três hidroxilas esterificadas (SANTOS et al., 2020; AMARAL et al., 2019).

Diversas técnicas são empregadas na produção de membranas poliméricas microporosas, sendo notáveis a sinterização, o estiramento de filmes, o método de evaporação total do solvente, a gravação e o método da inversão de fases (HABERT et al., 2006).

Dado que o AC é um polímero biodegradável de natureza hidrofílica, suscetível à funcionalização por diversos grupos para atender às propriedades desejadas, desperta particular interesse entre os pesquisadores nessa área. Essas membranas apresentam notáveis capacidades de formação de filmes, elevada estabilidade química e mecânica, marcante hidrofiliabilidade, propriedades de transporte superiores e fácil disponibilidade (ANG et al., 2021).

Na última década, tem-se observado uma atenção crescente voltada para esse tipo de membrana, sobretudo devido a considerações ambientais. Uma busca na plataforma Web of Science, realizada em 05 de março de 2024, utilizando o termo "cellulose acetate membrane", revelou aproximadamente 3500 artigos publicados desde 2013 até a presente data. Esse aumento significativo na produção de artigos sobre este material indica a crescente relevância do Acetato de Celulose na fabricação de membranas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os experimentos do presente trabalho foram realizados utilizando a enzima lipase de *Pichia pastoris*, gentilmente cedida pela Prozyn, São Paulo-SP. Como suporte para imobilização, foi utilizado o óxido de grafeno sintetizado. Ainda, foram utilizados os reagentes óleo de soja comercial (Liza), azeite de oliva comercial (Galo), hexano (Sigma), álcool comercial, acetona (Sigma). Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese do Óxido de grafeno

O óxido de grafeno sintetizado foi preparado por método Hummers adaptado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958) usando pó de grafite sintético (<20 µm, com pureza de 99,99% em peso, Aldrich) como material de partida.

4.2.2 Suporte de imobilização

A solução com o óxido de grafeno em dispersão foi colocada em placas de Petri e seca em estufa a 50 °C por tempo suficiente para secagem total e recolhido em pó.

4.2.3 Caracterização do Óxido de grafeno sintetizado

A análise da Microscopia de Força Atômica (AFM) (Shimadzu, SPM 9600), realizada no Instituto de Física (INFIS-UFU) foi utilizada para detectar a morfologia e a espessura das amostras do óxido de grafeno. Essas amostras foram aplicadas sobre a superfície de aço inox 430 da porta 59 amostra, a uma concentração de 0,1 g/L. Foram utilizadas as ponteiros Tap300Al-G da Budget Sensors para fazer as leituras da análise.

A técnica de espectroscopia RAMAN (Shimadzu Scanning Probe Microscope, SPM9600), realizada no Instituto de Física (INFIS-UFU) foi utilizada para obter informações cruciais sobre as características estruturais e eletrônicas das amostras produzidas. Um comprimento de onda do laser de 532 nm foi usado neste estudo. O carbono ordenado e desordenado, como as bandas D, G e 2D, foram atribuídos para

indicar os defeitos e a vibração no plano dos átomos de carbono, respectivamente, o que possibilita a identificação de laminados de grafeno no material.

4.2.4 Imobilização da enzima por adsorção física

Foram adicionados solução enzimática em concentração de 10 mg/mL (preparada em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0) e suporte, na proporção de 5:1 (m:v), deixou-se sob agitação suave no ultrasonificador por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm e então a enzima imobilizada no suporte foi separada da solução e levada para congelador. Posteriormente, o biocatalisador imobilizado foi liofilizado e armazenado em refrigeração.

4.2.5 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de emulsão de azeite, conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 g de azeite de oliva, 10 g de água, 16 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L e pH 7,0) e 20% da água de goma arábica. Foram adicionados 4,5 mL da emulsão em Erlenmeyer e 1 mL de solução enzimática para a enzima em sua forma livre e 0,025 g para a enzima imobilizada, colocados em banho com agitação a 37 °C por 5 minutos. A reação foi cessada adicionando 10 mL da solução de água:acetona:álcool (1:1:1, v/v/v). Adicionou-se fenolftaleína como indicador e 10 mL de hidróxido de potássio 0,05 M. Os ácidos graxos liberados foram titulados por retrotitulação com ácido clorídrico 0,05 M, previamente padronizado. Os testes de atividade enzimática foram realizados em triplicata. O cálculo de atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação (1):

$$A \text{ (U/g)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot ms} \quad (1)$$

Onde: V_b é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação do branco, em mL; V_a é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação da amostra, em mL; M é a molaridade do titulante, em mol/L; t é o tempo da reação (5 minutos); ms é a massa seca da enzima, em gramas, expressa pelas Equações (2) e (3):

Para a enzima livre:

$$ms (g) = \frac{mt \cdot 1mL \cdot 100}{vt \cdot (100-u)} \quad (2)$$

Sendo: mt é a massa total de enzima utilizada, em gramas; vt é o volume de tampão utilizado na solução enzimática, em mL; u é a umidade da enzima livre, em %.

Para a enzima imobilizada:

$$ms (g) = \frac{\mu \cdot 100}{100 - u} \quad (3)$$

4.2.6 *Teste de carregamento enzimático*

Para o teste de carregamento, 50 mg de suporte foram utilizados para a imobilização, de acordo com o item 4.2.4, variando as concentrações das soluções enzimáticas preparadas em tampão fosfato (0,1 mol/L e pH 7,0) em 2, 5, 10, 20, 40 mg/mL. A suspensão passou por etapa de separação para recolher o sobrenadante e secagem do imobilizado. Dosou-se a atividade hidrolítica do controle (sem enzima), do sobrenadante e do imobilizado. Para o comparativo, observou-se o Rendimento de Imobilização e a Atividade Recuperada, calculados pelas seguintes equações, de acordo com Lima et al. (2015):

Para calcular o Rendimento de Imobilização (RI), Equação (4):

$$RI (\%) = \frac{At}{A0} \cdot 100 \quad (4)$$

Para calcular a Atividade Recuperada (AR), Equação (5):

$$AR (\%) = \frac{Ader}{At} \cdot 100 \quad (5)$$

Sendo: At é a atividade teoricamente imobilizada, em U/g; A0 é a atividade oferecida na imobilização, em U/g; Aimob é a atividade da enzima imobilizada, em U/g.

A0, dosada no controle, é a atividade oferecida na imobilização, calculada pela Equação (6):

$$A0 (U/g) = \frac{At0 \cdot me}{ms} \quad (6)$$

Define-se: A0 é a atividade da solução enzimática, em U/g; me é a massa de enzima, em g; ms é a massa de suporte, em g.

At é a atividade que foi teoricamente imobilizada, Equação (7):

$$At (U/g) = A0 - Af \quad (7)$$

Af, dosada no sobrenadante, é a atividade não imobilizada, Equação (8):

$$Af (U/g) = \frac{Atf \cdot v}{ms} \quad (8)$$

Em que: Atf é a atividade final do sobrenadante, em U/mL; v é o volume final do sobrenadante, em mL; ms é a massa de suporte, em g.

4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das superfícies do suporte e do biocatalisador imobilizado foram caracterizadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em microscópio EVO MA 10, Carl Zeiss. As amostras foram previamente revestidas de ouro sob vácuo (LEICA EMSCD050). As microscopias das membranas de AC produzidas também foram avaliadas.

4.2.8 Temperatura e pH ótimos

A temperatura e pH ótimos para a lipase de *Pichia pastoris* livre e imobilizada em OG foram analisados variando em 45, 55 e 65 °C e pH 5, 7 e 9, avaliando a atividade enzimática, com a Equação 1, determinada pelo método de emulsão de azeite.

4.2.9 Determinação da quantidade enzima imobilizada

A quantidade de enzima imobilizada foi determinada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva de calibração foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) 1 mg/mL tendo os pontos da curva em diferentes concentrações (0,01 - 0,2 mg/mL). Para o procedimento, 20 µL da amostra a ser analisada foram transferidos a um tubo de ensaio seguido pela adição de 2,5 mL do reagente de Bradford. A solução resultante foi homogeneizada em agitador vortex e sua leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. A partir da equação da reta ($y = 3,5563x + 0,1619$; $R^2 = 0,96$) obtida foi possível converter a absorbância em concentração de proteínas, através da Equação (9).

$$CP \text{ (mg/mL)} = \frac{(Abs_{595} - 0,1619)}{3,5563} \quad (9)$$

Em que: CP é a concentração de proteínas, em mg/mL; Abs₅₉₅ é a absorbância medida no comprimento de onda 595 nm.

A quantidade de proteína fixada (Pt) foi determinada indiretamente relacionando a diferença entre quantidade de proteína enzimática disponibilizada na solução utilizada para imobilização e a quantidade de proteínas presentes na solução sobrenadante, e o valor encontrado foi dividido pela massa do suporte, apresentado na Equação (10). Por fim, o percentual de imobilização (PI) foi determinado pela Equação (11) adaptada de Petersohn Jr. (2019).

$$Pt \text{ (mg/g)} = \frac{(P_i - P_f)}{S} \quad (10)$$

$$PI \text{ (\%)} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \cdot 100 \quad (11)$$

Definiu-se P_i e P_f como sendo as concentrações de proteínas inicial e final, em mg, respectivamente; e S é a massa do suporte, em g.

4.2.10 Estabilidade térmica

Realizou-se o teste de estabilidade térmica para a enzima em forma livre e imobilizada, nas temperaturas de 30, 45, 60 e 70 °C nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 horas.

Para a enzima livre, a solução enzimática (10 mg/mL, tampão fosfato pH 7) foi incubada em banho com agitação e para a enzima imobilizada, 0,025 g foram incubadas em 2 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L e pH 7,0) nas temperaturas mencionadas. A cada tempo pré-estabelecido as amostras foram imediatamente resfriadas em água gelada para cessar a desativação e retiradas, uma alíquota de 1 mL da solução enzimática da enzima livre, e a amostra da enzima imobilizada, acrescentando nessa última 2,5 mL de emulsão de azeite de oliva para dosagem da atividade hidrolítica.

4.2.11 Cinética e Termodinâmica de desativação térmica

Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação para enzima livre e imobilizada foram determinados de acordo com as equações, apresentadas a seguir (FARIA et al., 2021; WAHAB et al., 2018):

A constante de inativação térmica (k_d) da enzima livre e imobilizada obtida por regressão linear dos dados de atividade hidrolítica versus tempo obtidos com os testes de estabilidade térmica foi calculada de acordo com a Equação (12) (FARIA et al., 2021):

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_d t \quad (12)$$

Sendo: A é a atividade enzimática temporal, em U/g; A_0 é a atividade enzimática inicial, em U/g; t é o tempo, em min.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é inversamente proporcional à K_d e foi calculado de acordo com a Equação (13) (FARIA et al., 2021):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (13)$$

A energia de desativação (E_d) foi obtida por regressão linear dos dados de K_d versus temperatura, calculada de acordo com a equação de Arrhenius, representada pela Equação (14) (FARIA et al., 2021):

$$\ln k_d = -\frac{E_d}{R} \frac{1}{T} + \ln A_0 \quad (14)$$

Sendo: R é a constante universal dos gases (8,314 J/K.mol); T é a temperatura, em K.

O fator de estabilidade (FE) determina a eficiência de imobilização, calculado considerando o tempo de meia vida da enzima antes e após um processo de imobilização pela Equação (15) (FARIA et al., 2021).

$$FE = \frac{t_{1/2immobilized}}{t_{1/2free}} \quad (15)$$

Sendo: t_{1/2}imobilizada é o tempo de meia vida da enzima imobilizada; t_{1/2}livre é o tempo de meia vida da enzima livre.

A Ed também está diretamente relacionada com os parâmetros termodinâmicos. A variação de entropia (ΔS^*), entalpia (ΔH^*) e energia livre de Gibbs (ΔG^*) de desnaturação térmica podem ser calculadas de acordo com as Equações (16), (17) e (18) a seguir (WAHAB et al., 2018):

$$\Delta H = E_d - RT \quad (16)$$

$$\Delta G = -RT \ln \frac{k_d h}{k_B T} \quad (17)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (18)$$

Sendo: h é a constante de Planck (11,04.10⁻³⁶ J.min⁻¹); KB é a constante de Boltzmann (1,38.10⁻²³ J.K⁻¹).

4.2.12 Produção da membrana

As membranas foram preparadas a partir de soluções com 20% (m/m) de acetato de celulose e 80% (m/m) de N-metil-2-pirrolidona (NMP) em relação à massa total, sob agitação magnética por 24 h e aproximadamente a 25°C. A solução foi espalhada sobre uma placa de vidro com auxílio de uma faca de espalhamento acoplada em um rolo automático, com espessura de 0,7 mm e 1 mm. As membranas resultantes ficaram em pré-evaporação do solvente por 0, 30 e 60 segundos e foram, então, imersas em banho de inversão de fases, utilizando água e etanol na proporção de 15:1 como não-solvente e armazenadas em potes com água e azida de sódio.

4.2.13 Fluxo do permeado na membrana de AC

O desempenho das membranas pode ser avaliado através do fluxo do permeado. O sistema de separação continha área ativa de membrana de 19,6 cm², em que foi abastecido da emulsão óleo-água usando pressão aplicada de 60 psi à temperatura ambiente (25 °C). O fluxo de permeado através da membrana (J) foi obtido através da Equação (19) (EL-GHAFFAR et al., 2020):

$$J \left(\frac{ml}{min.cm^2} \right) = \frac{V}{A \cdot t} \quad (19)$$

Em que: V é o volume do permeado, em mL; A é a área da membrana, em cm²; t é o intervalo de tempo, em min.

4.2.14 Ângulo de contato da membrana de AC

A molhabilidade das membranas em relação à água, ao óleo e ao meio reacional da hidrólise foi medida a partir do ângulo de contato, utilizando a técnica da gota séssil e método de ajuste ellipse, em temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) e 45 °C. O equipamento utilizado é do modelo Kruss Advance.

4.2.15 Quantificação dos ácidos graxos livres

O percentual de ácidos graxos livres (AGL) do óleo de soja foi determinado pelo método de titulação ácido/base Cd3d-63, recomendado pela AOCS (1998). Os ácidos presentes reagem com a solução de hidróxido de sódio e o resultado obtido é expresso em mg NaOH/g de amostra, determinando o índice de acidez do meio, pela presença dos ácidos graxos livres. Para isso, aproximadamente 1 grama de óleo e 3 gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 15 mL de uma solução isovolumétrica de etanol e éter e titulada com uma solução de NaOH 0,05 M sob agitação vigorosa até mudança de coloração (mudança súbita de uma coloração branca para rosa). Os testes do índice de acidez foram realizados em duplicatas. O índice de acidez foi quantificado a partir da Equação (20) adaptada de Zenevicz et al., 2016.

$$AGL (\%) = \frac{V_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot MMAGL}{m \cdot 10} \quad (20)$$

Em que: V_{NaOH} é o volume de solução de NaOH utilizado na titulação, em mL; M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH, em mol/L; $MMAGL$ é a massa molar média ponderada dos ácidos graxos do óleo de soja, em g/mol; m é a massa da amostra de óleo, em g.

4.2.16 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros foram obtidos por meio da Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR/FTIR) (Frontier; PerkinElmer, Connecticut, Estados Unidos) em uma faixa espectral de 4000 a 200 cm^{-1} . Uma amostra do OG sintetizado, da lipase de *Pichia pastoris* e da enzima imobilizada foi despejada diretamente no cristal e realizada a aquisição dos espectros em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade controlada. A aquisição dos espectros foi realizada por meio de 32 escaneamentos com uma resolução de 4 cm^{-1} . Os dados foram normalizados e suas linhas de base corrigidas. Posteriormente realizou-se a análise da área das bandas obtidas no espectro por meio do programa Opus 6.5 (Bruker, Ettlingen, Germany) e os gráficos plotados no programa Origin Pro 9.0.

4.2.17 Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima livre em batelada

A hidrólise do óleo de soja residual foi realizada sob as condições de razão mássica 1:1 (água:óleo), utilizando água destilada em pH neutro, por 4 h em reator batelada encamisado, 200 rpm, à 45°C e 0,5% da massa de água de enzima. Ao final da reação, o meio foi centrifugado à 5000 rpm por 10 minutos e o índice de acidez analisado. O teste foi realizado em duplicatas.

4.2.18 Otimização dos parâmetros reacionais para hidrólise enzimática do óleo de soja residual

Para a otimização dos parâmetros utilizados na hidrólise enzimática do óleo de soja residual, foram verificados razão mássica de 1:1, 1:2 e 1:4 (água:óleo), temperatura

de 35, 45, 55 e 65 °C e pH 5, 7 e 9, durante 4 h em reator batelada encamisado, à 200 rpm e utilizando 0,5% de biocatalisador (m:m) (massa de enzima:massa de água). Para comparativo, foi avaliado o índice de acidez do produto, calculado através da Equação 20.

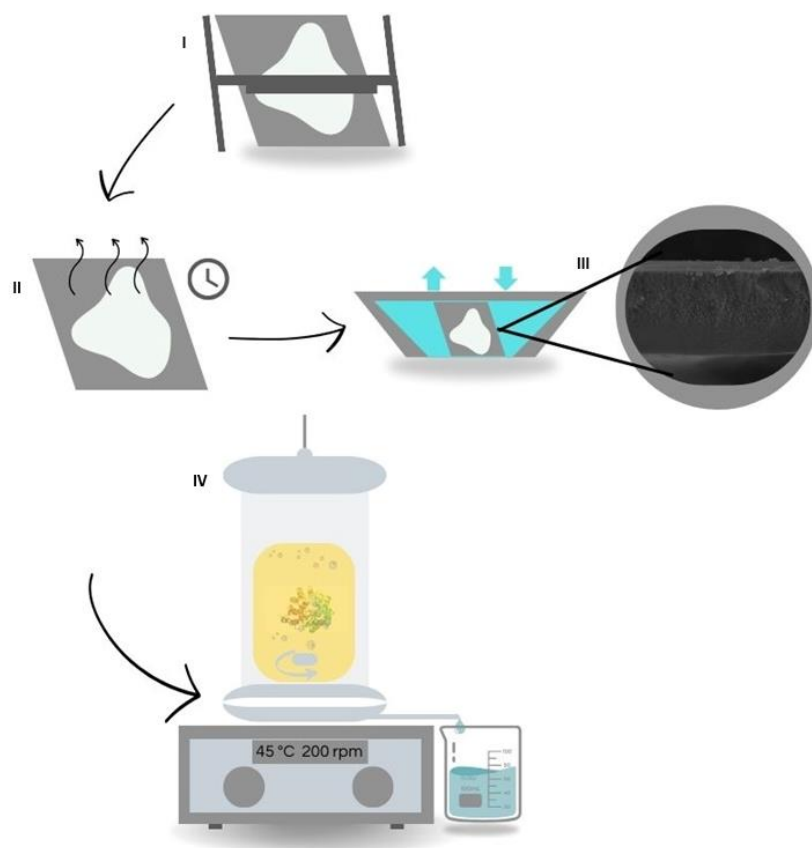
4.2.19 Hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em OG em reator batelada

A hidrólise foi realizada nas melhores condições obtidas de razão mássica (óleo:água) 1:1, utilizando água em pH neutro, à 55 °C. Foram utilizados 0,5% de catalisador (m:m) (massa de catalisador/massa de água), em reator batelada encamisado, à 200 rpm. Amostras foram retiradas nos tempos de 4, 24, 48, 72, 96, 120, 168 horas. O meio foi centrifugado à 5000 rpm por 5 minutos e o índice de acidez analisado. Os testes foram realizados em duplicatas.

4.2.20 Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em biorreator de membrana com separação simultânea

A hidrólise do óleo de soja residual foi realizada sob as condições de: razão mássica 1:1 (água:óleo), utilizando água destilada em pH neutro e 0,5% (m:m) (massa de catalisador/massa de água) de enzima imobilizada em OG, por 4h em biorreator de membrana de acetato de celulose selecionada com diâmetro de 5 cm, à 45 °C para enzima livre e 55 °C para imobilizada e pressão de 60 psi. Ao final da reação o índice de acidez do produto e do permeado foram analisados. Os testes foram realizados em duplicatas. Um esquema do processo é apresentado pela Figura 3.

Figura 3. Esquema do processo de produção da membrana de acetato de celulose (espalhamento I, pré-evaporação II, imersão em banho III) e da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea, IV.



Fonte: A autora.

4.2.21 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A quantificação dos triglicerídeos (TAG), diglicerídeos (DAG) e monoglicerídeos (MAG) foi analisada com uma adaptação da metodologia proposta por Carvalho *et al.* (2012) para cromatografia líquida de alto rendimento com detecção ultravioleta (High Performance Liquid Chromatography HPLC-UV) como método comprobatório dos produtos da reação de hidrólise. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo HPLC (Shimadzu TM, LC-20A Prominence) equipado com uma coluna Discovery HS C-18 (150mm × 4.6mm × 5µm) (Supelco) com temperatura constante de 40 °C, sistema gerador de gradiente e um detector UV-Vis (Shimadzu, SPD-20A) em 205 nm e injetor automático. O volume de injeção usado foi de 20 µl e a vazão de fluxo foi de 1 mL/min. O gradiente da fase móvel é composto por duas fases: A contendo metanol e B contendo solução de isopropanol-hexano (5:4 v/v). O método teve tempo total de 37 min, em que foi usado um gradiente de: 100%A + 0%B em 0 min, 50%A + 50%B em 20 min e mantendo por 10 min, voltando para 100%A + 0%B em 32 min e continuada da eluição isocrática por 5 min.

