



AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS E AGENTES DE ATIVAÇÃO EM BEADS DE CELULOSE EMPREGADOS COMO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Albuquerque, B. L. A.; Assis, G. P.; Pereira, R. A.; Rodrigues, L. A.; Freitas, L.

Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 12602-810, Brasil

Email: larissafreitas@usp.br

RESUMO

O objetivo do estudo foi desenvolver biocatalisadores ativos e estáveis, imobilizando lipase de *Candida rugosa* (LCR) em beads de celulose. Inicialmente foram realizados diferentes pré-tratamentos (sem tratamento, calcinado e silanizado + ultrassom) nos beads e empregados os agentes de ativação epicloridrina, glutaraldeído e metaperiodato de sódio, visando melhorar a interação entre o suporte e a enzima no processo de imobilização por ligação covalente. A maior atividade catalítica foi observada para os biocatalisadores ativados com epicloridrina (2788,86 – 2818,58 U g⁻¹), sendo selecionados para dar continuidade ao estudo. Caracterizações por MEV e FTIR mostraram diferenças estruturais nos biocatalisadores, além de confirmarem a imobilização da lipase no suporte. O teste de Tukey indicou que não houve diferenças significativas nas atividades catalíticas dos biocatalisadores ativados com epicloridrina, independentemente do pré-tratamento utilizado. Testes de estabilidade térmica indicaram que os biocatalisadores mantiveram 83-88% da sua atividade inicial após incubação por 4 horas a 45°C. Julga-se que, com os resultados obtidos até o presente momento, a escolha da utilização do bead sem pré-tratamento e ativado com epicloridrina seja a melhor condição experimental para a obtenção do biocatalisador, visto que apresenta características semelhantes ao demais, sendo mais vantajoso devido ao menor tempo de preparo e menor custo com reagentes.

Palavras-chave: Bead de celulose, imobilização de lipase, pré tratamento, hidrólise.

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento das preocupações em relação aos danos ambientais, causados pelos catalisadores químicos, incentiva a busca por alternativas que atendam às necessidades da indústria de maneira sustentável. Como consequência, a pesquisa por fontes e técnicas limpas e inovadoras vem se intensificando [1].

Assim, a utilização de enzimas, como biocatalisadores, oferecem uma alternativa promissora à catálise química, devido à sua alta especificidade e capacidade de operar em condições amenas de temperatura e pressão, resultando em processos mais sustentáveis e com menor geração de subprodutos. As lipases, pertencente ao grupo das hidrolases, são amplamente aplicáveis em reações como esterificação, transesterificação, interesterificação e hidrólise de óleos e gorduras. No entanto, limitações como solubilidade no meio reacional,

susceptibilidade à desnaturação e custos elevados ainda limitam o seu uso em aplicações industriais [2,3].

O uso de suportes insolúveis nos meios reacionais surge como uma alternativa para contornar os principais problemas apresentados pelas lipases que impedem seu uso em larga escala, pois, além de torná-las insolúveis no meio reacional, lhes conferem estabilidade, tanto térmica como operacional, além de facilitar sua recuperação ao final do processo[4].

Dentre os diferentes materiais que podem ser usados como suportes para imobilização de enzimas, estão os derivados de celulose que estão sendo cada vez mais empregados para esta finalidade. Dentre esses, estão os beads de celulose, que são partículas esféricas de escala milimétrica que possuem como principal característica sua grande área de superfície, o que os torna capazes de interagir com outras substâncias facilmente, devido à sua estrutura porosa [5,6].

No entanto, a característica hidrofílica dos beads de celulose incentiva a utilização de pré-tratamentos químicos e físicos na sua superfície, visando melhorar a interação da enzima-suporte, já que é sabido que as lipases tem preferência por suportes mais polares [7]. Um exemplo é a silanização que utiliza o γ -aminopropiltriethoxissilano (γ -APTS) como agente funcionalizador, que desempenha um papel fundamental nesse contexto. Existem também diferentes pré-tratamentos físicos que podem ser empregados em materiais utilizados como suporte para imobilização de enzimas, como o ultrassom, que tem como objetivo aumentar a superfície disponível do material e facilitar as etapas posteriores, através da cavitação resultante [8]. A calcinação gera um suporte com poros de dimensões variadas, aumentando a superfície de contato e elevando a área disponível para imobilização enzimática [9].

