



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**LIPASE PROVENIENTE DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.): EXTRAÇÃO,  
PRÉ-PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO EM CARVÃO ATIVADO**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA- BRASIL**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**LIPASE PROVENIENTE DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.): EXTRAÇÃO,  
PRÉ-PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO EM CARVÃO ATIVADO**

**KARINE AMARAL DOS SANTOS**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

**Orientador (a):** DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

**CO-ORIENTADOR:** DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

DSc. Leandro Soares Santos

DSc. Cristiane Martins Veloso

**ITAPETINGA**  
**BAHIA - BRASIL**

**2022**

660.634 Santos, Karine Amaral dos.  
S2351 Lipase proveniente de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): extração, pré-purificação e imobilização em carvão ativado. / Karine Amaral dos Santos. – Itapetinga-BA: UESB, 2022.

115f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Área de Concentração: Engenharia de Alimentos. Sob a orientação da Prof.<sup>a</sup>. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan, Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e Prof.<sup>a</sup>. D. Sc. Cristiane Martins Veloso.

1. Enzimas – Extração e purificação. 2. Lipase - Purificação - Casca do pequi. 3. Lipase – Imobilização - Carvão ativado. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. IV. Santos, Leandro Soares. V. Veloso, Cristiane Martins. VI. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Lipases vegetais
2. Sistema aquoso bifásico
3. *Caryocar brasiliense* Camb.

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** “LIPASE PROVENIENTE DE PEQUI (Caryocar brasiliense Camb.): EXTRAÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO EM CARVÃO ATIVADO”.

**Autor (a):** KARINE AMARAL DOS SANTOS

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Coorientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Documento assinado digitalmente  
 FELIPE CIMINO DUARTE  
Data: 17/01/2023 09:45:52-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Felipe Cimino Duarte  
Membro Externo - IFNMG

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vanessa Santos Sampaio  
UESB



Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior  
UESB



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Rosana Moura de Oliveira  
PÓS-DOC/UESB

Documento assinado digitalmente  
 RENATA CRISTINA FERREIRA BONOMO  
Data: 15/05/2023 16:37:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
Orientadora - UESB  
Presidente da Banca

**Itapetinga-BA, 07 de dezembro de 2022**

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO .....	13
CAPÍTULO 1 .....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Mercado das lipases.....	20
2.2. Enzimas.....	21
2.2.1. Lipases .....	22
2.3. Pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> ).....	26
2.4. Métodos convencionais para a purificação das lipases.....	28
2.4.1. Extração sólido-líquido das lipases de origem vegetal.....	30
2.4.2. Pré-purificação das lipases com SAB.....	32
2.5. Imobilização enzimática .....	35
2.4.1 Adsorção das lipases .....	36
2.4.2. Carvão ativado como suporte para imobilização de lipase.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo Geral .....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
CAPÍTULO 2 .....	56
ARTIGO 1.....	56
Otimização da extração e caracterização das lipases obtidas da casca do pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	56

RESUMO .....	57
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
2.1. Preparo da casca do pequi e do extrato.....	60
2.2. Determinação da composição química centesimal da farinha da casca de pequi .....	61
2.3. Otimização das condições para a obtenção do extrato rico em lipases .....	61
2.3.1. Validação do modelo .....	62
2.4. Determinação do teor de proteínas do extrato.....	62
2.5. Determinação da atividade hidrolítica das lipases.....	62
2.6. Caracterização das lipases do extrato .....	63
2.6.1. pH e temperatura de hidrólise .....	63
2.6.2. Influência do pH e temperatura na estabilidade .....	64
2.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	64
2.6.4. Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE e zimograma .....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1. Composição química centesimal da casca de pequi .....	65
3.2. Otimização da obtenção do extrato.....	67
3.2.1. Validação do modelo .....	69
3.3. Caracterização das lipases do extrato .....	70
3.3.1. Influência do pH e da temperatura na hidrólise catalisada pelas lipases..	70
3.3.2. Estabilidade térmica e de pH das lipases .....	72
3.3.3. Parâmetros cinéticos .....	75
3.3.4. Identificação das lipases.....	76

4. CONCLUSÃO.....	77
5. REFERÊNCIAS .....	77
CAPÍTULO 3 .....	83
ARTIGO 2.....	83
Partição das lipases da casca do pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) utilizando sistema aquoso bifásico e imobilização em carvão ativado: Avaliação e otimização do processo .....	83
1. INTRODUÇÃO.....	86
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	87
2.2. Preparo do Extrato.....	88
2.3. Determinação do teor de proteínas .....	88
2.4. Determinação de atividade enzimática do extrato.....	88
2.5. Determinação dos dados de equilíbrio.....	89
2.5.1. Curvas Binodais.....	89
2.5.2. Linhas de amarração .....	90
2.6. Otimização da partição .....	91
2.6.1. Fatorial completo.....	91
2.6.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	92
2.7. Determinação dos parâmetros da partição .....	93
2.8. Estimativa da energia livre de Gibbs na partição .....	93
2.9. Análise de outros SAB.....	94
2.10. Imobilização das lipases.....	94
2.11. Determinação de atividade específica das lipases imobilizadas .....	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.1. Dados de equilíbrio.....	95

3.2.	Otimização da partição .....	99
3.2.1.	Planejamento fatorial completo.....	99
3.2.2.	Delineamento Composto Central Rotacional.....	100
4.	CONCLUSÃO.....	107
5.	REFERÊNCIAS .....	107
	ANEXO: CAPÍTULO 1.....	112
	ANEXO: CAPÍTULO 3.....	114

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Algumas aplicações das lipases na indústria de alimentos .....	21
Tabela 2. Parâmetros de extração sólido-líquido de lipases de origem vegetal .....	31
Tabela 3. Condições (temperatura e pH) para partição de lipases em sistemas aquosos bifásicos (SAB), coeficientes de partição ( $K_e$ ) e fator de purificação (FP) .....	34

### Capítulo 2

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados segundo o delineamento experimental (DCCR) $2^2$ .....	61
Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no delineamento experimental (DCCR) $2^2$ , para otimização da extração de lipases da casca de pequi após estudo prévio .....	62
Tabela 3. Composição química centesimal da casca do pequi expressas em matéria seca .....	66
Tabela 4. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) na otimização da extração de lipases da casca de pequi e atividade específica (AE) enzimática .....	67
Tabela 5. Análise de variância dos parâmetros da função para a extração das lipases da casca do pequi variando temperatura e pH ( $CV = 24,54\%$ e $R^2 = 90,00\%$ ) .....	68
Tabela 6. Conjunto de validação para o ponto máximo da atividade específica (AE) estimada e outras três condições de parâmetros de extração de lipases da casca de pequi .....	70
Tabela 7. Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato da casca de pequi .....	70

### Capítulo 3

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes e valores codificados para o experimento fatorial completo .....	91
---	----

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo $2^2$ , para otimização da extração pelo delineamento experimental (DCCR) após a análise do fatorial completo .....	92
Tabela 3. Rendimento, área de superfície (Sg) e volume de microporos (Vmicro), ponto de carga zero (pHpcz), diâmetro do poro (Dp) e volume de mesoporos (Vmeso) do carvão ativado da casca de café .....	94
Tabela 4. Parâmetros ajustados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos para os sistemas PEG 1500 g mol <sup>-1</sup> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + água nas temperaturas de 10 °C e 25 °C pela equação de Hu et al. (2003) .....	96
Tabela 5. Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 1500 g mol <sup>-1</sup> (Wpeg), fosfato de potássio monobásico/bibásico (Wsal) e água (Wágua) nos planejamentos experimentais .....	98
Tabela 6. Projeto experimental do planejamento fatorial completo para o coeficiente de partição ( $K_e$ ) .....	99
Tabela 7. Análise de variância para o projeto experimental do planejamento fatorial completo na otimização da partição das lipases no extrato .....	100
Tabela 8. Projeto experimental do planejamento fatorial do delineamento composto central rotacional para o estudo dos parâmetros de partição .....	101
Tabela 9. Equações de regressão relacionando parâmetros de partição em função da concentração fosfato de potássio monobásico/bibásico (%) e do extrato (%) .....	102
Tabela 10. Partição da lipase do extrato em SAB: comparação entre sistemas de outros estudos com o desse trabalho .....	105

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1. Diagrama da fita da lipase da *Candida rugosa* com a tampa aberta e fechada (sobrepostas). A folha  $\beta$  mista central é azul claro e a folha  $\beta$  N-terminal menor é azul escuro. As hélices que compactam contra a folha  $\beta$  central são verdes escuras. A conformação fechada da tampa é amarela e a conformação aberta é vermelha. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho ..... 23
- Figura 2. Reações catalisadas por lipases ..... 24
- Figura 3. Estrutura convencional das  $\alpha/\beta$  hidrolases ..... 25
- Figura 4. Estrutura terciária das lipases de quatro espécies de plantas diferentes. Verde:  $\alpha$ -hélice; azul: folha  $\beta$ ; vermelho: hélices aleatórias; amarelo: suporte estendido (tampa) ..... 26
- Figura 5. Principais remanescentes de vegetação nativa de Cerrado no Brasil em 2002 (em verde) com maior ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess ..... 27
- Figura 6. A: Frutos *Caryocar brasiliense* do Mercado Municipal de Salinas-MG, Fonte: A-Autor; B- Endocarpo espinhoso e amêndoa ..... 28

### Capítulo 2

- Figura 1. Superfície de resposta para atividade específica enzimática em função do tempo e do pH..... 69
- Figura 2. Efeito do pH na hidrólise catalisada pelas lipases do extrato..... 71
- Figura 3. Efeito da temperatura na hidrólise catalisada pelas lipases do extrato ..... 71
- Figura 4. Termoestabilidade da atividade lipolítica do extrato ..... 72
- Figura 5. Efeito dos pH 4,0 (a); 5,0 (b); 7,0 (c); 9,0 (d) e 10,0 (e) na estabilidade das lipases do extrato enzimático em diferentes temperaturas ..... 74
- Figura 6. Efeito da concentração do substrato (p-Nitrophenyl palmitate) na atividade hidrolítica das lipases do extrato enzimático. A linha representa os valores preditos pelo modelo ..... 75

Figura 7. (a) Eletroforese SDS-PAGE em condição desnaturante da lipase do extrato da casca de pequi; (b) Zimograma em condição não desnaturante da lipase do extrato da casca de pequi e (P) Marcador molecular de proteínas (6,5 a 200,0 kDa)..... 76

### Capítulo 3

Figura 1. Diagramas de fases formados por PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + água. (○) 25 °C e (□) 10 °C; (---) linhas de amarração do FC; (—) linhas de amarração do DCCR; ( ) pontos globais..... 95

Figura 2. Superfície de resposta para o coeficiente de partição das lipases (K<sub>e</sub>) e energia livre de Gibbs de transferência das lipases (G<sub>e</sub>) em função da concentração do fosfato de potássio e do extrato na composição do sistema aquoso bifásico (SAB)..... 103

Figura 3. Superfície de resposta para a recuperação teórica (%Y) e fator de purificação (FP) em função da concentração do fosfato de potássio e do extrato na composição do sistema aquoso bifásico (SAB)..... 104

Figura 4. Imobilização em carvão ativado da fase superior do SAB composto por PEG 1500, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água após a partição das lipases do extrato da casca de pequi ..... 106

Figura 5. Imobilização em carvão ativado do extrato da casca de pequi. ■ Sobrenadante (extrato não imobilizado); ■ Lipase imobilizada ..... 106

## RESUMO

SANTOS, K. A. **Lipase Proveniente de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Extração, Pré-Purificação e Imobilização em Carvão Ativado**. Itapetinga – BA: UESB, 2021. 117 p. (Tese - Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) \*.

Esse trabalho teve como objetivo otimizar as condições de extração de lipases presentes na casca do pequi, otimizar a pré-purificação dessas enzimas em sistemas aquosos bifásicos (SAB) para posteriormente imobilizá-las em carvão ativado. No processo de extração foi utilizado a metodologia de superfície de resposta (MSR) a qual abrangeu o planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) para a obtenção do maior valor da variável resposta AE (atividade específica). O extrato definido pelo modelo de regressão com o máximo valor de AE ( $E_{m\acute{a}x}$ ) foi obtido no pH 8 e no tempo de 44 minutos ( $\approx 189,55$  U/mg). Após, o  $E_{m\acute{a}x}$  foi caracterizado quanto a atividade máxima, estabilidade, parâmetros cinéticos e eletroforese. Na etapa de otimização da pré-purificação das lipases presentes no  $E_{m\acute{a}x}$ , estudou-se a aplicação da extração líquido-líquido por meio de SAB, compostos por polietilenoglicol (PEG) 1500 g mol<sup>-1</sup>, fosfato de potássio monobásico/bibásico e água. Foram determinados dados de equilíbrio de fases para os SAB em 10 °C e 25 °C. Também foram avaliadas a influência dos fatores temperatura, concentração de PEG e concentração de sal no coeficiente de partição das lipases do  $E_{m\acute{a}x}$  aplicando-se, inicialmente, um delineamento fatorial fracionado. Para as variáveis significativas, foi empregado um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os resultados obtidos no DCCR foram submetidos à análise de regressão e superfície de resposta, sendo determinadas as melhores condições para a otimização da partição da enzima. A maior atividade relativa (AR) foi observada no pH 5 e na temperatura de 60 °C (AE igual a 3911,18 U/mg). As enzimas apresentaram estabilidade na faixa de pH 5-7 em até 180 minutos. Os estudos dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten demonstraram que as lipases possuem boa flexibilidade e difusividade em relação ao complexo enzima-substrato. Na otimização da partição das lipases do extrato bruto, somente os fatores que eram significativos pelo teste F ( $P < 0,05$ ) no estudo do fatorial completo, foram utilizados. Portanto, após a análise do FC, a concentração do PEG foi fixada em 15% e a temperatura em 25 °C para a próxima etapa de otimização. Os resultados das variáveis respostas obtidos pelo DCCR foram submetidos análise de MSR. A partir dessa análise foram obtidos modelos que descreviam o comportamento das variáveis respostas de partição em função das concentrações do extrato bruto da casca de pequi e do fosfato de potássio. Para melhores resultados de  $K_e$ , %Y e FP, a

concentração calculada dos componentes do SAB foi aproximadamente 15 % de PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, 13,7 % fosfato de potássio monobásico/bibásico (pH 7), 11,5 % para o extrato bruto da casca de pequi e 59,8 % de água. A *S* é máxima na concentração 10,47% de extrato e nas maiores concentrações de sal. Para atingir ótimos valores, as variáveis *Kp*, *Gp* e *Ge* apresentaram concentrações de extrato bruto e sal > 13,45 % e >15%, respectivamente, dentro das faixas de concentrações estudadas.

**Palavras-chave:** Lipases vegetais, otimização, sistemas aquosos bifásicos.

---

\* Orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB.

## ABSTRACT

SANTOS, K. A. **Extraction, pre-purification and immobilization in activated charcoal of lipase from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Itapetinga – BA: UESB, 2021. 117p. (Thesis - Doctorate in Engineering and Food Science) \*.

The food and beverage sector has the world's largest market and growth prospects for lipases. Thus, it is important to study these hydrolases from renewable sources such as vegetables. Pequi peel is a good vegetable alternative for lipase extraction, as it allows the insertion of enzyme options with specificity and stability to the market. In this sense, this work aimed to optimize the extraction conditions of the lipases present in the pequi peel, purify them in aqueous two-phase systems (ATPS) and then immobilize them in activated charcoal. Prior to extraction optimization, the pequi husks were sanitized, fractionated, dried and crushed for the extraction optimization process. The experimental design used was the central composite rotational design (CCRD) and the response surface methodology (RSM). Subsequently, the extract with the best lipolytic activity obtained was characterized for maximum activity, stability, kinetic parameters and electrophoresis. The lipases present in the crude extract, obtained under the best extraction conditions, were subjected to partition optimization by biphasic aqueous systems formed by PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, monobasic/bibasic potassium phosphate and water. Initially, a complete factorial design was applied, then the significant variables were studied by the CCRD and RSM. The extract with the highest lipase activity was obtained at pH 8 and at a time of 43 minutes and 50 seconds ( $\approx 189.55$  U/mg). The maximum relative activity (RA) was observed at pH 5 and temperature of 60 °C. The enzymes showed good stability in the pH range from 5 to 7 up to 180 minutes. Michaelis-Menten kinetic parameter studies demonstrated that lipases have good flexibility and diffusivity in relation to the enzyme-substrate complex. In optimizing the partition of lipases from the crude extract, only the factors that were significant by the F test ( $P < 0.05$ ) in the study of the full factorial were used. Therefore, after the FC analysis, the PEG concentration was adjusted to 15% and the temperature to 25°C for the next optimization step. The results of the response variables obtained by the CCRD were submitted to RSM analysis. From this analysis, models were obtained that described the behavior of the partition response variables as a function of the concentrations of crude pequi peel extract and potassium phosphate. For best results of  $K_e$ , %Y and FP, the calculated concentration of the ATPS components was approximately 15% PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, 13.7% monobasic/bibasic potassium phosphate (pH 7), 11.5% for the crude extract of pequi peel and 59.8% water. S is maximum at

the concentration of 10.47% of the extract and at the highest salt concentrations. To reach the optimal values, the variables  $Kp$ ,  $Gp$  and  $Ge$  presented crude extract and salt concentrations > 13.45% and > 15%, respectively, within the studied concentration ranges.

**Keywords:** plant lipases, optimization, aqueous two-phase systems.

---

\* Advisor: Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB.

## CAPÍTULO 1

---

INTRODUÇÃO

REFERENCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

---

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biomoléculas que desempenham importantes papéis em inúmeras atividades econômicas, uma vez que apresentam função catalítica superior à de catalisadores químicos e inorgânicos, devido a elevada especificidade para com os seus substratos (SUN; KAARTINEN, 2020). Por esse motivo, estudos reportam que o mercado de enzimas tem se desenvolvido progressivamente com perspectiva de crescimento nos próximos anos (REPORTS AND DATA, 2020).

Na indústria de alimentos as enzimas mais utilizadas são as amilases, proteases, pectinases, lipases e oxirredutases (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2021; MARKETS AND MARKETS, 2018; MORDOR INTELLIGENCE, 2020; REPORTS AND DATA, 2020). Dentre essas enzimas, as lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) vêm se destacando por apresentar atividade catalítica desejáveis em diversos processos, como na indústria de panificação, síntese de produtos fermentados, interesterificação de óleos vegetais e síntese de aromas (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007).

Comercialmente, os microrganismos são a principal fonte dessas enzimas. Entretanto, outras fontes de lipases podem ser plantas e animais. As lipases animais usadas em processos industriais incluem as lipases pancreáticas e pré-gástricas (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020). Geralmente, são obtidas de bovinos, ovinos e suínos e raramente são puras o suficiente para serem usadas na indústria alimentícia. Nas plantas, as lipases estão presentes principalmente nas folhas, óleos, caules, látex e sementes de plantas oleaginosas e cereais (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020). As características como a especificidade, a cinética e estabilidade variam de acordo a origem da enzima (ANBU *et al.*, 2017). Sendo assim, o estudo de novas fontes não-convencionais e de novos processos de obtenção e purificação de lipases para possível aplicação industrial é interessante do ponto de vista biotecnológico.

A espécie *Caryocar brasiliense* Cambess é uma planta arbórea da família Caryocaraceae popularmente conhecida como pequi. Alguns autores relatam as diversas aplicações de todas as partes dos frutos *Caryocar brasiliense* como a produção de óleo vegetal empregado em alimentos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011), complemento alimentar (SOMCHINDA *et al.*, 2018) e cosméticos (FARIA; DAMASCENO; FERRARI, 2014; PIANOVSKI *et al.*, 2008), a utilização da casca para a produção de geleias (SIQUEIRA *et al.*, 2012) e da amêndoa em alimentos (MONTEIRO, 2014; RAMOS *et al.*, 2020). A casca do pequi é considerada um subproduto agrícola, no entanto muitos estudos demonstram o potencial tecnológico dessa parte

do fruto, como fonte de muitos compostos de interesse industrial como as enzimas que estão originalmente em sua estrutura (LEÃO *et al.*, 2018; MARIANI *et al.*, 2015; PINHO *et al.*, 2012; REIS FILHO *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2010).

O estudo de novas técnicas de extração e purificação de enzimas com aplicações industriais que forneçam um produto final com elevado grau de pureza em um processo simples, rápido, econômico e com um rendimento satisfatório é de interesse para a indústria. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB), técnica de extração líquido-líquido, vêm se destacando como alternativa viável aos métodos convencionais de extração e recuperação de materiais biológicos por apresentar baixo custo, alta produtividade, simplicidade, separação relativamente rápida, possibilidade de aplicação em grande escala, capacidade de integração de processos e grande apelo ambiental (DOS SANTOS *et al.*, 2020; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; SHOW *et al.*, 2012). Além disso, a presença de elevada quantidade de água (cerca de 60 a 95%) fornece à biomolécula um ambiente ameno, com condições brandas, resultando na manutenção da estabilidade e atividade biológica (DA SILVA; LOH, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2017).

Na literatura é citada a utilização de diferentes SAB com o objetivo de extração ou pré-purificação de lipases (AMID *et al.*, 2015a; CARVALHO *et al.*, 2017; NASCIMENTO, 2020; PADILHA; OSÓRIO, 2019; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016). Muitas vezes na aplicação dessas biomoléculas na forma livre em processos industriais é observada a instabilidade estrutural, além de ser de difícil separação da enzima dos demais compostos presentes na reação catalítica (GONÇALVES *et al.*, 2019; SHELDON; BASSO; BRADY, 2021).

Logo, se faz necessário o desenvolvimento de estudos sobre a imobilização enzimática. Para a utilização dessa técnica nas enzimas lipolíticas, os suportes que possuem características hidrofóbicas em sua superfície são desejáveis por promover uma ativação interfacial na lipase, potencializando sua capacidade de catálise hidrolítica (ULKER; GOK; GUVENILIR, 2019).

O carvão ativado (CA) possui ou a ele podem ser adicionados os grupos químicos necessários para a imobilização das lipases. Além disso, o CA possui volume e número de poros que o torna uma matriz com características químicas e físicas com potencial para imobilização enzimática por adsorção. Outra vantagem é o baixo custo e facilidade de operação que facilita a remoção das enzimas utilizadas no processamento industrial. Assim, nesse estudo foi realizada a otimização da extração e da partição em sistemas aquosos bifásicos das lipases presentes na casca de pequi para a possível imobilização dessas enzimas em carvão ativado.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Mercado das lipases**

O mercado de enzimas vegetais ainda não é tão explorado comercialmente apesar do seu potencial, assim várias organizações de previsão econômica e análise de mercado não as citam em seus estudos. Isso ocorre porque as lipases microbianas são as principais fontes dessas enzimas no mercado atualmente. Em alguns relatórios aparecem estudos das lipases de origem animal por abranger pequena parte desse mercado.

Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated, “Global Industrial Enzymes” (2018) as enzimas industriais com aplicações em alimentos e bebidas são o nicho de maior crescimento seguido das enzimas utilizadas na produção de alimentos para animais. O levantamento feito pela empresa cita que o crescente consumo de carne aumentaria a demanda na produção de enzimas.

O relatório publicado pela Reports and Data (2020) corrobora com a estimativa de crescimento do mercado de enzimas industriais voltadas para a aplicação na indústria de alimentos. A busca dos consumidores e empresas por alimentos processados com a vida útil mais longa, com conteúdo nutricional prolongado e obtidos por tecnologias que utilizam a química verde, têm impulsionado o mercado de enzimas, principalmente em países com as tecnologias de processamento mais desenvolvidas. Diante disso, a perspectiva de crescimento do mercado global de enzimas deve atingir US\$ 11,03 bilhões em 2026, com crescimento anual de 5,5% (REPORTS AND DATA, 2020).

Devido às suas propriedades versáteis e elevada estabilidade, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em diversos setores industriais, tais como a indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no tratamento de efluentes, dentre outras, estando atrás apenas das carboidrases e proteases (MORDOR INTELLIGENCE, 2020; REPORTS AND DATA, 2020). Na indústria de alimentos, as enzimas lipolíticas atuam em diversos processos. Algumas dessas aplicações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Algumas aplicações das lipases na indústria de alimentos

Aplicações	Referências
Melhoradores da massa, aumento de volume e estabilidade de produtos de panificação	Melis; Meza Morales; Delcour, 2019
Síntese de produtos fermentados	Gil-Rodríguez; Beresford, 2019
Hidrólise da gordura do leite	Fraga <i>et al.</i> , 2018; Holland <i>et al.</i> , 2005
Interesterificação de óleos vegetais	Tavares <i>et al.</i> , 2017
Produção de compostos que atuam como agentes emulsificantes: ex. monoacilgliceróis	He <i>et al.</i> , 2017
Modificação de ácidos graxos polinsaturados resultando na produção de alimentos com baixa caloria	Moreira <i>et al.</i> , 2017
Produção de ésteres de aroma	Brito <i>et al.</i> , 2020

A falta de regulamentos e leis específicas que assegurem as patentes relacionadas à obtenção das lipases a âmbito mundial, têm sido um fator que retarda o crescimento do mercado para essa enzima. Apesar disso, desde 2018, onde a participação das lipases era de 21%, há prospecção de crescimento até 2026 com uma taxa de 6,1% ao ano (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2021; MARKETS AND MARKETS, 2018; MORDOR INTELLIGENCE, 2020; REPORTS AND DATA, 2020).

## 2.2. Enzimas

Durante o período de 1600 a 1800, as ações de enzimas em tecidos vivos ou respiratórios eram chamadas de “fermentos”. Exemplos que representam os primórdios da enzimologia de alimentos incluem fermentações alcoólicas de leveduras, processos digestivos em animais e malteamento de grãos para a conversão de amido em açúcar. O termo “enzima” foi criado por W. Kühne, em 1878, a partir do termo grego *enzyme*, que significa “na levedura”

(DAMODARAN; PARKIN, 2019). Foi Eduard Buchner que descobriu o processo de fermentação na ausência de células íntegras de leveduras, o que conferiu a ele o Prêmio Nobel de Química em 1907 (REIS, 2017).