Para identificação e quantificação dos grupos glicerídeos, foi utilizado um padrão Mono, Di, Triglyceride Mix (Supelco). As amostras a serem analisadas foram diluídas 2000x em solução de isopropanol-hexano (5:4 v/v) e filtradas em filtro PVDF 0.45 µm.

A quantificação do teor de cada grupo de componente (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos) foi calculada partindo da composição porcentual relativa para cada grupo e, assumindo esta composição porcentual equivalente à razão mássica entre o grupo e a amostra total, de acordo com a Equação (21), adaptada de KOMERS et al., 2001.

$$x_{grupo} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{\sum \text{Área grupo}}{\sum \text{Área total}} \cdot 100 \quad (21)$$

Em que: x_{grupo} é a fração mássica de cada grupo na amostra total, $\sum \text{Área grupo}$ é a soma das áreas de todos os picos correspondente ao grupo; $\sum \text{Área total}$ é a soma das áreas de todos os picos.

Cada grupo tem um intervalo de tempo de retenção específico: os monoglicerídeos (MAG) entre 2 e 9 min, os diglicerídeos (DAG) entre 10 e 17 min e os triglicerídeos (TAG) entre 18 e 25 min aproximadamente.

As curvas padrão construídas para cada grupo MAG, DAG e TAG são representadas pela Equação (22), (23) e (24), respectivamente:

$$y = 4 \cdot 10^{-7} \quad R^2 = 0,97 \quad (22)$$

$$y = 2 \cdot 10^{-7} \quad R^2 = 0,98 \quad (23)$$

$$y = 4 \cdot 10^{-7} \quad R^2 = 0,99 \quad (24)$$

4.2.22 *Rendimento de rejeição de membrana*

A seletividade das membranas foi estimada pelo rendimento de rejeição (R, %), calculado com base nas concentrações de óleo no produto (C0) e no permeado (CP), expresso pela Equação (25) (Darabi, 2021).

$$R (\%) = \frac{(C_0 - C_P)}{C_0} \cdot 100 \quad (25)$$

4.2.23 Reuso da enzima imobilizada

A enzima imobilizada foi aplicada em 5 ciclos de hidrólise, sendo a atividade enzimática avaliada ao final de cada. Após cada reação, o preparado imobilizado foi recuperado, lavado com hexano e seco em liofilizador por 6 h, congelado anteriormente a uma temperatura de aproximadamente -70 °C e depois submetido a pressão negativa (vácuo – aproximadamente 100 umHg), a fim de ser aplicado em novo ciclo.

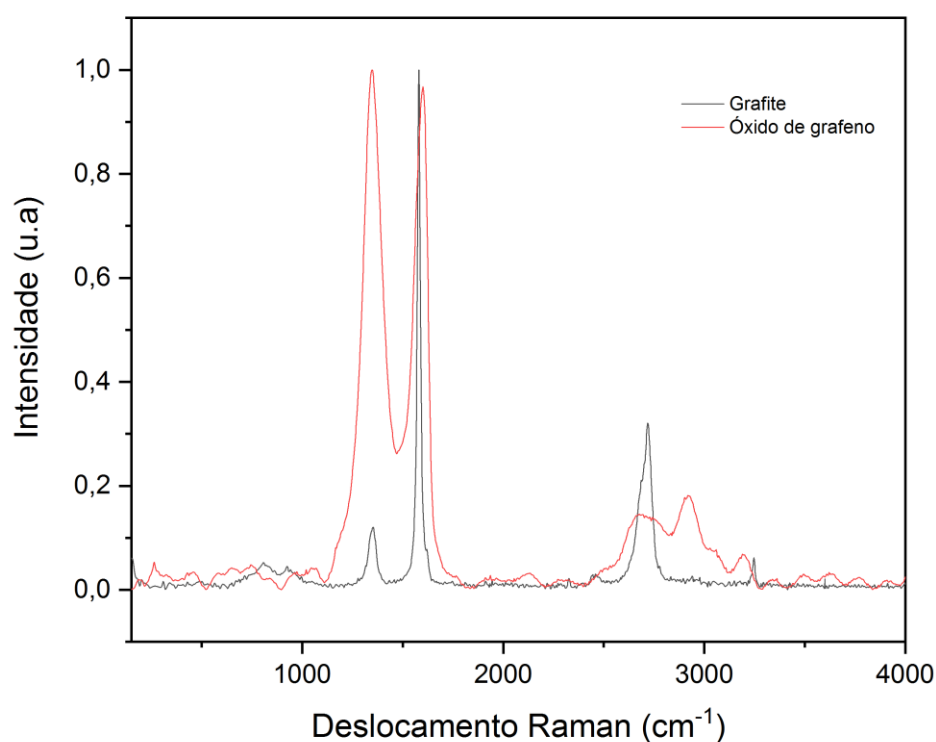
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do óxido de grafeno sintetizado

As amostras de OG produzidas foram caracterizadas por técnicas de Espectroscopia Raman (RAMAN), Análises termogravimétricas (TGA), Espectroscopia de Força Atômica (AFM, Atomic Force Microscopy), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

A Figura 4 apresenta os espectros Raman obtidos para as nano folhas do OG sintetizado. Essa análise refinada por espectroscopia Raman contribui significativamente para a caracterização precisa de materiais, permitindo uma compreensão mais profunda de suas propriedades estruturais e químicas.

Figura 4. Espectro Raman do OG sintetizado (vermelho) e grafite (preto).

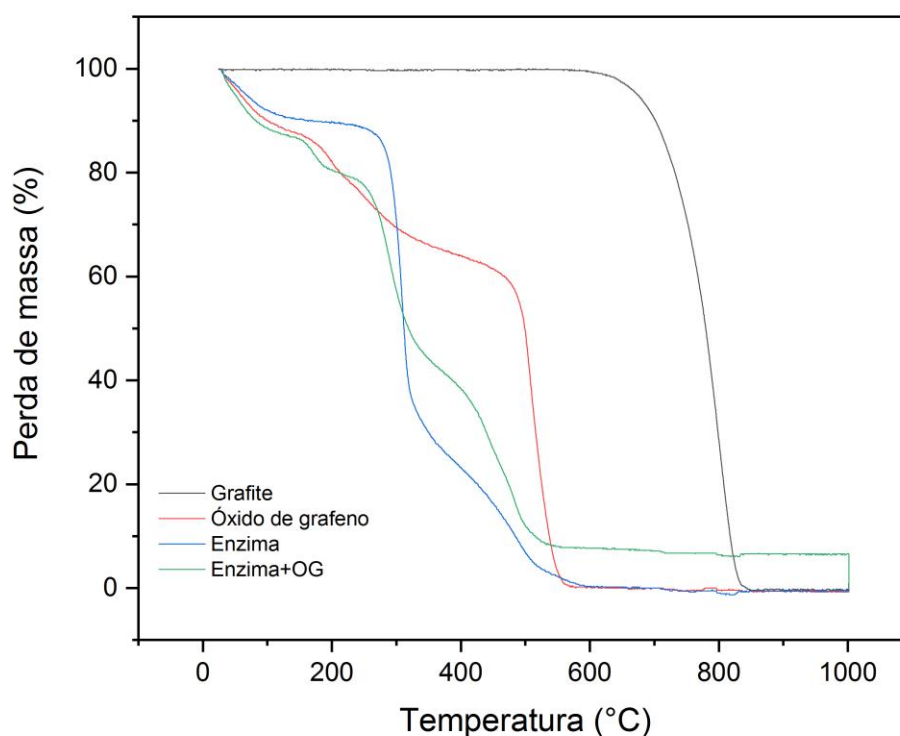


A técnica de espectroscopia Raman é estabelecida como uma ferramenta de grande eficácia na determinação do índice de defeitos em materiais. Por meio da espectroscopia Raman, são rotineiramente registrados dois picos distintos para a caracterização de estruturas de carbono, localizados em torno de 1350 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , respectivamente (JIŘÍČKOVÁ et al., 2022). O primeiro pico, designado como banda D,

reflete uma coordenação quase-tetraédrica com hibridização de carbono sp^3 , indicando irregularidades, como a presença de grupos funcionais. Por sua vez, o segundo pico, conhecido como banda G, revela um arranjo planar com hibridização sp^2 , sugerindo uma rede regular de grafeno. A relação D/G, obtida por meio do cálculo das intensidades desses picos, proporciona uma medida do grau de oxidação da amostra, sendo desejável que se mantenha em torno de 1,00 (JIŘÍČKOVÁ et al., 2022; RIBEIRO et al., 2022). Para a amostra, a relação D/G calculada foi de 0,99.

Amostras preparadas de grafite, OG, enzima e enzima imobilizada em OG foram submetidas à decomposição térmica até 1000°C na atmosfera do ar para sondar suas características térmicas. Gráficos das análises termogravimétricas (TGA) representativos são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Gráficos das análises termogravimétricas (TGA) das amostras preparadas de grafite, OG, enzima e enzima imobilizada em OG.



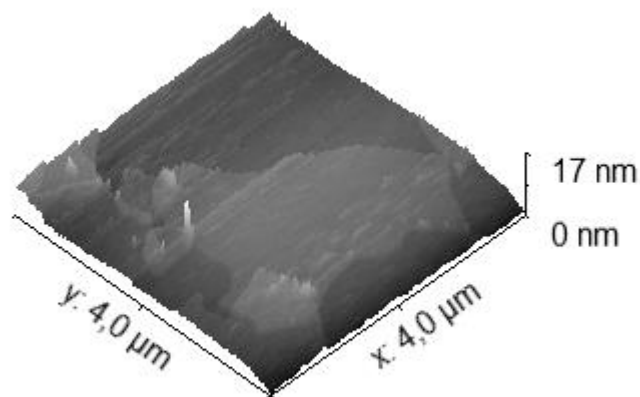
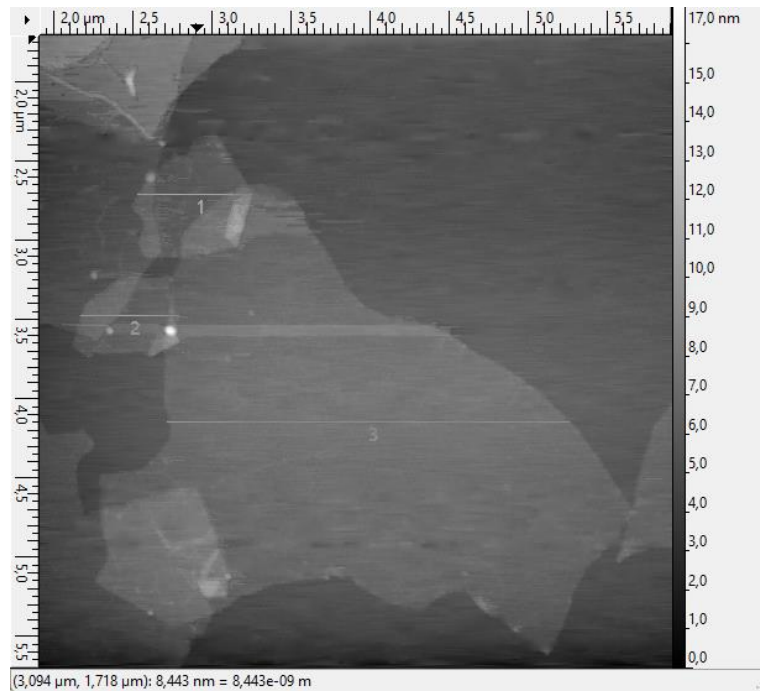
Os principais eventos que resultam na perda de massa do óxido de grafeno (OG) podem ser elucidados a partir das suas temperaturas de decomposição: a eliminação de água ocorre a temperaturas inferiores a 100°C, a remoção de grupos funcionais de

oxigênio se dá na faixa de 100 a 300°C, enquanto a pirólise oxidativa da estrutura de carbono é observada em temperaturas entre 300 e 1000°C (FARIVAR et al., 2021). Essa notável estabilidade térmica está intrinsecamente vinculada à perda de massa da composição elementar do OG, ou seja, o aumento do teor de oxigênio resulta em uma diminuição correspondente da estabilidade térmica, refletindo o grau de oxigenação proveniente do processo de síntese (RIBEIRO et al., 2022).

O processo de decomposição térmica tanto da enzima quanto do composto imobilizado foi analisado através de TGA. Conforme ilustrado na Figura 5, observou-se uma perda de peso mais proeminente em duas fases durante o processo de aquecimento. A degradação térmica na primeira fase (0–200 °C) foi associada à vaporização da água (ZHAO et al., 2022), enquanto o segundo estágio (200–500°C) foi atribuído à decomposição da lipase (LI et al., 2020). Contudo, neste segundo estágio até o fim da análise, a enzima imobilizada demonstrou uma perda de massa inferior, aproximadamente superior em 10%, indicando uma maior estabilidade térmica em comparação com a enzima pura.

A Figura 6 mostra as imagens de Espectroscopia de força atômica (AFM) do OG. O comprimento médio da folha de OG é marcado pelo traço, visto a seguir.

Figura 6. AFM das amostras do OG sintetizado.



A Espectroscopia de força atômica (AFM) pode ser empregada para estudar a espessura da amostra de OG, investigando assim o número de camadas. É conhecido pela literatura que uma amostra monocamada de OG tem uma espessura de 0,8–1,2 nm (JIRÍČKOVÁ et al., 2022).

Com as imagens apresentadas na Figura 6 é possível selecionar aleatoriamente uma folha de OG, com aspecto transparente, e traçar uma linha na vertical sobre a sua superfície para saber o tamanho lateral da folha selecionada, como é apresentado na Tabela 1.

Esta diferença de espessura pode ser atribuída a umidade relativa da amostra após a secagem, a qual pode influenciar na aglomeração das folhas, tornando-as mais empilhadas. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (RIBEIRO et al., 2022).

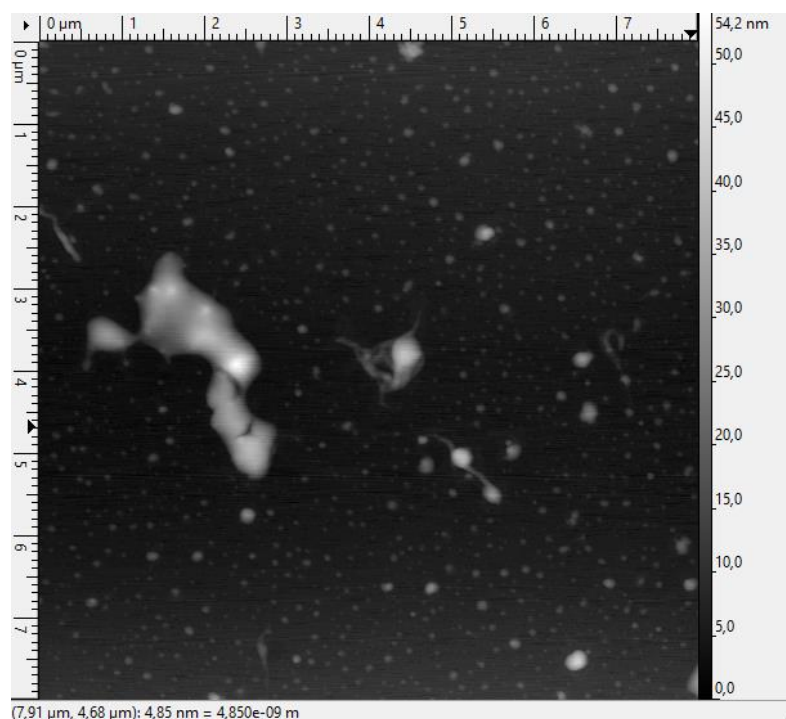
Tabela 1. Espessura e tamanho lateral médios da folha de OG obtidos por AFM

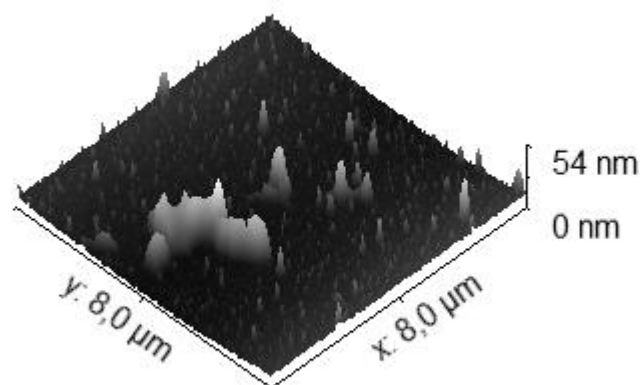
N	Espessura (nm)	Tamanho lateral (μm)
1	1,264	0,719
2	0,874	0,617
3	1,567	2,539
média	1,235	1,292

N: identificação da folha de OG.

A Figura 7 mostra as imagens de AFM do OG após a imobilização da enzima.

Figura 7. AFM das amostras do complexo imobilizado, OG+enzima.





A morfologia de superfície mais grosseira do imobilizado (Fig. 7) do que o suporte OG indicou fortemente a presença da enzima neste último. Como observado, essa face razoavelmente homogênea e com maior rugosidade superficial, e ainda, as partículas uniformes de formato globular detectadas na superfície do composto imobilizado, afirmou que a lipase estava ligada ao suporte (JACOB et al., 2021).

5.2 Teste de carregamento enzimático

Para a imobilização da lipase de *Pichia pastoris* foram testados diferentes carregamentos no intuito de buscar o melhor resultado em termos da Atividade enzimática do preparado imobilizado (AI), o Rendimento de Imobilização (RI) e a Atividade Recuperada (AR). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos:

Tabela 2. Carregamento enzimático da lipase de *Pichia pastoris* em OG

C (mg/mL)	RI (%)	AR (%)	AI (U/g)
2	49,21 ± 0	15,55 ± 1,67	280,17 ± 30,17
5	55,31 ± 4,69	28,52 ± 4,12	391,33 ± 3,09
10	62,96 ± 2,47	33,90 ± 0,86	503,09 ± 7,03
20	57,26 ± 1,71	21,84 ± 0,40	421,93 ± 4,95
40	38,10 ± 4,76	12,59 ± 1,11	176,22 ± 37,22

C: concentração da solução enzimática; RI: rendimento de imobilização; AR: atividade recuperada; AI: atividade do imobilizado.

Com base nas evidências apresentadas, a carga de 10 mg/mL emerge como a condição ótima, demonstrando os resultados mais promissores para todos os parâmetros analisados. A avaliação da atividade enzimática da enzima imobilizada (AI) revela uma expressiva performance, notavelmente destacada na concentração de 10 mg/mL (503,09 U/g $\pm$ 7,03). Neste ponto, observa-se uma notável capacidade de carga, atingindo aproximadamente 426,9 mg de proteína por grama de suporte em um período de imobilização de 2 horas.

À medida que se eleva a concentração da solução enzimática (C), verifica-se uma tendência à diminuição nos resultados, sugerindo uma possível saturação no carregamento do suporte. Este comportamento pode ser atribuído ao potencial excesso de lipase, levando a repulsões eletrostáticas entre as moléculas carregadas negativamente da enzima, conforme descrito por Zhang et al. (2017), resultando em uma redução de desempenho.