Dentre as técnicas de imobilização de enzimas, o método de imobilização por ligação covalente se baseia no uso de um agente ativador que adiciona grupos funcionais ao suporte, intensificando sua interação com a enzima e proporcionando maior estabilidade ao biocatalisador, visto que a enzima é ligada covalentemente ao material insolúvel ao meio reacional [10,11].

Assim, o presente estudo visou a obtenção de biocatalisadores ativos e estáveis a partir da imobilização da lipase de *Candida rugosa* (LCR) por ligação covalente em beads de celulose empregando diferentes tratamentos na superfície do suporte e agentes de ativação no processo de imobilização da lipase.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Metodologia

2.1.1 Síntese dos beads de celulose

Os beads foram obtidos pela dissolução de 7g de NaOH em 80ml de água destilada em um agitador magnético, seguida pela adição e dissolução de 12g de ureia e, por fim, 5g de celulose. Após agitação e mistura homogênea, a solução foi colocada no congelador por 40 min para cristalização. Após esse período, a mistura foi novamente agitada magneticamente até atingir homogeneização. Finalmente, essa mistura foi gotejada em uma solução de ácido nítrico (14 ml de HNO_3 em 80ml de água destilada), resultando na formação de esferas uniformes. Em seguida, as esferas foram filtradas a vácuo, lavadas com tampão até atingir o pH 7, sendo o processo concluído com secagem das esferas na estufa por 18 horas a 60°C.

2.1.2 Pré-tratamentos do suporte

Na utilização do ultrassom, os beads de celulose foram colocados em solução tampão fosfato (pH 7; $0,1\text{mol L}^{-1}$) em uma proporção de 10 ml para cada grama de suporte. Essa mistura foi levada para o ultrassom de sonda (Modelo UP200S- Marconi) onde permaneceu durante 30min no ciclo 0,5 e amplitude 100%. Após esse período, os beads foram lavados com tampão e secos em estufa a 60°C.

O tratamento empregando a silanização, foi dividida em 2 etapas. Na 1ª etapa 6,0 g do suporte foi colocado em contato com 100 mL de uma solução de 1% (v/v) de ácido nítrico, sendo levado ao rota evaporador a 75°C por 1h, finalizando-se com a lavagem do produto obtido, cujo pH se encontrava na faixa de 2, até atingir pH 7 e posterior secagem na estufa a 105°C durante 24h. Na 2ª etapa, o suporte foi imerso em uma solução de Y-APTS 0,5%, numa proporção de 18 ml de solução para 6g de suporte, finalizando-se essa etapa com a filtração do produto resultante com heptano e secagem na estufa a 105°C por 18h.

Para a calcinação, o suporte pronto foi levado a um forno tubular (N1200 – Sppencer) sob fluxo de N_2 ($0,5\text{ ml min}^{-1}$) a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir temperatura de 400°C, sendo mantido por 1h.

2.2.2.4 Ativação do suporte

Antes da realização da imobilização da lipase nos beads de celulose por ligação covalente, foi realizada a ativação do suporte. Para isso foi avaliado o desempenho de três

agentes de ativação, epícloridrina, glutaraldeído e metaperiodato de sódio, de acordo metodologias descritas por Santos et al. [12] e Santos et al. [13].

2.2.3 Imobilização da lipase no bead de celulose e quantificação da atividade hidrolítica do biocatalisador

O suporte ativado foi embebido em hexano na proporção de 1:10 (m/v) e mantido sob agitação em shaker a 150 rpm durante 2h. Na sequência, para cada grama de suporte, foram adicionados 100µL de solução de polietilenoglicol (5mg/mL) e 0,25g da lipase de *Candida rugosa* (LCR) na sua forma livre. O imobilizado foi mantido em contato durante 18h a 4°C. Após esse período, o biocatalisador foi filtrado a vácuo e seco até atingir umidade inferior a 10%. A atividade enzimática dos biocatalisadores foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Soares et al. [14]. Também foi realizado o teste de Tukey (nível de significância de 95%) utilizando o software Minitab Statistical, com a finalidade de comparar estatisticamente os valores de atividades dos biocatalisadores sintetizados.