Na natureza as enzimas são responsáveis pela catálise de diversas reações químicas que resultam no armazenamento e transformação em energia química, a degradação de nutrientes e síntese de macromoléculas a partir de precursores simples. Quando fora das células, apresentam a função catalítica superior à de catalisadores químicos e inorgânicos, pois possuem elevada especificidade para com os seus substratos (SUN; KAARTINEN, 2020). Na indústria de alimentos as enzimas mais utilizadas são as amilases, proteases, pectinases, oxirredutases e as lipases (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2021).

### **2.2.1. Lipases**

As enzimas triacilglicerol acil-hidrolases (E.C. 3.1.1.3) também denominadas de lipases atuam nas ligações éster carboxílico dos triacilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol (MUTHUKUMAR, 2019). Alguns autores relatam a capacidade de atuação da lipase na interface de meios aquosos e não aquosos (GAO *et al.*, 2018; MUTHUKUMAR, 2019). Citam nesses estudos como a atividade da lipase aumenta na interface lipídio-água devido a capacidade de interação da enzima ao substrato agregado, fenômeno conhecido como ativação interfacial. Algumas lipases possuem uma cadeia de oligopeptídeos, também denominada de “tampa”, que em meio aquoso homogêneo isola o centro ativo da enzima. No entanto, essa barreira se abre em meio hidrofóbico, permitindo o acesso do substrato com o centro ativo da enzima (VERGER, 1997). Essa “tampa” pode ser observada na Figura 1 na estrutura de cor amarela (quando fechada) e vermelha (quando aberta).

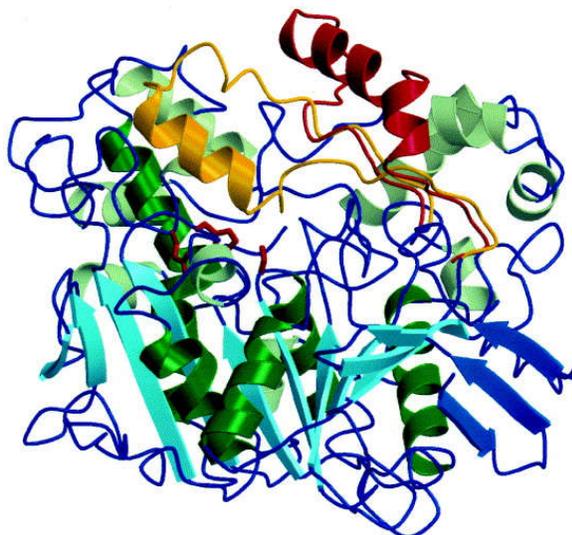


Figura 1. Diagrama da fita da lipase da *Candida rugosa* com a tampa aberta e fechada (sobrepostas). A folha  $\beta$  mista central é azul claro e a folha  $\beta$  N-terminal menor é azul escuro. As hélices que compactam contra a folha  $\beta$  central são verdes escuras. A conformação fechada da tampa é amarela e a conformação aberta é vermelha. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho. Fonte: Cygler e Schrag (1999).

Lipases que possuem a cadeia de oligopeptídeos capaz de bloquear o sítio ativo tem elevada especificidade quando comparada as demais enzimas. Elas podem estar inativas mesmo na presença do substrato, ou seja, há maior controle em sua ação de catálise. No entanto, há a impossibilidade de aplicação em processos onde não haja interface entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas no meio onde se deseja a ação dessa enzima, pois o sítio ativo está bloqueado. Geralmente a atividade das enzimas lipolíticas com a “tampa” é determinada utilizando emulsões de algum óleo vegetal como indutor, permitindo assim a exposição do sítio ativo e a catalisação da hidrólise do substrato (GUTGSELL *et al.*, 2019).

Segundo o modelo (Figura 1) da enzima no trabalho de Cygler e Schrag (1999), os resíduos da serina, histidina e glutamina que formam o sítio ativo estão localizadas próximo ao centro na extremidade mais interna da folha  $\beta$  mista. Esses aminoácidos específicos e seu arranjo espacial dentro do sítio ativo ditam os mecanismos de catálise do estabelecimento/rompimento de ligações e processos de rearranjo atômico (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

As lipases, apesar de serem altamente específicas como catalisadores químico, regio e enantiosseletivos, possuem uma gama de substratos muito diversa. Essas enzimas podem catalisar diferentes reações (

2), como as de hidrólise, esterificação, acidólise, alcoólise, aminólise e interesterificação (CASAS-GODOY *et al.*, 2019; FATIMA *et al.*, 2020; FUJIWARA *et al.*, 2014; RAMOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015).

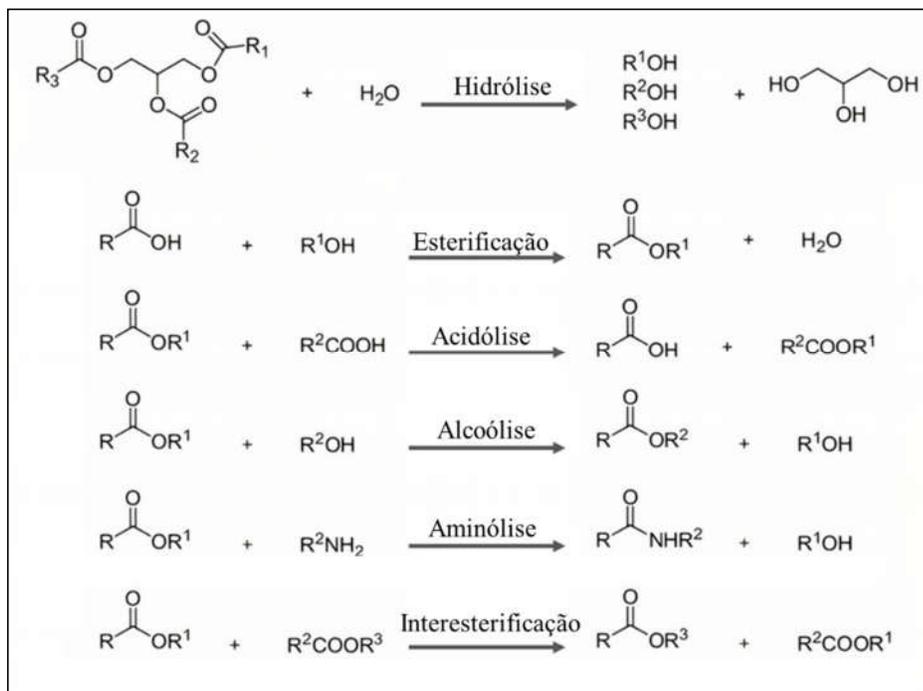


Figura 2. Reações catalisadas por lipases. Fonte: Ramos-Sánchez *et al.*, 2015.

Apesar de variarem de acordo a origem, a estrutura convencional das lipases possui características da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, juntamente com as proteases, peroxidases e esterases. A Figura 3 mostra o esquema da estrutura representativa da lipase. As  $\alpha$  hélices e as  $\beta$  folhas são representadas pelos cilindros brancos e flechas cinza, respectivamente. A localização da tríade catalítica é indicada pelas bolinhas pretas. As linhas pontilhadas apresentam a localização das suas possíveis inserções.

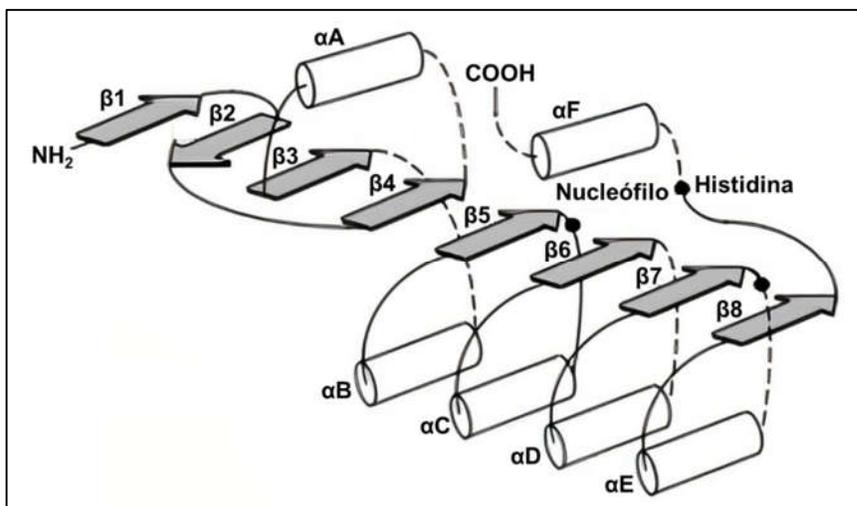


Figura 3. Estrutura convencional das  $\alpha/\beta$  hidrolases. Fonte: Nardini e Dijkstra (1999).

#### 2.2.1.1. Fonte das lipases

Segundo Casas-Godoy *et al.* (2019) as primeiras lipases foram isoladas em 1901 por Eijkman de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. Atualmente elas podem ser purificadas de várias fontes, sendo lipases de microrganismos as mais estudadas. Entretanto, outras fontes de lipases podem ser plantas e animais.

Segundo Patel *et al.* (2020), as lipases produzidas por microrganismos têm ganhado um grande interesse industrial devido facilidade de produção, maior rendimento, além da produção da matéria-prima não ser sazonal. As lipases microbianas geralmente são extracelulares, logo, a composição do meio determina os níveis de produção (RIGO, 2021). Os resíduos agroindustriais geralmente são ricos em compostos nutricionais, e excelentes substratos, contribuindo para a redução do custo de produtos biotecnológicos como as enzimas (THOMAS *et al.*, 2013).

Comercialmente, os microrganismos são a principal fonte dessas enzimas. O risco de contaminações, custos para controle das condições ideais de produção são compensadas pela facilidade de manipulação genética e a disponibilidade de cepas. No entanto, outras fontes enzimáticas são requeridas, uma vez que as características como a especificidade, a cinética e estabilidade variam de acordo a origem da enzima (ANBU *et al.*, 2017).

Segundo Casas-Godoy *et al.* (2019), as lipases pancreáticas e pré-gástricas possuem um sabor amargo ocasionado pelos contaminantes das lipases de origem animal que inviabiliza a

utilização na indústria alimentícia. Todavia são altamente aplicáveis a outros setores industriais. A lipase pancreática suína bruta é uma das lipases mais amplamente empregadas em reações de biotransformação porque é mais barata do que outras lipases microbianas e animais comerciais (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Nas plantas, as lipases estão presentes principalmente nas folhas, óleos, caules, látex e sementes de plantas oleaginosas e cereais (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020). Quando ainda presente nas plantas, as lipases possuem duas funções principais: fornecer energia hidrolisando os óleos armazenados nas sementes e proteção (por exemplo, como agentes antifúngicos (fitopatógenos) (RIVERA; MATEOS-DÍAZ; SANDOVAL, 2012).

As diferentes origens das lipases vegetais resultam na variabilidade das características estruturais e funcionais como é exemplificado na Figura 4. A especificidade dessas enzimas quando de origem vegetal precisa de mais estudos para a otimização da produção e obtenção de informações que permitam a aplicação industrial (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020).

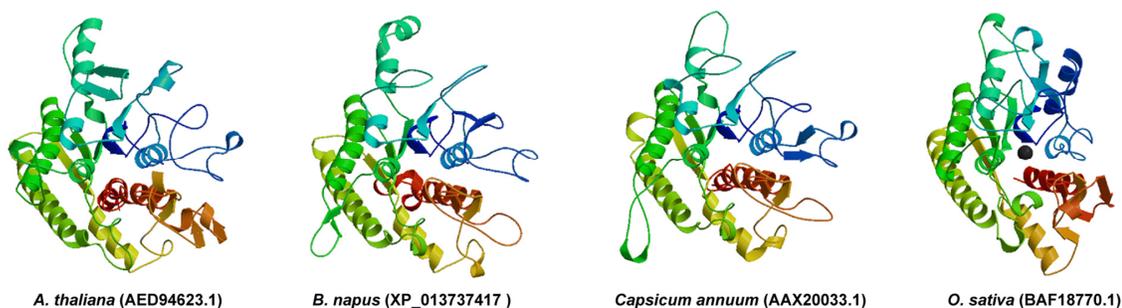


Figura 4. Estrutura terciária das lipases de quatro espécies de plantas diferentes. Verde:  $\alpha$ -hélice; azul: folha  $\beta$ ; vermelho: hélices aleatórias; amarelo: suporte estendido (tampa). Fonte: Ding *et al.* (2019).

### 2.3. Pequi (*Caryocar brasiliense*)

A espécie *Caryocar brasiliense* Cambess é uma planta arbórea da família Caryocaraceae popularmente conhecida como *pequi*. Essa planta é uma das espécies na vegetação nativa do cerrado brasileiro com maior ocorrência nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Pará, Piauí e Ceará (FIGURA 5) (LEÃO *et al.*, 2017; MALACRIDA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2020).

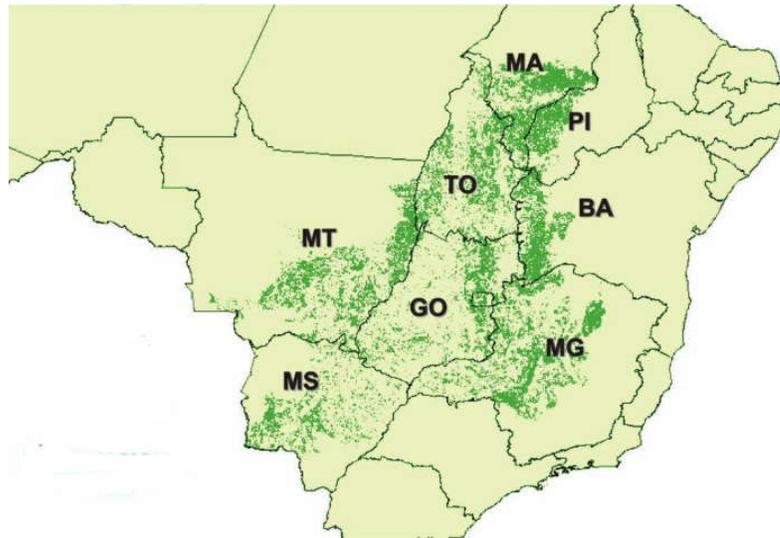


Figura 5. Principais remanescentes de vegetação nativa de Cerrado no Brasil em 2002 (em verde) com maior ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: Londe, 2010.

Devido à incidência do *Caryocar brasiliense* numa grande extensão territorial, além de pequi, outras denominações populares do fruto podem ocorrer. Segundo Lorenzi e Matos, (2008) pode ser conhecido por piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá. O nome pequi tem origem indígena da palavra tupi “*pyqui*”, em que *Py* = casca e *qui* = espinho.

Apesar do extrativismo ser ainda a única forma de cultivo e exploração do pequi, sua utilização deve estar aliada à conservação. Conciliar a utilização dos frutos com o incentivo de conservação pode promover o desenvolvimento econômico e a conservação dos recursos naturais. Atualmente o pequizeiro é uma árvore protegida por lei através da Portaria nº 54 de 03.03.87, do antigo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), hoje Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), que proíbe o corte e comercialização da madeira no território nacional (RODRIGUES, 2005).

O fruto de pequi (Figura 6) é composto por exocarpo (parte externa da epiderme do fruto) e mesocarpo (parte interna da epiderme do fruto), tais partes representam a maior porção do fruto inteiro. Geralmente possui até 06 caroços reniformes em seu interior, compostos por mesocarpo interno (polpa amarela– porção mais consumida do fruto); endocarpo espinhoso e amêndoa, que é revestida por um tegumento fino e marrom, também considerada uma porção comestível do pequi (CARDOSO *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2016).

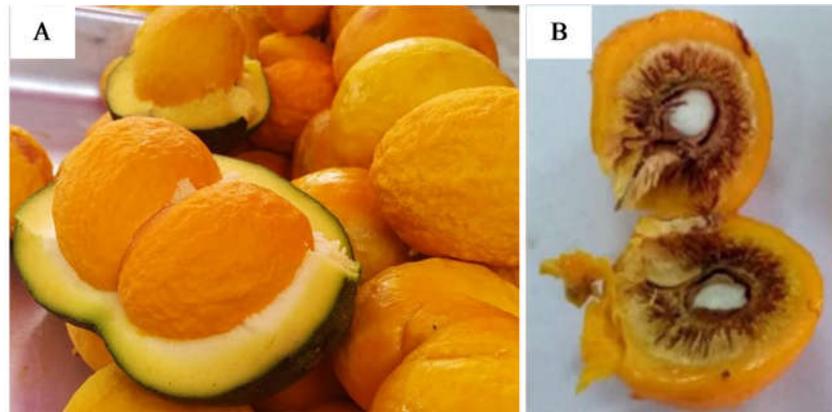


Figura 6. A: Frutos *Caryocar brasiliense* do Mercado Municipal de Salinas-MG, Fonte: A-Autor; B- Endocarpo espinhoso e amêndoa, Fonte: Nascimento, 2020.

Alguns autores relatam as diversas aplicações de todas as partes dos frutos *Caryocar brasiliense* como a produção de óleo vegetal empregado em alimentos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011), complemento alimentar (SOMCHINDA *et al.*, 2018) e cosméticos (FARIA; DAMASCENO; FERRARI, 2014; PIANOVSKI *et al.*, 2008), a utilização da casca para a produção de geleias (SIQUEIRA *et al.*, 2012) e da amêndoa em alimentos (MONTEIRO, 2014; RAMOS *et al.*, 2020).

A casca do pequi é considerada um subproduto agrícola, no entanto muitos estudos (LEÃO *et al.*, 2018; MARIANI *et al.*, 2015; PINHO *et al.*, 2012; REIS FILHO *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2010) demonstram o potencial tecnológico dessa parte do fruto. Ainda assim, regionalmente ela não é explorada como um insumo de valor comercial, sendo fonte de muitos compostos de interesse industrial como as enzimas que estão originalmente em sua estrutura.

#### **2.4. Métodos convencionais para a purificação das lipases**

Dentre as técnicas mais empregadas para purificação de enzimas, pode-se citar precipitação utilizando sulfato de amônio (CARVALHO *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2021; OKINO-DELGADO; PRADO; FLEURI, 2018; SANTOS *et al.*, 2015), acetona ou etanol (OKINO-DELGADO; PRADO; FLEURI, 2018), filtração por membranas (micro, ultra e nanofiltração), extração líquido-líquido (PRABHU *et al.*, 1999; VESCOVI, 2012) e algumas técnicas cromatográficas (GURKOK; OZDAL, 2021; YU *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021). As técnicas de precipitação são rápidas, de simples operação, baixo custo e fácil ampliação de

escala. Entretanto, para se obter um produto final com elevado grau de pureza, geralmente, se faz necessário etapas adicionais (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020).

A separação por membrana é um processo físico que não envolve mudança de fase, apresenta baixo consumo de energia, pequeno volume de sistema e fácil operação. A escolha adequada dos parâmetros do processo pode resultar em altos rendimentos e grau de pureza. No entanto, problemas associados à incrustações na membrana que podem reduzir o fluxo do processo de filtração bem como o custo da membrana são fatores importantes que restringem o desenvolvimento da tecnologia de separação por membrana em aplicações industriais (GAO *et al.*, 2021).

As técnicas cromatográficas como cromatografia de afinidade, de troca aniônica, de interação hidrofóbica e de exclusão molecular são técnicas de alta resolução com elevada seletividade capazes de fornecer alto grau de pureza em uma única etapa ou de forma sinérgica entre duas ou mais etapas cromatográficas, cada uma baseada em um princípio diferente de separação. Entretanto, o alto custo associado ao processo versus um rendimento relativamente baixo são empecilhos que muitas vezes dificultam o emprego dessas técnicas para a obtenção de enzimas destinadas a aplicações em produtos de baixo custo, tornando as demais técnicas preferíveis (ES'HAGHI *et al.*, 2011; FARAJZADEH; SATTARI DABBAGH; YADEGHARI, 2017).

A técnica de extração líquido-líquido (ELL) apresenta alto rendimento, alto grau de purificação, seletividade, combinação entre as etapas de recuperação e de purificação, além de ser uma tecnologia simples e de baixo custo e por isso, é uma operação frequentemente utilizada pelas indústrias em processos de separação, concentração e purificação de compostos de interesse econômico (BATISTA *et al.*, 2020; PIMENTEL *et al.*, 2017; ROSÁRIO *et al.*, 2019). Uma desvantagem que os métodos de ELL convencionais apresentam é a utilização de solventes orgânicos que podem causar problemas ambientais e serem nocivos à saúde humana, pois são tóxicos, inflamáveis e cancerígenos, além de não serem adequados para a separação de moléculas biológicas, que apresentam baixa solubilidade nestes sistemas (ASENJO; ANDREWS, 2011; DA SILVA; LOH, 2006; MAGESTE *et al.*, 2012).

A aplicação das enzimas no processamento de alimentos, fármacos e cosméticos envolve um controle mais rigoroso. Tais compostos, apesar de trazer inúmeros benefícios, necessitam de testes prévios para quantificar sua presença no produto final e para verificação de toxicidades, pois muitas vezes possuem características alergênicas. Além disso, a especificidade de uma única enzima em alguns processos industriais exigem alto grau de

purificação. Essa crescente demanda por biomoléculas com elevado grau de pureza tem chamado a atenção para a pesquisa de novas estratégias para o seu desenvolvimento e produção (CHAVEZ-SANTOSCOY *et al.*, 2010; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020). Técnicas alternativas de purificação têm sido estudadas com o intuito de aumentar a viabilidade da produção de lipases de fontes não-convencionais, visando a obtenção dessas enzimas em um processo rápido, econômico e eficaz. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB), técnica de extração líquido-líquido utilizada no presente trabalho, vêm se destacando como alternativa viável aos métodos convencionais de extração e recuperação de materiais biológicos por apresentar vantagens que serão destacadas posteriormente.

#### **2.4.1. Extração sólido-líquido das lipases de origem vegetal**

A primeira etapa de um processo para obtenção de proteínas de origem vegetal envolve etapas simples de trituração, maceração ou qualquer tipo de fragmentação que permita maior área de contato do solvente (solução tampão, água, etc.) com a célula vegetal. Geralmente alguns desses métodos são executados em junção com agitação ou ondas ultrassônicas para maior exposição dos compostos de interesse (AMID *et al.*, 2016; OKINO-DELGADO; PRADO; FLEURI, 2018).

O efeito dos sais na solubilidade das proteínas é muito utilizado na obtenção do extrato bruto. Esse método está relacionado ao efeito que os solventes promovem na estrutura das moléculas proteicas. A solubilidade de muitas proteínas aumenta em baixas concentrações dos sais, denominado de efeito *salting in*. Segundo Damodaran e Parkin (2019), tal efeito está relacionado com a capacidade de ionização das cadeias laterais livres dissociáveis da molécula quando o meio possui concentração de sal inferior a 0,5 M.

O efeito oposto é denominado de efeito *salting out*, onde a solubilidade das proteínas tende a reduzir com a elevação da concentração de sal. Quando o meio está com a concentração de sal elevada, a hidratação dos íons de sal irá reduzir a disponibilidade de moléculas de água que solvatam as regiões hidrofóbicas da superfície da proteína. Tal efeito ocasiona maior interação proteína-proteína, promovendo a precipitação (GHOSH, 2006; NAJAFPOUR, 2007). Portanto, na extração de algum grupo específico de enzimas, como as lipases, a concentração do solvente, como soluções salinas, é importante para a maior extração das enzimas retidas nas células vegetais.

Outros fatores como a concentração e o tipo de solvente, pH, tempo de extração e temperatura determinam a qualidade final do extrato bruto obtido, ou seja, com maiores valores

de atividade específica. A Tabela 2 traz um levantamento das condições de obtenção do extrato bruto rico em lipases a partir de diferentes vegetais.

Tabela 2. Parâmetros de extração sólido-líquido de lipases de origem vegetal

Fonte	Solvente	pH	T (°C)	Referência
Amêndoa de pequi	Sulfato de amônio 0,1M	7,0	30,0	Nascimento <i>et al.</i> , 2021
Sementes de mamona	Acetona	-	4,0	Corradini <i>et al.</i> , 2019
Sementes de girassol	Acetona + fosfato de potássio 0,05 M	7,5	-20,0	Özacar <i>et al.</i> , 2019
Avelã	Tampão fosfato de sódio 0,1 M + polivinilpirrolidona	5,8	-	Wang <i>et al.</i> , 2018
Sementes de abóbora	Tris-HCL	8,0	-	AMID <i>et al.</i> , 2015b
Sementes de maracujá	Tampão fosfato de sódio 0,1M	7,0	37,0	Santos <i>et al.</i> , 2013
Arroz	Fosfato de potássio 0,05M + cloreto de cálcio 0,0005 M	7,0	10,0	Prabhu <i>et al.</i> , 1999

De acordo o observado na Tabela 2, os solventes utilizados variam muito nesse processo de extração de acordo a fonte de enzimas. As concentrações observadas são sempre baixas, pois promovem o efeito *salting in*. O pH ótimo variou de 5,8 a 8,0. Por causa da estabilidade das enzimas no extrato pode-se observar que as temperaturas verificadas variaram de -20 °C a 30 °C.

#### 2.4.2. Pré-purificação das lipases com SAB

O sistema aquoso bifásico (SAB) é um método de extração líquido-líquido formado por água, componente majoritário, e outros dois ou mais compostos hidrossolúveis incompatíveis em menor concentração. Quando os componentes desses sistemas são combinados sob uma dada concentração crítica resultam na formação de duas fases (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2008).