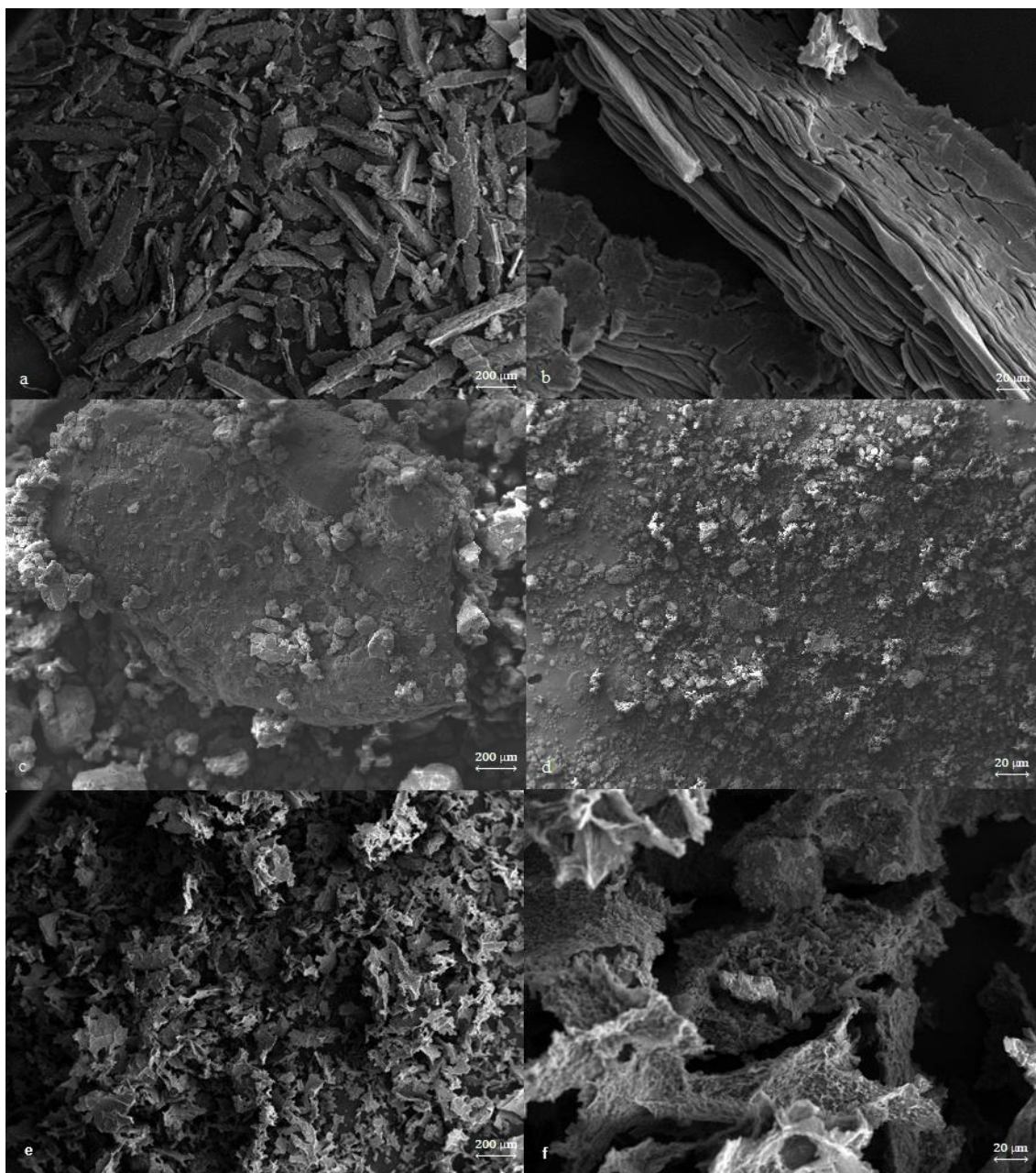
É relevante notar que a concentração de 20 mg/mL, embora ainda apresente resultados próximos aos do teste anterior (10 mg/mL), representa o dobro da concentração utilizada. Surpreendentemente, os resultados se assemelham também aos obtidos com 5 mg/mL, indicando que concentrações mais elevadas podem não ser vantajosas. Este cenário sugere que o uso excessivo do biocatalisador pode não ser necessário, enfatizando a importância da otimização cuidadosa das condições de carga para maximizar a eficiência do processo.

Resultados semelhantes são encontrados na literatura. Zhang et al. (2017) descrevem a concentração da solução de 15 mg/mL como melhor carregamento da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em OG decorado com nanopartículas de ZnO, com carga de cerca de 73,52 mg de proteína por g de suporte. Duta e Saha (2018) relatam que a capacidade ótima de carregamento de lipase *Brevibacillus borstelensis* NLIP05 por g de OG foi de 109,6 mg após 22 h do processo de imobilização e RI entre 45 e 81,6%.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura do OG sintetizado e da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em OG foram elucidadas em imagens obtidas por MEV e apresentadas pela Figura 8.

Figura 8. MEV do OG sintetizado (a, b), da lipase de *Pichia pastoris* (c, d) e da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em OG (e, f)



A Figura 8(a, b) exibe a estrutura característica do Óxido de Grafeno (OG), evidenciando uma superfície predominantemente lisa, composta por multicamadas, com algumas rugas e bordas levemente curvadas. As dobras presentes estão associadas aos grupos de oxigênio localizados no plano basal, resultado da oxidação do grafite. As lamelas finas, notáveis nas imagens, estão interligadas por forças fracas de Van der Waals (RIBEIRO et al., 2022).

A Figura 8 (e, f) apresenta a morfologia do OG após o processo de imobilização da lipase. Observa-se um aglomerado adsorvido na superfície do suporte, evidenciando de

maneira clara o carregamento da enzima, ilustrado na Fig 8 (c, d). A estrutura adquiriu um formato mais granular, cobrindo integralmente o suporte. Essas observações são coerentes com os achados de outros estudos previamente conduzidos (RIBEIRO et al., 2022; LI et al., 2018; KOHORI et al., 2017). Este padrão morfológico ilustra de maneira consistente o sucesso do processo de imobilização da lipase no Óxido de Grafeno, fornecendo uma base robusta para considerações futuras sobre sua aplicação em sistemas catalíticos.

5.4 Caracterização da enzima livre e imobilizada em OG

Para avaliar seu desempenho, a atividade relativa da enzima livre foi estimada em diferentes temperaturas, 35, 45, 55 e 65 °C e diferentes pH, 5, 7 e 9. O perfil descoberto é demonstrado nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9. Atividade relativa da lipase de *Pichia pastoris* livre em diferentes temperaturas.

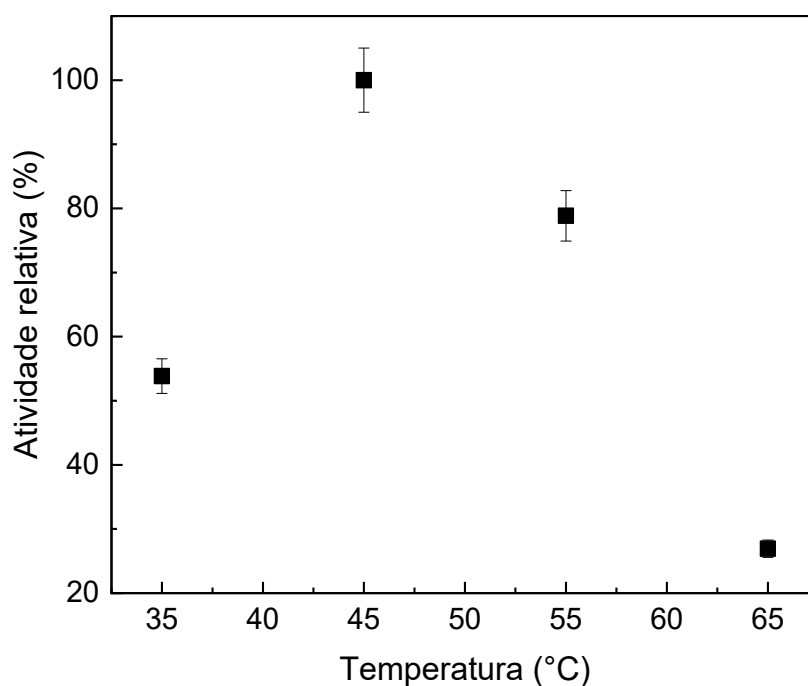
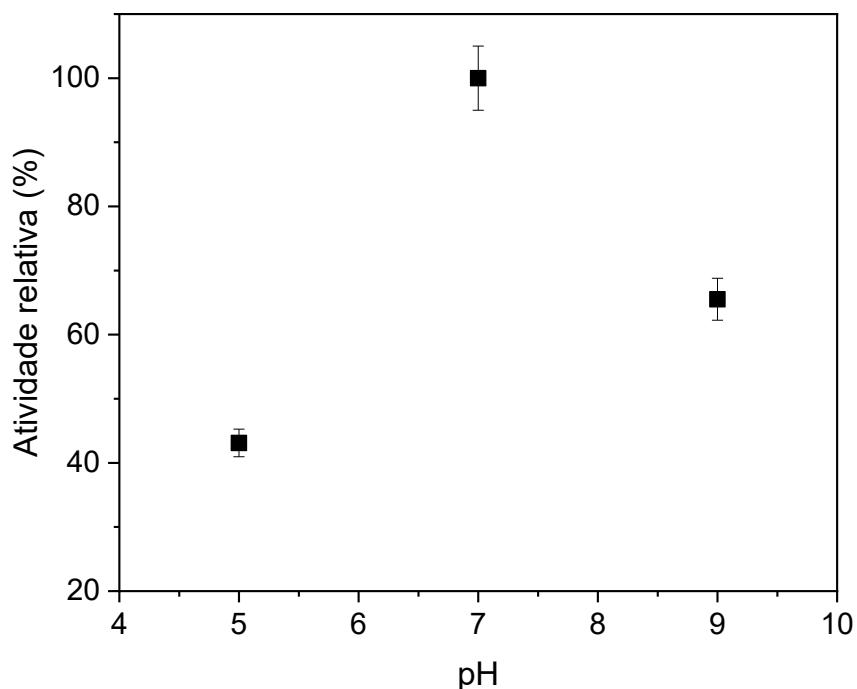


Figura 10. Atividade relativa da lipase de *Pichia pastoris* livre em diferentes pH.



As lipases geralmente possuem maior atividade em uma faixa ampla de temperatura, comumente entre 30 e 80 °C e em pH neutro a alcalino. Numerosos trabalhos na literatura relatam que as lipases se apresentaram mais ativas nessas condições (JAVED et al., 2018; LEE et al., 2023; NURUL FURQAN et al., 2019; QIU et al., 2021).

A capacidade destas enzimas de resistir naturalmente a condições de reação severas devido às adaptações fisiológicas, sem quaisquer modificações adicionais, confere-lhes uma vantagem sobre as demais (VIVEK et al., 2023). As Figuras 9 e 10 demonstram que a lipase de *Pichia pastoris* é ligeiramente termofílica, atuando em uma faixa de temperatura mais elevada, 45-55 °C, apresentando melhor desempenho a 45 °C, além disso exerce maiores atividades em pH 7, e, com comportamento alcalino tolerante, mantendo aproximadamente 70% de atividade relativa em pH 9.

A *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica amplamente utilizada para a expressão de lipases heterólogas (FENG et al., 2022). Entretanto, é interessante ressaltar que a lipase de *Pichia pastoris* é pouco relatada, limitando a busca literária, sendo a princípio usada como sistema de produção proteica e atualmente tem sido utilizada como sistema de expressão (SCHWARZHANS et al., 2017); assim, contribui à necessidade de estudos envolvendo a enzima.

O desempenho do biocatalisador imobilizado em OG também foi estudado em diferentes temperaturas, 35, 45, 55 e 65 °C e pH, 5, 7 e 9, e demonstrado nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Além disso, a proteína residual no sobrenadante da imobilização em função do tempo foi avaliada durante 24h, expressa na Figura 13.

Figura 11. Atividade relativa em diferentes temperaturas da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em óxido de grafeno.

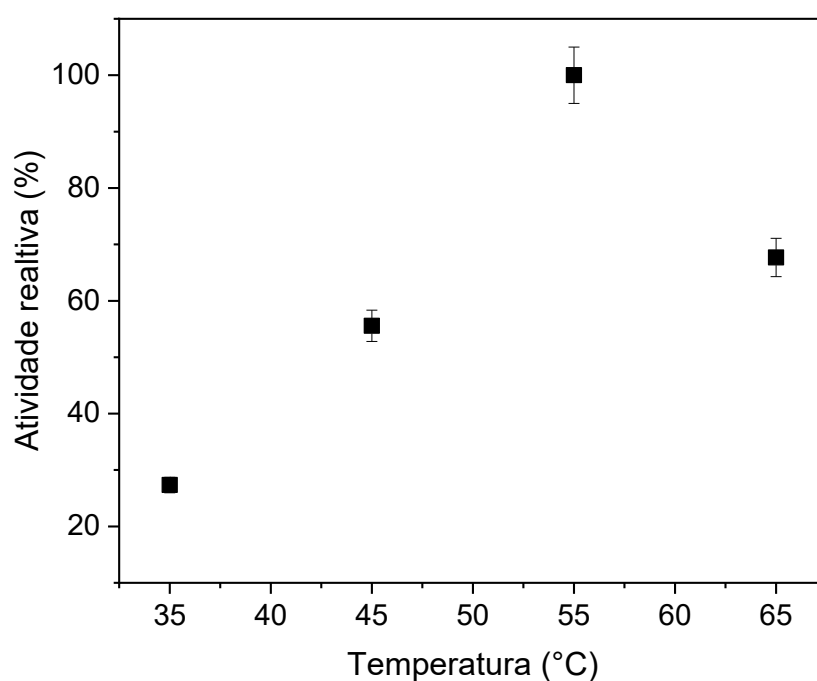
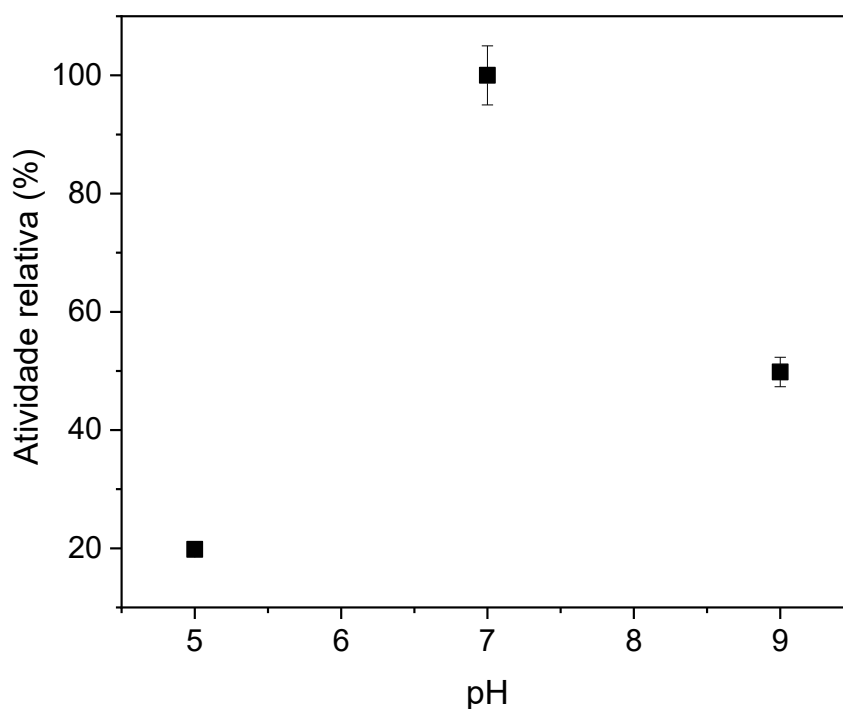


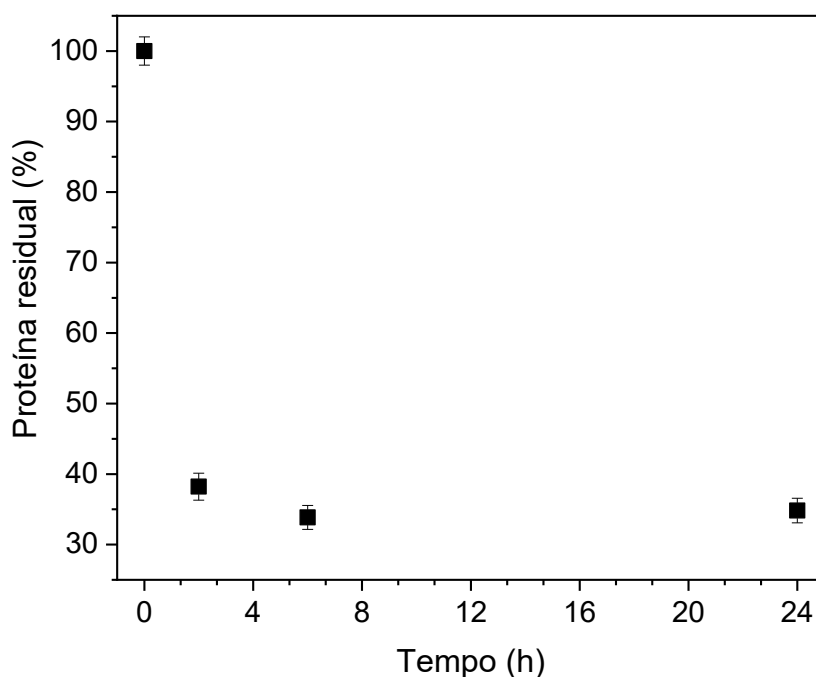
Figura 12. Atividade relativa em diferentes pHs da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em óxido de grafeno.



As Figuras 11 e 12 ilustram que a lipase derivada de *Pichia pastoris* apresenta uma ligeira termofilia, demonstrando maior eficácia em uma faixa de temperatura mais elevada, com desempenho otimizado a 55 °C. Além disso, essa lipase exibe atividade maximizada em pH 7 e demonstra ser tolerante a condições alcalinas, mantendo aproximadamente 50% de atividade relativa em pH 9. Comparando seu desempenho ao da enzima em sua forma livre, a qual exibiu maior atividade enzimática em temperatura de 45 °C e pH 7, percebe-se que a técnica de imobilização acrescentou maior tolerância a temperaturas maiores.

A concentração de proteínas no sobrenadante da solução enzimática durante o processo de imobilização foi acompanhada nos tempos de 0, 2, 6 e 24 h, apresentada na Figura 13.

Figura 13. Proteína residual no sobrenadante da imobilização em função do tempo.



Analizando a Figura 13, foi observado que na primeira hora já havia sido adsorvida grande parte da enzima. Após duas horas, apenas 38% da proteína oferecida, aproximadamente, era detectada no sobrenadante e até o final do processo de imobilização não houve uma mudança acentuada. A partir dos resultados obtidos foi escolhido o tempo de imobilização de 2 horas, a fim de carregar o máximo do biocatalisador no suporte em menor tempo de processo. O rendimento teórico da imobilização (PI) foi de $65,18\% \pm 0,09$ e está associado à quantidade de proteína presente no sobrenadante, que teoricamente não foi transferida para o suporte. Esse percentual está em teoria diretamente ligado à atividade enzimática do imobilizado. No melhor carregamento, de 10 mg/mL é encontrada uma quantidade de proteína fixada (Pt) de $13,49 \pm 0,39$ mg/g. Kuang et al. (2022) imobilizaram lipase de *Aspergillus oryzae* e mostraram em seus resultados uma tendência de equilíbrio, relatando que o tempo de imobilização não teve efeito significativo na atividade enzimática.

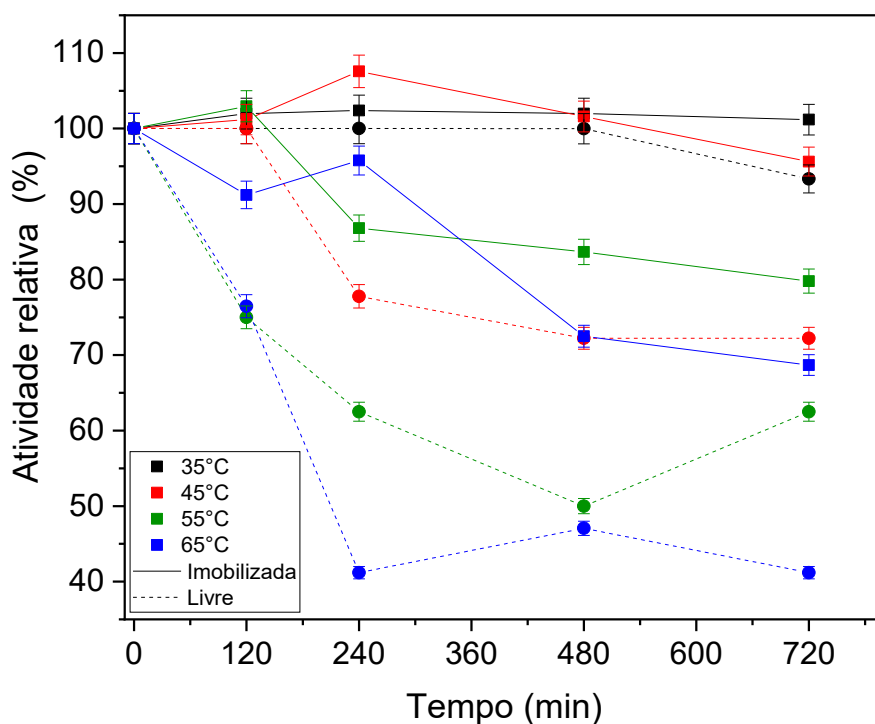
Esses resultados, amplamente respaldados pela literatura científica, não apenas consolidam o entendimento atual sobre a bioquímica das lipases, mas também destacam sua relevância adaptativa e suas aplicações potenciais em condições ambientais diversas. *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica amplamente empregada para a expressão de lipases heterólogas, é notavelmente subdocumentada na literatura científica. Inicialmente

utilizada como sistema de produção proteica, atualmente tem sido adotada como um eficiente sistema de expressão. Este cenário destaca a necessidade premente de mais estudos relacionados a essa enzima, e reforça a importância contínua da investigação científica para uma compreensão mais aprofundada das propriedades fundamentais dessas enzimas e suas implicações práticas em diferentes contextos industriais e biotecnológicos.

5.5 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada em OG

A Figura 14 apresenta os resultados de estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada em OG:

Figura 14. Estabilidade térmica da enzima livre (círculo e linha pontilhada) e imobilizada (quadrado e linha sólida) nas temperaturas de 35 (preto), 45 (vermelho), 55 (verde) e 65 (azul) °C durante 720 minutos.