2.2.6 Caracterização dos biocatalisadores sintetizados

As características morfológicas dos biocatalisadores foram analisadas utilizando um microscópio Tescan MIRA 3. Também foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em um espectrômetro Perkin Elmer Frontier, cobrindo a faixa de análise de 450 a 4000 cm⁻¹.

2.2.7 Estabilidade térmica dos biocatalisadores

O teste da estabilidade térmica da lipase de *Candida rugosa* imobilizada nos diferentes suportes obtidos foi realizado a partir da quantificação da sua atividade hidrolítica residual, após incubação à 45°C em meio hexano durante 4 horas, de acordo com metodologia modificada descrita por Bento et al. [15].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da síntese do bead de celulose, realização dos pré-tratamentos, ativação com diferentes agentes de ativação e posterior imobilização da LCR, foram obtidos 09 diferentes biocatalisadores (Tabela 1).

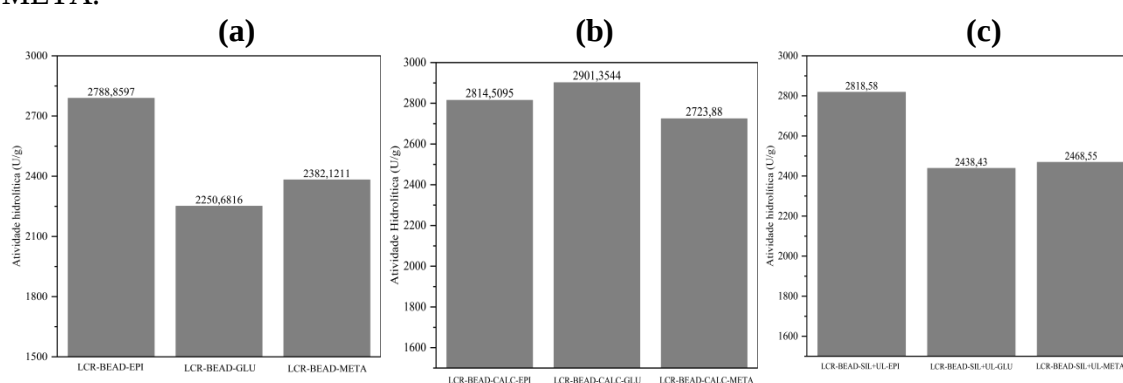
Tabela 1. Biocatalisadores obtidos a partir dos diferentes pré tratamentos e imobilização por ligação covalente empregando diferentes agentes ativadores.

Biocatalisador	Pré-tratamento	Agente de ativação
LCR-BEAD-EPI	Nenhum	Epicloridrina
LCR-BEAD-GLU	Nenhum	Glutaraldeído
LCR-BEAD-META	Nenhum	Metaperiodato de sódio
LCR-BEAD-CALC-EPI	Calcinação	Epicloridrina
LCR-BEAD-CALC-GLU	Calcinação	Glutaraldeído
LCR-BEAD-CALC-META	Calcinação	Metaperiodato de sódio
LCR-BEAD-SIL+UL-EPI	Silanização + Ultrassom	Epicloridrina
LCR-BEAD-SIL+UL-GLU	Silanização + Ultrassom	Glutaraldeído
LCR-BEAD-SIL+UL-META	Silanização + Ultrassom	Metaperiodato de sódio

3.1 Atividades catalíticas dos diferentes biocatalisadores obtidos

Após a síntese dos beads de celulose e realização dos diferentes tratamentos na superfície do suporte foi realizada a ativação empregando três diferentes agentes: epicloridrina, glutaraldeído e metaperiodato de sódio para posteriormente ocorrer a imobilização da lipase de *Candida rugosa*. A Figura 1 (a), (b) e (c) demonstra as atividades observadas para os 9 biocatalisadores obtidos.