Esse método foi descoberto e reportado pelo microbiologista holandês Martinus Beijerinck no final do século XIX, que observou a formação de fases ao misturar ágar, gelatina e água. Ele verificou que em determinadas concentrações e temperaturas a solução apresentava turbidez e posterior segregação em fases (LETCHER; SCOTT; PATTERSON, 2015). Tal descoberta possibilitou os estudos de Per-Åke Albertson na aplicação do SAB para partição e extração de biomoléculas nos anos 1950 (ALBERTSSON, 1958). Desde então, a formação de diferentes SAB como polímero-polímero (LEE *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2017), polímero-sal (HERNANDEZ-VARGAS *et al.*, 2019; MASTIANI *et al.*, 2019), álcool-sal (BATISTA *et al.*, 2020; NASCIMENTO, 2020; PIMENTEL *et al.*, 2017), líquido iônico-polímero (CAMÊLO *et al.*, 2021; CLAVIJO *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020), líquido iônico-sal (DIMITRIJEVIĆ *et al.*, 2020; GAO; CHEN; YAN, 2014), sal-surfactante (FIGUEIREDO *et al.*, 2021; SALABAT; TIANI MOGHADAM; RAHMATI FAR, 2010), polímero-surfactante (BADHWAR; KUMAR; DUBEY, 2019; CHANDRALEKHA *et al.*, 2021), líquido iônico-surfactante (LI; LIU; LIN, 2018), surfactante-surfactante (DAI *et al.*, 2015), dentre outras possíveis combinações, vêm sendo estudados.

A utilização dos SAB frente aos métodos de extração líquido-líquido convencionais, tem adquirido grande importância e sucesso progressivo na extração, pré-purificação e purificação de compostos de relevância biotecnológica. Essa técnica possui baixo custo, alta produtividade, simplicidade, separação relativamente rápida, possibilidade de aplicação em grande escala, capacidade de integração de processos e grande apelo ambiental (DOS SANTOS *et al.*, 2020; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; SHOW *et al.*, 2012). Além disso, a presença de elevada quantidade de água (cerca de 60 a 95%) fornece à biomolécula um ambiente ameno, com condições brandas, resultando na manutenção da estabilidade e atividade biológica (DA SILVA; LOH, 2006; SOUSA *et al.*, 2018).

Na literatura é citada a utilização de diferentes SAB com o objetivo de extração, purificação ou concentração de proteínas (AZIZ *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2020;

GONZÁLEZ-AMADO *et al.*, 2021; NASCIMENTO, 2020; PADILHA; OSÓRIO, 2019), carboidratos (CHENG *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2020), antibióticos (JAMSHIDI; PAZUKI, 2018; SANTOS *et al.*, 2011), ácidos nucleicos e DNA (LYU *et al.*, 2019; MASHAYEKHI *et al.*, 2009), fitoquímicos, como flavonoides (CHONG *et al.*, 2020; REQUEJO *et al.*, 2020), além de metais pesados (HAMTA; DEHGHANI, 2017; PAN *et al.*, 2020).

O equilíbrio termodinâmico de um SAB bem como a eficiência o processo de partição de biomoléculas, dependem de fatores como tipo e concentração dos componentes formadores dos sistemas, propriedades de superfície, massa molar do polímero, temperatura, pH, força iônica das soluções salinas e presença de componentes adjuvantes como líquidos iônicos, sais e surfactantes (IQBAL *et al.*, 2016; MAGESTE *et al.*, 2009; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Vários pesquisadores relatam a utilização de SAB para a pré-purificação das lipases, de diferentes origens, pois, além das vantagens dos SAB relativos à eficiência, segurança e baixo custo, muitas vezes essas biomoléculas não são estáveis à variações térmicas e à solventes orgânicos. Portanto foi feito um levantamento de estudos que particionaram as lipases, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Condições (temperatura e pH) para partição de lipases em sistemas aquosos bifásicos (SAB), coeficientes de partição (*K<sub>e</sub>*) e fator de purificação (*FP*)

<b>Origem</b>	<b>SAB</b>	<b>K<sub>e</sub></b>	<b>FP</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Referência</b>
Amêndoa do pequi	Isopropanol / sulfato de amônio	0,053	4,48	25,0	-	Nascimento, 2020
<i>Burkholderia cepacia</i>	PEG 1500 / fosfato de potássio	72,20	26,00	25,0	6,0	Padilha; Osório, 2019
<i>Yarrowia lipolytica</i>	PEG 1500 / fosfato de potássio	19,79	41,79	4,0	6,0	Carvalho <i>et al.</i> , 2017
<i>Enterococcus faecium</i>	PEG 8000 / fosfato dissódico	3,02	2,62	25,0	9,0	Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2016
Sementes de abóbora	Triton X-100 / xylitol	-	16,40	-	8,0	Amid <i>et al.</i> , 2015
<i>Leucosporidium scottii</i>	Triton X-114 / citrato-fosfato	0,13	1,20	25,0	5,1	Duarte <i>et al.</i> , 2015
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tetrahidrofurano / fosfato de potássio	0,10	14,40	25,0	7,0	Souza <i>et al.</i> , 2015
Fruta do dendê	PEG 1000 / fosfato monossódico	6,00	-	-	-	Kimtun <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhodotorula glutinis</i>	PEG 4000 / oxalato de potássio	-	13,90	24,0	6,6	Khayati; Alizadeh, 2013
Pancreática suína	PEG 4000 / fosfato de potássio	0,005	-	25,0	7,0	Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus niger</i>	PEG 4000 / citrato de sódio	0,07	30,50	6,0	5,2	Marini <i>et al.</i> , 2011

Embora a literatura aponte a viabilidade de aplicação dos SAB como um método de purificação ou uma etapa do processo de obtenção de biomoléculas, a exemplo das lipases, a utilização desses sistemas ainda se restringe a processos realizados em bancadas de laboratórios

ou escala piloto (PEREIRA; COUTINHO, 2020). Diante disso, se faz necessário a continuidade de estudos que busquem compreender melhor essa técnica a fim de otimizar o processo de partição visando a ampliação de escala a nível industrial.

## **2.5. Imobilização enzimática**

Apesar de as enzimas apresentarem função catalítica superior à de catalisadores químicos e inorgânicos, a aplicação dessas biomoléculas na forma livre em processos industriais muitas vezes é limitada devido à baixa estabilidade operacional e à dificuldade de separação da enzima dos seus respectivos substratos de reação, impossibilitando sua reutilização em processos contínuos, resultando em aumento de custo e dificuldade de aplicações em larga escala. Com o intuito de superar tais limitações, muitos estudos têm apontado a imobilização em suportes como uma interessante ferramenta para potencializar o uso de enzimas como catalisadores em diversos processos industriais (GONÇALVES *et al.*, 2019; SHELDON; BASSO; BRADY, 2021).

O processo de imobilização promove a interação e/ou aprisionamento físico de uma biomolécula em uma região definida do espaço, denominada suporte. A depender do tipo de imobilização, é possível promover o aumento da atividade catalítica, especificidade e estabilidade da enzima em comparação à sua forma livre e solúvel (GUISAN, 2006; MATEO *et al.*, 2007). Do ponto de vista comercial, essa técnica é interessante por promover aumento da estabilidade operacional, uma vez que a enzima imobilizada apresenta maior estabilidade térmica e frente a agentes como pH e solventes orgânicos (MOTEEVALIZADEH *et al.*, 2015), retenção da atividade catalítica à longo prazo permitindo a reutilização da enzima e condução de processos contínuos, facilidade de interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão do substrato em produto e simples recuperação da enzima ao final do processo (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Em contrapartida, algumas desvantagens devem ser consideradas à respeito dos processos de imobilização de uma enzima. A literatura reporta modificações indesejáveis nas propriedades físicas e químicas, como alterações conformacionais e efeitos estéricos na estrutura nativa, redução da estabilidade e da atividade catalítica e possível desnaturação proteica devido às propriedades de difusão e transferência de massa atreladas aos diferentes processos de imobilização. O custo do suporte também é um fator importante a ser avaliado (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015; MATEO *et al.*, 2007). O conhecimento da natureza da enzima,

do material usado como suporte e a técnica de imobilização auxiliam a superar tais desvantagens.

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como o encapsulamento em matriz ou membrana (MESQUITA *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2019), por ligação cruzada entre a enzima e o suporte (MODENEZ *et al.*, 2018; ORREGO *et al.*, 2018), interação covalente (WU *et al.*, 2015) ou adsorção (ZDARTA *et al.*, 2019). Fatores como características da enzima na forma livre, propriedades finais, eficiência e vida útil requeridas para a enzima imobilizada, custos associados ao processo e toxicidade dos reagentes utilizados na imobilização devem ser levados em consideração para a seleção do método mais adequado. Diante do importante papel tecnológico desempenhado pelas lipases nos diversos setores industriais, estudos voltados ao aprimoramento da técnica de imobilização dessa enzima em suportes que mantenham a sua atividade catalítica têm ganhado destaque (GAO *et al.*, 2018; MESQUITA *et al.*, 2018; VESCOVI, 2012).

#### **2.4.1 Adsorção das lipases**

A adsorção é um dos métodos mais utilizados para imobilizar enzimas por se tratar de um processo simples e eficiente (GONÇALVES, 2020; LIU; CHEN; SHI, 2018). Nesse método ocorre apenas um fenômeno físico de separação por transferência de massa, no qual a enzima presente em uma fase fluida é adsorvida na superfície de um suporte sólido insolúvel meio aquoso, denominado adsorvente. A adsorção ocorre por meio de ligações de baixa energia, como ligações de hidrogênio, forças de Van Der Waals, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas (THOMMES *et al.*, 2015).

A eficiência do processo de imobilização, isto é, a massa de enzima imobilizada e a intensidade das interações adsorvente-adsorbato, é dependente de fatores como características do adsorvente (área superficial, tamanho da partícula, estrutura e morfologia), proporção de concentração enzima/suporte e condições do meio como o potencial hidrogeniônico (pH), que irá determinar o número e natureza das cargas na superfície do suporte e da enzima. Geralmente, observa-se máxima capacidade adsortiva em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico da proteína, uma vez que nessas condições a densidade de cargas líquidas na superfície proteica é nula e os efeitos de repulsão eletrostática intermoleculares são minimizados (VINU; MIYAHARA; ARIGA, 2005). A temperatura possui efeito marcante sobre as força das interações hidrofóbicas. Até uma faixa de 70-80 °C, o aumento da temperatura tende a estabilizar as ligações hidrofóbicas existentes na interface sólido-líquido. Outros parâmetros

como força iônica e natureza do solvente empregado também devem ser levados em consideração (ZHAO *et al.*, 2013).

O aumento da concentração de enzima no meio aumenta a capacidade adsortiva do suporte até atingir um patamar de saturação, influenciando diretamente na eficiência da imobilização do suporte (ZHAO *et al.*, 2013). Sendo assim, o conhecimento da concentração de equilíbrio da enzima de interesse, em solução e adsorvida no suporte, é importante para se otimizar as condições do processo de imobilização. Uma forma de representar essa relação de equilíbrio é por meio das isotermas de adsorção, curvas que descrevem a relação de equilíbrio entre o adsorvato na superfície de um adsorvente e a concentração do adsorvato na fase fluida a uma dada temperatura (YAN *et al.*, 2015)

Adsorventes são partículas sólidas porosas que devem apresentar propriedades específicas em função de sua aplicação em processos adsortivos. Assim, o suporte empregado na imobilização por adsorção exerce influência direta na eficiência do processo (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

A eficiência do processo de imobilização por adsorção é resultado do emprego do suporte adequado que, de um modo geral, devem ser constituídos por materiais resistentes, possuir alta capacidade adsortiva e elevada área superficial (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014). Diversos materiais como carvões ativados, zeólitas, sílicas, biomassas/resíduos, resinas de troca iônica, peneiras moleculares e perovskitas podem ser utilizados como adsorventes (OTHMAN *et al.*, 2018). A seleção do suporte dependerá das características da biomolécula a ser imobilizada além de fatores relacionados à estabilidade física e química, porosidade e tamanho dos poros, área superficial, caráter hidrofílico/hidrofóbico e o custo do material a ser utilizado (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020).

A técnica de imobilização por adsorção em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica tem-se mostrado um método de simples execução e muito eficiente na imobilização, purificação e estabilização de lipases. Estudos reportam o aumento da atividade catalítica e especificidade por substratos hidrofóbicos devido a mudanças conformacionais que tornam o sítio ativo da enzima lipolítica acessível aos substratos (KHAN *et al.*, 2017; KOLLING, 2010; MATEO *et al.*, 2007).

Em condições adequadas, o método de adsorção em matrizes hidrofóbicas promove uma ativação interfacial na lipase, resultando na abertura de sua estrutura e exposição dos seus resíduos hidrofóbicos. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação aberta, disponibilizando o sítio catalítico da enzima (ULKER; GOK; GUVENILIR, 2019).

#### 2.4.2. Carvão ativado como suporte para imobilização de lipase

O carvão ativado (CA) é uma forma microcristalina, não grafitica de carbono que apresentam boa estabilidade química. Esses carbonáceos possuem elevada área superficial (80 a 1200 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) que é proporcional ao número e volume dos poros (DANISH; AHMAD, 2018). Além disso, podem apresentar alguns grupos funcionais em sua superfície ou esses grupos podem ser adicionados (SHAFEEYAN *et al.*, 2010). Os grupamentos químicos, tais como as carboxilas, carbonilas, hidroxilas e fenóis, influenciam diretamente na capacidade de adsorção e na reatividade dos carvões (ANDRADE *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2017; DANISH; AHMAD, 2018).

Devido às suas características químicas e físicas, o CA tem sido considerado um dos suportes com potencial para imobilização enzimática (BRITO *et al.*, 2017; DHAWANE; KUMAR; HALDER, 2018). Para a obtenção desse material são utilizados compostos com alto teor de carbono e baixo teor de inorgânicos, além de resíduos sólidos da agricultura (casca e sementes, madeira e bagaço), que podem resultar em um CA com propriedades adequadas para diversas aplicações. As características do CA variam de acordo o material precursor utilizado e o método de ativação (ANDRADE *et al.*, 2018; NOWICKI *et al.*, 2015).

A utilização do CA como matriz de imobilização enzimática por adsorção é observado em vários estudos nos últimos anos (LEE *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2018), uma vez que essa técnica tem poucos efeitos negativos na atividade e na seletividade das enzimas, além de ser de baixo custo e fácil execução (ZDARTA *et al.*, 2019). Além dessas vantagens, a imobilização nessa matriz, pode reduzir os custos, a nível industrial, por não ser necessário a realização de testes de toxicidade e alergenicidade, além de não ser necessário citar na embalagem a presença das enzimas por não constituir o produto final (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000).

Diante da importância comercial das lipases, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de potencializar a atividade e aplicação utilizando a imobilização em CA (BRITO *et al.*, 2020; ENAYATI *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2019; NAROWSKA; KUŁAŻYŃSKI; ŁUKASZEWICZ, 2020; TORRES *et al.*, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Otimizar as condições de extração de lipases oriundas da casca do pequi, realizar a pré-purificação em sistemas aquosos bifásicos e imobilizá-las em carvão ativado.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Realizar a extração das lipases presentes na casca do pequi;
- Estudar a influência do tempo e do pH do solvente no processo de extração por meio de um esquema fatorial em função das variáveis tempo (min) e pH;
- Caracterizar as lipases presentes no extrato bruto;
- Obter dados de equilíbrio para o sistema aquoso bifásico formado por PEG 1500, fosfato de potássio e água nas temperaturas de 10 e 25 °C;
- Determinar os parâmetros envolvidos na partição da lipase: coeficientes de partição de proteínas ( $K_p$ ) e de atividade enzimática ( $K_e$ ), índice de recuperação teórica (%Y), fator de purificação (FP) e seletividade (S);
- Imobilizar as lipases concentradas pelo SAB utilizando carvão ativado;
- Caracterizar as lipases imobilizadas.

#### 4. REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P. Å. Particle fractionation in liquid two-phase systems The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them application to the isolation of cell walls from microorganisms. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 27, n. C, p. 378–395, 1958.

AMID, M. et al. A novel liquid/liquid extraction process composed of surfactant and acetonitrile for purification of polygalacturonase enzyme from *Durio zibethinus*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 993–994, p. 1–8, 2015a.

AMID, M. et al. A novel aqueous two phase system composed of surfactant and xylitol for the purification of lipase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds and recycling of phase components. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11184–11201, 2015b.

AMID, M. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of pectinase enzyme from guava (*Psidium guajava*) peel: Enzyme recovery, specific activity, temperature, and storage stability. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 91–99, 2016.

ANBU, P. et al. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

ANDRADE, S. N. et al. Chemical-activated carbon from coconut (*Cocos nucifera*) endocarp waste and its application in the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin protein. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 17, n. 2, p. 463–475, 2018.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 141–158, 2007.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.

AZIZ, N. F. H. A. et al. Purification of  $\beta$ -mannanase derived from *Bacillus subtilis* ATCC 11774 using ionic liquid as adjuvant in aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1055–1056, n. April, p. 104–112, 2017.

BADHWAR, P.; KUMAR, P.; DUBEY, K. K. Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

BATISTA, I. DE C. et al. Thermodynamics for curcumin (*Curcuma longa* L.) partitioning in the alcohol–salt aqueous two-phase system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 577–584, 2020.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. May, p. 1163–1169, 2008.

BRITO, M. J. P. et al. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421–428, 2017.

BRITO, M. J. P. et al. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 309, n. June, 2020.

CAMÊLO, L. C. A. et al. Pre-purification of genipin from genipap using aqueous-two-phase systems composed of protic ionic liquids + polymers + water at 298 K and atmospheric pressure. **Separation and Purification Technology**, v. 256, n. September 2020, 2021.

CARDOSO, L. D. M. et al. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3–14, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.

CASAS-GODOY, L. et al. **Lipasas: Un resumen**. [s.l: s.n.]. v. 1908

CHANDRALEKHA, A. et al. A novel method for double encapsulation of C-phycoerythrin using aqueous two phase systems for extension of shelf life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 5, p. 1750–1763, 2021.

CHAVEZ-SANTOSCOY, A. et al. Application of Aqueous two-phase systems for the potential extractive Fermentation of Cyanobacterial products. **Chemical Engineering and Technology**,

v. 33, n. 1, p. 177–182, 2010.

CHENG, Z. et al. Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 75–87, 2017.

CHONG, K. Y. et al. Aqueous two-phase extraction of bioactive compounds from haskap leaves (*Lonicera caerulea*): Comparison of salt/ethanol and sugar/propanol systems. **Separation and Purification Technology**, v. 252, n. July, p. 117399, 2020.

CLAVIJO, V. et al. Aqueous two-phase systems for the recovery and purification of phage therapy products: Recovery of salmonella bacteriophage  $\phi$ San23 as a case study. **Separation and Purification Technology**, v. 211, n. July 2018, p. 322–329, 2019.

CORRADINI, F. A. S. et al. Chemical Engineering Research and Design Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 144, p. 115–122, 2019.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2–3, p. 205–214, 1999.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.

DAI, C. et al. Investigation on the phase behaviors of aqueous surfactant two-phase systems in a mixture of N-dodecyl-N-methylpiperidinium bromide (C12MDB) and sodium dodecyl sulfate (SDS). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 468, p. 322–326, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: 2018, 2019.

DANISH, M.; AHMAD, T. A review on utilization of wood biomass as a sustainable precursor for activated carbon production and application. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 87, n. February, p. 1–21, 2018.

DE OLIVEIRA, E. N. A. et al. Obtenção e caracterização de margarina convencional e light à base de óleo de pequi. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29,

n. 2, p. 294–304, 2011.

DHAWANE, S. H.; KUMAR, T.; HALDER, G. Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 176, n. June, p. 55–68, 2018.

DIMITRIJEVIĆ, A. et al. Further insight into the influence of functionalization and positional isomerism of pyridinium ionic liquids on the aqueous two-phase system equilibria. **Fluid Phase Equilibria**, v. 512, p. 112520, 2020.

DOS SANTOS, K. A. et al. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 94, n. March, p. 116–125, 2020.

DUARTE, A. W. F. et al. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215–225, 2015.

ENAYATI, M. et al. Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. **Food Chemistry**, v. 266, n. June, p. 508–513, 2018.

ES'HAGHI, Z. et al. Fabrication of a novel nanocomposite based on sol-gel process for hollow fiber-solid phase microextraction of aflatoxins: B 1 and B 2, in cereals combined with high performane liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 28, p. 3034–3040, 2011.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065–2082, 2015.

FARAJZADEH, M. A.; SATTARI DABBAGH, M.; YADEGHARI, A. Deep eutectic solvent based gas-assisted dispersive liquid-phase microextraction combined with gas chromatography and flame ionization detection for the determination of some pesticide residues in fruit and vegetable samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 10, p. 2253–2260, 2017.

FARIA, W. C. S.; DAMASCENO, G. A. DE B.; FERRARI, M. Moisturizing effect of a

cosmetic formulation containing pequi oil (*Caryocar Brasiliense*) from the Brazilian Cerrado biome. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 131–136, 2014.

FATIMA, S. et al. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2020.

FIGUEIREDO, M. T. D. et al. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems formed by Triton X-100 surfactant and thiocyanate salts. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, p. 116615, 2021.

FRAGA, J. L. et al. Use of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized in cell debris for the production of lipolyzed milk fat (Lmf). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

FREEDONIA GROUP INCORPORATED. **Global Industrial Enzymes Market**.

FUJIWARA, M. et al. Immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* into calcium carbonate microcapsule and its use for enzymatic reactions in organic and aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 94–100, 2014.

GAO, C. et al. Extraction and preliminary purification of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake using a thermoseparating aqueous two-phase system based on EOPO copolymer and deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 313, n. December 2019, p. 126164, 2020.

GAO, C. L. M. et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth. **Process Biochemistry**, v. 104, p. 142–151, 2021.

GAO, J.; CHEN, L.; YAN, Z. C. Extraction of dimethyl sulfoxide using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 107–116, 2014.

GAO, Z. et al. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. **Process Biochemistry**, v. 64, n. September, p. 152–159, 2018.

GHOSH, R. **Principles of Bioseparations Engineering**. [s.l.] World Scientific Publishing Company, 2006.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M.; BERESFORD, T. P. Lipase inhibitory activity of skim milk

fermented with different strains of lactic acid bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 60, n. June, p. 103413, 2019.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Lipase Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Development Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2021 – 2027**.

GONÇALVES, G. R. F. **Imobilização de lipases em carvões ativados obtidos a partir do caroço de tamarindo e sua aplicação na síntese de butirato de butila**. [s.l.] Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 2020.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, n. October 2018, p. 95–110, 2019.

GONZÁLEZ-AMADO, M. et al. Recovery of lactose and proteins from cheese whey with poly(ethylene)glycol/sulfate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 255, n. June 2020, 2021.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. n. 1, p. 1–13, 2006.

GUO, J. et al. The temperature influence on the phase behavior of ionic liquid based aqueous two-phase systems and its extraction efficiency of 2-chlorophenol. **Fluid Phase Equilibria**, v. 506, p. 112394, 15 fev. 2020.

GURKOK, S.; OZDAL, M. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. **Protein Expression and Purification**, v. 180, n. December 2020, p. 105819, 2021.

GUTGSELL, A. R. et al. Mapping the sites of the lipoprotein lipase (LPL)–angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) interaction provides mechanistic insight into LPL inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 8, p. 2678–2689, 2019.

HAMTA, A.; DEHGHANI, M. R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 20–24, 2017.

HE, Y. et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: Catalytic specificity and parameterization. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 445–456, 2017.

HERNANDEZ-VARGAS, G. et al. Thermo-separating polymer-based aqueous two-phase systems for the recovery of PEGylated lysozyme species. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1105, n. December 2018, p. 120–128, 2019.

HOLLAND, R. et al. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 711–718, 2005.

HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 2, p. 235–246, 2000.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.

JAMSHIDI, S.; PAZUKI, G. Effect of hybrane hyperbranched polymer additive on partitioning of cephalexin antibiotic in aqueous biphasic systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 259, p. 48–54, 2018.

KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. MAR, p. 1–13, 2017.

KHAYATI, G.; ALIZADEH, S. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Fluid Phase Equilibria**, v. 353, p. 132–134, 2013.

KIMTUN, P. et al. **Biodiesel Production Using Lipase from Oil Palm Fruit as a Catalyst**. [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 79

KOLLING, D. J. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DUAS LIPASES MUTANTES DE *Staphylococcus xylosus* E DE UMA ESTERASE DE *Lactobacillus plantarum* IMOBILIZADA EM POLIPROPILENO**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2010.

KUMAR, A. et al. SiO<sub>2</sub> microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an efficient support for enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 359, n. August 2018, p. 1252–1264, 2019.

LEÃO, D. P. et al. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, v. 225, p. 146–153, 2017.

- LEÃO, D. P. et al. Potential of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peels as sources of highly esterified pectins obtained by microwave assisted extraction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 575–580, 2018.
- LEE, J. H. et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. March, p. 100248, 2019.
- LEE, J. M. et al. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems made of polyethylene glycol and gelatin systems and their application in emulsion formation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 508, p. 112441, 2020.
- LETCHER, T.; SCOTT, J.; PATTERSON, D. **Chemical processes for a sustainable future**. [s.l: s.n.].
- LI, F.; LIU, Y.; LIN, W. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing imidazolium ionic liquids and surfactant at low voltage levels. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 372–379, 2018.
- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.
- LONDE, L. N. **Caracterização Molecular e Citogenética de frutos de *Caryocar brasiliense* (Cambess) com e sem espinho no caroço**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, F. DE A. **Plantas Medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas**. 2ª ed. ed. [s.l: s.n.].
- LYU, M. et al. Toward Complete Resolution of DNA/Carbon Nanotube Hybrids by Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 51, p. 20177–20186, 2019.
- MAGESTE, A. B. et al. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623–7629, 2009.
- MAGESTE, A. B. et al. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69–77, 2012.