A Figura 14 destaca a evidência de uma deterioração na atividade relativa ao longo do tempo de incubação, independentemente da temperatura considerada. Este declínio na atividade relativa intensifica-se com o aumento da temperatura, indicando que temperaturas superiores a 45 °C aceleram a inativação da enzima na forma livre. Esse fenômeno está associado à destruição da estrutura da lipase, resultando em uma diminuição concomitante na atividade enzimática.

O aprimoramento da estabilidade térmica, observado pós processo de imobilização, pode ser atribuído ao aumento das interações hidrofóbicas superficiais entre o suporte/lipase e à redução das mudanças conformacionais da lipase, quando comparadas à sua forma livre. Adicionalmente, a presença de interações secundárias, como ligações de hidrogênio, interações polares e iônicas entre a enzima e o suporte, desempenha um papel crucial no fortalecimento da estabilidade térmica (IŞIK et al., 2019).

De maneira geral, a enzima imobilizada revela uma notável tolerância à temperatura, correlacionada ao aumento da rigidez na estrutura secundária da lipase imobilizada (GUO et al., 2021). Ao final de 12 horas, as atividades relativas da enzima imobilizada a 35, 45, 55 e 65 °C exibiram incrementos de 7, 23, 17, 27% respectivamente, em relação à lipase livre. Mantendo aproximadamente 70% da atividade inicial sob a condição mais crítica estudada. Isso evidencia claramente que o processo de imobilização confere uma notável estabilidade térmica à enzima, estendendo as considerações para futuras aplicações práticas.

5.6 Cinética e Termodinâmica de desativação

A Tabela 3 apresenta os resultados da cinética e termodinâmica de desativação da enzima livre e imobilizada:

Tabela 3. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica da lipase de *Pichia pastoris* livre e imobilizada

Parâmetros	Enzima	30 °C	45°C	60°C	70°C
K_d (min ⁻¹)	Livre	0,00008	0,0006	0,0008	0,0012
	Imobilizada	0,00002	0,00005	0,0003	0,0006
$t_{1/2}$ (min)	Livre	8664,34	1155,25	866,43	577,62
	Imobilizada	34657,36	13862,94	2310,49	1155,25
FE		4	12	2,67	2
E_d (kJ/mol)	Livre	55,53			
	Imobilizada	76,64			
ΔH_D (kJ/mol)	Livre	53,01	52,89	52,76	52,68
	Imobilizada	74,12	73,99	73,87	73,79
ΔG_D (kJ/mol)	Livre	108,38	108,54	112,99	115,31
	Imobilizada	111,88	115,12	115,71	117,29
ΔS_D (kJ/mol)	Livre	-0,183	-0,175	-0,181	-0,183
	Imobilizada	-0,125	-0,129	-0,126	-0,127

De maneira global, os resultados indicam que a elevação da temperatura provoca um incremento na taxa de desativação térmica da lipase, tanto em sua forma livre quanto imobilizada, conforme evidenciado pelo aumento na constante de desativação térmica (k_d). Notavelmente, comparativamente à enzima livre, as variantes imobilizadas demonstram redução nos valores de k_d , denotando uma maior estabilidade térmica conferida pelo processo de imobilização (LEVENSPIEL, 2000).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), representando o período necessário para reduzir pela metade a atividade enzimática inicial, revela uma influência positiva do processo de imobilização. A lipase imobilizada exibe maior estabilidade, refletida por valores superiores de tempo de meia-vida (FARIA et al., 2021). Tal comportamento é corroborado pelo fator de estabilidade (FS), indicando que a enzima imobilizada manifesta 4, 12, 2.67 e 2 vezes mais estabilidade em comparação com sua forma livre a 35, 45, 55 e 65 °C, respectivamente.

O aumento na energia de desativação (E_d) para a enzima imobilizada em comparação com a lipase livre indica uma maior resistência ao processo de inativação térmica. Isso sugere uma notável melhoria na termoestabilidade da enzima imobilizada, visto que E_d representa a barreira energética a ser superada para a inativação enzimática.

Maior energia de ativação denota maior estabilidade, destacando o impacto positivo do processo de imobilização (RAHMAN et al., 2020).

A análise da entalpia (ΔH_D), representando a troca de calor, revela que a enzima imobilizada, com valores superiores de ΔH , demanda mais energia para modificar seu estado conformacional. Isso implica que a lipase imobilizada apresenta uma resistência acentuada, necessitando de mais energia para modificar suas ligações e transitar do estado nativo para o desnaturado (IBRAHIM et al., 2020).

A energia livre de Gibbs (ΔG_D) é uma expressão que reflete a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima, sendo que valores mais baixos indicam uma maior propensão à desnaturação. No contexto específico da lipase imobilizada, valores mais elevados de ΔG sugerem que o processo de imobilização conferiu uma notável estabilidade à enzima e a observação de valores positivos de ΔG indica que o processo de inativação térmica da enzima é termodinamicamente não espontâneo (AMIN; BHATTI; BILAL; 2022).

A entropia (ΔS_D) é uma medida da desordem na estrutura da enzima e está intrinsecamente ligada à formação do estado de transição. O valor de mudança de entropia negativa para uma determinada reação enzimática indica a espontaneidade do processo (JAISWAL & RATHOD, 2021).

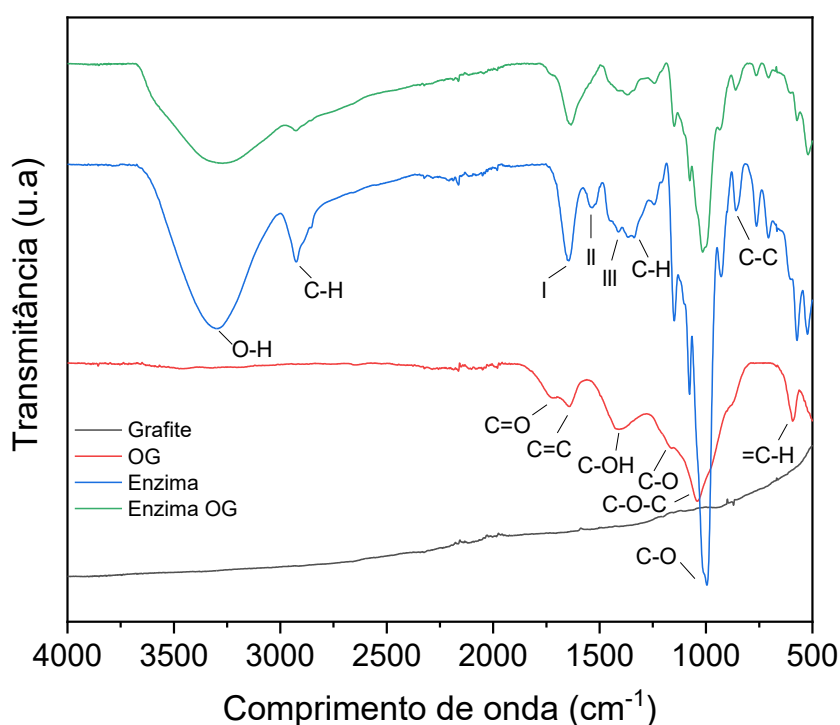
Sonkar e Singh (2021) relataram uma energia de inativação térmica (E_d) de 66,98 kJ/mol, energia livre de Gibb (86,31 kJ/mol), entalpia (64,26 kJ/mol) e entropia ($-66,21 \times 10^{-3}$ kJ/mol/K) para a inativação enzimática obtida a 60°C para lipase de *Bacillus gibsonii*. Enquanto, estudos de inativação térmica de Amin, Bhattie Bilal (2022) revelaram uma meia-vida de 1732,5 min (28,88 h) a 40 °C, sendo drasticamente reduzida em temperaturas elevadas, energia de ativação de 28,81 kJ mol⁻¹, entropia, entalpia e energia livre foram determinadas em 168,73 J mol⁻¹ K⁻¹, 160,60 e 107,79 kJ mol⁻¹, respectivamente, a 40°C.

Logo, de acordo com tais resultados, é possível notar que a imobilização da lipase conferiu, efetivamente, estabilidade térmica à enzima, como evidenciado pelo aumento em seu tempo de meia-vida. Em conjunto, essa interpretação reforça a eficácia da estratégia de imobilização na preservação da estabilidade enzimática em condições térmicas desafiadoras.

5.7 FTIR do grafite, óxido de grafeno, enzima e enzima imobilizada em OG

As amostras foram submetidas à análise usando FTIR-ATR, permitindo a contraposição dos picos característicos, com o objetivo de comparar os resultados para a matéria-prima, grafite, o OG obtido, a enzima pura e após o processo de imobilização. As análises do grafite utilizado na síntese, do óxido de grafeno sintetizado, da enzima utilizada e da enzima imobilizada em óxido de grafeno são exibidas pela Figura 15.

Figura 15. FTIR do Grafite (preto), Óxido de grafeno (vermelho), Enzima (azul) e Enzima imobilizada em OG (verde).



O espectro do óxido de grafeno (OG) (linha vermelha) mostra a presença de diversas bandas que podem ser atribuídas a grupos funcionais contendo oxigênio, o que é uma evidência da oxidação do grafite, em comparação com a ausência de picos no grafite (linha preta).

O espectro FTIR apresenta os picos característicos da amostra de óxido de grafeno (OG) (linha vermelha), os quais são devidamente documentados na literatura especializada (RIBEIRO et al., 2022; AL-GAASHANI et al., 2019; YU et al., 2016). Os

alongamentos carboxílicos (C=O) e aromáticos (C=C) estão associados aos picos observados em 1732 e 1643 cm^{-1} , respectivamente. Os picos a 1400 e 1160 cm^{-1} são atribuídos às deformações OH dos grupos COH e aos alongamentos C-O, respectivamente. Adicionalmente, os picos em 1037 e 590 cm^{-1} são resultantes dos alongamentos C-O-C e das ligações C-H, respectivamente (RIBEIRO et al., 2022). Essa análise espectroscópica proporciona uma caracterização precisa dos grupos funcionais presentes no óxido de grafeno, corroborando com os padrões previamente estabelecidos na literatura científica.

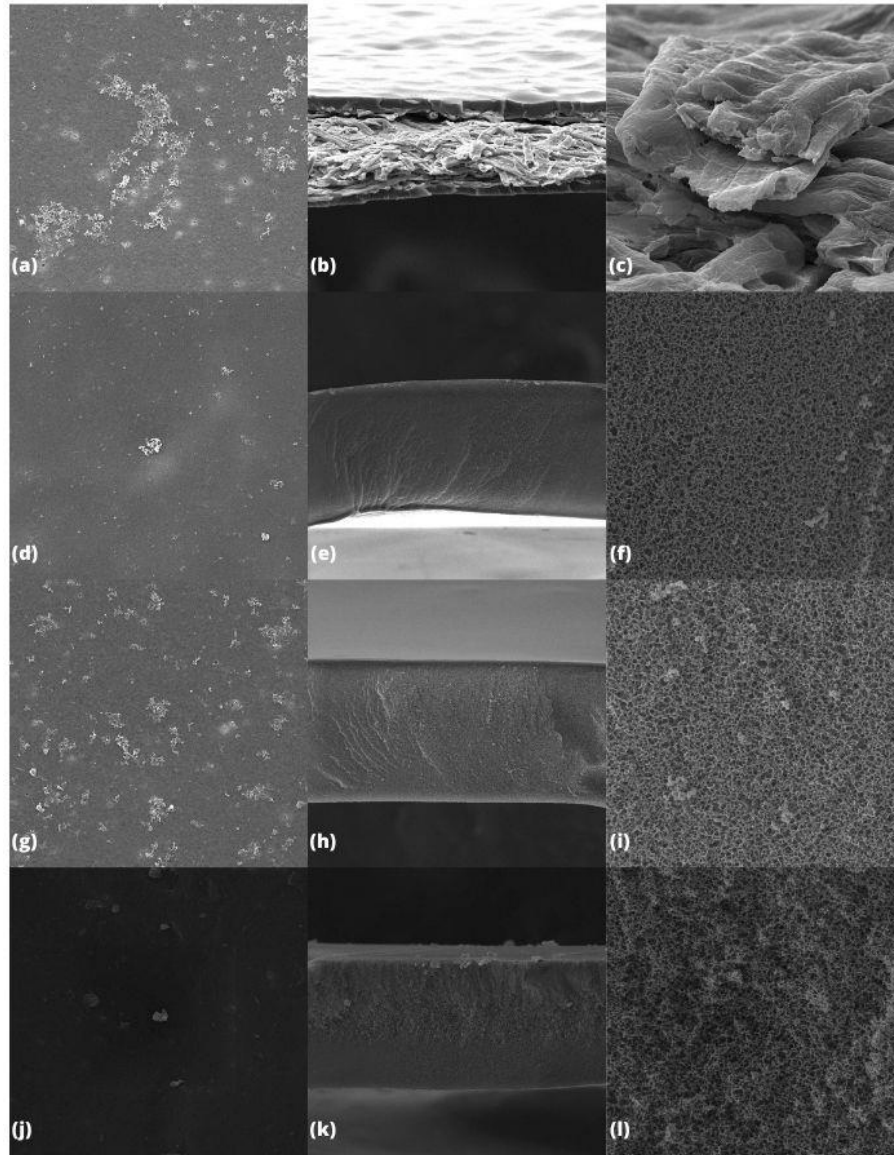
Quanto à enzima, espectro FTIR da lipase livre (linha azul) mostra abaixo de 1000 cm^{-1} alguns sinais atribuídos às vibrações de alongamento e flexão das ligações C – C que formam o esqueleto da enzima (DEGÓRSKA et al., 2022). O sinal de vibrações de alongamento das ligações C – O aparece no espectro em 1010 cm^{-1} . Os sinais em 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} são característicos das vibrações de estiramento das bandas amida I, amida II e amida III, e refere-se às vibrações de alongamento C=O, a vibrações de flexão N–H e alongamento C–N e às vibrações de alongamento C–C, C–N e flexão N–H, respectivamente (LI et al., 2019). A banda em torno de 2920 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento C–H (KHOLOUDEL-KADY et al., 2021). Finalmente, também ocorre uma banda entre 3600 e 3000 cm^{-1} , que pode ser atribuída às vibrações de estiramento dos grupos –OH e –NH (DEGÓRSKA et al., 2022). Os mesmos picos de grupos funcionais são observados no espectro da enzima livre (linha verde).

A comparação das análises dos espectros FTIR do OG (linha vermelha) e da lipase (linha azul) confirma a presença da enzima imobilizada no suporte (linha verde), sugerindo o sucesso no processo de imobilização.

5.8 Produção da membrana de acetato de celulose

As membranas de acetato de celulose (AC) foram produzidas no processo de inversão de fases em diferentes tempos de exposição em evaporação que antecede a imersão em banho, sendo M0 para 0 s de evaporação, M30 para 30 s, M60 para 60 s, com espessura de 0,7 mm e M1-30 para 30 s e espessura de 1 mm. As micrografias obtidas por MEV da superfície de topo e da seção transversal das membranas são apresentadas na Figura 16.

Figura 16. Imagens por MEV das diferentes membranas de AC produzidas: superfície (a) e seção transversal (b, c) da M0 membrana de 0,7 mm de espessura e 0 s de evaporação; superfície (d) e seção transversal (e, f) da M30 membrana de 0,7 mm de espessura e 30 s de evaporação; superfície (g) e seção transversal (h, i) da M60 membrana de 0,7 mm de espessura e 60 s de evaporação; superfície (j) e seção transversal (k, l) da M1-30 membrana de 1 mm de espessura e 30 s de evaporação.



As membranas podem ser produzidas pelo método de inversão de fases por uma das seguintes técnicas: Separação de fases induzida por evaporação (EIPS) e separação de fases induzida por não solvente (NIPS). No método mencionado ocorre um fluxo mássico difusivo, devido à diferença de potencial químico entre o solvente e o não solvente. Se inicia na região da superfície da membrana e é mantido por toda seção, porém, com intensidades diferentes. O fluxo na superfície é influenciado pelo tempo de

exposição antes da precipitação da solução polimérica. Esse tempo pode permitir que o solvente localizado na superfície evapore, de modo que ocorra uma maior concentração de polímero (FERNANDES et al., 2018). Tal tempo de exposição foi investigado. Foram produzidas 10 membranas empregando produções diferentes em tempo de exposição e espessura, das quais foram selecionadas 4 e que são discutidas a seguir.

Para a M0 (Figura 16a-c) produzida por NIPS, sendo submersa em 0 s, verifica-se a formação de uma membrana de superfície densa, contínua e sem poros aparentes. A imagem da seção transversal (Figura 16, c) evidencia a ausência de poros, exibindo um aspecto de membrana densa formada por camadas segmentares superpostas das cadeias poliméricas (FERREIRA et al., 2019), justificando sua classificação como membrana do tipo anisotrópica densa, não apresentando uma mesma morfologia ao longo de sua espessura e sem presença de poros, e ainda, integral, sendo densas integrais aquelas que possuem apenas um tipo de material em sua composição (SOUZA et al., 2021).

Para as membranas M30, M60 e M1-30, produzidas pela combinação de EIPS e NIPS, foram observadas superfícies contínuas, homogêneas e escassa formação de poros, como exibido na Figura 16d, g, j. Os mesmos aspectos são observados na M60, porém distinguido do fato de haver maior visualização de poros superficiais. Essa morfologia contínua se dá ao fato de o fluxo mássico na superfície influenciar a evaporação do solvente localizado no topo, advindo uma maior concentração do polímero (FERNANDES et al., 2018).

De forma diferente, a imersão imediata para a M0 leva à uma precipitação direta do polímero em função do contato com a solução de solvente e não solvente do banho de coagulação, onde ocorre a difusão do solvente do filme polimérico para o banho e do não solvente do banho para o filme polimérico, até a formação da estrutura da membrana, e ocasionando uma membrana mais densa (PAUL et al., 2016). Para a M30, M60 e M1-30, o processo de evaporação coloca o filme polimérico exposto ao ambiente e o solvente da solução é gradativamente evaporado enquanto a solubilidade do polímero diminui, separando a solução polimérica em uma fase rica em polímero e uma fase pobre em polímero, logo em seguida, a membrana é imersa no banho, aumentando o fluxo mássico, até que ocorra a precipitação do polímero, originando a estrutura mais porosa da membrana (ASAD et al., 2020).

Na membrana M1-30 (Figura 16k, l) observou-se características de uma membrana anisotrópica porosa, com uma faixa superficial mais densa e poros menores, seguida de uma estrutura de maior porosidade em seu interior. Descobriu-se que a

espessura da solução polimérica espalhada e, conseqüentemente, a quantidade da solução polimérica a ser solidificada influencia nas concentrações de polímero ao longo da seção, isso devido ao fato de o não solvente necessitar de maior tempo para percorrer através de uma fase polimérica espessa, alterando assim a estrutura morfológica porosa da membrana final (MORSI et al., 2023). Essa estrutura pode ter sido decisiva na seleção da membrana para uso na etapa de separação efetiva do óleo. Diferentemente, a M30 e M60 apresentaram uma morfologia porosa mais uniforme em toda seção transversal (Figura 16e, f, h, i), com estrutura homogênea e simétrica, caracterizando uma membrana isotrópica porosa, apresentando as mesmas características morfológicas ao longo de toda espessura. Em membranas porosas, as características como a porosidade superficial, distribuição e tamanho de poros, e a espessura são consideradas parâmetros morfológicos relevantes (TAN; RODRIGUES, 2019).

Na Tabela 4 é mostrado os aspectos gerais de cada membrana produzida, como espessura, tempo de evaporação, porosidade resultante, classificação, fluxo alcançado, pressão utilizada para o processo de validação na separação e observações da aplicação na hidrólise do óleo de soja.

Tabela 4. Aspectos gerais das membranas de AC produzidas

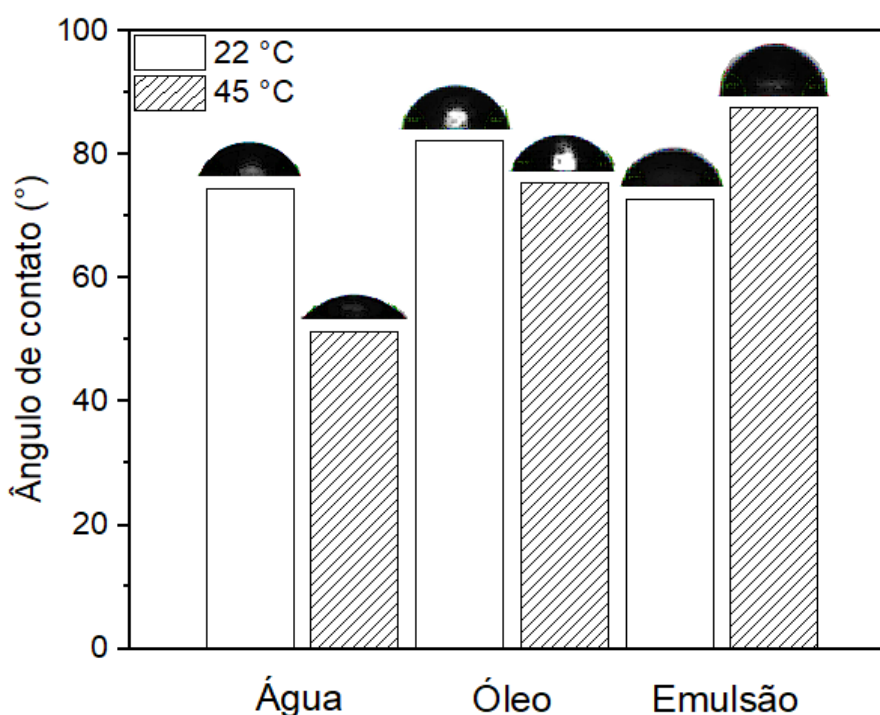
Membrana	M0	M30	M60	M1-30
Espessura (mm)	0,7	0,7	0,7	1
Evaporação (seg)	0	30	60	30
Classificação	Anisotrópica densa	Isotrópica porosa	Isotrópica porosa	Anisotrópica porosa
Fluxo (mL/cm ² .min)*	0	0,032	0,128	0,005
Pressão (psi)**	0, 60, 90	0	0	0, 60, 90
Observações	Não havia fluxo, mesmo com interferência de pressões mais altas.	Não realizava uma separação do óleo efetiva. Foi detectado uma porção de óleo no permeado.	Não realizava a separação do óleo. O meio reacional percorria para o permeado.	Realiza a separação efetiva do óleo, e mantendo o meio no reator.