Figura 1 - Atividade hidrolítica dos biocatalisadores obtidos a partir da lipase de *Candida rugosa* imobilizada por ligação covalente em beads de celulose tratados empregando diferentes agentes de ativação: **(a)** LCR-BEAD-EPI, LCR-BEAD-GLU e LCR-BEAD-META; **(b)** LCR-BEAD-CALC-EPI, LCR-BEAD-CALC-GLU e LCR-BEAD-CALC-META; **(c)** LCR-BEAD-SIL+UL-EPI, LCR-BEAD-SIL+UL-GLU e LCR-BEAD-SIL+UL-META.



A Figura 1 (a) apresenta as atividades hidrolíticas dos biocatalisadores obtidos pelo bead de celulose sem tratamento e ativados com os diferentes agentes de ativação, na qual é possível observar atividades elevadas para esses biocatalisadores, destacando aquele que empregou epicloridrina como ativador, demonstrando atividade hidrolítica de 2788,86 U g⁻¹.

Já a Figura 1 (b), que apresenta os resultados observados para os biocatalisadores obtidos pela calcinação no suporte, observou-se que, independente do agente de ativação empregado, as atividades hidrolíticas foram muito semelhantes e em alguns casos, um pouco

superiores a obtida pelo biocatalisador formado pelo bead sem tratamento e ativado com epicloridrina, (2788,86 U g⁻¹). É importante citar que esta técnica apresenta uma elevada perda de massa durante o processo de calcinação, que pode chegar a 60% de redução da mesma.

A Figura 1 (c) mostra que o biocatalisador pré-tratado com ultrassom, silanizado e ativado com epicloridrina, apresentou-se mais eficiente que os demais que empregaram o mesmo pré-tratamento, com resultados de 2818,58 U g⁻¹ de atividade hidrolítica, sendo também bastante semelhante a atividade hidrolítica obtida pelo LCR-BEAD-EPI (2788,86 U g⁻¹).

Em trabalho publicado por Santos et al. [16], em que imobilizaram a LCR por ligação covalente em geopolímeros impressos em 3D, obtiveram atividade catalítica de 847,7 U g⁻¹. Já em outro trabalho, Ali et al. [17] empregando a mesma lipase imobilizada em nanopartículas de sílica fibrosa, constaram que a atividade do biocatalisador foi de cerca de 700 U g⁻¹.

Baseado nos resultados expostos, pode-se perceber que os 9 biocatalisadores sintetizados, foram considerados adequados, visto que apresentaram valores de atividades hidrolíticas elevados, quando comparado à outros biocatalisadores obtidos pela mesma lipase, o que contribui diretamente na busca por novos materiais para a obtenção de biocatalisadores estáveis, ativos e com propriedades adequadas para mediar a catálise de bioprocessos.

Analisando-se os resultados das atividades catalíticas obtidas pelos biocatalisadores, nota-se uma superioridade no desempenho do agente de ativação epicloridrina, apresentando os valores mais elevados nos beads sem nenhum tipo de pré-tratamento (LCR-BEAD-EPI) e no bead tratado com ultrassom e silanizado (LCR-BEAD-SIL+UL-EPI), obtendo valores de 2788,86 e 2818,58 U g⁻¹, respectivamente, quando comparado aos outros agentes de ativação. Já para os biocatalisadores calcinados, o LCR-BEAD-CALC-EPI e o LCR-BEAD-CALC-GLU apresentaram resultados semelhantes, de 2814,51 U g⁻¹ e de 2901,35 U g⁻¹, respectivamente.