- MALACRIDA, C. R. et al. Effect of the application of an enzymatic pretreatment on bioactive compounds of Caryocar brasiliense Camb pulp oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 12, p. 1–6, 2018.
- MARIANI, M. et al. Elaboração e avaliação de biscoitos sem glúten a partir de farelo de arroz e farinhas de arroz e de soja Elaboration and evaluation of gluten-free cookies made with rice bran. **Brazilian Journal of Food Techology**, v. 18, n. 1, p. 70–78, 2015.
- MARINI, A. et al. Isolation of a Aspergillus niger lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 22, p. 2135–2141, 2011.
- MARKETS AND MARKETS. **Microbial Lipase Market by Application (Cleaning Agents, Animal Feed, Dairy Products, Bakery Products, and Confectionery Products), Form (Powder and Liquid), Source (Fungi and Bacteria), and Region - Global Forecast to 2023**.
- MASHAYEKHI, F. et al. Concentration of mammalian genomic DNA using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1613–1623, 2009.
- MASTIANI, M. et al. Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System (ATPS) Micro-Droplets for Cell Encapsulation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2020.
- MELIS, S.; MEZA MORALES, W. R.; DELCOUR, J. A. Lipases in wheat flour bread making: Importance of an appropriate balance between wheat endogenous lipids and their enzymatically released hydrolysis products. **Food Chemistry**, v. 298, n. June, p. 125002, 2019.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.
- MESQUITA, M. V. N. et al. Enzymatic immobilizations in polymeric matrixes. **Informative Geum Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 38–50, 2018.

- MODENEZ, I. A. et al. Influence of dlutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from candida antarctica for transesterification of soy bean oil. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.
- MONTEIRO, S. S. Development of biscuits cookie type made with almond pequi. p. 77–82, 2014.
- MORDOR INTELLIGENCE. **Lipase market - growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts**.
- MOREIRA, D. K. T. et al. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 99, n. June, p. 713–719, 2017.
- MOTEVALIZADEH, S. F. et al. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 75–83, 2015.
- MUTHUKUMAR, A. **Microbial Technology for the Welfare of Society**. [s.l: s.n.]. v. 17
- NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.
- NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. [s.l: s.n.].
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: The family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 732–737, 1999.
- NAROWSKA, B. E.; KUŁAŻYŃSKI, M.; ŁUKASZEWICZ, M. Application of activated carbon to obtain biodiesel from vegetable oils. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2020.
- NASCIMENTO, P. A. **Extração de lipase da amêndoa do pequi e purificação parcial por sistemas aquosos bifásicos**. ITAPETINGA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira, 2020.
- NASCIMENTO, P. A. et al. Optimization of lipase extraction from pequi seed ( *Caryocar brasiliense* Camb.) . **Journal of Food Processing and Preservation**, n. April, p. 1–8, 2021.
- NOWICKI, P. et al. Production of activated carbons from biodegradable waste materials as an

alternative way of their utilisation. **Adsorption**, v. 22, n. 4–6, p. 489–502, 2015.

OKINO-DELGADO, C. H.; PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian fruit processing , wastes as a source of lipase and other biotechnological products : a review. v. 90, p. 2927–2943, 2018.

ORREGO, A. H. et al. Stabilization of immobilized lipases by intense intramolecular cross-linking of their surfaces by using aldehyde-dextran polymers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–16, 2018.

OTHMAN, N. H. et al. Adsorption kinetics of methylene blue dyes onto magnetic graphene oxide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2803–2811, 2018.

ÖZACAR, M. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces The novel multi cross-linked enzyme aggregates of protease , lipase , and catalase production from the sunflower seeds , characterization and application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, n. November 2017, p. 58–68, 2019.

PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic Method for Extraction/Purification of a Burkholderia cepacia Lipase with Potential Biotechnology Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1108–1126, 2019.

PAN, Y. et al. A clean and efficient method for separation of vanadium and molybdenum by aqueous two-phase systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113540, 2020.

PATEL, H. et al. Enhanced lipase production from organic solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101731, 2020.

PEREIRA, J. F. B.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous two-phase systems. **Liquid-Phase Extraction**, p. 157–182, 2020.

PIANOVSKI, A. R. et al. Uso do óleo de pequi (Caryocar brasiliense) em emulsões cosméticas: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249–259, 2008.

PIMENTEL, J. G. et al. Evaluation of salting-out effect in the liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub> at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 450, p. 184–193, 2017.

PINHO, L. DE et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de

alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326–331, 2012.

PIRES, J. et al. Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. March, 2020.

PRABHU, A. V et al. Rice Bran Lipase : Extraction , Activity , and Stability. p. 1083–1089, 1999.

RAMAKRISHNAN, V. et al. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19–27, 2016.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B. et al. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 05, n. 02, 2015.

RAMOS, R. DE O. et al. Chemical and antioxidant characterization, sensory and shelf-life analysis of cereal bars with almonds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1–7, 2020.

REIS, L. DOS. **Caracterização bioquímica de duas lipases mutantes de *Staphylococcus xylosus* e de uma esterase de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em polipropileno.** [s.l.] Universidade de Caxias do Sul, 2017.

REIS FILHO, J. et al. Melhoria do valor nutricional do brownie utilizando farinha do mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* camb). **Motricidade**, v. 14, n. 1, p. 196–204, 2018.

REPORTS AND DATA. **Microbial Lipase Market Source (Fungi and Bacteria), by Form (Powder and Liquid), By Application (Cleaning Agents, Animal Feed, Dairy Products, Bakery Products, And Confectionery Products), And Region - Global Forecast To 2026.**

REQUEJO, P. F. et al. Study of Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Based on Ethyl Lactate and Partitioning of Rutin and Quercetin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 48, p. 21196–21204, 2020.

RIGO, D. Produção Microbiológica de Enzimas : uma Revisão Microbiological Production of Enzymes : a Review. p. 9232–9254, 2021.

- RIVERA, I.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; SANDOVAL, G. Em: Sandoval G. (eds) Lipases and Phospholipases. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, v. 861, p. 115–122, 2012.
- ROCHA, L. B. et al. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 592–598, 2015.
- RODRIGUES, L. J. O PEQUI ( *Caryocar brasiliense* Camb .): CICLO VITAL E AGREGAÇÃO DE VALOR PELO PROCESSAMENTO MÍNIMO. **Universidade Federal de Lavras**, p. 152, 2005.
- RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; ORREGO, C. E. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 787–806, 2020.
- ROSÁRIO, R. L. S. F. et al. Acetonitrile as adjuvant to tune polyethylene glycol+K3PO4 aqueous two- phase systems and its effect on phenolic compounds partition. **Separation and Purification Technology**, v. 223, n. April, p. 41–48, 2019.
- SALABAT, A.; TIANI MOGHADAM, S.; RAHMATI FAR, M. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems composed of TritonX-100 and sodium citrate or magnesium sulfate salts. **Calphad: Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry**, v. 34, n. 1, p. 81–83, 2010.
- SANTOS, T. C. DO et al. Effect of Solid State Fermentation on Nutritional Content and Evaluation of Degradability in Cactus Pear. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 248–254, 2015.
- SANTOS, K. C. et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, 2013.
- SANTOS, V. C. et al. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1–2, p. 75–83, 2011.
- SHAFEEYAN, M. S. et al. A review on surface modification of activated carbon for carbon dioxide adsorption. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 89, n. 2, p. 143–151, 2010.
- SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: Robust

biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.

SHOW, P. L. et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 226–233, 2012.

SIQUEIRA, B. DOS S. et al. Extracted pectin of “pequi” peel and application in light mango jam. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 560–567, 2012.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. **Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 79

SOARES, M. S. et al. Development and chemical characterization of four obtained from the external mesocarp of “pequizeiro” fruit. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 949–954, 2010.

SOMCHINDA, A. et al. Prospecção Tecnológica Da Produção De Cápsulas Gelatinosas De Polpa De Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb) Como Um Novo Nutracêutico. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 2, p. 615, 2018.

SOUSA, R. DE C. S. et al. Evaluation of the effect of ionic liquids as adjuvants in polymer-based aqueous biphasic systems using biomolecules as molecular probes. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 244–253, 2018.

SOUZA, R. L. et al. Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1459–1467, 2015.

SUN, H.; KAARTINEN, M. T. Assessment of expression and specific activities of transglutaminases TG1, TG2, and FXIII-A during osteoclastogenesis. **Analytical Biochemistry**, v. 591, n. September 2019, p. 113512, 2020.

TAN, Z. et al. Chiral separation of mandelic acid enantiomers using an aqueous two-phase system based on a thermo-sensitive polymer and dextran. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 382–387, 2017.

TAVARES, G. R. et al. Enzymatic interesterification of crambe oil assisted by ultrasound.

**Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 218–223, 2017.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

TORRES, J. A. et al. Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1279–1287, 2018.

TORRES, L. R. DE O. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of canned pequi pulp (*Caryocar* spp). **Científica**, v. 44, n. 4, p. 493, 2016.

ULKER, C.; GOK, Z.; GUVENILIR, Y. Performance comparison of commercial and home-made lipases for synthesis of poly( $\delta$ -valerolactone) homopolymers. **Journal of Renewable Materials**, v. 7, n. 4, p. 335–343, 2019.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VESCOVI, V. Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. 2012.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: Influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 13, p. 6436–6441, 2005.

WANG, W. et al. Investigation of drying conditions on bioactive compounds, lipid oxidation, and enzyme activity of Oregon hazelnuts (*Corylus avellana* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. August 2017, p. 526–534, 2018.

WU, J. C. Y. et al. Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 83–90, 2015.

YAN, F. et al. Determination of adsorption isotherm parameters with correlated errors by measurement error models. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 921–930, 2015.

YU, C. WEI et al. Purification, identification, characterization and catalytic mechanism of two lipases from rice bran (*Oryza sativa*). **Lwt**, v. 140, n. 235, p. 110693, 2021.

ZDARTA, J. et al. Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107401, 2019.

ZHANG, C. et al. Laccase immobilization and surface modification of activated carbon fibers by bio-inspired poly-dopamine. **RSC Advances**, v. 8, n. 26, p. 14414–14421, 2018.

ZHAO, J. et al. Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-D butyl ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 126–136, 2021.

ZHAO, X. et al. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4–5, p. 226–233, 2013.

ZHOU, Y. J. et al. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 926, p. 77–82, 2013.

ARTIGO 1

**Otimização da extração e caracterização das lipases obtidas da casca do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).**

---

## RESUMO

Neste trabalho foi otimizada a extração sólido-líquido da lipase presente na casca do pequi, sendo empregada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), a qual abrangeu o delineamento composto central rotacional (DCCR), como ferramentas estatísticas para identificar as melhores condições (tempo e pH da solução extratora) para obtenção do extrato com maior valor da atividade lipolítica (U/mg). O tempo de extração e o pH do meio apresentaram efeito significativo na variável resposta, sendo obtida uma atividade máxima de  $\approx 189,55$  U/mg nas condições otimizadas. O extrato obtido foi caracterizado quanto à máxima capacidade catalítica da reação de hidrólise ( $CCRH_{m\acute{a}x}$ ) variando o pH (4-10) e a temperatura (30-80 °C). Também foi verificada a estabilidade da enzima quanto à variação de pH (4-10) combinado às temperaturas de 30, 40 e 50 °C em função do tempo (0-180 min.). A  $CCRH_{m\acute{a}x}$  ( $3911,18 \pm 28,28$  U/mg) foi observada no pH 5 e na temperatura de 60 °C e a estabilidade enzimática (atividade relativa  $\geq 60\%$ ) na faixa de pH 5-7 em até 180 minutos. Os estudos dos parâmetros cinéticos velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), cujos valores foram respectivamente  $197,85 \pm 6,64$   $\mu\text{Mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e  $0,12 \pm 0,02$   $\text{mMol mL}^{-1}$ , demonstraram que as lipases possuem boa flexibilidade e difusividade em relação ao complexo enzima-substrato de acordo a literatura. Portanto, o planejamento experimental utilizado para a extração foi eficiente e o modelo encontrado pela superfície de resposta representa os valores empíricos obtidos.

**Palavras-chave:** Enzima vegetal, protease, termoestabilidade.

## ABSTRACT

To obtain a crude extract rich in lipases, a study was carried out to optimize the extraction conditions (time and pH of the extractor solution) and to characterize these enzymes present in the pequi peel. The response surface methodology (RSM), which encompassed the central composite rotational design (CCRD), was used to identify the best conditions for extracting lipases from pequi peel. Therefore, a response surface region was described from the factors pH of the extraction solution and the extraction time to obtain the extract with the highest value of lipolytic activity. Thus, it was possible to obtain the maximum extraction of lipases at pH 8 and in a time of 44 minutes ( $\approx 189.55$  U/mg). The crude extract obtained was characterized for maximum catalytic capacity of the hydrolysis reaction ( $CCHR_{max}$ ) by varying the pH (4-10) and temperature (20-90 °C). The stability of the enzyme was also verified in terms of pH variation (5-10) and as a function of time (0-180 min.).  $CCRH_{max}$  ( $3911.18 \pm 28.28$  U/mg) was observed at pH 5 and at a temperature of 60 °C and enzyme stability (relative activity  $\geq 60\%$ ) at pH 5-7 range within 180 minutes. The studies of the kinetic parameters maximum velocity ( $V_{max}$ ) and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ), whose values were respectively  $197.85 \pm 6.64$   $\mu\text{Mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  and  $0.12 \pm 0.02$   $\text{mMol mL}^{-1}$ , demonstrated that lipases have good flexibility and diffusivity in relation to the enzyme-substrate complex, according to the literature. Therefore, the experimental design used for the extraction was efficient and the model found by the response surface represents the empirical values obtained.

**Keywords:** Plant enzyme, protease, thermostability.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas terrestres, desde as que emergiram das primícias Streptophytas há pouco mais de 500 milhões de anos, utilizam de seus sistemas metabólicos para obter produtos químicos e polímeros naturais estrutural e funcionalmente diversos para se adaptar a ecossistemas desafiadores (MORRIS et al., 2018). Nessas vias metabólicas, as enzimas são responsáveis pela catálise de múltiplas reações para o desenvolvimento e adaptação. Dentre elas as lipases, que se concentram principalmente nas folhas, óleos, caules, látex e sementes de plantas oleaginosas e cereais (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020).

Ao contrário das lipases de origem microbiológica e animal, as plantas retêm as lipases clássicas e com estruturas e sítios ativos mais flexíveis. Portanto, a origem vegetal e o processo de extração podem resultar em hidrólises com substratos específicos ou amplamente diversos e propriedades multifuncionais (SHEN et al., 2022).

Os extratos enzimáticos obtidos de fontes vegetais apresentam a vantagem de não necessitar de etapas complexas de isolamento e purificação, resultando em uma redução nos custos de produção, o que os tornam alternativa interessante para a indústria (ANTUNES *et al.*, 2017; KAPOOR; GUPTA, 2012). As diferentes origens das lipases vegetais apresentam variabilidade de suas características estruturais e funcionais, resultando em diferentes especificidades. Sendo assim, é necessário a realização de mais estudos que visem a otimização de produção de lipases e obtenção de informações que permitam a aplicação industrial (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020).

A espécie *Caryocar brasiliense* Cambess é uma planta arbórea da família Caryocaraceae popularmente conhecida como pequi. Essa planta é uma das espécies na vegetação nativa do cerrado brasileiro com maior ocorrência nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Pará, Piauí e Ceará (LEÃO *et al.*, 2017; MALACRIDA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2020). Alguns autores relatam as diversas aplicações de todas as partes dos frutos *Caryocar brasiliense* como a produção de óleo vegetal empregado em alimentos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011), complemento alimentar (SOMCHINDA *et al.*, 2018) e cosméticos (FARIA; DAMASCENO; FERRARI, 2014; PIANOVSKI *et al.*, 2008), a utilização da casca para a produção de geleias (SIQUEIRA *et al.*, 2012) e da amêndoa em alimentos (MONTEIRO, 2014; RAMOS *et al.*, 2020). A casca do pequi é considerada um subproduto agrícola, no entanto muitos estudos (LEÃO et al., 2018; MARIANI et al., 2015; PINHO et al., 2012; REIS FILHO et al., 2018; ROCHA et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2012;

SOARES et al., 2010) demonstram o potencial tecnológico dessa parte do fruto como fonte de enzimas originalmente presentes em sua estrutura, como as lipases.

Geralmente, extração sólido-líquido é o primeiro passo no processo de obtenção de proteínas de origem vegetal, essa técnica se baseia no efeito que a concentração dos solventes promovem na estrutura das moléculas. A solubilidade de muitas proteínas aumenta em baixas concentrações dos sais, efeito denominado *salting-in*. Segundo Damodaran e Parkin, (2019), tal efeito está relacionado com a capacidade de ionização das cadeias laterais livres dissociáveis da molécula quando o meio possui concentração de sal inferior a 0,5 M. A eficiência desse método depende de fatores, como concentração e tipo de solvente, temperatura, pH, tempo de reação e presença de aditivos (GHOSH, 2006; NAJAFPOUR, 2007).

Como mencionado anteriormente, o estudo de novas fontes de obtenção de lipases para possível aplicação industrial é interessante do ponto de vista biotecnológico. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo de otimização das condições de extração (tempo e pH da solução extratora) das lipases presentes na casca do pequi e caracterização das lipases obtidas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo da casca do pequi e do extrato**

Os frutos, cujas cascas foram utilizadas no experimento, foram obtidos no comércio local de Salinas-MG. Após, foram sanitizados em água clorada (200 ppm) por 15 minutos, e abertos com faca de aço inoxidável. As cascas de pequi cortadas com tamanho aproximado de 3 cm x 3 cm x 1 cm foram acondicionadas em estufa de circulação de ar (SL 102; Solab) a 50°C por 18h (condições que favoreceram a trituração, 9% b.s). Depois de secas foram trituradas em moinho de facas do tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) com granulometria menor que 9 mesh.

Para o preparo do extrato, foram pesados 1g de farinha em tubos de centrífuga e 10g de solução fosfato de sódio 0,1 mol/L. Para ajuste do pH das soluções, utilizou-se proporções adequadas de fosfato de sódio monobásico e bibásico e conferidas com auxílio de pHmetro. Os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e em seguida no banho ultrassônico. Após o tempo de extração (determinado na Tabela 1), os tubos foram submetidos à centrifugação (3250 G à 4 °C).

## 2.2. Determinação da composição química centesimal da farinha da casca de pequi

Os teores de umidade, cinzas, proteínas totais e lipídeos foram determinados de acordo com a AOAC (2007), sendo o teor de carboidratos definido pela diferença em relação aos demais componentes da farinha.

## 2.3. Otimização das condições para a obtenção do extrato rico em lipases

As condições ideais para a obtenção do extrato rico em lipases foram determinadas pela metodologia de superfície de resposta (MSR), que englobou o delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>). As variáveis independentes estudadas foram o tempo de extração e pH (Tabela 1) em função da variável resposta de AE. O delineamento possui 1 ponto central, 4 pontos fatoriais e 6 pontos axiais, totalizando 9 tratamentos com 3 repetições para cada ponto.

Os níveis dos pontos axiais utilizados foram do tipo  $\pm \alpha$ , onde  $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS STUDIO (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) versão para estudante.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados segundo o delineamento experimental (DCCR) 22

Variáveis	Símbolos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo (minutos)	X <sub>1</sub>	2	10	30	50	58
pH	X <sub>2</sub>	4,5	5,0	6,3	7,6	8,1

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo empírico de regressão polinomial de segunda ordem (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1^2 + \beta_3 X_2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde Y são os valores previstos,  $\beta_0$  é a intercessão,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são coeficientes de regressão para termos lineares, quadráticos e de interação, respectivamente, X<sub>i</sub> e X<sub>j</sub> são variáveis independentes que afetam a resposta.

Após análise dos resultados, foi observado uma tendência nas superfícies de resposta de forma que não fosse possível prever o ponto ótimo de extração. Portanto, o procedimento foi

repetido deslocando a faixa de pH e aumentando a faixa de tempo como demonstra a distribuição das variáveis na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no delineamento experimental (DCCR) 22, para otimização da extração de lipases da casca de pequi após estudo prévio

Variáveis	Símbolos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo (minutos)	X1	9,7	20,0	45,0	70,0	80,3
pH	X2	6,6	7,0	8,0	9,0	9,4

### 2.3.1. Validação do modelo

O modelo foi validado utilizando as condições em que os parâmetros resultam em atividade específica máxima calculada. Outras três variações aleatórias dentro da faixa de pH e tempo estudadas também foram verificados em relação aos seus valores de AE calculados. Assim, para a validação houve a comparação entre os valores calculados e os valores empíricos.

### 2.4. Determinação do teor de proteínas do extrato

A concentração de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como referência para curva padrão de calibração.

### 2.5. Determinação da atividade hidrolítica das lipases

A atividade hidrolítica das lipases no extrato e nas etapas de purificação foi determinada conforme a metodologia proposta por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações, utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (p-NPP). O meio reacional é denominado solução C, composto pelas soluções A e B. A solução A consiste em 162,0 mg de p-NPP dissolvidos em 30,0 mL de isopropanol; para o preparo da solução B 9,0 g de Triton X-100 e 0,90 g de goma arábica são dissolvidos em 450 mL de tampão Tris-HCl 0,09 mol/L, pH 8,0.

Em 0,5 mL da solução C a 37 °C mantida por 10 minutos em banho termostático, foi adicionado 50 µL do extrato e 450 µL da mesma solução utilizada na extração (fosfato de sódio monobásico/ bibásico 0,1 mol/L) no pH 8,0 por 15 minutos. Depois desse

tempo, os tubos contendo a solução foram colocados em banho com água em ebulição ( $\approx 100$  °C) por 7 minutos. Com os tubos ainda no banho, foi adicionado à cada tubo 0,5 mL de solução do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mol/L. Os tubos foram resfriados com água corrente. A curva analítica foi construída utilizando p-Nitrofenol palmitato como padrão, com leituras realizadas no comprimento de onda de 410 nm.

Uma unidade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-Nitrofenol por mL por minuto nas condições descritas. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada a Equação 2.

$$U/mL = \frac{C_{pN} \cdot FD \cdot V_T}{V_E \cdot t} \quad (2)$$

Onde  $C_{pN}$  é a concentração de p-Nitrofenol ( $\mu\text{mol}$ ) liberado por mL;  $FD$  é o fator de diluição;  $V_T$  é o volume total de reação;  $V_E$  é o volume de extrato enzimático;  $t$  é o tempo de reação (minutos).

Por fim, a atividade enzimática específica (U/mg) foi obtida através da razão entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteína (mg/mL), conforme a Equação 3.

$$AE = \frac{U/mL}{mg/mL} \quad (3)$$

A atividade relativa (AR) foi calculada a partir do maior resultado de AE observado, onde esse valor é 100% e os demais são relativos à ele.

$$AR (\%) = \frac{\text{Valor de AE de outra amostra}}{\text{Maior valor de AE}} \cdot 100 \quad (5)$$

## 2.6. Caracterização das lipases do extrato

O extrato a ser caracterizado foi obtido após a otimização do processo de extração, utilizando os parâmetros ideais (pH 8,0 e o tempo de 44 minutos) estimados pelo modelo empírico de regressão.

### 2.6.1. pH e temperatura de hidrólise

A influência do pH na atividade de hidrólise das lipases foi avaliada diluindo o extrato na proporção 1:9 (v/v) nos tampões acetato de sódio/ácido acético 0,1 mol/L, pH 4,0 e 5,0; fosfato de potássio/ácido fosfórico 0,1 mol/L, pH 6,0 e 7,0; Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0 e 9,0 e bicarbonato de sódio/hidróxido de sódio 0,1 mol/L para o pH 10,0 (CARVALHO et al., 2020;

NASCIMENTO et al., 2021). A atividade foi determinada de acordo a metodologia descrita no tópico 2.5, no entanto diferentes soluções B foram preparadas, onde o tampão Tris-HCl 0,09 mol/L (pH 8,0) foi substituído pela solução tampão equivalente a cada pH, na concentração de 0,09 mol/L.

O efeito da temperatura na atividade máxima foi realizado variando a temperatura (30 °C a 70 °C) de incubação seguindo a mesma metodologia de determinação de atividade enzimática. O pH utilizado (solução B e diluição da amostra) foi o de maior valor de atividade enzimática (U) no estudo da influência do pH.

### **2.6.2. Influência do pH e temperatura na estabilidade**

Para o teste de estabilidade variando o pH, o extrato enzimático foi diluído na proporção 1:9 (v/v) em tampões (0,1mol/L) assim como no item 2.6.1. A atividade residual (U) da lipase foi medida nos pH 5,0-10,0, seguindo o ensaio padrão, após o tempo de incubação variando de 0 a 180 minutos à 30, 40 e 50°C.

Para determinação da termoestabilidade, o extrato foi diluído em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 8 (pH ótimo do extrato otimizado) e incubados em temperaturas variando de 35 a 80 °C. O tempo de incubação variou de 0 a 180 min, após o qual foi imediatamente resfriado em gelo para subsequente determinação da atividade de lipase residual (%), conforme descrito no item 2.6.

### **2.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos**

Para verificar o efeito da concentração de substrato sobre a atividade hidrolítica das lipases presentes no extrato, a concentração de p-Nitrofenil palmitato variou na faixa de 0,1 a 2,1 mMol/L. Os parâmetros cinéticos  $V_{m\acute{a}x}$  (velocidade máxima) e constante de Michaelis ( $K_m$ ) foram estimados a partir da equação de Michaelis-Menten sem linearização (JOHNSON; GOODY, 2011). Os parâmetros foram obtidos através do ajuste da curva pelo software SigmaPlot 11.0.

### **2.6.4. Identificação da proteína por eletroforese SDS-PAGE e zimograma**

O extrato foi submetido à técnica de eletroforese por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) sob condições desnaturantes para acompanhamento qualitativo das moléculas presentes (CUTLER, 2004). A desnaturação das amostras ocorreu a partir de sua adição em tampão de

desnaturação (Tris-HCl pH 6,8, 4% m/v de SDS, 4% v/v de 2-mercaptoetanol, 20% v/v de glicerol e azul de bromofenol) na proporção 1:1.

O gel de poliacrilamida foi polimerizado com um gel de separação de 15% e um gel de empilhamento de 5%, seguido de adição de 30 µL de amostra (desnaturada e centrifugada) em cada poço e posterior acréscimo de tampão do eletrodo para cobri-los completamente. A corrida obteve duração de 180 minutos em uma voltagem de 100 V. Por fim, o gel foi retirado das placas de vidro e imerso em solução corante com 0,1% de azul de Coomassie brilliant G- 250, metanol, água e ácido acético na proporção 5:4:1 e descorado com a mesma solução sem o azul de Coomassie. As massas moleculares dos componentes presentes na amostra foram determinadas utilizando-se marcador de peso molecular com bandas entre 24 e 200 kDa. O gel resultante foi digitalizado em escaner para documentação em foto.