* Fluxo do permeado em 60 psi e aproximadamente 25 °C. ** Pressão de avaliação para separação efetiva do óleo. Foi monitorada, variando entre 0, 60 e 90 psi, através do surgimento de gota e volume do permeado.

5.9 Ângulo de contato da membrana

A hidrofiliicidade da superfície é um parâmetro considerável que atua tanto na capacidade de permeação quanto de antiincrustante das membranas. Quanto mais baixo ângulo de contato, maior será a sua molhabilidade. A interação da água, do óleo de soja e da emulsão de água e óleo com a membrana de AC M1-30 desenvolvida foi avaliada em temperatura ambiente (22 °C) e na temperatura de reação (45 °C) usando ângulo de contato como medida da hidrofiliicidade/oleofobicidade da superfície. A Figura 17 mostra os ângulos de contato obtidos.

Figura 17. Ângulo de contato da membrana de AC frente à água, óleo e emulsão em 22 °C (completo) e 45 °C (listrado).



As medições do ângulo de contato com a água demonstraram um perfil hidrofílico, com ângulos de contato correspondendo à hidrofiliicidade natural do acetato de celulose (SHUJUAN et al., 2021). Possivelmente, esse perfil é devido às ligações de hidrogênio de ésteres de celulose com água através de grupos hidroxila. Membrana de acetato de

celulose com a água tem o menor ângulo de contato devido ao conteúdo de grupos acetil e hidroxila que aumenta sua hidrofiliidade (ABDELLAH ALI et al., 2020).

Polímeros naturais, celulose e os materiais baseados nela são hidrofílicos, portanto, podem ser usados no preparo de membranas de separação sem etapas adicionais de modificação, devido terem hidrofiliidade máxima e oleofobicidade, o que exclui (ou minimiza) a possível contaminação com componentes orgânicos de emulsões água-óleo (DMITRIEVA et al., 2022).

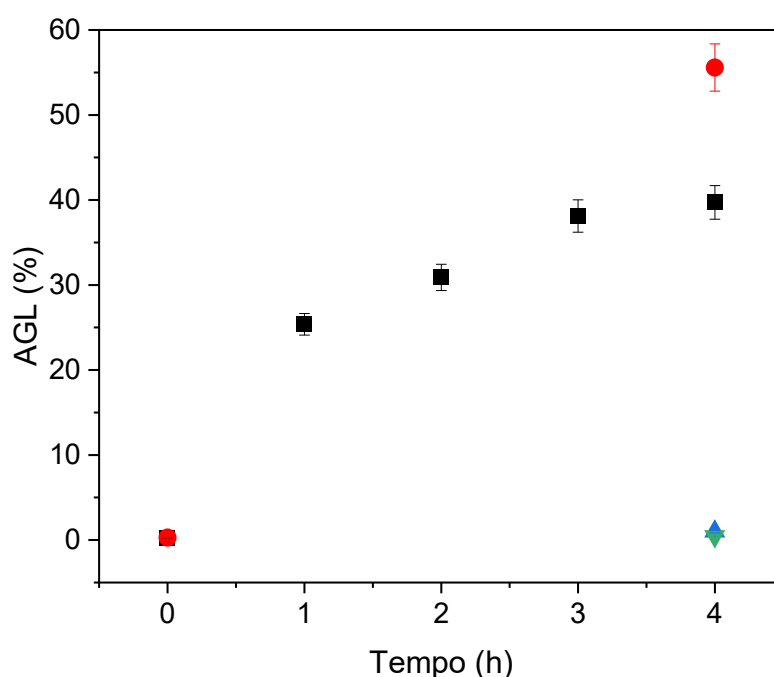
Os resultados apontam uma diminuição no ângulo de contato para água e óleo com incremento da temperatura, de 74,5° para 51,4 e de 82,3° para 75,5, respectivamente, aumentando a molhabilidade da membrana frente a esses componentes. De forma contrária, frente ao substrato, houve um aumento do ângulo de contato, de 72,7° para 87,7°, apontando uma molhabilidade superficial moderada. Tal comportamento pode estar relacionado a uma melhor emulsificação do óleo em água na temperatura elevada, dificultando a passagem do substrato. Entretanto, é notório a melhor molhabilidade por água, levando a propensão da membrana em separar tal componente no substrato.

5.10 Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando enzima livre em batelada e em biorreator de membrana com separação simultânea

Definida e caracterizada, a membrana produzida foi aplicada em reação de hidrólise enzimática, com a enzima livre, do óleo de soja residual, utilizando-a para separação de forma simultânea ao ocorrer da reação.

O produto da hidrólise e o permeado foram analisados pelo percentual de ácidos graxos livres (AGL), comparando-se a reação batelada sem a separação simultânea com o processo simultâneo (Figura 18). Ainda, foi investigado perfil cromatográfico das amostras, Figuras 19 e 20, averiguando qualitativamente e quantitativamente o produto e permeado através das análises em HPLC.

Figura 18. Percentual de AGL nas hidrólises do óleo de soja residual a 45 °C e pH 7 sem separação por membrana de AC (quadrado preto) e centrifugado (triângulo azul); com separação simultânea por membrana de AC (círculo vermelho) e permeado (triângulo verde).



A reação foi realizada nas condições otimizadas, 45°C e pH 7. O óleo de soja residual tinha percentual de $0,27\% \pm 0,01$ AGL inicial. Ao final da hidrólise, em 4 h, realizada em reator batelada obteve-se $39,72\% \pm 1,99$ de AGL e o centrifugado de $0,53\% \pm 0,15$, enquanto o processo em biorreator de membrana com separação simultânea, $55,58\% \pm 2,78$ e o permeado $0,42\% \pm 0,12$. Dessa forma, pode-se dizer que a hidrólise com separação simultânea foi mais eficiente.

Além disso, existe um grande desafio na indústria para separação de produtos, devido ao alto custo do processo. Esse impasse apresenta a importância da combinação do processo com a tecnologia de separação, alcançando melhores resultados em uma produção mais facilitada e econômica (MOHAMMAD et al., 2023). O resultado obtido nesse estudo é superior ao apresentado por Porcel et al. (2023), aproximadamente 22-28 % de AGL em 3 h, da hidrólise do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme® TL IM. Diferente do resultado encontrado por Huang et al. (2023), que alcançou um rendimento de ácidos graxos livres de 80,63 % após 12h utilizando lipase *Y. lipolytica*. Porém, nesse caso foi usado um caldo de fermentação da lipase, além do maior tempo de reação comparado ao do presente estudo, o que pode ter favorecido o maior rendimento alcançado.

Esta análise foi correlacionada com a análise em HPLC das mesmas amostras. A qualificação e quantificação dos glicerídeos é demonstrada nos cromatogramas (Figura 19 e 20) exibindo os grupos de MAG, DAG ou TAG presentes, e o teor e concentrações, nas Tabelas 5 e 6.

Figura 19. Cromatograma dos MAG, AGL, DAG e TAG presentes no produto (diluído em 2000x) da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea.

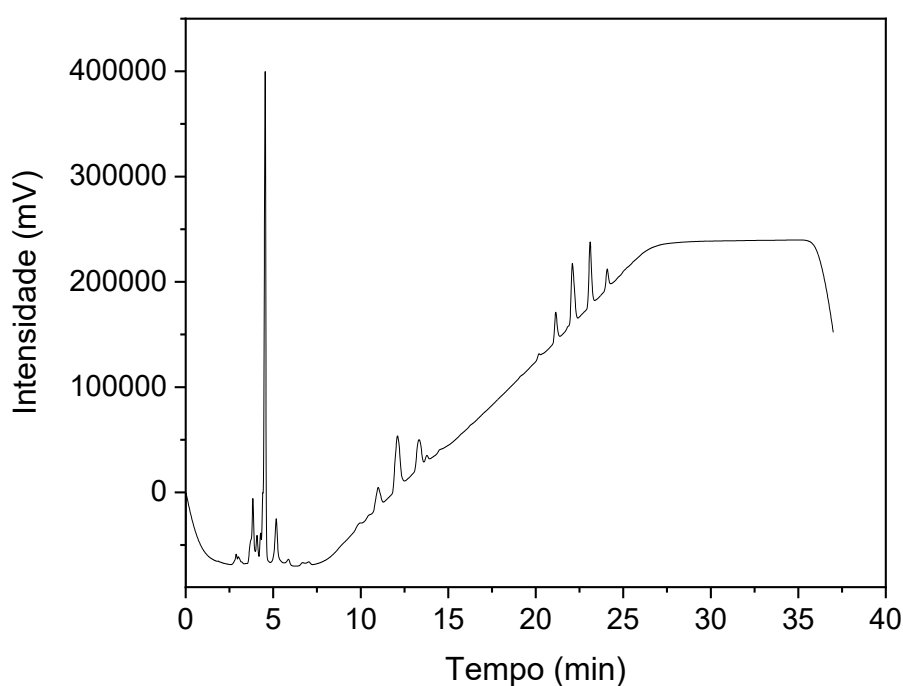


Figura 20. Cromatograma dos MAG, AGL, DAG e TAG presentes no permeado da hidrólise enzimática do óleo de soja residual com separação simultânea.

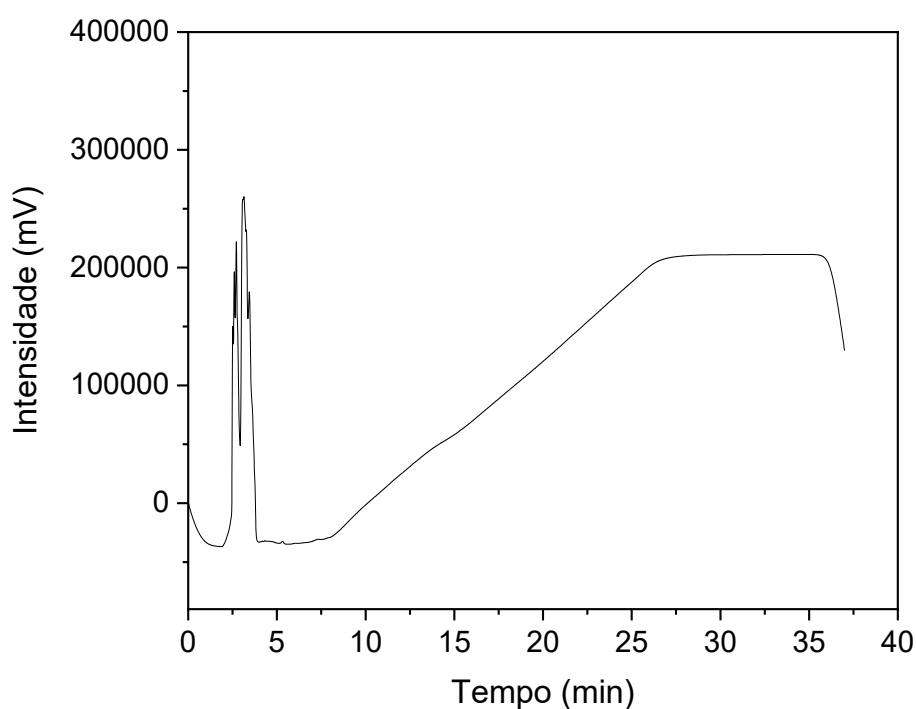


Tabela 5. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, AGL, DAG e TAG no produto

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	$57,95 \pm 2,89$	$4,2263 \pm 0,2113$
DAG	$22,15 \pm 0,88$	$0,8079 \pm 0,0403$
TAG	$19,90 \pm 0,98$	$1,4516 \pm 0,0726$

Tabela 6. Conteúdo percentual e concentração do grupo MAG, AGL no permeado

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	100 ± 0	$0,0059 \pm 0,0002$

A quantificação do teor de cada componente (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos) foi feita calculando a composição porcentual relativa para cada grupo, assumindo tal como equivalente à razão mássica entre o grupo e a amostra total.

Cada grupo tem um intervalo de tempo de retenção específico, baseado nos cromatogramas obtidos dos padrões e literatura. Os MAGs foram identificados entre 2 e 9 min, os DAGs entre 10 e 17 min e os TAGs entre 18 e 25 min (ZENEVICZ et al., 2016).

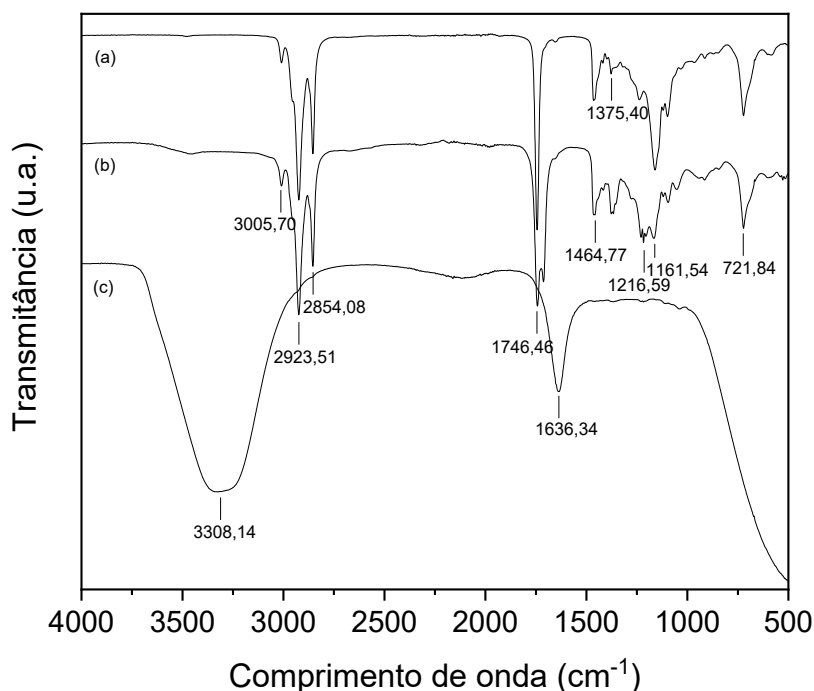
Na Figura 19 são constados os três grupos de glicerídeos, resultado esse que corrobora com a quantificação apresentada na Tabela 5. O triacilglicerol (TAG) é inicialmente hidrolisado em diacilglicerol (DAG) e uma molécula de ácido graxo. Em seguida, o DAG é subdividido em monoacilglicerol (MAG) e um segundo ácido graxo. Por fim, o MAG é convertido em glicerol e um terceiro ácido graxo (KULMINSKAYA et al., 2021). De acordo com Shen et al. (2021), o óleo de soja é composto em mais de 95% TAG. Após a hidrólise (Tabela 5), o percentual encontrado no produto foi de $19,90\% \pm 0,98$, sendo majoritariamente composto por MAG ($57,95\% \pm 2,89$).

O permeado aquoso (Figura 20), oriundo da separação, foi identificado composto apenas de MAG (Tabela 6), ainda em concentrações ínfimas de $0,0059 \pm 0,0002$ g/mL, pouco importante, apontando a eficiência da separação. Assim, levando a um rendimento de rejeição do óleo, R, na membrana de 100%, baseado na relação entre as concentrações encontradas no produto e permeado. Especificadamente, o processo obteve 100% de rejeição para TAG e DAG e 99,9% para MAG. Resultados semelhantes foram observados por Guzman et al. (2020) com eficiências de separação de 95–99% para as membranas de matriz mista de acetato de celulose com nanopartículas zwitteriônicas - metacrilato de polidopamina-sulfobetaina produzidas.

5.11 FTIR do óleo de soja residual, do produto da hidrólise enzimática utilizando enzima livre em biorreator de membrana e do permeado

Para uma análise qualitativa, o óleo de soja residual, os produtos hidrolisados a partir da hidrólise de óleo de soja de cozinha residual e o permeado do processo de separação em biorreator de membrana de AC foram analisados por FTIR-ATR para caracterizar os grupos funcionais associados, fornecendo informações químicas de cada amostra, o que estão demonstrados a seguir pela Figura 21.

Figura 21. FTIR do óleo de soja residual (a), do produto da hidrólise (b) e do permeado na membrana de AC (c).



A partir da análise da Figura 21, que apresenta os espectros de FTIR do óleo (a) e do produto (b), podem ser observadas bandas semelhantes relacionadas ao C–H alongamento de longas cadeias de carbono, CH₃ e CH₂ aparecem em 2854,08 cm⁻¹ e 2923,51 cm⁻¹, respectivamente, e é também observado em 3005,70 cm⁻¹ o alongamento =C–H (ATTIA et al., 2020). Na faixa de 1300 a 1400 cm⁻¹, é possível diferenciar ambos os espectros, uma vez que as bandas estão relacionadas aos grupos glicérol O–CH₂ (mono, di e triglicerídeos), observado nos espectros do óleo de soja em 1375,40 cm⁻¹, de acordo com a literatura (ROSSET et al., 2019; RABELO et al., 2015). Os picos observados na região de 1800 a 1700 cm⁻¹ em ambos os espectros (1746,46 cm⁻¹) estão associados à vibração de estiramento dos grupos carbonila (C=O). Na faixa de 1300 a 800 cm⁻¹ é observada uma distinção entre as amostras, diretamente relacionadas ao alongamento da ligação C–O dos ésteres. Detalhadamente, entre 1240 e 1130, pode ser verificada uma segregação do pico em 1161,54 cm⁻¹ nos espectros do óleo de soja, em duas bandas nos comprimentos de onda de 1161,54 e 1216,59 cm⁻¹ nos espectros do produto, sendo esse segundo pico (1216,59 cm⁻¹) relacionado ao alongamento do grupo metil (O–CH₃), típico do FAME. Ainda, o sinal em 1464,77 cm⁻¹ no espectro caracteriza a deformação angular do CH₃ do éster metílico (ROSSET et al., 2019). Além disso, a banda em 721,84 cm⁻¹ é devida ao estiramento do carbono olefínico (ATTIA et al., 2020).

O espectro FTIR do permeado (Fig. 21c) mostrou uma larga banda na faixa de 3300–3500 cm⁻¹, centrado em 3308,14 cm⁻¹ que, corresponde a vibração de estiramento dos grupos hidroxila (-OH), remanescentes da reação de hidrólise. Este alargamento indica uma grande expansão do grupo OH associado à ligação de hidrogénio (SARFAT et al., 2022). Além disso, a banda do grupo alcoólico (-OH) do glicerol na faixa de 3300–3400 cm⁻¹ se fundiu com a banda do grupo hidroxila (AQSA et al., 2023) O pico forte centrado em 1636,34 cm⁻¹ é atribuído ao modo de estiramento H–O–H, característico da flexão H₂O (ALMUSLEM et al., 2023). A ausência de demais picos confirma a limpidez do permeado decorrente da separação simultânea eficiente pela membrana produzida.

5.12 Parâmetros reacionais otimizados para reação de hidrólise enzimática utilizando enzima imobilizada em OG em processo batelada

Na expectativa de potencializar a reação de hidrólise enzimática do óleo de soja residual, as condições reacionais foram estudadas variando-se a razão mássica entre água/óleo, a temperatura e o pH. A Tabela 7 apresenta o resultado encontrado.

Tabela 7. Parâmetros reacionais otimizados de razão molar, temperatura e pH para hidrólise enzimática do óleo de soja residual

Variável	Condição	AGL (%)
Razão Mássica água/óleo	1:1	35,55 ± 0,19
	1:2	33,77 ± 0,24
	1:4	29,74 ± 0,03
Temperatura	35 °C	30,74 ± 0,23
	45 °C	34,95 ± 0,07
	55 °C	38,94 ± 0,16
	65 °C	27,35 ± 0,12
pH	5	33,37 ± 0,08
	7	34,17 ± 0,14
	9	29,74 ± 0,03

AGL: ácidos graxos livres.

Os resultados obtidos evidenciam a existência de inibição por substrato no caso do óleo de soja, notadamente quando a fração mássica ultrapassa o limiar de 50%.

Portanto, para assegurar uma reação isenta desse efeito inibitório, as investigações indicam que a fração mássica deve ser mantida abaixo de 50%.