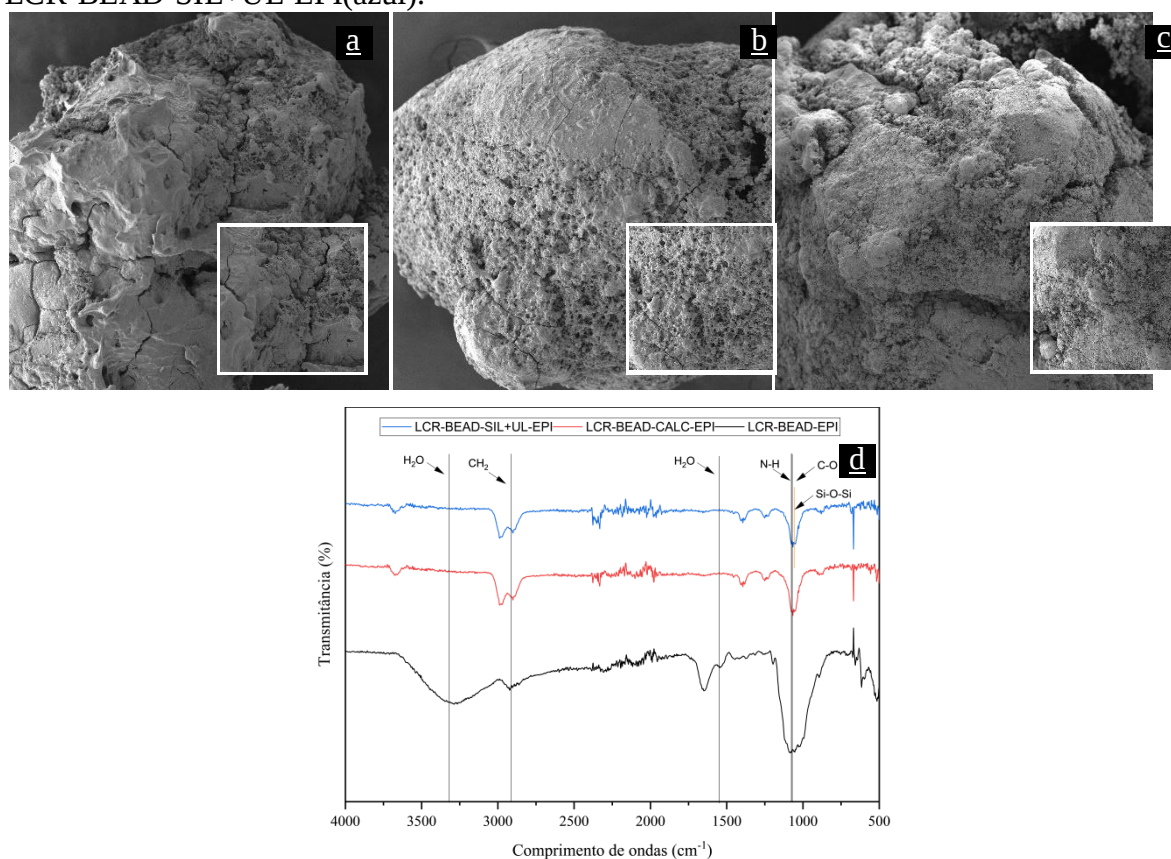
Assim, considerando as maiores atividades catalíticas e a *expertise* que o grupo de pesquisa tem em utilizar a epicloridrina como agente de ativação de diferentes suportes para imobilização de diversas fontes de lipase, optou-se por dar continuidade ao trabalho, selecionando-se os biocatalisadores que empregaram este ativador.

3.2 Caracterização das propriedades dos diferentes suportes obtidos

Foram realizadas as caracterizações morfológicas dos biocatalisadores obtidos pela imobilização da LCR no bead de celulose sem nenhum tratamento, calcinado e que empregou o ultrassom e silanização. A Figura 2 (a-d) apresenta as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e os espectros gerados a partir das análises de espectroscopia de infravermelho, respectivamente.

Analisando-se a Figura 2b, é possível notar que o bead calcinado apresentou maior “porosidade”, ou seja, mais espaços vazios entre os poros, quando comparado ao LCR-BEAD-EPI e LCR-BEAD-SIL+UL-EPI. Observam-se também pequenos aglomerados aderidos à superfície do suporte em todas as imagens, identificando a presença da lipase aos beads de celulose, ocasionada durante o processo de imobilização.