A verificação da presença de proteases no extrato foi realizada em eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com o método modificado de García-Carreno; Dimes e Haard (1993). À água utilizada na preparação do gel foi adicionada gelatina (1%) e caseína (0,2%). A amostra não foi submetida ao aquecimento como na eletroforese. Após a corrida, o gel foi submerso duas vezes em Triton X-100 2 %, com agitação por 30 minutos para remoção do SDS. Posteriormente o gel foi incubado em por 48 horas no Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0 a 37 °C. Finalmente, o gel foi corado com 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R250 com uma solução de 40 % de etanol e 10 % de ácido acético e descorado com uma solução de 5 % de etanol e 7,5 % de ácido acético. O desenvolvimento de zonas claras no fundo azul do gel indica a presença de atividade de protease.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Composição química centesimal da casca de pequi**

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de alguns constituintes da casca seca do pequi (9% b.s).

Tabela 3. Composição química centesimal da casca do pequi expressas em matéria seca

<b>Constituintes</b>	<b>g/100g de amostra seca</b>
Carboidratos	91,56 ± 0,01
Cinzas	2,25 ± 0,03
Lipídios	1,57 ± 0,10
Proteínas	4,62 ± 0,07
Umidade	8,67 ± 0,75

A constituição de cinzas, lipídios e proteínas, observadas na Tabela 3, foram as que mais se aproximaram dos resultados visualizados na literatura (CAMPOS et al., 2016; LIMA et al., 2017). A divergência dos demais componentes pode ter ocorrido devido à variabilidade genética, propagação por sementes do pequizeiro, condições de cultivo (solo, clima, época de colheita) e variações nas metodologias utilizadas (tempo, velocidade e temperatura do ar de secagem) (CESTINO, 2010; DAMIANI et al., 2013).

O indicativo de enzima mediante a composição foi analisada por Maia da Silva et al. (2016). Eles avaliaram o potencial de enzimas lipolíticas presentes na casca de laranja da terra na hidrólise de ésteres aromáticos. Os resultados foram promissores na capacidade catalítica em reações de redução/oxidação, hidrólise/esterificação. A casca do pequi assim como a da laranja são constituídos em sua grande maioria por carboidratos, todavia, o reduzido teor de proteínas e lipídeos não são indicativos da ausência de enzimas lipolíticas.

Nos frutos, as enzimas lipolíticas geralmente estão relacionadas às vias metabólicas que resultam no amadurecimento, amolecimento da casca e produção de aromas. Nesse processo natural da planta, o conteúdo lipídico (1,57%) do mesocarpo externo e o percentual de proteínas (4,62%) do pequi podem indicar a presença de lipases, devido a participação dessa enzima nas funções fisiológicas da planta que promove a hidrólise de lipídeos em compostos voláteis, contribuindo para a produção do aroma natural. Assim, ocorre a hidrólise enzimática dos triacilgliceróis presentes nos corpos oleíferos (oleossomos) do mesocarpo interno (polpa) e externo (casca) do pequi (DIN et al., 2021). Os testes realizados nos próximos tópicos confirmam a presença dessas enzimas.

### 3.2. Otimização da obtenção do extrato

O planejamento experimental DCCR e a análise de superfície de resposta foram utilizadas para verificar a influência e a interação das variáveis pH e tempo para a obtenção da máxima AE. A AE representa a atividade hidrolítica das lipases (U/mL) presentes no extrato em razão das proteínas totais extraídas no processo (mg/mL). A Tabela 4 resume os fatores e níveis utilizados em cada um deles, e a matriz dos tratamentos projetados com a resposta AE.

Tabela 4. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) na otimização da extração de lipases da casca de pequi e atividade específica (AE) enzimática

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis		AE
	X1	X2	pH	Tempo	(U/mg)
1	-1	-1	7,00	20,00	79,37
2	-1	1	7,00	70,00	62,54
3	1	-1	9,00	20,00	80,36
4	1	1	9,00	70,00	64,81
5	-1,41	0	6,59	45,00	47,04
6	1,41	0	9,41	45,00	48,04
7	0	-1,41	8,00	9,64	90,21
8	0	1,41	8,00	80,35	86,71
9	0	0	8,00	45,00	163,41
9	0	0	8,00	45,00	171,37
9	0	0	8,00	45,00	241,85

A Tabela 5 mostra o teste ANOVA para AE resposta. O valor de F do modelo (13,44) é estatisticamente significativo e existe apenas uma probabilidade inferior a 0,05 de que o valor de F seja devido ao efeito aleatório do erro ou resíduo experimental.

Tabela 5. Análise de variância dos parâmetros da função para a extração das lipases da casca do pequi variando temperatura e pH (CV =24,54% e R2=90,00%)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>f</b>	<b>P</b>
Tratamento	4	34497,00	8624,254	13,44	0,0001
Erro	6	3850,927	641,819		
Total	10	38348,00			
F tabelado ( $\alpha=5\%$ )				7,50	

Além disso, os termos pH e t (tempo) foram significativos para o modelo. De acordo com o procedimento de regressão de superfície de resposta, a AE enzimática foi relacionada às condições de extração estudadas a partir de equações (5 e 6).

$$AE = 4538,1369 + 1142,8456\text{pH} + 7,1474t - 71,39125\text{pH}^2 - 0,08149t^2 \quad (5)$$

$$AE = 192,2071 + 0,5856X_1 - 4,66412X_2 - 71,39125X_1^2 - 50,93043X_2^2 \quad (6)$$

O modelo gerado (Equação 5 ou 6) apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) razoável de 90,00%. Esse valor representa a qualidade do ajuste, pois determina a proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total da resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A metodologia de superfície de resposta engloba um conjunto de técnicas e é empregada na investigação da relação e interação de variáveis independentes nas variáveis resposta, envolvendo modelos matemáticos e técnicas estatísticas (BEZERRA *et al.*, 2008). A Figura 1 mostra um gráfico gerado pela metodologia de superfície de resposta construída com base no modelo (Equação 5) obtido pela regressão dos dados no DCCR. A partir da interação das variáveis estudadas, observa-se o valor máximo de AE (192,2 U/mg) das lipases próximo à região central do gráfico.

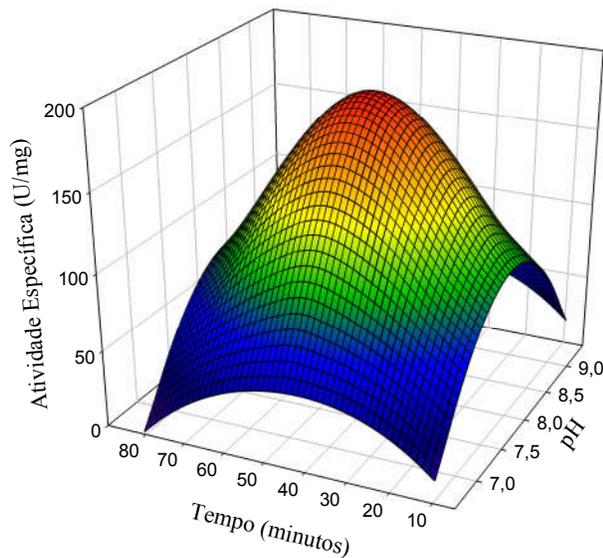


Figura 1. Superfície de resposta para atividade específica enzimática em função do tempo e do pH.

Ao todo, este modelo significativamente ajustado ( $P < 0,001$ ) indica que a extração enzimática depende em grande parte do pH, seguido pelo tempo em banho ultrassônico.

A partir da derivação da Equação 5 foi determinada a condição ideal de extração (189,55 U/mg), sendo o pH 8,00 e o tempo 44 minutos. Na faixa de pH (7,0 a 9,0) e tempo (10 a 80 minutos) estudados, os menores valores podem ter promovido a protonação parcial dos resíduos glutâmico e aspártico presentes na lipase, sem alteração no estado iônico carregado dos resíduos aminados. Isso resultou na baixa solubilização da proteína no tampão de extração. Combinando tempos elevados (>40 minutos) e pH mais alcalinos (8,5 e 9,0) foi observado a redução da atividade, ou seja, houve a desnaturação enzimática.

Aplicando as condições ótimas (pH 8,00 e o tempo 44 minutos), foram realizados testes para verificar a precisão do modelo por meio da validação.

### 3.2.1. Validação do modelo

Para confirmar a validação do modelo gerado pela regressão do DCCR de extração, o ponto máximo da AE estimada e outras três condições de parâmetros de extração foram testadas aleatoriamente conforme tabulado em Tabela 6.

Tabela 6. Conjunto de validação para o ponto máximo da atividade específica (AE) estimada e outras três condições de parâmetros de extração de lipases da casca de pequi

Conjunto de validação	Variáveis		AE (U/mg)	
	pH	Tempo	Calculado	Experimental
AE máximo	8,0	43,85	192,31	189,55 ± 6,26
1	6,5	50,00	45,62	40,97 ± 3,42
2	7,3	70,00	101,21	94,63 ± 7,58
3	9,5	40,00	31,35	34,80 ± 3,20

De acordo com os resultados, a otimização da extração das lipases da casca de pequi utilizando fosfato de sódio monobásico/bibásico em banho ultrassônico possui boa precisão pelo planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.

### 3.3. Caracterização das lipases do extrato

#### 3.3.1. Influência do pH e da temperatura na hidrólise catalisada pelas lipases

A atividade enzimática foi medida variando o pH de 4,0 a 10,0 em uma temperatura fixa de 37 °C (padrão da metodologia) como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito do pH na atividade lipolítica do extrato da casca de pequi

pH	AE (U/mg)
4,0	68,15 ± 9,43
5,0	3911,18 ± 28,28
6,0	1317,61 ± 6,28
7,0	240,20 ± 1,14
8,0	168,19 ± 4,22
9,0	127,67 ± 3,63
10,0	23,21 ± 0,30

Valores expressos em termos de média ± desvio padrão.

As enzimas lipolíticas do extrato apresentaram atividade hidrolítica máxima no pH 5 (3911,18 U/mg) em tampão acetato de sódio/ácido acético. Nos demais pH avaliados a atividade foi reduzida a mais de 50% do valor máximo (Figura 2).

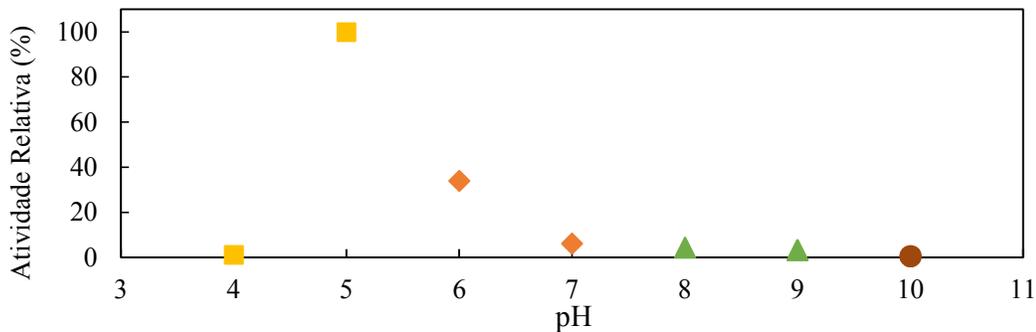


Figura 2. Efeito do pH na hidrólise catalisada pelas lipases do extrato.

Os baixos valores de AR observados no pH 9,0 (127,67 U/mg) e no pH 10,0 (23,21 U/mg) exibidos na Figura 2, podem estar relacionados com o efeito de desnaturação proteica em pH alcalinos, onde alguns grupos da molécula são desprotonados (grupos fenólicos, carboxílicos, sulfidril e amina), além da repulsão entre as cadeias da própria enzima, que resultam na desnaturação da molécula (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

O excesso de cargas positivas do meio no pH 4,0 pode ter desnaturado a enzima nas condições experimentais (37 °C por 15 min) de forma que desfavoreceu a catalisação da hidrólise do p-Nitrofenil palmitato em p-Nitrofenol palmitato. No entanto, no pH 5,0 a repulsão entre as cadeias pode ter exposto o sítio ativo, de forma que impediu o efeito estérico, ocasionando numa melhor interação com o substrato (RIBEIRO LIMA et al., 2019).

A Figura 3 representa o estudo da AR em relação ao efeito da temperatura na capacidade máxima da catalisação da hidrólise, onde a AE das lipases presentes no extrato foi examinada em uma faixa de 30- 80 °C e pH 5,0.

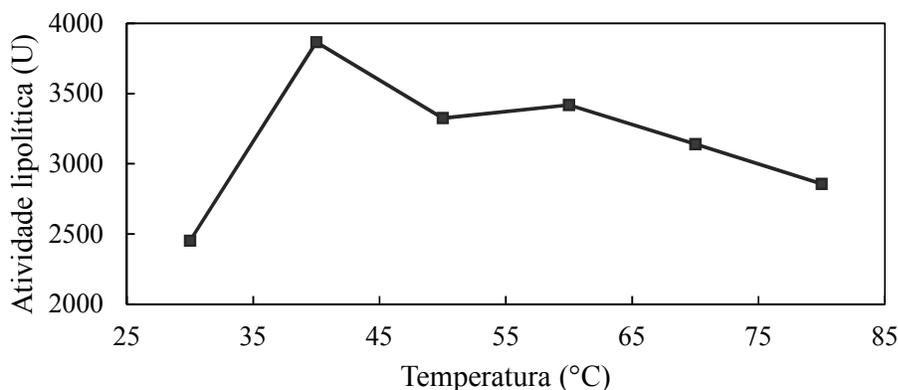


Figura 3. Efeito da temperatura na hidrólise catalisada pelas lipases do extrato.

As lipases exibiram atividade em uma ampla faixa de temperatura, com a atividade máxima em 40 °C (3865,33 U/mg). As enzimas se mantiveram estáveis no intervalo de 60-70 °C, onde os valores de atividade relativa (AR) foram superiores a 80%.

Geralmente, as temperaturas acima de 60 °C tem efeito desnaturante nas lipases de origem vegetal, no entanto esse fator está diretamente relacionado ao tempo de exposição da enzima (SANTOS *et al.*, 2013). Como na análise o tempo de exposição foi relativamente baixo (15 min.), a completa inativação das enzimas não ocorreu. A redução da atividade residual pode ter sido consequência da desestabilização entre as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio que contribuem para a estrutura terciária da enzima. Supõe-se, também, que haja interações hidrofóbicas na superfície enzimática, que são endotérmicas e preservaram a capacidade catalítica na faixa de temperatura estudada.

### 3.3.2. Estabilidade térmica e de pH das lipases

Segundo KUMAR, GOOMBER, KAUR (2019) enzimas termoestáveis são necessárias às aplicações industriais. A engenharia enzimática busca estratégias de modificação genética de microrganismos para atribuir características como a termoestabilidade às enzimas produzidas. Todavia, o estudo de novas fontes enzimáticas, como a casca de pequi, proporciona a obtenção de lipases com especificidade ideal à determinados processamentos, utilizando tecnologias mais simples e de menor custo.

Nesse estudo, os efeitos da termoestabilidade na atividade da enzima lipolítica foram examinados em temperaturas entre 40 e 80 °C (Figura 4).

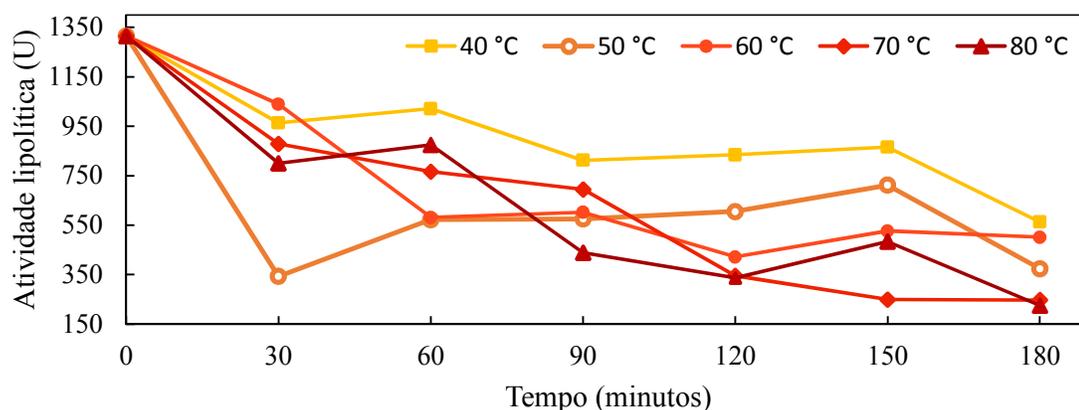


Figura 4. Termoestabilidade da atividade lipolítica do extrato.

As lipases do extrato retiveram mais de 65% da atividade inicial em 40 °C dentro de 150 minutos de incubação (Figura 4) e foram consideradas termofílicas (CARVALHO et al., 2017). Em até 60 minutos, as temperaturas 70 e 80 °C também apresentaram atividade superior a 60%. No entanto, em todas as temperaturas acima de 40 °C, as enzimas perderam cerca de 50% da capacidade catalítica após 1h. Essa ampla faixa de temperatura, onde há atividade enzimática em um tempo de até 60 minutos, é desejável para processos industriais onde há aplicação de elevadas temperaturas de produção.

Lipases de outras origens podem possuir tal característica, como pode ser visto no estudo de Priyanka et al. (2019), onde purificaram lipase ativa e estável por 24 horas a 40°C. No entanto, para tal, houve mais etapas de produção (biodescoberta, fermentação etc.) além enzima não ser aplicável a meios aquosos.

A fim de observar a estabilidade da capacidade de hidrólise da lipase, o extrato foi exposto aos pH 4,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 10,0 combinados às temperaturas de 30, 40 e 50 °C (Figura 5).

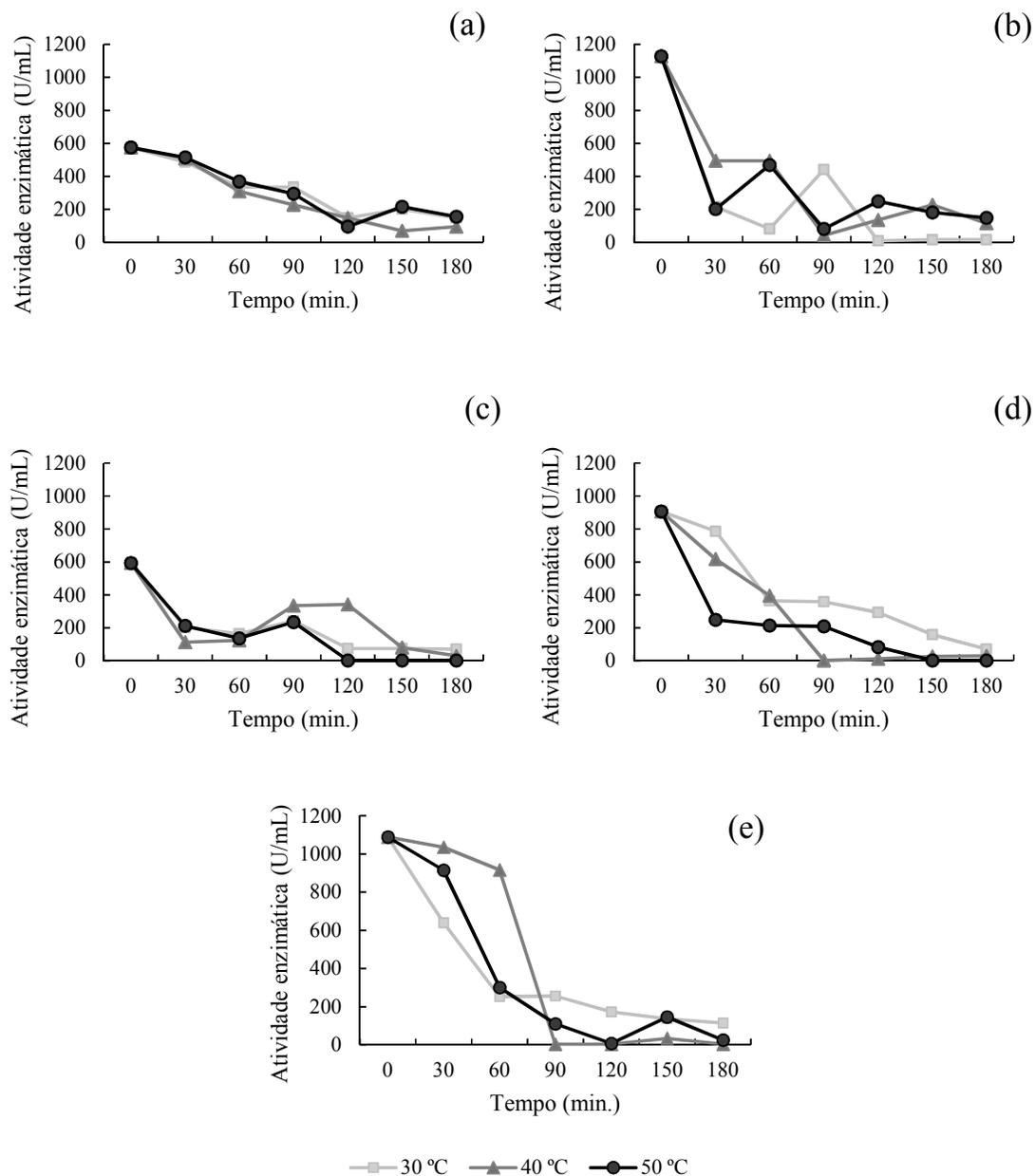


Figura 5. Efeito dos pH 4,0 (a); 5,0 (b); 7,0 (c); 9,0 (d) e 10,0 (e) na estabilidade das lipases do extrato enzimático em diferentes temperaturas.

O pH 5,0 apresentou a maior atividade no tempo inicial, no entanto a capacidade catalítica residual caiu mais de 56% em até 30 minutos em todas as temperaturas estudadas (30, 40 e 50 °C). No entanto, no pH 10,00 a capacidade de catálise de hidrólise se manteve superior a 84% por até 60 minutos a 40 °C.

### 3.3.3. Parâmetros cinéticos

O perfil de taxa reacional da concentração do substrato (p-Nitrofenil palmitato) sobre a atividade para as lipases presentes no extrato está representado na Figura 6.

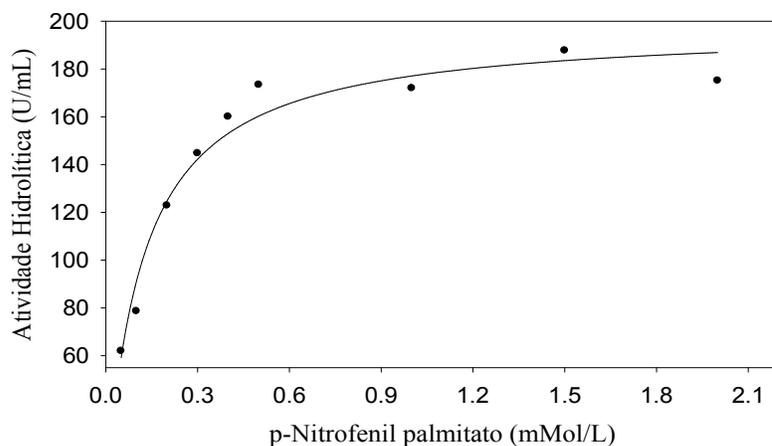


Figura 6. Efeito da concentração do substrato (p-Nitrophenyl palmitate) na atividade hidrolítica das lipases do extrato enzimático. A linha representa os valores preditos pelo modelo.

Analisando o gráfico é possível inferir que o aumento na concentração do p-Nitrophenyl palmitate de 0,1 para 0,5 mMol/L resultou em um aumento significativo na taxa de reação da enzima. Entretanto, para concentrações de substrato maiores que 0,5 mMol, a atividade enzimática tornou-se substancialmente independente da concentração do substrato.

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) é um parâmetro importante para medir a afinidade de uma enzima com seu substrato. Um valor de  $K_m$  baixo indica uma elevada capacidade de ligação superior com o substrato. E o valor  $V_{max}$  define a velocidade máxima de reação enzimática, ou seja, todos os centros ativos estão ocupados com substrato. Utilizando o modelo da cinética de Michaelis-Menten, a curva obtida pelo efeito da concentração do substrato na atividade enzimática (Figura 6) foi submetida ao ajuste não linear utilizando o software SigmaPlot 11.0. Um alto valor de coeficiente de determinação foi obtido no ajuste ( $R^2 = 0,96$ ). Isso permite considerar que os valores dos parâmetros cinéticos foram determinados com boa precisão. Os parâmetros cinéticos aparentes  $V_{max}$  e  $K_m$  foram, respectivamente,  $197,85 \pm 6,64 \mu\text{Mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e  $0,12 \pm 0,02 \text{ mMol mL}^{-1}$ . O valor de  $V_{max}$  obtido indica elevada difusão ou flexibilidade enzimática para a formação do complexo lipase-substrato (DAS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019). O valor de  $K_m$  foi relativamente baixo, isso indica elevada afinidade

entre o complexo enzima-substrato (DAS *et al.*, 2017; MARTINS; CAMARGO; MARCO, [s.d.]; PEREIRA *et al.*, 2019).

### 3.3.4. Identificação das lipases

#### 3.3.4.1. Eletroforese e zimograma

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada para acompanhar qualitativamente o processo de extração da lipase da casca do pequi, além de auxiliar na estimativa da massa molar da lipase extraída. A fim de verificar a presença de proteases no extrato, a zimografia foi utilizada. Os resultados podem ser observados na Figura 7.