A hidrólise enzimática do óleo de soja se inicia com a adsorção da lipase na interface água/óleo. Subsequentemente, a enzima forma um complexo com a molécula do substrato (TAG), originando o complexo enzima/substrato de óleo. Uma sequência de reações se desencadeia, culminando na formação de produtos solúveis (AGL e GL) que podem se difundir na camada aquosa. A presença de um excesso de água no sistema pode favorecer uma mudança na reação, direcionando-a para a formação dos produtos desejados, otimizando, assim, o rendimento da hidrólise. Assim, é importante ressaltar que um excesso de água, além da estequiometria (1:3), é conhecido por deslocar o equilíbrio da reação para a formação do produto (PORCEL et al., 2023). No entanto, acima de um certo limite, problemas de transferência de massa podem surgir devido à miscibilidade mútua muito baixa do sistema binário água-óleo (ZENEVICZ et al., 2016).

Em condições de mistura constante, o tamanho médio das gotas de óleo e a concentração de óleo exercem impacto direto na área de contato da interface, que neste sistema representa a concentração do substrato. Todavia, acima de uma concentração crítica de óleo, os efeitos interfaciais e as resistências à transferência de massa resultam em uma diminuição nas taxas de reação aparentes, conforme evidenciado nos experimentos conduzidos neste estudo (CORRADINI et al., 2019).

Dada a sua influência nas reações bioquímicas, o efeito da temperatura de reação também foi investigado no intervalo de 35 a 65 °C. É imperativo observar que o rendimento da reação mantém uma relação proporcional com a temperatura envolvida. Em temperaturas mais baixas, manifesta-se uma atividade enzimática mais lenta, enquanto, à medida que a temperatura é elevada, ocorre um aumento na taxa de reação. No entanto, é essencial reconhecer que as enzimas são sensíveis à variação de temperatura e podem ser prontamente desativadas em temperaturas elevadas (RAHIMI et al., 2014).

Este fenômeno destaca a importância de se otimizar a temperatura para garantir a eficácia e a estabilidade das enzimas em processos catalíticos. Na Tabela 7 é elucidado que a porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) é crescente. Isso ocorre pois à medida que a temperatura da reação é elevada, a probabilidade de colisão entre as moléculas da enzima e do substrato aumenta, facilitando a formação de complexos enzima-substrato e, por conseguinte, promovendo um incremento no rendimento da reação. Submetendo a reação a uma temperatura extrema de 65 °C em um teste adicional, observou-se que a diminuição no rendimento provavelmente resultava da desnaturação, ou seja, da alteração

na estrutura proteica. Esse fenômeno decorre da destruição induzida pelo calor das interações não covalentes, incluindo a quebra de íons fracos e ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura tridimensional da enzima (PATCHIMPET et al., 2020).

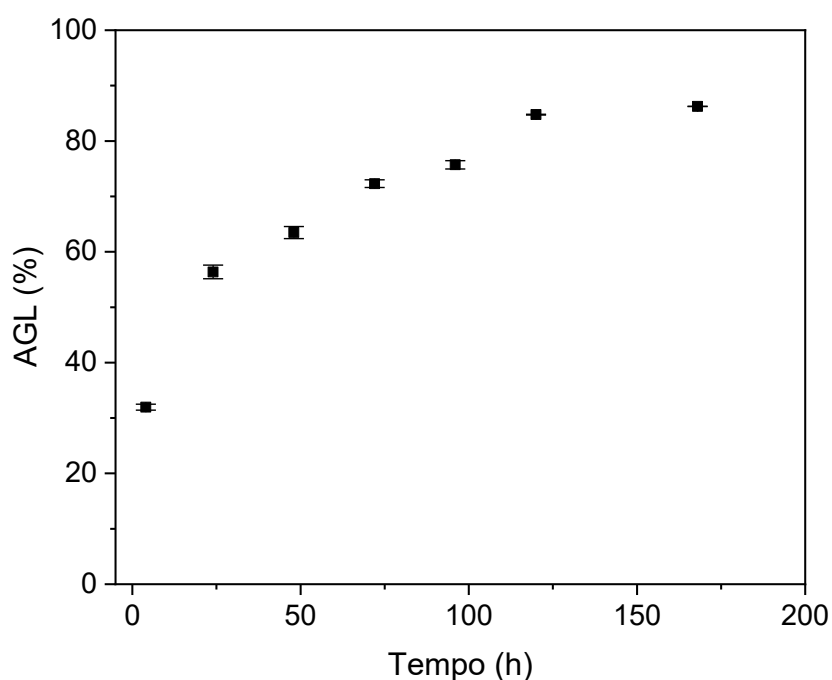
Notavelmente, uma temperatura de 55 °C emergiu como a mais propícia. Assim, os demais experimentos foram conduzidos nessa temperatura, considerada como ideal para maximizar o rendimento da reação.

Os resíduos de aminoácidos localizados na tampa e no centro catalítico da lipase contribuem para a estabilidade da lipase e podem ser especialmente afetado pelo pH. Além disso, as ligações iônicas que ajudam a manter a rigidez da estrutura tridimensional da enzima podem mudar em vários ambientes, causando desnaturação enzimática ou perda de atividade enzimática em condições inadequadas de pH (ZHANG et al., 2017). Esta lipase se assemelha a outras, que normalmente exibem alta estabilidade de pH e adaptabilidade (NURUL FURQAN et al., 2023). Após reação de 4 h, a lipase exibiu maior índice de AGL em valores de pH 7. Além disso, a adaptabilidade em pH menor desta lipase também foi observada.

5.13 Hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual utilizando enzima imobilizada em OG em batelada

Nesta seção, a reação de hidrólise foi levada em tempo extra no intuito de explorar a máxima conversão. A Figura 22 apresenta o perfil da reação de hidrólise do óleo de soja residual à 55 °C durante 168 h.

Figura 22. Cinética da reação de hidrólise do óleo de soja residual a 55 °C durante 168 h. Condições operacionais: 1:1 óleo/água, 55°C, pH 7, 0,5% da massa de água de enzima imobilizada em OG, 168h.



É evidenciada uma notável conversão nas primeiras 24 horas, atingindo aproximadamente 60%. Posteriormente, a taxa de reação apresenta um decréscimo gradual, aproximando-se da fase de equilíbrio em 120 horas, mantendo sua conversão constante até o término da reação em 168 horas.

Na Figura 22 é apresentada a cinética de hidrólise do óleo de soja utilizando a lipase imobilizada em OG, em termos do índice de acidez e tempo de reação. Em suma, podem ser observadas três regiões na conversão. Na primeira (0 – 24 horas) há um aumento rápido do índice de acidez (1 → 60%) no óleo de soja. Na segunda região (24 – 120 horas) observa-se uma redução da taxa de reação (diminuição da inclinação considerando a projeção de uma reta sobre os pontos), onde o índice de acidez mantém uma crescente menos expressiva e constante por volta de 7% a cada ponto (60 → 85%), aproximadamente. Finalmente, na terceira região (120 – 168 horas), decorre que a reação tende a atingir a condição de equilíbrio, alcançando 86,25% no índice de acidez final. Esta condição de equilíbrio pode ser observada pela elevação de apenas 1,5% no índice de acidez entre os tempos de 120 e 168 horas (84,76→86,25%). Chen e colaboradores (2020) também reportaram que a curva cinética pode ser dividida em três segmentos, observada na transesterificação de óleos vegetais com metanol catalisada heterogeneamente usando um catalisador de CaO, os quais são detalhados como um

segmento inicial controlado por transferência de massa (lento), um segmento quimicamente controlado (rápido) e um segmento final próximo do equilíbrio (lento), onde uma curva cinética sigmóide é geralmente observada.

A reação culminou em uma hidrólise praticamente completa, conforme evidenciado no cromatograma do produto (Figura 23) e corroborado pela quantificação dos componentes (Tabela 8), onde mais de 98% em monoacilgliceróis (MAG) foram identificados.

Figura 23. Cromatograma do produto (diluído a 2.000x) da hidrólise enzimática longa do óleo de soja residual.

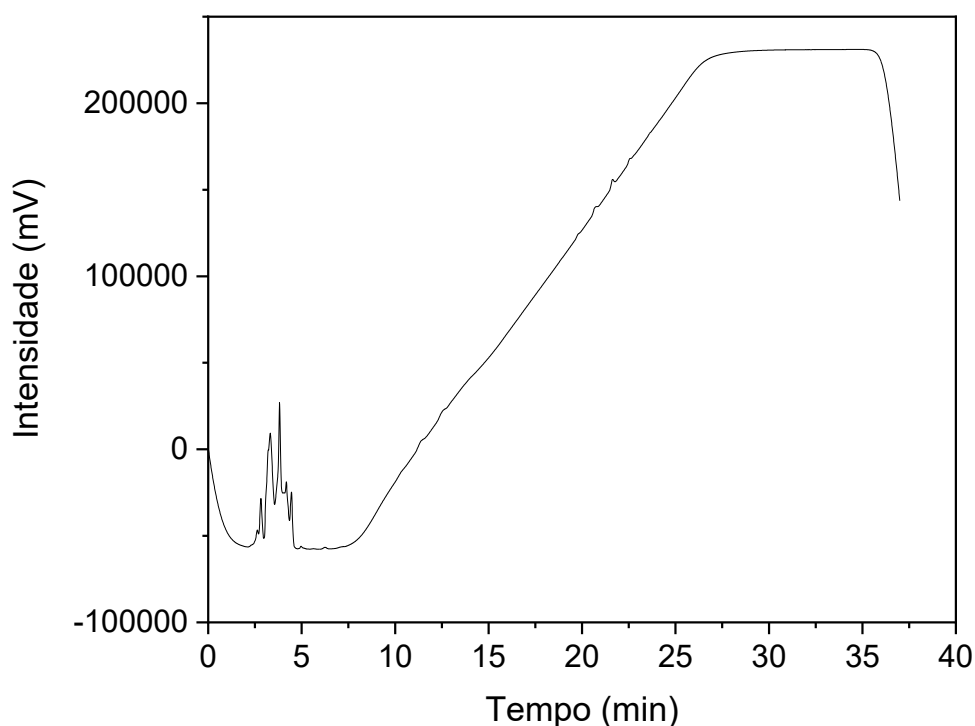


Tabela 8. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, DAG e TAG no produto.

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	98,31 ± 0,29	3,1572 ± 0,0936
TAG	1,69 ± 0,12	0,0544 ± 0,0341

Adicionalmente, ao final da reação, a atividade da enzima imobilizada foi mensurada, resultando em $81,62\% \pm 2,07$ de atividade residual, validando a excelente estabilidade do biocatalisador imobilizado, visto a alta atividade hidrolítica preservada, e demonstrando sua ótima reusabilidade no processo. Resultado superior ao encontrado por Kuang et al. (2023) na reação de hidrólise do óleo de soja durante 120 min catalisada por lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em uma estrutura metal-orgânica, em que o biocatalisador manteve 52% da sua atividade original.

5.14 Hidrólise enzimática do óleo de soja residual utilizando lipase imobilizada em OG em batelada e em biorreator de membrana com separação simultânea

Nesta fase, procedeu-se à análise do produto resultante da hidrólise e do permeado quanto ao teor percentual de ácidos graxos livres (AGL), estabelecendo comparações entre a reação em batelada e o processo em biorreator de membrana com separação simultânea. O óleo de soja residual, inicialmente apresentando um percentual de $0,2713\% \pm 0,0140$ de AGL, foi submetido a uma hidrólise de 4 horas em um reator batelada à 55°C . Ao término deste processo, foram obtidos $38,94\% \pm 0,1604$ de AGL no produto e $0,67\% \pm 0,08$ no centrifugado. Em contraste, o processo em biorreator de membrana com separação simultânea resultou em $35,67\% \pm 1,02$ de ácidos graxos livres e $0,82\% \pm 0,05$ no permeado. Conclui-se, portanto, a eficiência da hidrólise com separação simultânea, representando uma abordagem promissora para otimizar o processo, diminuindo operações e custos.

Além disso, os perfis cromatográficos das amostras foram minuciosamente investigados, sendo avaliados qualitativa e quantitativamente por meio de análise via HPLC (Figura 24).

A quantificação do teor de cada componente (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos) foi realizada mediante o cálculo da composição percentual relativa de cada grupo, adotando-se a premissa de que essa relação seja equivalente à razão de massa entre o grupo específico e a amostra total, de acordo com a Equação 21.

Cada grupo apresenta um intervalo de tempo de retenção distinto, determinado com base nos cromatogramas obtidos a partir de padrões e também referências presentes na literatura. Os monoglicerídeos (MAGs) foram identificados no intervalo de 2 a 9 minutos, os diglicerídeos (DAGs) entre 10 e 17 minutos, e os triglicerídeos (TAGs) entre 18 e 25 minutos (ZENEVICZ et al., 2016).

O óleo de soja residual utilizado era composto de $80,06\% \pm 0,14$ TAG e $19,94\% \pm 0,22$ MAG, como demonstrado na Tabela 9. Após a reação, o produto apresentou $21,38\% \pm 0,08$ em TAG, aumentando a composição em MAG para $50,98\% \pm 0,57$ (Tabela 10). Isso devido ao triacilglicerol (TAG) sofrer inicialmente hidrólise, resultando em diacilglicerol (DAG) e uma molécula de ácido graxo. O DAG, por sua vez, é decomposto em monoacilglicerol (MAG) e um segundo ácido graxo. Por fim, o MAG é convertido em glicerol e um terceiro ácido graxo, completando o ciclo de hidrólise dos triglicerídeos (KULMINSKAYA et al., 2021). Além disso, o permeado é identificado apenas de MAG em concentração bastante moderada, $0,2077 \pm 0,0016$ (Tabela 11).

Figura 24. Cromatograma de MAG, DAG e TAG presentes no óleo de soja residual (diluído a 2.000x) (laranja), no produto (diluído a 2.000x) (preto) e no permeado (diluído a 500x) (azul) da hidrólise enzimática utilizando lipase imobilizada em OG em biorreator de membrana com separação simultânea.

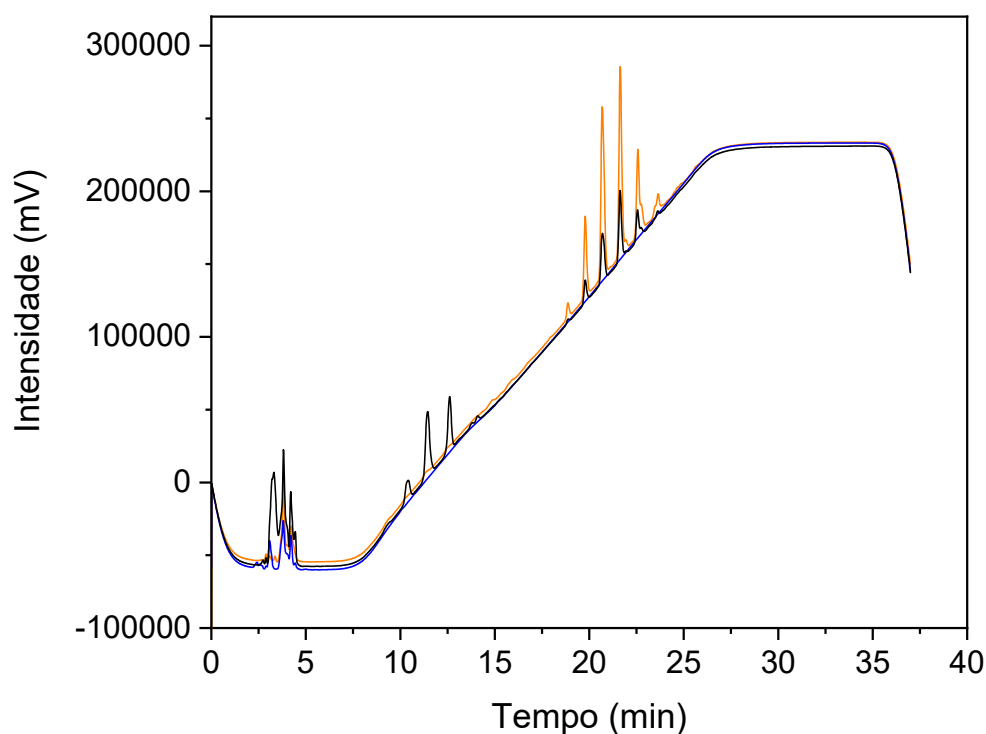


Tabela 9. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG e TAG no óleo de soja residual

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	19,94 ± 0,22	0,8769 ± 0,0763
TAG	80,06 ± 0,14	3,5211 ± 0,1154

Tabela 10. Conteúdo percentual e concentração dos grupos MAG, DAG e TAG no produto

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	50,98 ± 0,57	2,5863 ± 0,1861
DAG	27,64 ± 0,45	0,7009 ± 0,0115
TAG	21,38 ± 0,08	1,0847 ± 0,1287

Tabela 11. Conteúdo percentual e concentração de MAG no permeado

Grupo	Percentual (%)	C (g/mL)
MAG	100 ± 0	0,2077 ± 0,0016

Entretanto, a maior vantagem do processo proposto nesta pesquisa é a separação simultânea à reação. Na indústria, um desafio significativo é enfrentado no que tange à separação de produtos, frequentemente exacerbado pelos custos elevados associados ao processo (MOHAMMAD et al., 2023). Esta problemática ressalta a importância de integrar técnicas avançadas de separação ao processo industrial, buscando aprimorar os resultados e eficiência da produção de maneira mais acessível.

Dessa forma, com base na razão entre as concentrações encontradas no produto e no permeado, o processo alcança 100% de rejeição, R, para TAG e DAG e 99,9% para MAG.

Os resultados obtidos no presente estudo apresentaram rendimentos próximos comparado ao estudo de Freitas et al. (2007) e Chew et al. (2008) (Tabela 12), em que a hidrólise enzimática de óleo vegetais usando lipase de diferentes fontes foram avaliadas. Por outro lado, pode-se observar na Tabela 12 que os valores de rendimento de AGL foram inferiores aos relatados por Porcel et al. (2023). Vale ressaltar que o tempo de reação foi expressivamente mais longo (24h) em comparação com o utilizado no presente estudo (4h), entretanto, para esse tempo pode-se observar, quando na reação longa deste estudo, rendimento próximo dos 60% de AGL. Contudo, neste último caso, os autores utilizam uma lipase comercial em estado livre, o que pode ter favorecido a reação devido a ausência de suporte enzimático, entretanto, não sendo passível de reuso.

Tabela 12. Rendimentos de AGL em hidrólises de óleos vegetais e enzimas

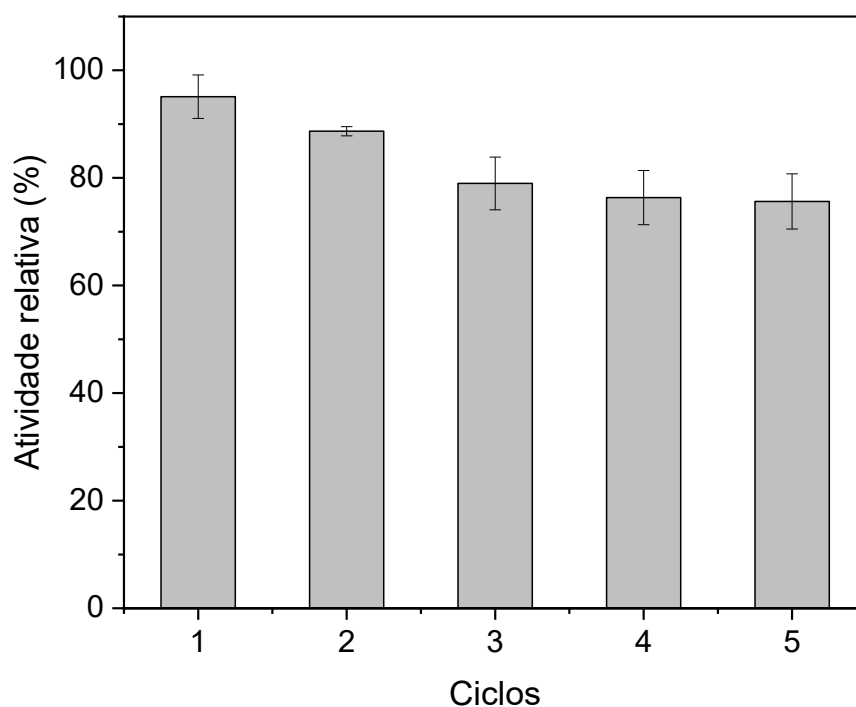
Óleo substrato	Catalisador	Condições Operacionais	Rendimento (%)	Referência
Óleo de soja	Lipozyme® TL IM	T= 52 °C, Ma/Mo= 46:1, me/mo= 1% (m/m), rpm= 250, t= 24h	76	Porcel (2023)
Óleo de palma	Lipozyme® TL IM	T= 55 °C, Ma/Mo= 4:1, me/mo= 3.5% (m/m), rpm = 200, t= 6h	28	Chew (2008)
Óleo de soja	<i>Thermomyces lanuginose</i>	T= 40 °C, Ma/Mo= 4:1, me/mo= 1% (m/v), rpm= 200, t= 4h	30	Freitas (2007)
Óleo de soja	<i>Pichia pastoris</i>	T= 45 °C, Ma/Mo= 50:1, me/ma= 0,5% (m/m), rpm= 200, t= 4h	39,72	Pesquisa presente
Óleo de soja	<i>Pichia pastoris</i>	T= 45 °C, Ma/Mo= 50:1, me/ma= 0,5% (m/m), rpm= 200, t= 4h Biorreator de membrana	55,58	Pesquisa presente
Óleo de soja	<i>Pichia pastoris</i> + OG	T= 55 °C, Ma/Mo= 50:1, me/ma= 0,5% (m/m), rpm= 200, t= 4h	38,94	Pesquisa presente
Óleo de soja	<i>Pichia pastoris</i> + OG	T= 55 °C, Ma/Mo= 50:1, me/ma= 0,5% (m/m), rpm= 200, t= 4h, Biorreator de membrana	35,67	Pesquisa presente
Óleo de soja	<i>Pichia pastoris</i> + OG	T= 55 °C, Ma/Mo= 50:1, me/ma= 0,5% (m/m), rpm= 200, t= 168h	86,25	Pesquisa presente

T: temperatura; Ma/Mo: relação molar água/óleo; me/mo: relação massa enzima/óleo; me/ma: relação massa enzima/água; rpm: rotação por minutos; t: tempo.