Figura 2 - Micrografias obtidas pelo MEV com aumento de 250 x: (a) LCR-BEAD-EPI (b) LCR-BEAD-CALC-EPI; (c) LCR-BEAD-SIL+UL-EPI; (d) Espectros de FT-IR dos biocatalisadores sintetizados: LCR-BEAD-EPI (preto); LCR-BEAD-CALC-EPI(vermelho); LCR-BEAD-SIL+UL-EPI(azul).



Na Figura 3 notam-se as bandas características da lipase como o grupamento N-H e C-N (CO-NH₂) em 1126 cm⁻¹, além de C-O em 1090 cm⁻¹, que assim como o C-H₂ (2900 cm⁻¹), também refere-se à presença de epiclodrina no suporte.

Não foi notada a presença de vibrações referentes a H₂O por volta de 3237 cm⁻¹ e em 1600 cm⁻¹ para o CRL-BEAD-CALC-EPI, comprovando a eficiência da calcinação do suporte. Já a silanização do CRL-BEAD-SIL+UL-EPI pode ser observada nas vibrações entre 900–1100 cm⁻¹, características do grupamento Si-O-Si [16,18,19].

3.3. Teste de Tukey para a seleção do melhor biocatalisador sintetizado

Visando-se selecionar o biocatalisador sintetizado mais adequado para posteriores aplicações em bioprocessos, foi realizado o teste de Tukey a partir das atividades hidrolíticas obtidas para os LCR-BEAD-EPI, LCR-BEAD-CALC-EPI e LCR-BEAD-SIL+UL-EPI (Tabela 2).

Tabela 2. Análise estatística das atividades hidrolíticas dos biocatalisadores LCR-BEAD-EPI, LCR-BEAD-CALC-EPI e LCR-BEAD-SIL+UL-EPI empregando o teste de Tukey com 95% de confiabilidade.

Biocatalisadores	Atividade hidrolítica (U g ⁻¹)
LCR-BEAD-EPI	2788,86 ^A
LCR-BEAD-CALC-EPI	2814,51 ^A
LCR-BEAD-SIL+UL-EPI	2818,58 ^A

Ao analisar a Tabela 2, pode-se notar que não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos das atividades hidrolíticas dos biocatalisadores avaliados, visto que, todos os sistemas imobilizados partilham da mesma letra indicativa (A), evidenciando tal ocorrência.

3.3 Estabilidade térmica

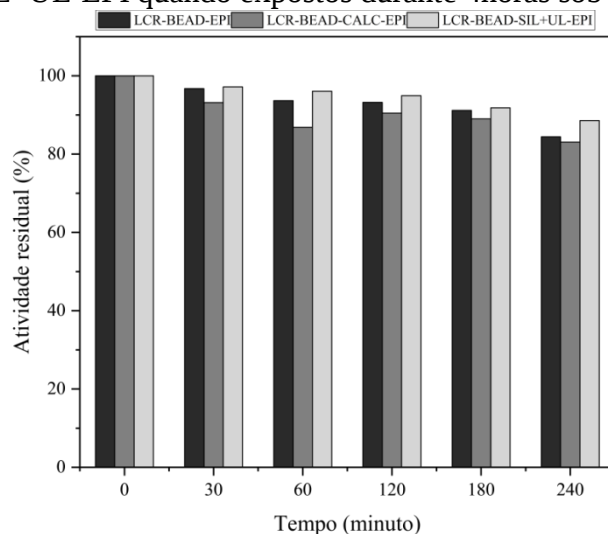
Visando avaliar se o tipo do pré-tratamento realizado no suporte poderia interferir de alguma forma na robustez do biocatalisador, foram realizados testes de estabilidade térmica para os 3 biocatalisadores obtidos pela ativação com epicloridrina. A avaliação foi realizada através da atividade residual dos biocatalisadores expostos durante 4 horas sob 45°C. Os resultados obtidos estão apresentados a Figura 5.

Ao observar a Figura 5, nota-se que após 3h de incubação, todos os biocatalisadores mantinham cerca de 90% da sua atividade catalítica inicial, constatando-se retenção da atividade na faixa de 83 – 88%, dependendo do biocatalisador, após 4h de exposição a temperatura de 45°C.