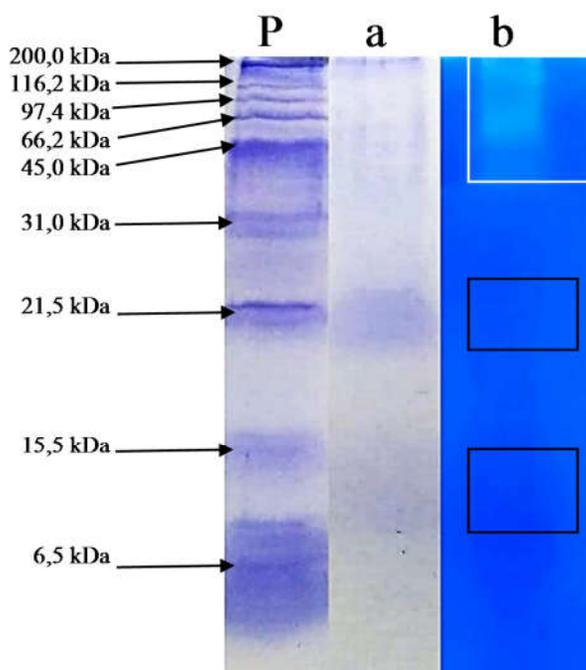


Figura 7. (a) Eletroforese SDS-PAGE em condição desnaturante da lipase do extrato da casca de pequi; (b) Zimograma em condição não desnaturante da lipase do extrato da casca de pequi e (P) Marcador molecular de proteínas (6,5 a 200,0 kDa).

A Figura 7 mostra a presença de bandas similares da eletroforese SDS-PAGE e do zimograma entre 97,4 e 200 kDa, indicando a presença de proteases (atividade caseinolítica) de elevada massa. Alguns autores (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; MARTINS;

KALIL; COSTA, 2008; OHNISHI; YOSHIDA; SEKIGUCHI, 1994; RIVERA-MUÑOZ *et al.*, 1991) relatam que há a possibilidade das proteases presentes no meio afetarem a estabilidade lipolítica. Assim, observando a zimografia, talvez haja a influência dessas proteases nos testes aplicados nesse estudo, como as condições de atividade ótima, estabilidade e cinética das lipases.

Percebe-se duas outras bandas no estudo eletroforético, uma entre 6,5 e 15,5 kDa e outra com massa molecular em torno de 21,5 kDa. Esses valores correspondem à faixa de peso molecular esperado para as lipases (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Ao estudar as lipases da amêndoa de pequi, Nascimento (2020) observou pela eletroforese SDS-PAGE uma das bandas com a massa molecular próxima à observada nesse estudo, indicando que há uma proteína de massa similar na amêndoa e na casca do fruto.

#### 4. CONCLUSÃO

O planejamento experimental utilizado para a extração foi eficiente e atingiu o resultado máximo de atividade específica ( $189,55 \text{ U/mg} \pm 6,26$ ) no pH 8,0 em 43,85 minutos. O modelo encontrado pela superfície de resposta representa os valores empíricos obtidos. As lipases presente no extrato resultaram na melhor atividade ( $3911,18 \text{ U/mg}$ ) no pH 5,0 a 60 °C. As enzimas apresentaram estabilidade ótima na faixa de pH 5-7 por até 180 minutos e bons resultados para os parâmetros de cinética enzimática. A massa das enzimas lipolíticas não foram determinadas, outros estudos serão realizados para melhor caracterização.

#### 5. REFERÊNCIAS

ANTUNES, R. S. et al. Enzimas vegetais : extração e aplicações biotecnológicas. n. 3, p. 181–198, 2017.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase

production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77–84, 2004.

CAMPOS, R. P. et al. Elaboração e Caracterização de Farinha da Casca de Pequi. **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2236–7934, p. 1–12, 2016.

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.

CARVALHO, T. et al. Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 889–902, 2020.

CELESTINO, S. M. C. Princípios de Secagem de Alimentos. In: **Embrapa Cerrados**. 1. ed. Planaltina: [s.n.]. p. 51, 2010.

CUTLER, P. **Protocolos de purificação de proteínas**. 2. ed. [s.l.] Humana Press, 2004.

DAMIANI, C. et al. Perfil de ácidos graxos e fatores antinutricionais de amêndoas de pequi crua e torrada. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 1, p. 71–78, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: 2018, 2019.

DAS, R. et al. Covalent immobilization of B-amylase onto functionalized molybdenum sulfide nanosheets, its kinetics and stability studies: A gateway to boost enzyme application. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p. 215–227, 2017.

DE OLIVEIRA, E. N. A. et al. Obtenção e caracterização de margarina convencional e light à base de óleo de pequi. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 294–304, 2011.

DIN, M. H. M. et al. Heterologous expression and characterization of plant lipase lip2 from *elaeis guineensis* jacq. Oil palm mesocarp in *escherichia coli*. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 1–20, 2021.

FARIA, W. C. S.; DAMASCENO, G. A. DE B.; FERRARI, M. Moisturizing effect of a cosmetic formulation containing pequi oil (*Caryocar Brasiliense*) from the Brazilian Cerrado biome. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 131–136, 2014.

GARCÍA-CARRENO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, N. F. **Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors** *Analytical Biochemistry*, 1993.

GHOSH, R. **Principles of Bioseparations Engineering**. [s.l.] World Scientific Publishing Company, 2006.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KUMAR, R.; GOOMBER, S.; KAUR, J. Engineering lipases for temperature adaptation: Structure function correlation. 2019.

LEÃO, D. P. et al. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. *Food Chemistry*, v. 225, p. 146–153, 2017.

LEÃO, D. P. et al. Potential of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peels as sources of highly esterified pectins obtained by microwave assisted extraction. *LWT - Food Science and Technology*, v. 87, p. 575–580, 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIMA, V. J. et al. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA INCLUSÃO DO FARELO DA CASCA DO PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm.) EM DIETAS DE MATRIZES SUÍNAS EM GESTAÇÃO. *Revista Acta Kariri - Pesquisa e Desenvolvimento*, v. 2, p. 20–28, 2017.

MAIA DA SILVA, F. F. et al. The orange peel as biocatalyst for the hydrolysis of esters. *Industrial Crops and Products*, v. 84, p. 22–27, 2016.

MALACRIDA, C. R. et al. Effect of the application of an enzymatic pretreatment on bioactive compounds of *Caryocar brasiliense* Camb pulp oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, n. 12, p. 1–6, 2018.

MARIANI, M. et al. Elaboração e avaliação de biscoitos sem glúten a partir de farelo de arroz e farinhas de arroz e de soja Elaboration and evaluation of gluten-free cookies made with rice

bran. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 70–78, 2015.

MARTINS, P. A.; CAMARGO, B. R. DE; MARCO, J. L. DE. Lipases de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 ( 579 ): caracterização do efeito de íons , surfactantes e solventes e determinação de parâmetros cinéticos. v. 99, n. 579, [s.d.].

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942–1947, 2008.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2020.

MONTEIRO, S. S. Development of biscuits cookie type made with almond pequi. p. 77–82, 2014.

MORRIS, J. L. et al. The timescale of early land plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 10, p. E2274–E2283, 2018.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. [s.l: s.n.].

NASCIMENTO, P. A. **Extração de lipase da amêndoa do pequi e purificação parcial por sistemas aquosos bifásicos**. ITAPETINGA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira, 2020.

NASCIMENTO, P. A. et al. Optimization of lipase extraction from pequi seed ( *Caryocar brasiliense* Camb.) . **Journal of Food Processing and Preservation**, n. April, p. 1–8, 2021.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490–495, 1994.

PEREIRA, A. DA S. et al. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, n. August, p. 621–630, 2019.

PIANOVSKI, A. R. et al. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249–259, 2008.

PINHO, L. DE et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de

alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326–331, 2012.

PIRES, J. et al. Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. March, 2020.

PRIYANKA, P. et al. Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. **Protein Expression and Purification**, v. 153, n. August 2018, p. 121–130, 2019.

RAMOS, R. DE O. et al. Chemical and antioxidant characterization, sensory and shelf-life analysis of cereal bars with almonds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1–7, 2020.

REIS FILHO, J. et al. Melhoria do valor nutricional do brownie utilizando farinha do mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* camb). **Motricidade**, v. 14, n. 1, p. 196–204, 2018.

RIBEIRO LIMA, L. G. et al. Lipase production by *Aspergillus niger* C by submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1–14, 2019.

RIVERA-MUÑOZ, G. et al. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 277–280, 1991.

ROCHA, L. B. et al. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 592–598, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: Casa do pão editora, 2005.

SANTOS, K. C. et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, 2013.

SHEN, G. et al. *Molecular Functions in Plant Development*. 2022.

SIQUEIRA, B. DOS S. et al. Extracted pectin of “pequi” peel and application in light mango jam. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 560–567, 2012.

SOARES, M. S. et al. Development and chemical characterization of four obtained from the external mesocarp of “pequizeiro” fruit. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 949–954, 2010.

SOMCHINDA, A. et al. Prospecção Tecnológica Da Produção De Cápsulas Gelatinosas De Polpa De Pequi (Caryocar Brasiliense Camb) Como Um Novo Nutracêutico. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 2, p. 615, 2018.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663–670, 1979.

ARTIGO 2

**Partição das lipases da casca do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) utilizando sistema aquoso bifásico e imobilização em carvão ativado: Avaliação e otimização do processo**

---

## RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho otimizar a partição das lipases presentes na casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por polietilenoglicol (PEG) 1500 g mol<sup>-1</sup> e fosfato de potássio no pH 7,0. Inicialmente, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>. As variáveis (% extrato, % sal, % PEG e temperatura) foram estudadas em função do coeficiente de partição. Posteriormente, o planejamento de delineamento composto central rotacional (DCCR) e a superfície de resposta foram utilizados para determinar as condições ideais para a partição do extrato rico em lipases. Para isso, somente os fatores que exerciam influência, significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste F, no processo de partição das lipases do extrato foram utilizados. Portanto, após a análise do fatorial completo (FC), a concentração do PEG foi fixada em 15% e a temperatura em 25 °C para a próxima etapa de otimização. Os resultados das variáveis respostas obtidos pelo DCCR foram submetidos análise de regressão. A partir dessa análise foram obtidos modelos que descreviam o comportamento das variáveis respostas de partição em função das concentrações do extrato da casca de pequi e do fosfato de potássio. Para melhores resultados do coeficiente de partição das lipases ( $K_e$ ), recuperação teórica (% $Y$ ) e fator de purificação ( $FP$ ), a concentração calculada dos componentes do SAB foi aproximadamente 15 % de PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, 13,7 % fosfato de potássio monobásico/bibásico no pH 7,0, 11,5 % para o extrato da casca de pequi e 59,8 % de água. A seletividade ( $S$ ) é máxima na concentração 10,47 % de extrato e nas maiores concentrações de sal. Para atingir ótimos valores, as variáveis coeficiente de partição das proteínas totais ( $K_p$ ), energia livre de Gibbs de transferência de proteínas ( $G_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência enzimática ( $G_e$ ) apresentaram concentrações de extrato e sal > 13,45 % e > 15 %, respectivamente, dentro das faixas de concentrações estudadas.

**Palavras-chave:** Enzimas, partição, proteínas vegetais.

## ABSTRACT

The objective of this work was to optimize the partition of lipases from pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.) in aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol 1500 g mol<sup>-1</sup> and potassium phosphate, pH 7. Initially, a full factorial design was applied. The variables (% extract, %salt, %PEG and temperature) were studied as a function of the partition coefficient. Subsequently, the central composite rotational design and the response surface were used to determine the ideal conditions for partitioning the lipase-rich crude extract. For this, only the factors that exerted influence, significantly (P<0.05) by the F test, in the process of partitioning the lipases of the crude extract were used. Therefore, after the FFD analysis, the PEG concentration was set at 15% and the temperature at 25 °C for the next optimization step. The results of the response variables obtained by the CCRD were submitted to regression analysis. From this analysis, models were obtained that described the behavior of the partition response variables as a function of the concentrations of crude pequi peel extract and potassium phosphate. For best results of *Ke*, %*Y* and *FP*, the calculated concentration of the SAB components was approximately 15% PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, 13.7% monobasic/bibasic potassium phosphate, pH 7,0, 11.5% for the crude extract of pequi peel and 59.8% of water. *S* is maximum at the 10.47% concentration of extract and at the highest salt concentrations. To achieve optimal values, the variables *Kp*, *Gp* and *Ge* presented crude extract and salt concentrations >13.45 % and >15%, respectively, within the ranges of concentrations studied.

**Keywords:** Enzymes, partition, vegetable proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido a vasta gama de aplicabilidade das enzimas nos mais variados processos industriais, estudos reportam que esse mercado têm se desenvolvido progressivamente com perspectiva de crescimento nos próximos anos (REPORTS AND DATA, 2020). Dentre essas enzimas, as lipases vêm se destacando por desempenhar papéis em diversos setores industriais, como na indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no tratamento de efluentes, entre outras (MORDOR INTELLIGENCE, 2020; REPORTS AND DATA, 2020). Por conseguinte, estudos que visem otimização processos de obtenção e purificação dessas enzimas, a partir de novas fontes vegetais, com alto rendimento e grau de pureza à um custo reduzido são interessantes do ponto de vista biotecnológico. Um destas possíveis fontes é a casca do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) que é considerada um subproduto agrícola, no entanto, muitos estudos demonstram o potencial tecnológico dessa parte do fruto, como fonte de muitos compostos de interesse industrial como as lipases que estão originalmente em sua estrutura (LEÃO et al., 2018; MARIANI et al., 2015; PINHO et al., 2012; REIS FILHO et al., 2018; ROCHA et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2012; SOARES et al., 2010).

Em termos de processos para a obtenção de biomoléculas, o emprego dos SAB frente aos métodos de extração líquido-líquido convencionais que utilizam solventes orgânicos, tem adquirido grande importância e sucesso progressivo na extração e purificação de biocompostos de interesse de tecnológico, tais como proteínas, enzimas, carboidratos, flavonoides, antibióticos, ácidos nucleicos e DNA (AZIZ et al., 2017; CHENG et al., 2017; CHONG et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020; GAO et al., 2021; GONZÁLEZ-AMADO et al., 2021; JAMSHIDI; PAZUKI, 2018; LYU et al., 2019; MASHAYEKHI et al., 2009; NASCIMENTO, 2020; PADILHA; OSÓRIO, 2019; REQUEJO et al., 2020; SANTOS et al., 2011). A literatura reporta a partição de lipases obtidas em diferentes fontes em SAB (AMID et al., 2015; CARVALHO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2021a; PADILHA; OSÓRIO, 2019; RAMAKRISHNAN et al., 2016).

Por se tratar de um processo de baixo custo, alta produtividade, simplicidade, separação relativamente rápida, possibilidade de aplicação em grande escala, capacidade de integração de processos e grande apelo ambiental (DOS SANTOS et al., 2020; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; SHOW et al., 2012), essa técnica apresenta viabilidade de aplicação industrial. Entretanto, a utilização desses sistemas ainda se restringe a processos realizados em

bancadas de laboratórios ou escala piloto (PEREIRA; COUTINHO, 2020). O que mostra a importância das pesquisas voltadas à compreender melhor essa técnica e otimizar o processo de partição visando a ampliação de escala a nível industrial.

Em alguns processos industriais, a aplicação de enzimas na forma livre é limitada devido à baixa estabilidade operacional e à dificuldade de separação destas dos seus respectivos substratos de reação, o que impossibilita seu reuso em processos contínuos, resultando em aumento de custo e dificuldade de aplicações em larga escala. Diante disso, a imobilização enzimática em suportes vêm sendo utilizada como uma maneira de superar tais restrições e potencializar o uso de enzimas como catalisadores industriais (GONÇALVES *et al.*, 2019; SHELDON; BASSO; BRADY, 2021). Para a utilização dessa técnica nas enzimas lipolíticas, os suportes que possuem características hidrofóbicas em sua superfície são desejáveis por promover uma ativação interfacial na lipase, potencializando sua capacidade de catálise hidrolítica (ULKER; GOK; GUVENILIR, 2019).

Dentre os suportes geralmente utilizados para a imobilização de lipases, o carvão ativado tem se mostrado uma alternativa com potencial para imobilização enzimática por adsorção por apresentar vantagens como baixo custo e facilidade de remoção das enzimas utilizadas no processamento industrial. Esse tipo de suporte possui uma forma microcristalina, não grafitica de carbono e podem apresentar ou a eles serem adicionados alguns grupos funcionais em sua superfície (SHAFEEYAN *et al.*, 2010). Devido à essas características Brito *et al.* (2017), Dhawane, Kumar, Halder (2018) relatam que o carvão ativado é um dos suportes com potencial para imobilização enzimática. Assim, nesse estudo foi realizada a otimização da partição em sistemas aquosos bifásicos das lipases presentes na casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) para a possível imobilização dessas enzimas em carvão ativado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

As cascas utilizadas nesse estudo foram obtidas de frutos de pequi da feira livre de Salinas-MG. Não houve transporte das cascas de maneira direta pois as mesmas deterioram rapidamente e inviabilizam a extração das lipases. Após alguns testes, foi observado que a secagem reduz a deterioração química e enzimática. Desse modo, foi possível armazenar cascas para a utilização durante todo o experimento. Os reagentes usados na experimento foram de grau analítico e estão descritos ao longo da metodologia.

## **2.2. Preparo do Extrato**

Para a obtenção do extrato enzimático contendo a lipase foram pesados 1g de farinha da casca de pequi em tubos de centrífuga e 10g de solução fosfato de sódio monobásico e bibásico 0,1 M no pH 8,0. Os tubos foram agitados, colocados dentro de um béquer de vidro com água e em seguida no banho ultrassônico por 43,85 minutos (aproximadamente 43 minutos e 50 segundos). Após o tempo de extração, os tubos foram submetidos à centrifugação (3250 G à 4 °C) e filtração com auxílio de gaze.

## **2.3. Determinação do teor de proteínas**

A concentração de proteínas totais no extrato enzimático da casca de pequi e das demais etapas do experimento foi determinada por espectrofotometria utilizando o método proposto por Bradford (1976). A curva analítica foi construída utilizando proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) como padrão, com leituras realizadas no comprimento de onda de 595 nm.

## **2.4. Determinação de atividade enzimática do extrato**

A atividade hidrolítica das lipases no extrato e nas etapas de purificação foi determinada conforme a metodologia proposta por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações, utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (p-NPP). O meio reacional é denominado solução C, composto pelas soluções A e B. A solução A consiste em dissolver 162,0 mg de p-NPP dissolvidos em 30,0 mL de isopropanol; a solução B é uma solução onde 9,0 g de Triton X-100 e 0,90 g de goma arábica são dissolvidos em 450 mL de tampão Tris-HCl 0,09M, pH 8,0.

A solução C (0,5 mL) foi incubada à 37 °C por 10 minutos em banho termostático, após foi adicionado 50µL do extrato e 450µL da mesma solução utilizada na extração (fosfato de sódio monobásico/ bibásico 0,1 M) no pH 8,0 por 15 minutos. Depois desse tempo, os tubos contendo a solução foram colocados em banho com água em ebulição (≈100 °C) por 7 minutos. Com os tubos ainda no banho, foi adicionado à cada tubo 0,5 mL de solução do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 M. Os tubos foram resfriados com água corrente.

A curva analítica foi construída utilizando p-nitrofenol palmitato como padrão, com leituras realizadas no comprimento de onda de 410 nm.

Uma unidade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por mL por minuto nas condições descritas. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada a Equação 1.

$$U/mL = \frac{C_{pN} \cdot FD \cdot V_T}{V_E \cdot t} \quad (1)$$

Onde  $U$  é a unidade de atividade enzimática, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;  $C_{pN}$  é a concentração de p-nitrofenol (μmol) liberado por mL;  $FD$  é o fator de diluição;  $V_T$  é o volume total de reação;  $V_E$  é o volume de extrato enzimático;  $t$  é o tempo de reação (minutos).

Por fim, a atividade enzimática específica (U/mg) foi obtida através da razão entre a atividade enzimática ( $U$ ) e a concentração de proteína ( $P$ ), conforme a Equação 2.

$$AE = \frac{U}{P} \quad (2)$$

A atividade relativa foi calculada a partir do maior resultado de atividade específica observado, onde esse valor é 100% e os demais são relativos a ele.

## 2.5. Determinação dos dados de equilíbrio

### 2.5.1. Curvas Binodais

O método para estabelecer as curvas binodais foi descrito por (ALBERTSSON, 1970), mediante a turbidez, onde é observada diretamente a formação de uma segunda fase. Foram preparadas as soluções concentradas dos polímeros PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> (60% m/m) e do fosfato de potássio monobásico/bibásico pH 7,0 (30% m/m) para utilização na titulação. O procedimento consistiu em pesar 1,00 g da solução estoque de PEG (60% m/m) em tubos de ensaio, em uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil). Os tubos contendo solução do PEG foram levados ao banho termostático (Tecnal, Te- 184, Piracicaba, Brasil) com precisão ±0,1 °C, até atingir o equilíbrio térmico na temperatura de construção da curva (25 °C ou 10 °C). Foram adicionadas alíquotas da solução estoque do sal até a turvação do sistema (solução bifásica) e o volume de sal foi registrado. O sistema foi titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação, e a quantidade também foi anotada para o cálculo de concentração dos componentes para a construção da curva. A equação empírica sugerida por Hu *et al.* (2003) foi utilizada para ajuste das curvas binodais:

$$X_{SAL} = \exp(a + b(X_{PEG})^{0.5} + cX_{PEG} + d(X_{PEG})^2) \quad (3)$$

Em que  $X_{SAL}$  e  $X_{PEG}$  são as composições em fração mássica do fosfato de potássio e PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, respectivamente, e  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  são parâmetros de ajuste da equação.

### 2.5.2. Linhas de amarração

As linhas de amarração foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk, Andrews e Asenjo (1998), que consiste em selecionar um ponto acima da região bifásica, através do qual a linha de amarração vai passar. Os pontos globais utilizados na formação das linhas de amarração foram as concentrações determinadas em cada planejamento experimental no processo de otimização da partição.

As composições conhecidas dos solutos foram adicionados em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques do fosfato de potássio monobásico/bibásico, PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> e água. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a uma força centrífuga de 3250G por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 horas em estufa B.O.D em temperatura constante (10 °C ou 25 °C) para alcançar o equilíbrio das fases. Todas as soluções foram preparadas, usando balança analítica M254A (Bel Engineering, 80 Piracicaba, Brasil) com precisão de ± 0,0001 g. Alcançado o equilíbrio, utilizando seringa de 10 mL com agulhas longas, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 3 mm desta fase acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, após a coleta da fase superior, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada.

Após separadas, as fases foram pesadas. A concentração de cada componente nas fases coletadas foi estimada pela aplicação da regra da alavanca, na relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema. Para determinação dos componentes da linha de amarração o seguinte sistema de quatro equações (Equações 4-7) e quatro incógnitas ( $W_{SAL}^s$ ,  $W_{SAL}^i$ ,  $W_{PEG}^s$ ,  $W_{PEG}^i$ ) foi resolvido (HU *et al.*, 2003) com o auxílio do comando solver do software Microsoft Excel:

$$W_{SAL}^s = \exp(a + b(W_{PEG}^s)^{0,5}) + cW_{PEG}^s + d(W_{PEG}^s)^2 \quad (4)$$

$$W_{SAL}^i = \exp(a + b(W_{PEG}^i)^{0,5}) + cW_{PEG}^i + d(W_{PEG}^i)^2 \quad (5)$$

$$\frac{W_{SAL^s}}{W_{SAL^M}} \frac{W_{SAL^M}}{W_{SAL^i}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (6)$$

$$\frac{W_{PEG^M}}{W_{PEG^i}} \frac{W_{PEG^s}}{W_{PEG^M}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (7)$$

Onde  $W_{SAL^s}$ ,  $W_{PEG^s}$ ,  $W_{SAL^i}$ ,  $W_{PEG^i}$ ,  $W_{SAL^M}$ ,  $W_{PEG^M}$  são as composições em fração mássica do sal e do PEG na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente. E  $m_i$  e  $m_s$  é a massa da fase inferior e superior, respectivamente.

O comprimento da linha de amarração foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$CLA = \sqrt{[C_1]^2 + [C_2]^2} \quad (8)$$

A inclinação da linha de amarração foi determinada pela equação:

$$ILA = \frac{C_1}{C_2} \quad (9)$$

Onde:  $C_1$  e  $C_2$  correspondem a diferença de concentração de componente 1 ( $C_1$ ) e componente 2 ( $C_2$ ) nas fases superior e inferior respectivamente expressa em % m/m.

## 2.6. Otimização da partição

### 2.6.1. Fatorial completo

Foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 1), estudando as seguintes variáveis: concentração do PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> (15,0 e 17,5 % m/m), concentração de fosfato de potássio (12,0 e 13,5 % m/m), percentual de extrato em substituição à água do SAB (5,0 e 10 % m/m) e temperatura (10 e 25 °C).

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes e valores codificados para o experimento fatorial completo

Variável independente (Fator)	Fator codificado	Nível	
		-1	1
% PEG 1500 g mol <sup>-1</sup>	A	15,0	17,5
% Fosfato de potássio	B	12,0	13,5
% Extrato	C	5,0	10,0

Temperatura (°C)	D	10,0	25,0
------------------	---	------	------

### 2.6.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Para determinar as condições ideais para a partição do extrato rico em lipases após os resultados obtidos pelo fatorial completo, foi feito um planejamento experimental utilizando DCCR 2<sup>2</sup> sob a metodologia de superfície de resposta. As variáveis independentes estudadas foram a concentração de extrato e a concentração do fosfato de potássio monobásico/bibásico na composição do SAB (Tabela 2) em função das variáveis resposta que foram o coeficiente de partição enzimático (*Ke*), o coeficiente de partição de proteínas totais (*Kp*), energia livre de Gibbs de transferência enzimática (*G<sub>e</sub>*), energia livre de Gibbs de transferência de proteínas (*G<sub>p</sub>*), seletividade (*S*), recuperação teórica (%*Y*) e o fator de purificação (*FP*). Após a análise do fatorial completo, a concentração do PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> foi fixada em 15% e a temperatura em 25 °C para o estudo do DCCR.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, para otimização da extração pelo delineamento experimental (DCCR) após a análise do fatorial completo

Variável independente (fator)	Nível				
	-1,41	-1	0	1	1,41
% Extrato	3,55	5,00	8,50	12,00	13,45
% Fosfato de potássio	11,38	12,00	13,50	15,00	15,62

Para prever as condições ideais, a versão para estudante do software SAS STUDIO (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi utilizado para analisar os dados experimentais ajustados a um modelo empírico de regressão polinomial de segunda ordem (Equação 10).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1^2 + \beta_3 X_2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 \quad (10)$$

Onde *Y* são os valores previstos (*Ke* e *Kp*),  $\beta_0$  é a intercessão,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são coeficientes de regressão para termos lineares, quadráticos e de interação, respectivamente,  $X_i$  e  $X_j$  são variáveis independentes que afetam a resposta.