5.15 Reuso do biocatalisador imobilizado

Foram realizados testes de reutilização da lipase imobilizada em OG. A Figura 25 mostra as perspectivas de reuso do biocatalisador.

Figura 25. Atividade relativa da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em GO após reuso em 5 ciclos. Condições operacionais: 1:1 óleo/água, 55°C, pH 7, 0,5% da massa de água de enzima imobilizada em OG, 4h.



O princípio fundamental subjacente à utilização de lipases imobilizadas reside na viabilização da recuperação prática dessas enzimas, ao mesmo tempo em que se capitaliza sobre suas vantagens ecoeficientes em comparação aos catalisadores químicos (QUAYSON et al., 2020). Esse conceito expandiu a pesquisa sobre a imobilização desse biocatalisador com mais de 3500 trabalhos científicos na última década (buscado em Web of Science em 19 de Janeiro de 2024 usando os termos “*immobilization lipase*”). Nesse estudo, o complexo imobilizado reteve $75,62 \pm 5,14$ % da atividade enzimática inicial ao final de 5 ciclos de 4 horas (Figura 25), indicando que a lipase imobilizada possui alta reusabilidade. O declínio na atividade relativa do catalisador é multifatorial e pode ser explicado por mudanças conformacionais, acessibilidade ao substrato, efeitos de inibição e degradação do suporte. Durante os ciclos de reutilização, as condições de reação (como pH, temperatura e presença de substratos e produtos) podem induzir alterações conformacionais na enzima. Estas modificações podem resultar na desativação ou perda de afinidade pelo substrato, o que compromete a atividade catalítica. Com o passar dos

ciclos, a enzima pode sofrer uma alteração na sua orientação ou no ambiente em que está imobilizada, levando a um efeito de difusão que limita a interação com o substrato. Outro fator relevante é a possível inativação enzimática causada pela presença de inibidores ou produtos acumulados durante a reação, o que também pode impactar na lixiviação da enzima no processo de lavagem. Além disso, a degradação física do suporte de imobilização pode ocorrer ao longo do tempo, a enzima pode ser liberada ou o material pode deteriorar-se, impactando a estabilidade do sistema como um todo [37, 38].

Fan et al., (2023) descrevem que pós 5 ciclos, a atividade de hidrólise da lipase de *Candida rugosa* (CRL) imobilizada em magnetita revestida de sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ magnético) permaneceu em 55%.

6 CONCLUSÃO

O óxido de grafeno foi reconhecido como competente suporte na imobilização da lipase de *Pichia pastoris*. Foram investigados a otimização do carregamento enzimático com melhor resultado para 10 mg/mL e condições ótimas de temperatura e pH para a atividade enzimática em 45 °C e 7 para enzima livre e em 55 °C e 7 para enzima imobilizada com tempo de imobilização em 2h. A avaliação da estabilidade térmica da enzima demonstra o ganho em estabilidade após o processo de imobilização, assim como na determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desativação. As morfologias analisadas em MEV e FTIR da enzima comprovam a adsorção do biocatalisador ao suporte. Foi determinada as características das membranas de acetato de celulose e validada sua alta eficiência de separação na emulsão de óleo-água. A membrana M1-30 foi selecionada e sua morfologia e o ângulo de contato analisados. Para o processo utilizando a enzima livre, na hidrólise do óleo de soja residual em batelada alcançou-se $39,72\% \pm 1,99$, aplicada na hidrólise enzimática em biorreator de membrana no processo simultâneo obteve-se melhor resultado, com $55,58\% \pm 2,78$ de AGL, e 100% de rendimento de rejeição do óleo na membrana. Por fim, na aplicação do biocatalisador imobilizado, na hidrólise em biorreator de membrana com a separação simultânea, foi alcançado $35,67\% \pm 1,02$ de ácidos graxos livres e $0,82\% \pm 0,05$ no permeado, também com 100% de rejeição para óleo. Pós 5 ciclos, a atividade de hidrólise da lipase imobilizada permaneceu em $75,62\% \pm 5,14$. Os resultados encontrados destacam a viabilidade de utilizar o óxido de grafeno como suporte, e, ainda, legitima a separação por membrana de AC de forma simultânea como uma estratégia promissora para otimizar sua eficácia e aplicabilidade em processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDELLAH ALI, S. F., WILLIAM, L. A., FADL, E. A. Cellulose acetate, cellulose acetate propionate and cellulose acetate butyrate membranes for water desalination applications. **Cellulose**, 27(16), 9525–9543, 2020. DOI:10.1007/s10570-020-03434-w
- ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Capacidade de processamento de oleaginosas no Brasil cresce para mais de 69 milhões de toneladas em 2023. Disponível em: <https://abiove.org.br/publicacoes/capacidade-de-processamento-de-oleaginosas-no-brasil-cresce-para-mais-de-69-milhoes-de-toneladas-em-2023/>. Acesso em: 06 março 2024.
- ALMUSLEM, A. S., ALNAIM, N., IBRAHIM, S. S., IBRAHIM, M. A. Green Synthesis and Characteristics of Cellulose Nanocrystal/Poly Acrylic Acid Nanocomposite Thin Film for Organic Dye Adsorption during Water Treatment. **Polymers**, 15 (9), 2154, 2023. DOI:10.3390/polym15092154
- AMARAL, H., CIPRIANO D., SANTOS, M., SCHETTINO, M., FERRETI, J., MEIRELLES, C., PEREIRA, V., CUNHA, A., EMMERICH, F., FREITAS, J., Production of high-purity cellulose, cellulose acetate and cellulose-silica composite from babassu coconut shells. **Carbohydrate Polymers**, 210, 127-134, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.061
- AMIN, M., BHATTI, H. N., BILAL, M., Kinetic and thermodynamic characterization of lipase from *Aspergillus melleus* and its biocatalytic performance for degradation of poly(ϵ -caprolactone). **J Chem Technol Biotechnol**, 97, 446-454, 2022. <https://doi.org/10.1002/jctb.6649>
- ANG M., DEVANADERA K., DUENA A., LUO Z., CHIAO Y., MILLARE J., AQUINO R., HUANG S., LEE K., Modifying Cellulose Acetate Mixed-Matrix Membranes for Improved Oil-Water Separation: Comparison between Sodium and Organo Montmorillonite as Particle Additives. **Membranes**, 11(2), 80, 2021. <https://doi.org/10.3390/membranes11020080>.

AOCS. – American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. Champaign:AOCS, 1998.

AQSA, A., MUSAMMIR, K. Starch/Pectin as Emerging Renewable Materials for Fabrication of Sustainable Bioplastics for Food Packaging Applications. **Research Square**, 1-17, 2023. DOI:10.21203/rs.3.rs-3160443/v1

ASAD, A., SAMEOTO, D., SADRZADEH, M. Chapter 1 - Overview of membrane technology, Editor(s): Mohtada Sadrzadeh, Toraj Mohammadi, In Micro and Nano Technologies, Nanocomposite Membranes for Water and Gas Separation. **Elsevier**, 1-28, 2020. DOI:10.1016/B978-0-12-816710-6.00001-8

ATTIA, N. K., EL-MEKKAWI, S. A., ELARDY, O. A., ABDELKADER, E. A. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, 271, 117578, 2020. DOI:10.1016/j.fuel.2020.117578.

ALVES, D. C. D. S., HEALY, B., YU, T., BRESLIN, C. B. Graphene-Based Materials Immobilized within Chitosan: Applications as Adsorbents for the Removal of Aquatic Pollutants. **Materials**, 14(13):3655, 2021. <https://doi.org/10.3390/ma14133655>

AWOGBEMI, O., KALLON, D. V. V., AIGBODION, V. S., PANDA, S. Advances in biotechnological applications of waste cooking oil. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, 4, 100158, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100158>

BADOEI-DALFARDA., KARAMI, A. T. Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate. **Colóides e Superfícies B: Biointerfaces**, 209, 2, 112151, 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112151

BASSO A; SERBAN S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, 479, 110607, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

BEZERRA, M. A. S. Desenvolvimento de Um Destilador Solar Para Tratamento de Águas de Produção de Petróleo Com Vistas a Sua Utilização Na Agricultura e Geração de Vapor. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

BILAL, M., RASHID, E. U., ZDARTA, J., JESIONOWSKI, T. Graphene-based nanoarchitectures as ideal supporting materials to develop multifunctional nanobiocatalytic systems for strengthening the biotechnology industry. **Chemical Engineering Journal**, 452, 3, 139509, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139509>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, 248–254, 1976. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRAUN, J. V., SANTOS, S. J., ESPÍNDOLA, G. C., MATTOS, G. F. DE., ONGARATTO, D. P., OLIVEIRA, D. M. DE., SILVA, M. W. DA., VENDRUSCULO, V., SANTOS, V. O. B. DOS., RENNER, R. E., NACIUK, F. F., MARQUES, M. V., FONTOURA, L. A. M. Oxidative stability and cold filter plugging point of biodiesel blends derived from fats and soy oil. **Química Nova**, 43, 9, 1246-1250, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170619>

BRODIE, B., "Sur le poids atomique du graphite". **Ann. Chim. Phys**, 59, 466, e472, 1860. DOI:10.1088/1757-899X/242/1/012032

BRUNO, C. M. A.; ALMEIDA, M. R. Óleos essenciais e vegetais: matérias-primas para fabricação de bioprodutos nas aulas de química orgânica experimental. **Química Nova**, 44, 7, 899-907, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170722>

BUCHORI, L., ANGGORO, D. D., SUMANTRI, I., PUTRA, R. R. Optimization of Monoglycerides Production Using KF/CaO-MgO Heterogeneous Catalysis. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, 14, 3, 689-696, 2019. doi:10.9767/bcrec.14.3.4251.689-696

CARVALHO, M. S., MENDONÇA, M. A., PINHO, D. M. M., RESCK, I. S., & SUAREZ, P. A. Z. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23(4), 763–769, 2012. DOI:10.1590/S0103-50532012000400023

CHEN, G., UMATHEVA, U., ALFORQUE, L., SHIRATAKI, H., OGAWA, S., KATO, C.; GHOSH, R. An annular-flow, hollow-fiber membrane chromatography device for fast, high-resolution protein separation at low pressure. **Journal of Membrane Science**, 590, 117305-117312, 2019. DOI:10.1016/j.memsci.2019.117305

CHEN, X.; LI, Z.; CHUN, Y.; YANG, F.; XU, H. WU, X. Effect of the Formation of Diglycerides/Monoglycerides on the Kinetic Curve in Oil Transesterification with Methanol Catalyzed by Calcium Oxide. **ACS Omega**, 5 (9), 4646-4656, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04431>

CHEW, Y. H., CHUA, L. S., CHENG, K. K., SARMIDI, M. R., AZIZ, R. A., LEE, C. T. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, 39, 3, 516-520, 2008. DOI: 10.1016/j.bej.2007.10.019

CHINÉ, B.; CONCHA, F. Flow patterns in conical and cylindrical hydrocyclones. **Chemical Engineering Journal**, 80, 1-3, 267-273, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(00\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(00)00101-5)

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Brasília, DF: Conab, v. 10, n. 7, abr. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 29 fev 2024.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Safra Brasileira de Grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/graos>. Acessado em: 29 fev 2024.

CORRADINI, F. A. S., ALVES, E. S., KOPP, W., RIBEIRO, M. P. A., MENDES, A. A., TARDIOLI, P. W., GIORDANO, R. C., GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of

soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, 144, 115-122, 2019. DOI: 10.1016/j.cherd.2019.02.008

COSTA, M. B, LIMA, Á. S, SOARES, C. M. F, LIMA, I. S. Tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização de lípases e aplicação em biodiesel. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPES**, 18, 2018.

COSTER, H. G. L., FARAHANI, T. D., CHILCOTT, T. C. Membrane and membrane separation system. United States Patent 9, 901, 881, 2018.

DARABI, R. R., PEYRAVI, M., JAHANSHAH, M. Modified forward osmosis membranes by two amino-functionalized ZnO nanoparticles: A comparative study. **Chemical Engineering Research and Design**, 145, 85-98, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.019>.

DEGÓRSKA, O., SZADA, D., ZDARTA, A., SMULEK, W., JESIONOWSKI, T., ZDARTA, J. Immobilized Lipase in Resolution of Ketoprofen Enantiomers: Examination of Biocatalysts Properties and Process Characterization. **Pharmaceutics**, 14, 1443, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071443>.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, 45(171), 97-110, 2021. DOI: 10.31512/persp.v.45.n.171.2021.168.p.97-110

DORNIER, M., BELLEVILLE, M. P., VAILLANT, F. Membrane technologies for fruit juice processing. **In: Fruit Preservation. Springer**, 211-248, 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-3311-2_8

DUTTA N, SAHA M.K. Immobilization of a Mesophilic Lipase on Graphene Oxide: Stability, Activity, and Reusability Insights. **Methods Enzymol**, 609, 247-272, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.05.009>.

DUTRA, C.P. Avaliação do efeito de suportes mistos de sílicas luoradas sobre a produtividade de catalisador metaloceno suportado. 2019. 53bf. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

DMITRIEVA, E. S., ANOKHINA, T. S., NOVITSKY, E. G., VOLKOV, V. V., BORISOV, I. L., VOLKOV, A. V. Polymeric Membranes for Oil-Water Separation: A Review. **Polymers**, 14, 980, 2022. DOI:10.3390/polym14050980

EL-GHAFFAR, A.B.D., ELAWADY, M., ABDELGAWAD, M., RABIE, M., AHMED, A. Enhancing the RO performance of cellulose acetate membrane using chitosan nanoparticles. **Journal of Polymer Research**, 27. 337, 2020. DOI:10.1007/s10965-020-02319-7

FAN, X., ZHANG, P., FAN, M. *et al.* Lipase imobilizada para hidrólise sustentável de óleo acidificado para produzir ácido graxo. **Bioprocesso Biosyst Eng**, 46, 1195–1208, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02891-4>.

FARIA, L. L., MORALES, S. A. V., PRADO, J. P. Z., DIAS, G. S., DE ALMEIDA, A. F, XAVIER, M. D. C. A., DA SILVA, E. S., MAIORANO, A. E., PERNA, R. F. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnol. Lett**, 43, 43-59, 2021. DOI: 10.1007/s10529-020-03016-7

FARIVAR, F., YAP, P. L., HASSAN, K., TUNG, T. T., TRAN, D. N.H., POLLARD, A. J., LOSIC, D. Unlocking thermogravimetric analysis (TGA) in the fight against “Fake graphene” materials, **Carbon**, 179, 505-513, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.04.064>

FENG, K., WANG, W., RONG, J., LIANG, J., MI, J., WU, Y., WANG, Y. Construction of recombinant *Pichia pastoris* strains for ammonia reduction by the *gdhA* and *glnA* regulatory genes in laying hens. **Ecotoxicol Environ Saf**, 1, 234, 113376, 2022. DOI:10.1016/j.ecoenv.2022.113376

FERNANDES, P. M., MEDEIROS, K. M., ARAÚJO, E. M., ARAUJO, B. A., SANTOS FILHO, E. A. Membranas de polisulfona/argila: influência de diferentes argilas na propriedade de barreira. **Matéria (Rio De Janeiro)**, 23(1), e-11981, 2018. DOI:10.1590/S1517-707620170001.0317

FERREIRA, M. V., PRADELA, L. A., SANTOS, A. L., TAKEUCHI, R. M., ASSUNÇÃO, R. M. N. Avaliação do perfil de liberação do fármaco ibuprofeno em membranas simétricas e assimétricas de acetato de celulose: efeito da morfologia. **Química Nova**, 42(8), 823–830, 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170409>

FREITAS, L., BUENO, T., PEREZ, V. H., CASTRO, H. F. Monoglicerídeos: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, 31, 6, 1514–1521, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9421-8>.

FREITAS, L., BUENO, T., PEREZ, V. H., SANTOS, J. C., DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. **World J. Microbiol. Biotechnol**, 23, 1725–31, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9421-8>.

FORTUNA, S. S. Hidrólise e separação de peptídeos de *buttermilk* obtidos a partir de um biorreator a membrana. 2020. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2020.

FURLANI IL, AMARAL BS, OLIVEIRA RV, CASS QB. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, 43(4), 463–73, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>

GAVLAK, G., VIDAL, C. M. de S. Avaliação de um biorreator a membrana de leite móvel na remoção de nutrientes de efluente da indústria de laticínios. **Revista AIDIS de ingeniería y ciencias ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, 15, 2, 896–915, 2022. DOI: <https://doi.org/10.22201/iingen.0718378xe.2022.15.2.79853>

GOH, B. H. H., CHONG, C. T., GE, Y., ONG, H. C., NG, J., TIAN, B., ASHOKKUMAR, V., LIM, S., SELJAK, T., JÓZSA, V. Progress in utilisation of waste cooking oil for sustainable biodiesel and biojet fuel production. **Energy Conversion and Management**, 223, 113296, 2020. DOI:10.1016/j.enconman.2020.113296

GUO, H., LEI, B., YU, J., CHEN, Y., QIAN, J. Immobilization of Lipase by Dialdehyde Cellulose Crosslinked Magnetic Nanoparticles. **Int. J. Biol. Macromol.** 185, 287-296, 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.073>.

GUZMAN, M. R.; ANDRA, C. K.; ANG, M. B. M.; DIZON, G. V.; CAPARANGA, A.; HUANG, S.; LEE, K. Increased performance and antifouling of mixed-matrix membranes of cellulose acetate with hydrophilic nanoparticles of polydopamine-sulfobetaine methacrylate for oil-water separation. **Journal of Membrane Science**, 620, 118881, 2020. DOI:10.1016/j.memsci.2020.118881

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Introdução aos Processos de Separação com Membranas. Apostila da Escola Piloto/COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1997.

HABERT, A. C; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de Separação por Membranas. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HASANIN, M. Cellulose-Based Biomaterials: Chemistry and Biomedical Applications. **Starch - Stärke**, 74, 7-8, 2022. DOI:10.1002/star.202200060

HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, H.; NIZAMI, A.; KALOGIROU, S. A.; GUPTA, V. K.; PARK, Y.; FALLAHI, A.; SULAIMAN, A.; RANJBARI, M.; RAHNAMA, H.; AGHBASHLO, M.; PENG, W.; TABATABAEI, M. Environmental life cycle assessment of biodiesel production from waste cooking oil: A systematic review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 161, 112411, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2022.112411

HUANG, S.; LI, H.; ZHU, R.; WANG, M.; TAN, T. Production of Liquid Biofuel Precursors: Optimization and Regulation of Lipase Fermentation and Its Application in

Plant Oil Hydrolysis Process. **Fermentation**, 9, 708, 2023.
DOI:10.3390/fermentation9080708.

HUMMERS, W. S. and OFFEMAN, R. E., "Preparation of Graphitic Oxide". **Journal of the American Chemical Society**, 80, 6, 1339-1339, 1958.
<https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>.
Acessado em: 05 março 2024.

IBRAHIM, E.; MAHMOUD, A.; JONES, K. D.; TAYLOR, K. E.; HOSSENEY, E. N.; MILLS, P. L.; ESCUDERO, J. M. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation for recombinant *Escherichia coli* cellulases, cel12B, cel8C, and polygalacturonase, peh28; biocatalysts for biofuel precursor production. **The Journal of Biochemistry**, 169, 109–117, 2021. DOI: 10.1093/jb/mvaa097

IŞIK, C.; ARABACI, G.; DOĞAÇ, Y. I.; DEVECI, I.; TEKE, M. Synthesis and characterization of electrospun PVA/Zn²⁺ metal composite nanofibers for lipase immobilization with effective thermal, pH stabilities and reusability. **Mater. Sci. Eng.: C**, 99, 1226-35, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.031>.