Liu et al. [20] e Cui et al. [21] em seus trabalhos publicados, descrevem que a imobilização por ligação covalente é considerada uma das técnicas mais eficazes para

manter a estabilidade da enzima, ou seja, impede a ocorrência de uma alteração conformacional não desejada à enzima, quando exposta a diferentes temperaturas e pH.

Figura 5 - Atividade residual dos biocatalisadores LCR-BEAD-EPI, LCR-BEAD-CALC-EPI e LCR-BEAD-SIL+UL-EPI quando expostos durante 4 horas sob 45°C.



Em trabalho realizado por Ali et al. [17], em que os autores imobilizaram a LCR via ligação covalente em nanopartículas de sílica fibrosa e empregaram APTES como agente de ativação, observaram a manutenção de 60% da atividade inicial do biocatalisador após a exposição por 4 horas sob 50°C. Em estudo realizado por Bento et al. [15], em que imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* por adsorção física em estireno-divinilbenzeno, constaram que o biocatalisador apresentava 70% da sua atividade inicial, após 3h de incubação a 60°C.

Esses dados demonstram a elevada eficiência dos biocatalisadores obtidos pelo presente estudo, visto que, foram mantidas atividades residuais acima de 80% para todas as condições avaliadas. Dessa forma, julgou-se que o biocatalisador obtido pela imobilização da LCR no bead sem tratamento e ativado com epicloridrina seja o mais adequado para possíveis aplicações futuras, pois apresenta desempenho semelhante aos demais, além de possuir algumas vantagens, tais como: menor tempo de preparo, menor gasto energético e emprego de menor quantidade de reagentes químicos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a epicloridrina apresentou o melhor desempenho entre os agentes de ativação, sendo selecionado o biocatalisador obtido pela

imobilização da LCR no bead sem tratamento, atingindo atividade hidrolítica de 2788,86 U g⁻¹. As micrografias obtidas por MEV e os espectros de FTIR mostraram diferenças estruturais nos biocatalisadores, além de confirmarem a imobilização da lipase nos beads de celulose. Os testes de estabilidade térmica dos sistemas imobilizados indicaram a manutenção da atividade catalítica inicial na faixa de 83-88%, após incubação por 4 horas a 45°C. Assim, os biocatalisadores obtidos neste estudo apresentam-se como uma alternativa promissora para o avanço na utilização de enzimas em processos sustentáveis, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e aprimorando o desempenho dos bioprocessos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2023/04243-7, a Universidade de São Paulo (Bolsa PUB USP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001, pelo suporte financeiro.

REFERENCIA

- [1] SILVA, M. V. C.; AGUIAR, L. G.; ROSA, C. M. R.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Kinetic study of isopropyl palmitate synthesis catalyzed by lipases immobilized on a magnetic copolymer support. *Chemical Engineering Communications*, vol. 207, no 9, p. 1329–1336, 2020. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1647179>.
- [2] PEREIRA, A. da S.; DE SOUZA, A. H.; FRAGA, J. L.; VILLENEUVE, P.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. *Catalysts*, vol. 12, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>.
- [3] SANTI, M.; SANCINETO, L.; NASCIMENTO, V.; AZEREDO, J. B.; OROZCO, E. V. M.; ANDRADE, L. H.; GRÖGER, H.; SANTI, C. Flow biocatalysis: A challenging alternative for the synthesis of APIs and natural compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no 3, p. 1–32, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22030990>.
- [4] CORTEZ, D. V.; REIS, C.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. The Realm of Lipases in Biodiesel Production. *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*. [S. l.]: Springer International Publishing, 2018. p. 247–288. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6_10.
- [5] GERICKE, M.; TRYGG, J.; FARDIM, P. Functional cellulose beads: Preparation, characterization, and applications. *Chemical Reviews*, vol. 113, no 7, p. 4812–4836, 2013. <https://doi.org/10.1021/cr300242j>.
- [6] ZHANG, Y.; KOBAYASHI, K.; KUSUMI, R.; KIM, U. J.; WADA, M. Adsorption properties of cellulose beads prepared by emulsion-gelation method and subsequent oxidation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 682, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.132859>.
- [7] MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 78, p. 119–134, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>.
- [8] JØRGENSEN, H.; PINELO, M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 11, no 1, p. 150–167, 2017. <https://doi.org/10.1002/bbb.1724>.