## 2.7. Determinação dos parâmetros da partição

O coeficiente de partição das proteínas totais ( $K_p$ ), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio (mg/mL) da proteína total na fase superior ( $C_{sup}$ ) e inferior ( $C_{inf}$ ) foi determinado como descrito na Equação 11.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (11)$$

O coeficiente de partição das lipases ( $K_e$ ) foi determinado pela razão entre a atividade específica enzimática (AE) na fase superior ( $U_{sup}$ ) e a AE na fase inferior ( $U_{inf}$ ) de cada sistema, conforme descrito pela Equação 12.

$$K_e = \frac{[AE]_{sup}}{[AE]_{inf}} \quad (12)$$

A seletividade ( $S$ ) foi calculada como a razão entre o coeficiente de partição das lipases ( $K_e$ ) e o coeficiente de partição da proteína total ( $K_p$ ) pela equação 13.

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (13)$$

Para selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada a recuperação teórica (%Y) do sistema, utilizando-se a Equação 14 (PICÓ *et al.*, 2006).

$$\%Y = \frac{100}{1 + (1/rK_e)} \quad (14)$$

Onde  $r$  corresponde a razão entre os volumes da fase superior.

O fator de purificação ( $FP$ ) foi definido como a razão entre a atividade enzimática específica (AE) na fase preferencial de particionamento da enzima ( $[AE]_{fase}$ ) e no extrato ( $[AE]_{ext}$ ):

$$FP = \frac{[AE]_{fase}}{[AE]_{ext}} \quad (15)$$

## 2.8. Estimativa da energia livre de Gibbs na partição

Ao estudar a partição do substrato entre as fases de um sistema aquoso bifásico, a espontaneidade do processo de transferência pode ser melhor compreendida com base no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta G$ ), que é calculado pela relação clássica da termodinâmica:

$$G(kJ \text{ mol}^{-1}) = RT \ln K \quad (16)$$

Onde R é a constante universal dos gases ( $8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ), T é a temperatura do sistema (K) e K é o coeficiente de partição da atividade enzimática ( $K_e$ ) ou do coeficiente de partição das proteínas totais ( $K_p$ ). Assim, foi determinada a energia livre de Gibbs de transferência enzimática ( $G_e$ ) e a energia livre de Gibbs de transferência de proteínas ( $G_p$ ).

## 2.9. Análise de outros SAB

Sistemas previamente estudados para a partição de lipases foram selecionados para a comparação com o SAB formado por fosfato de potássio e PEG 1500. O percentual de fosfato de potássio, PEG 1500 e extrato foi determinado após a análise da superfície de resposta para os parâmetros  $K_p$ ,  $K_e$ ,  $G_e$ ,  $G_p$ ,  $S$ ,  $\%Y$  e  $FP$ . Os SAB selecionados foram 15 % PEG 1500 e 13,7 % de  $K_2PO_4$  desse estudo; 20 % de Isopropanol e 17,5 %  $(NH_4)_2SO_4$ ; 20 % de PEG 4000 e 17,5 % de  $(NH_4)_2SO_4$  foram obtidos do trabalho de Nascimento et al. (2021b). A concentração de extrato foi 11,5 % para todos os sistemas.

## 2.10. Imobilização das lipases

Para a imobilização das lipases, presentes no extrato e na fase para onde as lipases particionaram, foi utilizado como suporte o carvão ativado sintetizado a partir da casca de café (CA). A metodologia utilizada na síntese do suporte bem como os resultados da caracterização estão descritas de maneira detalhada em estudo anterior (SANTOS *et al.*, 2020).

As principais propriedades do carvão ativado utilizado neste estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento, área de superfície ( $S_g$ ) e volume de microporos ( $V_{micro}$ ), ponto de carga zero ( $pH_{pcz}$ ), diâmetro do poro ( $D_p$ ) e volume de mesoporos ( $V_{meso}$ ) do carvão ativado da casca de café

Rendimento (%)	As $m^2/g$	$V_{micro}$ ( $cm^3/g$ )	$pH_{pcz}$	$D_p$ (nm) <sup>a</sup>	$V_{meso}$ ( $cm^3/g$ )
41,2	1209	0,123	4,43	4,42	0,544

Fonte: Santos *et al.* (2020).

O tempo de imobilização foi determinado em estudos preliminares de estabilidade da enzima no extrato. As variáveis estudadas foram a quantidade de enzima imobilizada e a respectiva atividade. Para isso, 50 mg de carbono foram misturados com 5 mL de extrato ou fase do SAB. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm) em agitador orbital à temperatura ambiente (25°C). Após 1 h, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 5 min, o

sobrenadante foi removido e as proteínas não adsorvidas foram identificadas pelo método de Bradford (1976).

Lavagens sucessivas, com o tampão utilizado na extração (fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0), foram realizadas nas amostras para remover as enzimas não ligadas. 5 mL do respectivo tampão foi adicionado às amostras, sob agitação a 20 rpm por 10 minutos, seguido de centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos, e novamente o sobrenadante foi removido e quantificado. O equilíbrio do processo foi alcançado quando os valores de concentração de proteína na solução sobrenadante foram nulos.

### 2.11. Determinação de atividade específica das lipases imobilizadas

A capacidade de catalisação de hidrólise das lipases imobilizadas foi medida com base na metodologia de Winkler e Stuckmann (1979). Para isso foi adicionado 5mL de substrato (Solução C) ao carvão sedimentado após a imobilização.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Dados de equilíbrio

Na Figura 1 estão representados os dados de equilíbrio referente aos SAB do presente estudo.

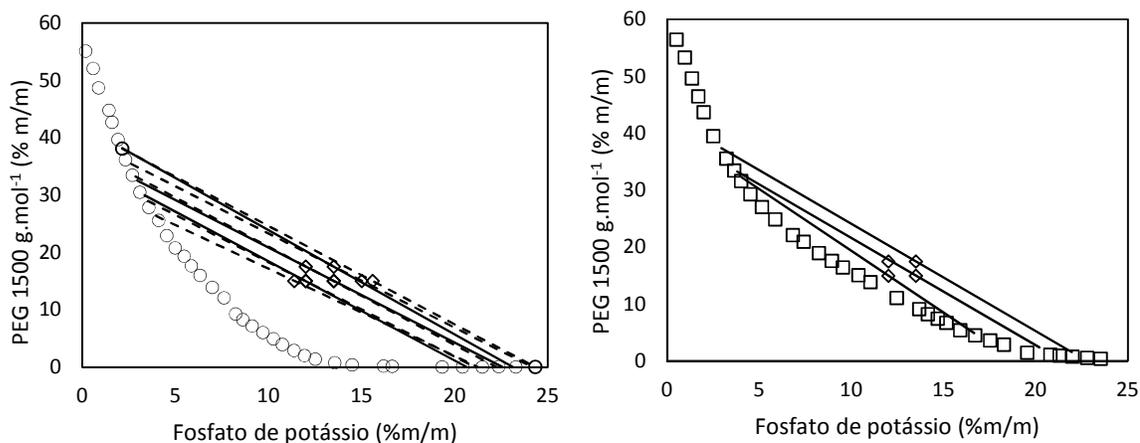


Figura 1. Diagramas de fases formados por PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + água. (○) 25 °C e (□) 10 °C; (---) linhas de amarração do FC; (—) linhas de amarração do DCCR; ( ) pontos globais.

Nos dados de equilíbrio (Figura 1) pode ser observado que as concentrações dos pontos globais utilizados nos planejamentos experimentais (FC e DCCR) se encontram dentro das regiões bifásicas nos SAB de 10 °C e 25 °C.

Os valores obtidos experimentalmente para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) no delineamento das curvas binodais dos sistemas compostos por PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> e fosfato de potássio nas temperaturas de 25 °C e 10 °C, foram obtidos a partir do ajuste da equação não linear (Equação 3) proposta por Hu *et al.* (2003). Os valores obtidos para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$ , bem como  $R^2$  para os sistemas estudados estão apresentados na Tabela 4. Com base nos valores de  $R^2$  pode-se concluir que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

Tabela 4. Parâmetros ajustados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos para os sistemas PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + água nas temperaturas de 10 °C e 25 °C pela equação de Hu *et al.* (2003)

Temperatura (°C)	$a$	$b$	$c$	$d$	$R^2$
10	-0,2126	-4,7202	2,7421	-48,2073	0,9974
25	-0,5181	-1,0454	-11,7863	-89,0815	0,9987

As composições de equilíbrio das fases superior e inferior, o comprimento (CLA) e a inclinação (ILA) da linha de amarração dos sistemas compostos por PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, fosfato de potássio monobásico/bibásico e água nas temperaturas de 10 °C e 25 °C são apresentados na Tabela 5.

A partir dos dados na Tabela 5 é possível observar que as concentrações de PEG na fase inferior e sal na fase superior são muito pequenas, sendo as concentrações de PEG quase nulas nas fases inferiores dos sistemas à 25 °C. O aumento da temperatura promove maior atração entre as moléculas de PEG, pois estas tornam-se mais hidrofóbicas reduzindo assim a afinidade da água por estas e conseqüentemente, a interação entre as moléculas de PEG e água (OLIVEIRA *et al.*, 2018; ZAFARANI-MOATTAR; GASEMI, 2002).

É possível observar também que os comprimentos das linhas de amarração (CLA) nos sistemas a 10 °C são menores. Segundo Pirdashti *et al.* (2019) o aumento da temperatura promove um aumento no CLA e também da inclinação da linha de amarração (ILA), assim como houve nesse estudo. Isso ocorre pois, como anteriormente citado, o polímero se torna mais hidrofóbico, promovendo a difusão espontânea de água da fase superior (rica em polímero) para a fase inferior (rica em sal), ou seja, a relação entre a temperatura e o tamanho da região

bifásica nos sistemas desse estudo está associada à natureza endotérmica do processo de separação de fases (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Tabela 5. Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 1500 g mol<sup>-1</sup> (W<sub>peg</sub>), fosfato de potássio monobásico/bibásico (W<sub>sal</sub>) e água (W<sub>água</sub>) nos planejamentos experimentais

Linhas de amarração	CLA	ILA	Composição global (%)			Fase superior (%)			Fase inferior (%)		
			W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>	W <sub>peg</sub>	W <sub>sal</sub>	W <sub>água</sub>
1	30,14	-2,17	15,00	12,00	73,00	32,26	4,06	63,68	4,88	16,66	78,46
2	34,98	-1,89	15,00	13,50	71,50	33,26	3,82	62,92	2,36	20,20	77,44
3	34,98	-1,89	17,50	12,00	70,50	33,26	3,82	62,92	2,36	20,20	77,44
4	40,51	-1,88	17,50	13,50	69,00	37,36	2,95	59,69	1,58	21,95	76,46
5	34,53	-1,73	15,00	12,00	73,00	29,98	3,35	66,67	0,07	20,62	79,31
6	37,93	-1,66	15,00	13,50	71,50	32,51	2,95	64,54	0,03	22,54	77,43
7	37,93	-1,66	17,50	12,00	70,50	32,51	2,95	64,54	0,03	22,54	77,43
8	43,52	-1,82	17,50	13,50	69,00	38,15	2,14	59,72	0,02	23,12	76,86
9	31,47	-1,52	15,00	11,40	73,60	26,36	3,96	69,67	0,05	21,24	78,70
10	33,83	-1,65	15,00	12,00	73,00	28,97	3,52	67,51	0,06	21,08	78,86
11	38,48	-1,71	15,00	13,50	71,50	33,27	2,84	63,90	0,03	22,24	77,73
12	41,47	-1,64	15,00	15,00	70,00	35,45	2,62	61,93	0,01	24,16	75,83
13	44,10	-1,72	15,00	15,60	69,40	38,12	2,14	59,74	0,01	24,33	75,66

1-4: LA do SAB à 10 °C nas concentrações dos pontos globais do fatorial completo;

5-8: LA do SAB à 25 °C nas concentrações dos pontos globais do fatorial completo;

9-13: LA do SAB à 25 °C nas concentrações dos pontos globais do delineamento composto central rotacional;

## 3.2. Otimização da partição

### 3.2.1. Planejamento fatorial completo

O fatorial completo (Tabela 6) foi utilizado com a finalidade de avaliar a hipótese onde as variáveis estudadas eram significativas ( $P < 0,05$ ) no processo de partição das lipases do extrato (extrato obtido em condições ótimas, estudado anteriormente no Capítulo 2). Os testes foram em função da variável resposta coeficiente de partição das lipases ( $K_e$ ) devido ao interesse da partição de proteínas que tinham atividade lipolítica. Observa-se na Tabela 6 que o valor de  $K_e$  foi menor do 1,00 para quase todos os sistemas estudados, exceto para o sistema do Tratamento 7. Tais resultados indicam que para os sistemas estudados a lipase teve maior afinidade com fase inferior.

Tabela 6. Projeto experimental do planejamento fatorial completo para o coeficiente de partição ( $K_e$ )

Trat	Variáveis				$K_e$
	T (°C)	% Extrato	% PEG	% Sal	
1	10,00	5,00	15,00	12,00	0,275 ± 0,004
2	10,00	5,00	15,00	13,50	0,138 ± 0,021
3	10,00	5,00	17,50	12,00	0,030 ± 0,011
4	10,00	5,00	17,50	13,50	0,049 ± 0,007
5	10,00	10,00	15,00	12,00	0,452 ± 0,032
6	10,00	10,00	15,00	13,50	0,013 ± 0,002
7	10,00	10,00	17,50	12,00	1,156 ± 0,098
8	10,00	10,00	17,50	13,50	0,145 ± 0,020
9	25,00	5,00	15,00	12,00	0,010 ± 0,001
10	25,00	5,00	15,00	13,50	0,034 ± 0,011
11	25,00	5,00	17,50	12,00	0,085 ± 0,030
12	25,00	5,00	17,50	13,50	0,078 ± 0,009
13	25,00	10,00	15,00	12,00	0,480 ± 0,121
14	25,00	10,00	15,00	13,50	0,531 ± 0,127
15	25,00	10,00	17,50	12,00	0,827 ± 0,057
16	25,00	10,00	17,50	13,50	0,834 ± 0,111

A análise de significância das variáveis da ANOVA (Tabela 7) foi realizada ao nível de 5%. A baixa probabilidade ( $P < 0,05$ ) de significância dos fatores concentração de extrato e de sal (fosfato de potássio) indicam que esses exercem influência no processo de partição das lipases do extrato da casca de pequi na faixa de concentração dos SAB avaliados pelo teste F. Portanto, os valores da concentração de PEG  $1500 \text{ g mol}^{-1}$  (15,0 %) e a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foram fixados para os estudos posteriores de otimização de partição. Tais valores foram escolhidos tendo como premissa a redução de quantidade de material formador dos sistemas e de energia para atingir e manter a temperatura do processo.

Tabela 7. Análise de variância para o projeto experimental do planejamento fatorial completo na otimização da partição das lipases no extrato

Efeitos	Graus de liberdade	Média quadrática	p**
Temperatura	1	0,048	0,369
% Extrato	1	1,749	<0,0001*
% PEG	1	0,202	0,072
% SAL	1	0,279	0,037*
Total	4		

\*\*p: Probabilidade ( $P < 0,05$ ) de significância dos fatores testados.

### 3.2.2. Delineamento Composto Central Rotacional

Após a execução do primeiro planejamento experimental, foi realizado um delineamento composto central rotacional apenas com os fatores significativos no processo de partição (Tabela 8). Neste experimento, o coeficiente de partição enzimático ( $Ke$ ), o coeficiente de partição de proteínas totais ( $Kp$ ), energia livre de Gibbs de transferência enzimática ( $G_e$ ), energia livre de Gibbs de transferência de proteínas ( $G_p$ ), seletividade ( $S$ ), recuperação teórica ( $\%Y$ ) e o fator de purificação ( $FP$ ) foram avaliados em função da variação da concentração de extrato e fosfato de potássio monobásico/bibásico, no pH 7,0 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tabela 8. Projeto experimental do planejamento fatorial do delineamento composto central rotacional para o estudo dos parâmetros de partição

T	Variáveis		$K_p$	$K_e$	$G_e$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$G_p$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$S$	%Y	FP
	% E	% S							
1	5,00	12,00	9,74	1,64	-1159,68	-5326,15	0,1791	32,63	0,13
2	5,00	15,00	43,56	0,30	2820,17	-8573,23	0,0062	80,94	0,66
3	12,00	12,00	15,29	0,20	3114,80	-6819,62	0,0214	81,82	0,81
4	12,00	15,00	21,78	0,10	5499,35	-7313,96	0,0035	90,69	1,20
5	3,55	13,50	3,97	1,74	-1305,99	-3351,86	0,4039	39,90	0,28
6	13,45	13,50	73,59	0,03	8321,61	-9796,72	0,0005	97,30	3,52
7	8,50	11,38	9,47	0,70	853,61	-5622,77	0,0639	50,80	0,56
8	8,50	15,62	23,27	0,20	3645,86	-7572,83	0,0093	87,41	0,95
9	8,50	13,50	32,96	0,23	3417,97	-8078,32	0,0060	82,89	1,18
9	8,50	13,50	28,93	0,37	4250,86	-8307,18	0,0057	87,35	1,33
9	8,50	13,50	28,54	0,29	2891,55	-7028,98	0,0037	79,49	0,89

T- tratamento; E – Extrato; S – Fosfato de sódio;  $K_p$  – coeficiente de partição de proteínas totais;  $K_e$  – coeficiente de partição enzimático;  $G_e$  – energia livre de Gibbs de transferência enzimática;  $G_p$ : energia livre de Gibbs de transferência de proteínas;  $S$  – seletividade; %Y – recuperação teórica e FP – fator de purificação.

Posteriormente, foi realizada a análise de regressão para determinar as equações dos parâmetros de partição em função das variáveis independentes significativas. Estas equações foram obtidas a partir das regressões dos dados experimentais, utilizando a versão para estudante do software SAS STUDIO (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Na Tabela 9 estão as equações obtidas.

Com base na significância ( $P = 0,05$ ), os dados foram verificados a partir da Análise de Variância (ANOVA) pelo teste t (ANEXO) para cada variável resposta ( $K_e$ ,  $K_p$ ,  $G_e$ ,  $G_p$ ,  $S$ , %Y ou FP) e todos os modelos da Tabela 9 foram significativos.

Tabela 9. Equações de regressão relacionando parâmetros de partição em função da concentração fosfato de potássio monobásico/bibásico (%) e do extrato (%)

Parâmetros	Equações
$K_p$	$\hat{Y} = 1,13491 + 2,93705[E]$
$K_e$	$\hat{Y} = 12,579 - 1,347E - 0,697[Sal] + 0,0609[E][s] + 0,0224[E]^2$
$G_e$	$\hat{Y} = 64424 + 746,47699[E] + 8270,17845[s] - 274,65902[s]^2$
$G_p$	$\hat{Y} = 4020,6095 - 325,2541[E] - 617,1309[s]$
$S$	$\hat{Y} = 1,0386 - 0,14643[E] - 0,02179[s] + 0,00699[E]^2$
%Y	$\hat{Y} = 815,222 + 39,364[E] + 96,4442[s] - 1,8394[E][s] - 0,5705[E]^2 - 2,6655[s]^2$
FP	$\hat{Y} = 43,4353 + 0,2031[E] + 6,26956[s] - 0,022745[s]^2$

$K_p$  é o coeficiente de partição de proteínas totais;  $K_e$  é o coeficiente de partição enzimático;  $G_e$  é a energia livre de Gibbs de transferência enzimática;  $G_p$  é a energia livre de Gibbs de transferência de proteínas;  $S$  é a seletividade, %Y é a recuperação teórica; FP é o fator de purificação;  $E$  é o percentual de extrato e  $s$  é o percentual de sal.

Ao derivar a equação para o estudo do coeficiente de partição das lipases ( $K_e$ ), o valor resultante para a concentração de sal foi 13,68% e para o extrato foi 11,46%. Ao substituir esses valores na equação, o valor de  $K_e$  foi 0,096. Os valores empíricos desse parâmetro na Tabela 8 assim como o valor calculado no ponto ótimo de partição das lipases, indicam que essas enzimas migraram preferencialmente para fase inferior. Esse comportamento pode ser observado na superfície de resposta de  $K_e$  como está expresso na Figura 2.

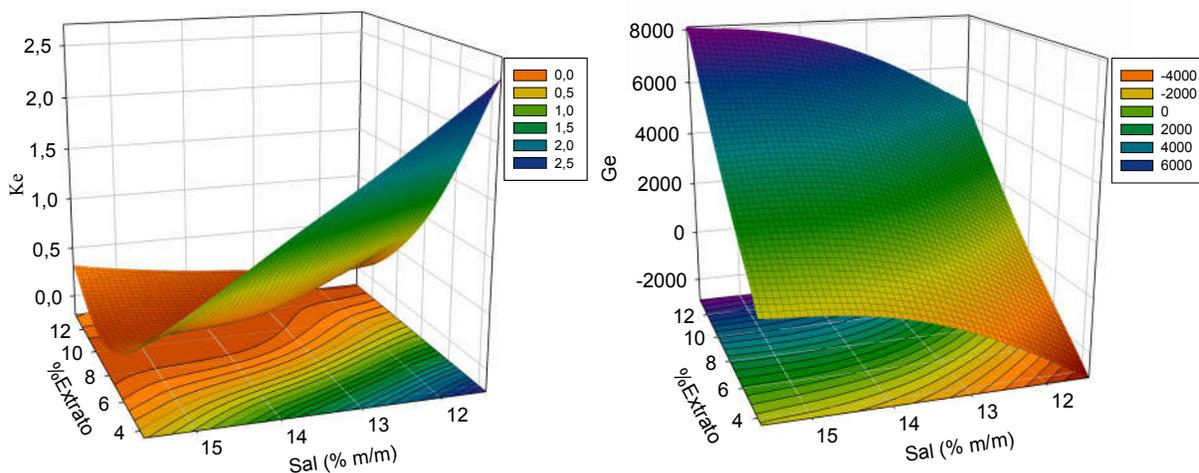


Figura 2. Superfície de resposta para o coeficiente de partição das lipases ( $K_c$ ) e energia livre de Gibbs de transferência das lipases ( $G_e$ ) em função da concentração do fosfato de potássio e do extrato na composição do sistema aquoso bifásico (SAB).

O gráfico da energia livre de Gibbs de transferência das lipases ( $G_e$ ) (Figura 2) mostra que energeticamente a partição ocorreu para ambas as fases, com maior tendência de partição das enzimas lipolíticas para a fase inferior (região positiva do eixo  $G_e$ ). Ao calcular a derivada da equação de  $G_e$  a concentração de fosfato de potássio foi 15,05%. A concentração do extrato influenciou linearmente  $G_e$ . Assim, dentro da faixa de concentração estudada, a melhor concentração de extrato que maximiza  $G_e$  é 13,45%. O valor calculado de  $G_e$  para essa concentração resultou em  $7871,35 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Portanto, ao avaliar o comportamento de  $K_e$  e  $G_e$ , é observado que tanto o valor calculado quanto o valor experimental demonstram que o SAB utilizado nesse estudo favorece a migração das lipases para a fase inferior, pois o valor da energia de transferência é positiva.

Pelo valor da intercessão da equação linear de  $K_p$  (1,1349) pôde-se inferir que as proteínas migram para a fase superior independente das concentrações dos componentes do SAB. Os resultados da energia livre de Gibbs de transferência das proteínas totais ( $G_p$ ) apresentou valores que justificam o comportamento observado no  $K_p$ . Pela equação, as maiores concentrações dos componentes, dentro da faixa estudada, resultam em valores cada vez mais negativos, indicando maior migração de proteínas para a fase superior. Os valores experimentais corroboram com esse resultado, pois mostram que as proteínas contaminantes foram para a fase oposta à da enzima, ou seja, fase superior (Tabela 8). A fase rica em PEG é mais hidrofóbica do que fase inferior, rica em sal.

A derivação da equação da seletividade ( $S$ ), resultou na concentração calculada do extrato de 10,47% para atingir um valor máximo de  $S$ . Para uma concentração fixa de PEG, à medida que a concentração de sal é aumentada na composição global, aumenta-se o tamanho da linha de amarração (Figura 1) e o valor de  $S$ , confirmando a influência linear da concentração de sal. Portanto, quando as fases apresentam propriedades bem-definidas favorecem a partição da biomolécula para a fase que ela possui maior afinidade, e nesse caso, ocorre também a elevação da seletividade do sistema.

Os melhores valores experimentais observados para a seletividade (0,0005) e a recuperação teórica (% $Y$ ) (97,30%) foram na mesma concentração do SAB, em 13,45% de extrato e 13,50% de fosfato de potássio. O ponto ótimo de % $Y$  calculado (93,76 %) a partir da derivada de sua equação (Tabela 9) foi na concentração 11,95% de extrato e 13,99% de sal. Na Figura 3 está representado o gráfico que mostra o comportamento de % $Y$  e  $FP$ . Os resultados de Padilha e Osório, (2019) corroboram com % $Y$  obtido. Ao analisarem a partição de lipase de *Burkholderia cepacia* em vários sistemas, concluíram que o de maior eficiência (98%) foi utilizando PEG 1500/sal fosfato em pH 6,0.