JACOB, A. G., WAHAB, R. A., MAHAT, N. A. Ternary biogenic silica/magnetite/graphene oxide composite for the hyperactivation of *Candida rugosa* lipase in the esterification production of ethyl valerate. **Enzyme and Microbial Technology**, 148, 109807, 2021. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109807

JAISWAL, K. S., RATHOD, V. K. Green synthesis of amyl levulinate using lipase in the solvent free system: Optimization, Mechanism and Thermodynamics studies. **Catalysis Today**, 375, 120-131, 2021. DOI:10.1016/j.cattod.2020.06.059

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Prog Biophys Mol Biol**, 132, 23 –34, 2018. DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014

JIRÍČKOVÁ A, JANKOVSKÝ O, SOFER Z, SEDMIDUBSKÝ D. Síntese e aplicações de óxido de grafeno. **Materiais**, 15(3), 920, 2022. DOI: 10.3390/ma15030920

KHAN, F. A.; HISHAM, S.; GHASEMI, M. Oil field produced water recovery and boosting the quality for using in membrane less fuel cell. **SN Applied Sciences**, 6, 510, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0523-3>

KHAN, R, JOLLY, R, FATIMA, T, SHAKIR, M. Extraction processes for deriving cellulose: A comprehensive review on green approaches. **Polym Adv Technol**, 33 (7), 2069- 2090, 2022. <https://doi.org/10.1002/pat.5678>

KHOLOUD EL-KADY, MAI RASLAN, AND AYMAN H. ZAKI. Effect of Different TiO₂ Morphologies on the Activity of Immobilized Lipase for Biodiesel Production. **ACS Omega**, 6, 51, 35484–35493, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.1c04942

KOHORI NA, DA SILVA MKL, CESARINO I. Evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide in the immobilization of laccase enzyme and its application in the determination of dopamine. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 22(1), 141–148, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3738-5>.

KUANG, G.; DU, Y.; LU, S.; WANG, Z.; ZHANG, Z.; FÄ, X.; BILAL, M.; CUI, J.; JIA, S. Silica@lipase hybrid biocatalysts with superior activity by mimetic biomineralization in oil/water two-phase system for hydrolysis of soybean oil. **LWT**, 160, 113333, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113333>.

KUANG, G.; WANG, Z.; LUO, X.; GENG, Z.; CUI, J.; BILAL, M.; WANG, Z.; JIA, S. Immobilization of lipase on hydrophobic MOF synthesized simultaneously with oleic acid and application in hydrolysis of natural oils for improving unsaturated fatty acid

production. **International Journal of Biological Macromolecules**, 242, 2, 124807, 2023. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.124807

KULMINSKAYA, N.; RADLER, C.; VIERTLMAYR, R.; HEIER, C.; HOFER, P.; COLAÇO-GASPAR, M.; OWENS, R. J.; ZIMMERMANN, R.; SCHREIBER, R.; ZECHNER, R.; OBERER, M. Optimized expression and purification of adipose triglyceride lipase improved hydrolytic and transacylation activities *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, 297, 4, 101206, 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101206>.

KYEONG YOON, B.; JACKMAN, J. A.; VALLE-GONZALEZ, E. R.; CHO, N.-J. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, 4, 1114-1154, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>

KYZAS, G.; MATIS, K. Flotation in water and wastewater treatment. **Processes**, 6, 8, 116, 2018. <https://doi.org/10.3390/pr6080116>

LEE, J.; LEE, H.; LEE, J.; CHANG, P. S. Heterologous expression, purification, and characterization of a recombinant *Cordyceps militaris* lipase from *Candida rugosa*-like family in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, 168, 110254, 2023. DOI:10.1016/j.enzmictec.2023.110254

LEI, Z.; GAO, C.; CHEN, L.; HE, Y.; MA, W.; LIN, Z. Recent advances in biomolecule immobilization based on self-assembly: organic–inorganic hybrid nanoflowers and metal–organic frameworks as novel substrates. **J. Mater. Chem. B**, 11, 1581, 2018. DOI: 10.1039/c7tb03310a

LEVENSPIEL, O.; Engenharia das Reações Químicas, 3^a ed.; Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 2000.

LI, Q., CHEN, Y., BAI, S., SHAO, X., JIANG, L., LI, Q. Immobilized lipase in bio-based metal-organic frameworks constructed by biomimetic mineralization: A sustainable

biocatalyst for biodiesel synthesis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 188, 110812, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110812

LI, S., ZHAO, S., HOU, Y., CHEN, G., CHEN, Y., & ZHANG, Z. Polylactic Acid (PLA) Modified by Polyethylene Glycol (PEG) for the Immobilization of Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 190(3), 982-996, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03134-7>.

LI Y, JING T, XU G, TIAN J, DONG M, SHAO Q, WANG B, WANG Z, ZHENG Y, YANG C, GUO Z. 3-D magnetic graphene oxide-magnetite poly(vinyl alcohol) nanocomposite substrates for immobilizing enzyme. **Polymer**, 149, 13–22, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.06.046>.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 42, 523-535, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1586-9>.

LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. Sea Water Demineralization by Means of a Semi permeable Membrane. **Sea Water Research**, 2, 60, 1960. doi: 10.1021/ba-1963-0038.ch009

LOPES, M.; MIRANDA, S.M.; BELO, I. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—a review, **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol**, 50, 2583–2616, 2020. DOI: 10.1080/10643389.2019.1704602

LUZARDO, J., AGUIAR, D., SILVA, A., OLIVEIRA, S., ARCHANJO, B., SIMÃO, R., ARAUJO, J. Tailoring surface properties of functionalized graphene papers aiming to enzyme immobilization: Original scientific paper. **Journal of Electrochemical Science and Engineering**, 12(1), 137–151, 2021. <https://doi.org/10.5599/jese.1099>

LV, E. et al. An Integrated Process of Catalytic Hydrolysis and Membrane Separation for Fatty Acids Production from Lard Oil. **The Canadian Journal of Chemical Engineering, Canada**, 96, 9, 2014–2024, 2018. DOI:10.1515/ijcre-2019-0224

MEI, S; HAN, P; WU, H; SHI, J; TANG, L; JIANG, Z; MELLER, K; SZUMSKI, M; BUSZEWSKI, B. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. **Journal of biotechnology**, 266, 1-8, 2018. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.11.015

MO, Q.; FU, A.; DENG, L.; ZHAO, M.; LI, Y.; ZHANG, H.; FENG, F. High-Dose Glycerol Monolaurate Up-Regulated Beneficial Indigenous Microbiota without Inducing Metabolic Dysfunction and Systemic Inflammation. **Nutrients**, 11, 9, 1981, 2019. DOI: 10.3390/nu11091981

MOHAMAD, N.R., MARZUKI, N.H., BUANG, N.A., HUYOP, F., WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnol Biotechnol Equip**, 29(2), 205-220, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192

MOHAMMAD, S. S.; FERREIRA, M. V. S.; BARBOSA, MARIA I. M. J.; BARBOSA JÚNIOR, J. L. Characteristics of Enzymatic Hydrolysis of Protein from Different Food Sources and Potential Separation Techniques. **Current Nutrition & Food Science**, 19, 6, 590-601, 2023. DOI:10.2174/1573401318666221003104005

MOOSAVI, F., AHRARI, F., AHMADIAN, G., MOHAMMADI, M. Sortase-mediated immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB) on graphene oxide; comparison with chemical approach. **Biotechnol Rep (Amst)**, 21, 34, e00733, 2022. DOI: 10.1016/j.btre.2022.e00733

MORETTO, E; FETT, R. Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos. ed., Varela: São Paulo, 1998.

MORSI, R.E.; CORTICELLI, F.; MORANDI, V.; GENTILI, D.; CAVALLINI, M.; FIGOLI, A.; RUSSO, F.; GALIANO, F.; ALUIGI, A.; VENTURA, B. Influence of the

Fabrication Conditions on the Physical Properties and Water Treatment Efficiency of Cellulose Acetate Porous Membranes. **Water**, 15, 1061, 2023. DOI:10.3390/w15061061

MOTAUNG, T., LINGANISO, L. Critical review on agrowaste cellulose applications for biopolymers. **Int J Plast Technol**, 22, 185–216, 2018. DOI:10.1007/s12588-018-9219-6

MUÑOZ, M. E. S. Separação de óleos emulsificados por flotação não convencional. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

NITBANI, F.O., TJITDA, P.J.P., NUROHMAH, B.A., WOGO, H.E. Preparation of Fatty Acid and Monoglyceride from Vegetable Oil. **J Oleo Sci**, 69(4), 277-295, 2020. DOI: 10.5650/jos.ess19168

NURUL FURQAN, B. R.; AKHMALOKA. Heterologous expression and characterization of thermostable lipase (Lk1) in *Pichia pastoris* GS115. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 23, 101448, 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101448>.

PAUL, M.; JONS, S. D. Chemistry and fabrication of polymeric nanofiltration membranes: A review. **Polymer**, 103, 417–456, 2016. DOI:10.1016/j.polymer.2016.07.085

PATCHIMPET, J., SIMPSON, B. K., SANGKHARAK, K., KLOMKLAO, S. Optimization of process variables for the production of biodiesel by transesterification of used cooking oil using lipase from Nile tilapia viscera. **Renewable Energy**, 153, 861-869, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2020.02.039

PETERSOHN Jr, E. Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana. p. 121. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PEREIRA, A.D.S.; DE SOUZA, A.H.; FRAGA, J.L.; VILLENEUVE, P.; TORRES, A.G.; AMARAL, P.F.F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. **Catalysts** 12, 88, 2022. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>

PORCEL, M. G.; STAUDT, J.; SPOHR, G. H.; SILVA, C.; BORBA, C. E. Effect of the Temperature and Molar Ratio of Water-Oil on the Enzymatic Hydrolysis Kinetics of the Soybean Oil: Experimental and Mathematical Modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 34(10), 1486–1498, 2023. DOI:10.21577/0103-5053.20230061

QUAYSON, E., AMOAH, J., HAMA, S., KONDO, A., & OGINO, C. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 134, 110355, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>

QUEISSADA, D. D.; SILVA, J. V. “Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens.” **Holos Environment**, 20, 271-286, 2020. <https://doi.org/10.14295/holos.v20i2.12378>

QIU, J.; HAN, R.; WANG, C. Microbial halophilic lipases: A review. **Journal of Basic Microbiology**, 61(7), 594–602, 2021. DOI: 10.1002/jobm.202100107

RABELO, S. N.; FERRAZ, V. P.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. FTIR analysis for quantification of fatty acid methyl esters in biodiesel produced by microwave-assisted transesterification. **International Journal of Environmental Science and Development**, 6(12), 964–969, 2015. DOI:10.7763/IJESD.2015.V6.730

RAHIMI, M., AGHEL, B., ALITABAR, M., SEPAHVAND, A., GHASEMPOUR, H.R. Optimization of biodiesel production from soybean oil in a microreactor, **Energy Convers. Manag**, 79, 599e605, 2015. DOI: 10.1016/j.enconman.2013.12.065

RAHMAN, N. H. A., JAAFAR, N. R., MURAD, A. M. A.; BAKAR, F. D. A., ANNUAR, N. A. S., ILLIAS, R. M. Novel cross-linked enzyme aggregates of levanase from *Bacillus lehensis* G1 for short-chain fructooligosaccharides synthesis: Developmental, physicochemical, kinetic and thermodynamic properties. **Int. J. Biol. Macromol**, 159, 577-589, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.262

RAMALHO, H. F., SUAREZ, P. A. Z. The chemistry of oils and fats and their extraction and refining processes. **Revista Virtual de Quimica**, 5, 2–15, 2013. DOI:10.5935/1984-6835.20130002

RASOULI, S., REZAEI, N., HAMEDI, H., ZENDEHBOUDI, S., DUAN, X. Superhydrophobic and superoleophilic membranes for oil-water separation application: A comprehensive review. **Materials & Design**, 204, 109599, 2021. DOI:10.1016/j.matdes.2021.109599

RAY, S. C., RAY, S. C. “Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide” Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials, chapter 2, Oxford, William Andrew Publishing, 2015.

RIBEIRO SRFL, BESSA LP, CARDOSO VL, REIS MHM. Enhanced hydrogen permeance through graphene oxide membrane deposited on asymmetric spinel hollow fiber substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, 47, 9616-9626, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.049>.

RODRIGUES, R., BERENGUER-MURCIA, Á., CARBALLARES, D., MORELLON-STERLING, R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnol Adv**, 52, 107821, 2021. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107821.

ROSSET, D. V., WANCURA, J. H. C., UGALDE, G. A., OLIVEIRA, J. V., TRES, M. V., KUHN, R. C., JAHN, S. L. Enzyme-Catalyzed Production of FAME by Hydroesterification of Soybean Oil Using the Novel Soluble Lipase NS 40116. **Appl Biochem Biotechnol**, 188(4), 914-926, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-02966-7.

SARFAT, M. S., SETYANINGSIH, D., FAHMA, F., INDRASTI, N. S., SUDIRMAN. Characterization of mono-diacylglycerols, cellulose nanocrystals, polypropylene, and supporting materials as raw materials for synthesis of antistatic bionanocomposites. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci**, 1034, 012009, 2022. DOI:10.1088/1755-1315/1034/1/012009

SANTOS, M., AMARAL, H., CIPRIANO D., Aproveitamento De Precursores Lignocelulósicos Para Produção De Acetato De Celulose. **Química Nova**, 43(3), 279-285, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170500>

SCHWARZHANS, J. P., LUTTERMANN, T., GEIER, M., KALINOWSKI, J., FRIEHS, K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. **Biotechnol Adv**, 1, 35(6), 681-710, 2017. DOI:10.1016/j.biotechadv.2017.07.009

SOARES, C. M. F., DE CASTRO, H. F., DE MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 77–79, 745-757, 1999. <https://doi.org/10.1385/abab:79:1-3:745>.

SONKAR, K., SINGH, D. P. Kinetic and thermodynamic characterization of novel alkaline lipase from halotolerant *Bacillus gibsonii*. **Arch Microbiol**, 203, 2199–2209, 2021. DOI: 10.1007/s00203-021-02197-7

SOUZA, J. E. S.; ARAÚJO, B. A.; SARMENTO, K. K. F.; REBOUÇAS, L. D.; MEDEIROS, K. M.; LIMA, C. A. P. Zinc oxide polymeric nanocomposite membranes for wastewater treatment: Literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], 10(8), e46510817402, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17402>

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, 31, 2, 1481-1487, 1898. <https://doi.org/10.1002/cber.18980310237>

SHEN, Q.; ZHANG, Z.; EMAMI, S.; CHEN, J.; BELL, J. M. L. N. M.; TAHA, A. Y. Triacylglycerols are preferentially oxidized over free fatty acids in heated soybean oil. **npj Sci Food**, 5, 7, 2021. DOI:10.1038/s41538-021-00086-3

SHUJUAN, Y.; RONG, T.; YANAN, D.; TIANHAO, W.; ZHINONG, Z.; LIPING, Z. Fabrication of cellulose acetate membrane with advanced ultrafiltration performances and

antibacterial properties by blending with HKUST-1@LCNFs. **Separation and Purification Technology**, 279, 119524, 2021. DOI:10.1016/j.seppur.2021.119524

TAN, C. P.; CHE MAN, Y. B. Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils: I. Effects of heating rate variation. **Phytochemical Analysis**, 13, 3, 129–141, 2002. DOI: 10.1002/pca.633

TAN, X.; RODRIGUES, D. A Review on Porous Polymeric Membrane Preparation. Part I: Production Techniques with Polysulfone and Poly (Vinylidene Fluoride). **Polymers**, 8;11(7), 1160, 2019. <https://doi.org/10.3390/polym11071160>

TEIXEIRA, I. S.; MILAGRE, C. D. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Química Nova**, 43, 6, 773-786, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170538>

TEO, W. WAHAB, R. Towards an eco-friendly deconstruction of agro-industrial biomass and preparation of renewable cellulose nanomaterials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 161, 1414-1430, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.076>

THANGARAJ, B.; MUMTAZ, F.; ABBAS, Y.; ANJUM, D.H.; SOLOMON, P.R.; HASSAN, J. Synthesis of Graphene Oxide from Sugarcane Dry Leaves by Two-Stage Pyrolysis. **Molecules**, 28, 3329, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083329>

UGO, A. K.; AMARA, A. V.; KENECHUWKU, U.; CN, I. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. **Fermentation Technology**, 6, 1000144, 2017. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Oilseeds: World Markets and Trade. Mar 2023. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/8336jf16z/tq57q421z/oilseeds.pdf>. Acesso em: 29 fev. 2024.

VIVEK, K., SANDHIA, G. S. Subramaniyan S. Purification and characterization of a psychrophilic lipase from *Serratia marcescens* VT 1 and its application in methyl ester synthesis. **Bioresource Technology Reports**, 22, 101443, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101443>

XIN, Z., MENG-PING, L., ZHI-HAO, H., HAO, Z., WEI-LIANG, L., XIN-RU, X., XIAO-HUA, M., ZHEN-LIANG, X. Fast surface crosslinking ceramic hollow fiber pervaporation composite membrane with outstanding separation performance for isopropanol dehydration. **Separation And Purification Technology**, 234, 116116-116124, 2020. DOI:10.1016/j.seppur.2019.116116

WAN IKHSAN, S.N., YUSOF, N., AZIZ, F., MISDAN, N. A review of oilfield wastewater treatment using membrane filtration over conventional technology. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, 21, 3, 643-658, 2017. DOI:10.17576/mjas-2017-2103-14

WEN-QIONG, W., YUN-CHAO, W., XIAO-FENG, Z., RUI-XIA, G., MAO-LIN, L. WHEY protein membrane processing methods and membrane fouling mechanism analysis. **Food Chemistry**, 289, 468-481, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.03.086

WAHAB, W. A. A., KARAM, E. A., HASSAN, M. E., KANSOH, A. L., ESAWY, M. A., AWAD, G. E. A. Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 2⁴ full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization. **Int. J. Biol. Macromol**, 113, 159-170, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.086

YANG, Y. et al. Robust membranes with tunable functionalities for sustainable oil/water separation. **Journal of Molecular Liquids**, 321, 114701, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114701>

YU, P., XUE, Y., GAO, F., LIU, Z., CHENG, X., YANG, K. Phosphorus Removal from Aqueous Solution by Pre- or Post-Modified Biochars Derived from Agricultural Residues. **Water, Air, & Soil Pollution**. 227. 370, 2016. DOI: 10.1007/s11270-016-3066-x

YUAN, Y., SHEN, J., SALMON S. Developing Enzyme Immobilization with Fibrous Membranes: Longevity and Characterization Considerations. **Membranes**. 13(5), 532, 2023. <https://doi.org/10.3390/membranes13050532>

ZEFERINO, M; RAMOS, S. de F. Mercado Mundial de Óleos Vegetais: panorama e perspectivas. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 1-8, maio 2023. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=16138>. Acesso em: 29 fev. 2024.

ZENEVICZ, M. C. P., JACQUES, A., FURIGO, A. F., OLIVEIRA, J. V., DE OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, 80, 235–241, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.031>.

ZHANG S, SHI J, DENG Q, ZHENG M, WAN C, ZHENG C, LI Y, HUANG F. Preparation of carriers based on ZnO nanoparticles decorated on Graphene Oxide (GO) nanosheets for efficient immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Molecules**, 22, 1205, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22071205>.

ZHAO, J., MA, M., YAN, X., WAN, D., ZENG, Z., YU, P., & GONG, D. Immobilization of lipase on β -cyclodextrin grafted and aminopropyl-functionalized chitosan/Fe₃O₄ magnetic nanocomposites: An innovative approach to fruity flavor esters esterification. **Food Chemistry**, 366, 130616, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130616

ZHAO, J.; WANG, Q.; YANG, J.; LI, Y.; LIU, Z.; ZHANG, L.; ZHAO, Y.; ZHANG, S.; CHEN, L. Comb-shaped amphiphilic triblock copolymers blend PVDF membranes overcome the permeability-selectivity trade-off for protein separation. **Separation And Purification Technology**, 239, 116596-116607, 2020. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116596

WENFENG, Z.; YUAN, R.; WEI, Z.; LEI, G.; RIJIA, L.; TING, T.; JINGLAN, W.; MING, L.; PENG PENG, Y.; CHENJIE, Z.; HAO, W.; HANJIE, Y. Improved enzymatic activity by oriented immobilization on graphene oxide with tunable surface heterogeneity. **Composites Part B: Engineering**, 216, 108788, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.108788>

ZHU, X., HAN, Y., FENG, Y., CHENG, P., PENG, Y., WANG, J., CAI, J., CHEN, Y., Formation and emission characteristics of intermediate volatile organic compounds (IVOCs) from the combustion of biomass and their cellulose, hemicellulose, and lignin. **Atmospheric Environment**, 286, 119-217, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2022.119217>

ZHU, Y., MURALI, S., CAI, W., LI, X., SUK, J. W., POTTS, J. R. and RUOFF, R. S., "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications". **Advanced Materials**, 22, 35, 3906-3924, 2010. DOI: 10.1002/adma.201001068

ZOU, D.; CHEN, X.; DRIOLI, E.; KE X.; QIU, M.; FAN, Y. Facile co-sintering process to fabricate sustainable antifouling silver nanoparticles (AgNPs)-enhanced tight ceramic ultrafiltration membranes for protein separation. **Journal of Membrane Science**, 593, 117402-117413, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117402>