- [9] JACKSON, S. D.; WIGZELL, F. A. Characterizing the Processes of Calcination and Reduction in the Preparation of Supported Cobalt Catalysts. 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/267356945>.
- [10] KUJAWA, J.; GŁODEK, M.; LI, G.; AL-GHARABLI, S.; KNOZOWSKA, K.; KUJAWSKI, W. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. *Science of the Total Environment*, vol. 801, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>.
- [11] LIU, S.; BILAL, M.; RIZWAN, K.; GUL, I.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 190, p. 396–408, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006>.
- [12] SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 354, n. 42–44, p. 4823–4826, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.04.019>.
- [13] SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 52–53, no 1–4, p. 49–57, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.11.005>.
- [14] SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of Candida rugosa lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl Biochem Biotechnol* 79, 745–757, 1999. <https://doi.org/10.1385/ABAB:79:1-3:745>.
- [15] BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F.; DE OLIVEIRA, P. C.; FREITAS, L. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 426, p. 95–101, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.061>.
- [16] SANTOS, L. K.; BOTTI, R. F.; INNOCENTINI, M. D. de M.; MARQUES, R. F. C.; COLOMBO, P.; DE PAULA, A. V.; FLUMIGNAN, D. L. 3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of Candida rugosa lipase. *Chemical Engineering Journal*, vol. 414, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128843>.
- [17] ALI, Z.; TIAN, L.; ZHAO, P.; ZHANG, B.; ALI, N.; KHAN, M.; ZHANG, Q. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 134, p. 129–135, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.011>.
- [18] AL QAYOUDI, A.; AL-ZUHAIR, S. Dynamic Modelling of Enzymatic Hydrolysis of Oil Using Lipase Immobilized on Zeolite. *Sustainability (Switzerland)*, vol. 14, 2022. <https://doi.org/10.3390/su14148399>.
- [19] SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Immobilization of lipase on carboxylic acid-modified silica nanoparticles for olive oil glycerolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 41, no 1, p. 115–127, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1852-5>.
- [20] LIU, S.; BILAL, M.; RIZWAN, K.; GUL, I.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 190, p. 396–408, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006>.
- [21] CUI, J.; REN, S.; SUN, B.; JIA, S. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: Current development and future challenges. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 370, p. 22–41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.004>.

TITLE

EVALUATION OF DIFFERENT PRETREATMENTS AND ACTIVATION AGENTS IN CELLULOSE BEADS USED AS SUPPORT FOR LIPASE IMMOBILIZATION

ABSTRACT

The objective of the study was to develop active and stable biocatalysts by immobilizing *Candida rugosa* lipase (CRL) on cellulose beads. Firstly, different pretreatments (untreated, calcined, and silanized + ultrasound) were performed on the beads, and the activation agents epichlorohydrin, glutaraldehyde, and sodium metaperiodate were employed to enhance the interaction between the support and the enzyme in the immobilization process through covalent bonding. The best catalytic activity was observed for the biocatalysts activated with epichlorohydrin (2788.86 – 2818.58 U g⁻¹), which were selected for further study. Characterizations by SEM and FTIR revealed structural differences in the biocatalysts and confirmed the successful immobilization of the lipase on the support. The Tukey test indicated that there were not significant differences in the catalytic activities of the biocatalysts activated with epichlorohydrin, regardless of the pretreatment used. Thermal stability tests showed that the biocatalysts retained 83-88% of their initial activity after incubation for 4 hours at 45°C. Thus, the use of untreated beads activated with epichlorohydrin appears to be the best experimental condition for obtaining the biocatalyst, as it offers similar characteristics to the others while being more advantageous due to the shorter preparation time and lower reagent costs.

Keywords: cellulose bead, lipase immobilization, pretreatment, hydrolysis.