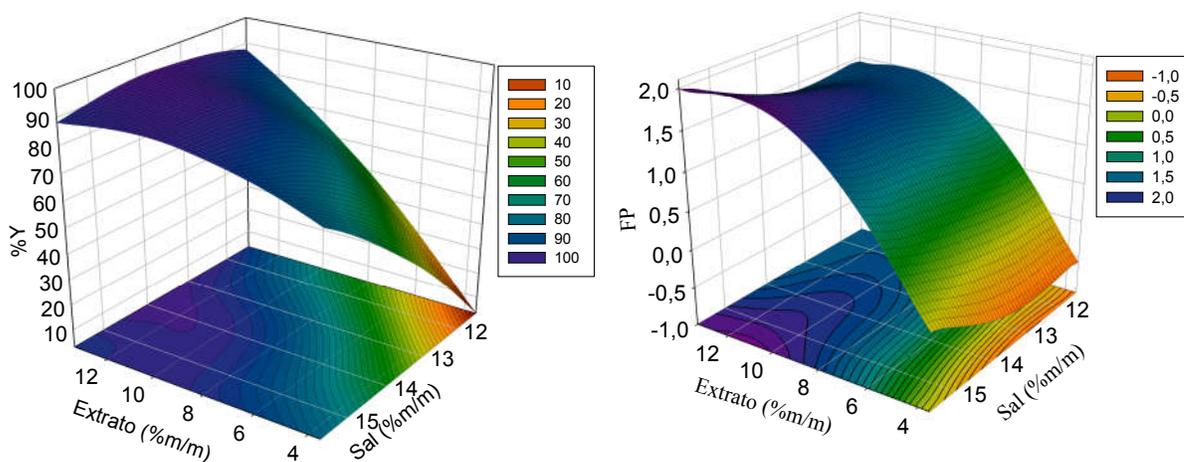


Figura 3. Superfície de resposta para a recuperação teórica (% $Y$ ) e fator de purificação ( $FP$ ) em função da concentração do fosfato de potássio e do extrato na composição do sistema aquoso bifásico (SAB).

A Figura 3 também apresenta como o fator de purificação ( $FP$ ) varia com a concentração dos componentes estudados no SAB. Com o auxílio da equação de  $FP$  (Tabela 9) é possível observar que a concentração do sal exerce maior influência nesse fator que a concentração do

extrato. Ao calcular o ponto máximo de *FP*, a concentração de fosfato de potássio foi 13,78% e a concentração de extrato é a máxima possível no SAB.

Após verificar qual a melhor concentração dos componentes que promoveriam a máxima partição de lipases com a máxima atividade foi realizado a comparação com sistemas de outros trabalhos que particionaram lipases vegetal e microbiológica. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para *Ke* e *Kp*.

Tabela 10. Partição da lipase do extrato em SAB: comparação entre sistemas de outros estudos com o desse trabalho

SAB	Fase	Atividade ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )	U/mL	Proteínas ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Atividade específica	<i>Ke</i>	<i>Kp</i>
PEG 1500/ $\text{K}_2\text{PO}_4$	Superior	3557,5	474,33	0,40	1195,57		
	Inferior	5,88	0,78	8,58E-06	91486,15	0,01	46240,21
Isopropanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Superior	1350,00	180,00	0,46	395,47	1,67	1,28
	Inferior	633,33	84,44	0,36	236,32		
PEG 4000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Superior	2308,33	297,11	0,32	905,47		
	Inferior	5E-09	6,67E-10	8,58E-06	7,77E-05	11943465,32	37296,04

Os valores de proteínas e atividade ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) tendendo a zero na fase inferior do SAB composto por PEG 1500/ $\text{K}_2\text{PO}_4$  e no SAB composto por PEG 4000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , torna a análise dos resultados por meio do *Ke* e *Kp* menos eficaz que a avaliação da atividade total (U/mL) em cada fase de maneira isolada. Portanto, a fase que apresentou maior valor de atividade total (474,33 U/mL) foi a superior do SAB composto por PEG 1500,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  e água. Sendo assim essa fase foi utilizada para a verificação da imobilização em carvão ativado.

### 3.2.3. Imobilização das lipases

Como foi observado no tópico anterior, a fase superior do SAB composto por PEG 1500,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  e água foi selecionado para a imobilização em carvão ativado. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.

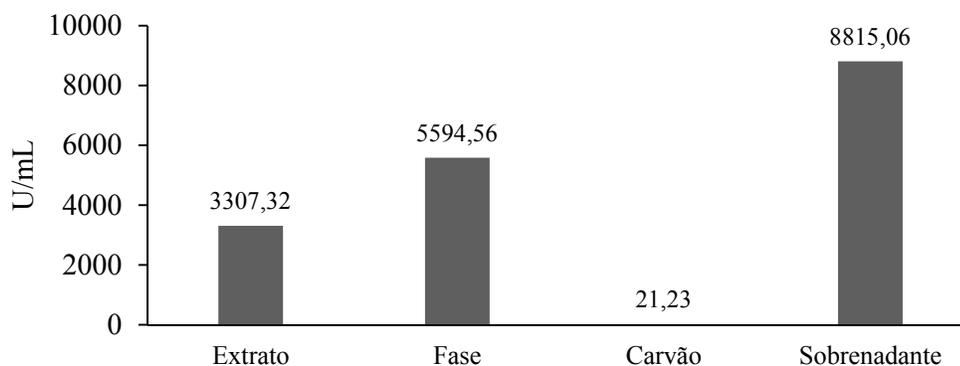


Figura 4. Imobilização em carvão ativado da fase superior do SAB composto por PEG 1500,  $K_2PO_4$  e água após a partição das lipases do extrato da casca de pequi.

Na Figura 4 estão representadas as atividades totais do extrato puro, da fase superior do SAB composto por PEG 1500,  $K_2PO_4$  e água após a partição das lipases do extrato da casca de pequi, do carvão ativado após o processo de imobilização das lipases na fase e o sobrenadante removido do tubo com carvão na imobilização. Considerando que não houve imobilização da enzima na matriz de carbono, verificou-se que esse processo não é recomendado para tal finalidade.

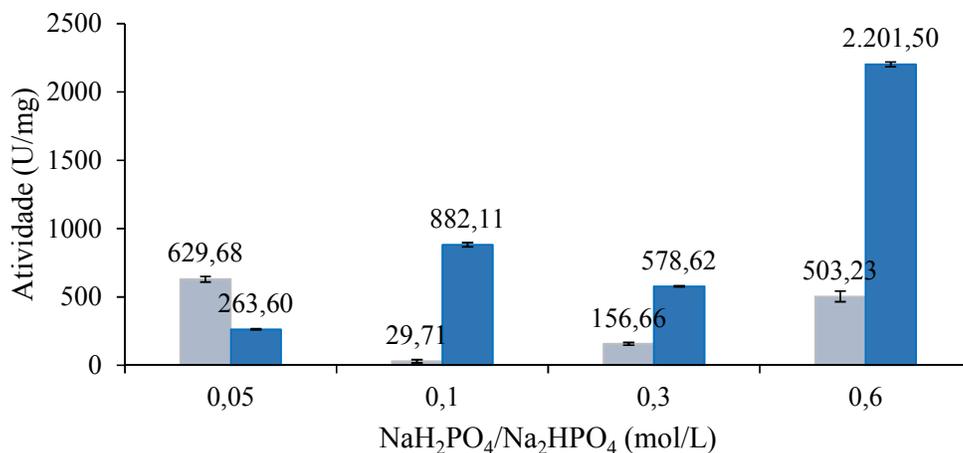


Figura 5. Imobilização em carvão ativado do extrato da casca de pequi. ■ Sobrenadante (extrato não imobilizado); ■ Lipase imobilizada.

A fim de observar se o carvão ainda seria um bom suporte para as enzimas lipolíticas presentes na casca de pequi, o extrato puro foi submetido ao processo de imobilização (Figura 5). A força iônica do meio foi alterada pela adição de fosfato mono/dissódico. A atividade do

carvão e do sobrenadante residual de cada tubo foi quantificada. O carvão que entrou em contato com o extrato, cuja concentração de fosfato era 0,6 M, apresentou o maior valor de atividade enzimática total (U/mL).

#### 4. CONCLUSÃO

Utilizando os planejamentos experimentais fatorial completo, delineamento composto central rotacional e metodologia de resposta foi possível verificar as melhores composições para a partição da lipases presentes no extrato da casca de pequi. Para melhores resultados de  $Ke$ ,  $\%Y$  e  $FP$ , a concentração calculada dos componentes do SAB foi aproximadamente 15 % de PEG 1500 g mol<sup>-1</sup>, 13,7 % fosfato de potássio monobásico/bibásico no pH 7,0, 11,5 % para o extrato da casca de pequi e 59,8 % de água. A  $S$  é máxima na concentração 10,47% de extrato e nas maiores concentrações de sal. Para atingir ótimos valores, as variáveis  $Kp$ ,  $Gp$  e  $Ge$ , as concentrações de extrato foram maiores que 13,45 % e de sal foram maiores que 15 %, dentro das faixas estudadas. No entanto, um sistema composto por PEG 1500, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água de outro trabalho apresentou melhor resultado de partição das lipases para a fase superior. Essa fase foi selecionada para o processo de imobilização em carvão ativado. Não houve imobilização. Porém, o extrato enzimático, sem pré-purificação resultou numa elevada atividade (2201 U/mL) com o aumento da força iônica do meio (0,6M).

#### 5. REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P.-A. Partition of cell particles and macromolecules. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 24, p. 309–341, 1970.

AMID, M. et al. A novel liquid/liquid extraction process composed of surfactant and acetonitrile for purification of polygalacturonase enzyme from *Durio zibethinus*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 993–994, p. 1–8, 2015.

AZIZ, N. F. H. A. et al. Purification of  $\beta$ -mannanase derived from *Bacillus subtilis* ATCC 11774 using ionic liquid as adjuvant in aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1055–1056, n. April, p. 104–112, 2017.

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**, v. 72, n. 1–

2, p. 248–254, 1976.

BRITO, M. J. P. et al. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421–428, 2017.

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.

CHENG, Z. et al. Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 75–87, 2017.

CHONG, K. Y. et al. Aqueous two-phase extraction of bioactive compounds from haskap leaves (*Lonicera caerulea*): Comparison of salt/ethanol and sugar/propanol systems. **Separation and Purification Technology**, v. 252, n. July, p. 117399, 2020.

DHAWANE, S. H.; KUMAR, T.; HALDER, G. Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 176, n. June, p. 55–68, 2018.

DOS SANTOS, K. A. et al. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 94, n. March, p. 116–125, 2020.

GAO, C. L. M. et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth. **Process Biochemistry**, v. 104, p. 142–151, 2021.

GONÇALVES, M. C. P. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, n. October 2018, p. 95–110, 2019.

GONZÁLEZ-AMADO, M. et al. Recovery of lactose and proteins from cheese whey with poly(ethylene)glycol/sulfate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 255, n. June 2020, 2021.

HAMTA, A.; DEHGHANI, M. R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 20–24, 2017.

HU, M. et al. Liquid-Liquid and Solid-Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 48, n. 6, p. 1561–1564, 2003.

JAMSHIDI, S.; PAZUKI, G. Effect of hybrane hyperbranched polymer additive on partitioning of cephalexin antibiotic in aqueous biphasic systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 259, p. 48–54, 2018.

LEÃO, D. P. et al. Potential of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peels as sources of highly esterified pectins obtained by microwave assisted extraction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 575–580, 2018.

LYU, M. et al. Toward Complete Resolution of DNA/Carbon Nanotube Hybrids by Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 51, p. 20177–20186, 2019.

MARIANI, M. et al. Elaboração e avaliação de biscoitos sem glúten a partir de farelo de arroz e farinhas de arroz e de soja Elaboration and evaluation of gluten-free cookies made with rice bran. **Brazilian Journal of Food Techology**, v. 18, n. 1, p. 70–78, 2015.

MASHAYEKHI, F. et al. Concentration of mammalian genomic DNA using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1613–1623, 2009.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2020.

MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, n. 1, p. 285–293, 1998.

MORDOR INTELLIGENCE. **Lipase market - growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts**.

NASCIMENTO, P. A. **Extração de lipase da amêndoa do pequi e purificação parcial por sistemas aquosos bifásicos**. ITAPETINGA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira, 2020.

NASCIMENTO, P. A. et al. Optimization of lipase extraction from pequi seed ( *Caryocar brasiliense* Camb.) . **Journal of Food Processing and Preservation**, n. April, p. 1–8, 2021a.

NASCIMENTO, P. A. et al. Optimization of lipase extraction from pequi seed (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 7, p. 1–8, 2021b.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Study of liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene glycol) (PEG) and sodium thiosulfate pentahydrate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O) at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, p. 1–8, 2018.

PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic Method for Extraction/Purification of a Burkholderia cepacia Lipase with Potential Biotechnology Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1108–1126, 2019.

PAN, Y. et al. A clean and efficient method for separation of vanadium and molybdenum by aqueous two-phase systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113540, 2020.

PEREIRA, J. F. B.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous two-phase systems. **Liquid-Phase Extraction**, p. 157–182, 2020.

PINHO, L. DE et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326–331, 2012.

PIRDASHTI, M. et al. Phase equilibria of aqueous mixtures of PEG with formate salt: Effects of pH, type of cation, polymer molecular weight and temperature. **Fluid Phase Equilibria**, v. 485, p. 158–167, 2019.

RAMAKRISHNAN, V. et al. Extraction and purification of lipase from Enterococcus faecium MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19–27, 2016.

REIS FILHO, J. et al. Melhoria do valor nutricional do brownie utilizando farinha do mesocarpo externo do pequi (Caryocar brasiliense camb). **Motricidade**, v. 14, n. 1, p. 196–204, 2018.

REPORTS AND DATA. **Microbial Lipase Market Source (Fungi and Bacteria), by Form (Powder and Liquid), By Application (Cleaning Agents, Animal Feed, Dairy Products, Bakery Products, And Confectionery Products), And Region - Global Forecast To 2026.**

REQUEJO, P. F. et al. Study of Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Based on Ethyl Lactate and Partitioning of Rutin and Quercetin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 48, p. 21196–21204, 2020.

ROCHA, L. B. et al. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (Caryocar brasiliense Camb.)

- fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 592–598, 2015.
- SANTOS, M. P. F. et al. New insight about the relationship between the main characteristics of precursor materials and activated carbon properties using multivariate analysis. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 98, n. 7, p. 1501–1511, 2020.
- SANTOS, V. C. et al. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1–2, p. 75–83, 2011.
- SHAFEEYAN, M. S. et al. A review on surface modification of activated carbon for carbon dioxide adsorption. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 89, n. 2, p. 143–151, 2010.
- SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.
- SHOW, P. L. et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 226–233, 2012.
- SIQUEIRA, B. DOS S. et al. Extracted pectin of “pequi” peel and application in light mango jam. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 560–567, 2012.
- SOARES, M. S. et al. Development and chemical characterization of four obtained from the external mesocarp of “pequizeiro” fruit. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 949–954, 2010.
- ULKER, C.; GOK, Z.; GUVENILIR, Y. Performance comparison of commercial and home-made lipases for synthesis of poly( $\delta$ -valerolactone) homopolymers. **Journal of Renewable Materials**, v. 7, n. 4, p. 335–343, 2019.
- WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663–670, 1979.

## ANEXO: CAPÍTULO 1

a- Partição do extrato fatorial completo

TRAT	Fase superior			Fase inferior		
	Teor de proteínas totais (mg ml <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Teor de proteínas totais (mg ml <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	0,261 ± 0,043	13,505 ± 1,469	53,019 ± 2,379	0,026 ± 0,008	4,798 ± 0,227	192,315 ± 3,370
2	0,205 ± 0,020	7,043 ± 0,491	35,335 ± 0,506	0,021 ± 0,005	4,970 ± 0,751	245,994 ± 3,005
3	0,147 ± 0,001	9,205 ± 0,535	62,546 ± 0,896	0,001 ± 0,001	2,656 ± 0,183	2389,541 ± 12,475
4	0,152 ± 0,008	7,109 ± 0,055	47,189 ± 1,872	0,004 ± 0,000	3,970 ± 0,524	959,576 ± 4,590
5	0,386 ± 0,025	17,073 ± 0,977	44,291 ± 0,330	0,071 ± 0,012	6,958 ± 0,454	98,532 ± 1,660
6	0,188 ± 0,013	11,175 ± 0,739	59,848 ± 1,009	0,001 ± 0,000	4,063 ± 0,236	4664,281 ± 8,586
7	0,343 ± 0,007	23,463 ± 0,841	68,328 ± 1,065	0,067 ± 0,005	3,946 ± 0,140	59,492 ± 3,227
8	0,279 ± 0,022	13,433 ± 1,011	48,087 ± 0,174	0,019 ± 0,005	6,378 ± 0,262	337,028 ± 6,818
9	0,261 ± 0,002	9,253 ± 1,351	35,382 ± 2,853	0,001 ± 0,000	3,285 ± 0,812	3771,393 ± 32,019
10	0,280 ± 0,025	9,061 ± 0,032	32,980 ± 0,799	0,002 ± 0,000	2,119 ± 0,314	987,611 ± 8,395
11	0,209 ± 0,007	8,574 ± 0,990	41,308 ± 0,689	0,006 ± 0,002	3,119 ± 0,367	501,635 ± 4,257
12	0,228 ± 0,032	12,472 ± 0,450	55,468 ± 3,883	0,008 ± 0,001	5,662 ± 0,646	711,695 ± 7,334
13	0,437 ± 0,012	20,442 ± 0,973	46,726 ± 2,566	0,139 ± 0,005	14,106 ± 2,986	101,782 ± 4,834
14	0,459 ± 0,008	15,745 ± 1,172	34,337 ± 1,161	0,033 ± 0,008	2,156 ± 0,017	67,491 ± 2,796
15	0,322 ± 0,075	15,313 ± 0,635	50,287 ± 2,996	0,060 ± 0,000	3,563 ± 1,309	59,712 ± 1,945
16	0,631 ± 0,038	11,950 ± 0,740	18,756 ± 0,394	0,031 ± 0,009	0,711 ± 0,314	22,162 ± 0,492

b- Análise de variância para o fatorial completo dentro dos testes iniciais de extração de lipase a partir da casca do pequi

FV	GL	QM	f	P
Temperatura (A)	1	0,04817	0,84	0,3688
Extrato (B)	1	1,749483	30,37	<0,0001
PEG(C)	1	0,20224	3,51	0,072
SAL(D)	1	0,278817	4,84	0,037
A×B	1	0,177	3,08	0,091
A×C	1	0,009	0,14	0,711
A×D	1	0,337	6,56	0,017
B×C	1	0,362	7,16	0,013
B×D	1	0,208	3,69	0,066
C×D	1	0,030	0,48	0,496

c- Partição do extrato DCCR

TRAT	Fase superior			Fase inferior		
	Teor de proteínas totais (mg ml <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Teor de proteínas totais (mg ml <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	0,198 ± 0,004	9,023 ± 0,732	45,601 ± 0,845	0,020 ± 0,001	0,541 ± 0,001	26,634 ± 0,001
2	0,192 ± 0,036	7,949 ± 1,226	41,583 ± 0,495	0,012 ± 0,011	0,638 ± 0,138	151,695 ± 3,458
3	0,308 ± 0,012	10,710 ± 0,749	34,804 ± 1,040	0,004 ± 0,001	0,660 ± 0,106	151,652 ± 3,731
4	0,324 ± 0,005	5,369 ± 1,192	16,528 ± 0,398	0,011 ± 0,009	1,771 ± 1,677	189,230 ± 4,222
5	0,100 ± 0,005	10,458 ± 0,067	104,470 ± 1,369	0,021 ± 0,006	3,173 ± 0,305	61,187 ± 2,354
6	0,374 ± 0,013	8,354 ± 0,162	22,350 ± 0,374	0,022 ± 0,005	3,417 ± 0,041	748,869 ± 6,116
7	0,214 ± 0,019	12,445 ± 3,911	59,335 ± 0,590	0,017 ± 0,002	3,238 ± 0,295	93,192 ± 2,723
8	0,241 ± 0,001	9,706 ± 0,393	40,314 ± 0,501	0,019 ± 0,005	2,269 ± 1,076	195,312 ± 0,881
9	0,221 ± 0,019	13,347 ± 0,444	60,569 ± 0,136	0,025 ± 0,003	1,545 ± 0,052	416,066 ± 5,719
9	0,256 ± 0,028	12,270 ± 0,377	48,366 ± 0,689	0,017 ± 0,015	2,882 ± 1,838	408,625 ± 7,012
9	0,256 ± 0,025	11,642 ± 0,458	51,698 ± 0,583	0,005 ± 0,001	3,782 ± 0,565	417,513 ± 5,814

### ANEXO: CAPÍTULO 3

#### A- ANOVA para modelo quadrático de KP

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	7529,92	941,24	21,44	<0,0001	-	-
Interseção	29,35	-	-	-	-	-	4,01	0,0011
X <sub>1</sub> -% Extrato	10,28	1	1690,75	1690,75	38,52	<0,0001	2,51	0,0240
X <sub>2</sub> -%SAL	7,48	1	895,10	895,10	20,39	0,0007	1,83	0,0877
X <sub>12</sub>	-6,83	1	373,59	373,59	8,51	0,0129	-1,18	0,2563
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	3,47	1	455,83	455,83	10,38	0,0073	0,68	0,5067
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-7,74	1	617,93	617,93	14,08	0,0028	-1,52	0,1499
Tratamento	-	3	3496,73	1165,57	26,55	<0,0001	-	-

#### B- ANOVA para modelo quadrático de Ke

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	7,41	0,93	186,86	<0,0001	-	-
Interseção	0,16	-	-	-	-	-	2,23	0,0414
X <sub>1</sub> -% Extrato	-0,49	1	3,93	3,93	791,73	<,0001	-12,28	<0,0001
X <sub>2</sub> -%SAL	-0,29	1	1,32	1,32	265,34	<0,0001	-7,11	<0,0001
X <sub>12</sub>	0,30	1	0,73	0,73	147,49	<0,0001	5,30	<0,0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,33	1	0,92	0,92	185,37	<0,0001	6,52	<0,0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,14	1	0,19	0,19	38,27	<0,0001	2,70	0,0164
Tratamento	-	3	0,33	0,11	22,23	<0,0001	-	-

## C- ANOVA para modelo quadrático de Ge

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	153550119,3	19193764,9	37,20	<0,0001	-	-
Interseção	3637,98	-	-	-	-	-	7,50	<0,0001
X <sub>1</sub> -% Extrato	2612,67	1	109216668,2	109216668,2	211,68	<0,0001	9,63	<0,0001
X <sub>2</sub> -%SAL	1281,58	1	26279050,3	26279050,3	50,93	<0,0001	4,73	0,0003
X <sub>12</sub>	-491,67	1	1933952,8	1933952,8	3,75	0,0768	-1,28	0,2193
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-121,87	1	150157,8	150157,8	0,29	0,5994	-0,36	0,7232
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-661,23	1	4513240,6	4513240,6	8,75	0,0120	-1,96	0,0690
Tratamento	-	3	11457049,7	3819016,6	7,40	0,0046	-	-

## D- ANOVA para modelo quadrático de Gp

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	73830053,76	9228756,72	33,40	<0,0001	-	-
Interseção	-8171,06	-	-	-	-	-	-12,68	<0,0001
X <sub>1</sub> -% Extrato	-1138,39	1	20734880,30	20734880,30	75,04	<0,0001	-3,16	0,0065
X <sub>2</sub> -%SAL	-925,70	1	13710620,12	13710620,12	49,62	<0,0001	-2,57	0,0213
X <sub>12</sub>	658,96	1	3473792,58	3473792,58	12,57	0,0040	1,29	0,2153
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	635,06	1	1447418,17	1447418,17	5,24	0,0410	1,42	0,1771
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	803,10	1	6657792,33	6657792,33	24,09	0,0004	1,79	0,0934
Tratamento	-	3	27805550,26	9268516,75	33,54	<0,0001	-	-

## E- ANOVA para modelo quadrático de S

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	0,34	0,04	255,79	<0,0001	-	-
Interseção	0,01	-	-	-	-	-	0,34	0,7400
X <sub>1</sub> -% Extrato	-0,10	1	0,15	0,15	891,54	<0,0001	-5,33	<0,0001
X <sub>2</sub> -%SAL	-0,03	1	0,02	0,02	102,38	<0,0001	-1,81	0,0910
X <sub>12</sub>	0,04	1	0,01	0,01	72,96	<0,0001	1,52	0,1481
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,08	1	0,09	0,09	518,71	<0,0001	3,71	0,0021
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,01	1	3,55E-04	3,55E-04	2,12	0,1706	-0,26	0,7982
Tratamento	-	3	0,08	0,02	152,87	<0,0001	-	-

## F- ANOVA para modelo quadrático de %Y

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	8874,30	1109,29	32,49	<0,0001	-	-
Interseção	81,50	-	-	-	-	-	27,49	<0,0001
X <sub>1</sub> -% Extrato	16,92	1	4578,89	4578,89	134,11	<0,0001	10,21	<0,0001
X <sub>2</sub> -%SAL	13,26	1	2814,46	2814,46	82,43	<0,0001	8,00	<0,0001
X <sub>12</sub>	-9,66	1	746,04	746,04	21,85	0,0005	-4,12	0,0009
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-6,09	1	216,55	216,55	6,34	0,0270	-2,95	0,0099
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-5,10	1	268,61	268,61	7,87	0,0159	-2,47	0,0259
Tratamento	-	3	249,75	83,25	2,44	0,1150	-	-

G- ANOVA para modelo quadrático de Fp

<b>FV</b>	<b>Parâmetro estimado</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>
Modelo	-	8	17,67	2,21	9,52	<0,0004	-	-
Interseção	1,31	-	-	-	-	-	3,92	0,0014
X <sub>1</sub> -% Extrato	0,71	1	8,08	8,08	34,83	<0,0001	3,80	0,0017
X <sub>2</sub> -%SAL	0,19	1	0,59	0,59	2,55	0,1361	1,03	0,3197
X <sub>12</sub>	-0,07	1	0,03	0,03	0,15	0,7041	-0,25	0,8056
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,16	1	1,22	1,22	5,27	0,0405	0,69	0,5012
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,45	1	2,14	2,14	9,20	0,0104	-1,95	0,0696
Tratamento	-	3	5,61	1,87	8,05	0,0033	-	-