IMOBILZAÇÃO DE DIFERENTES ENZIMAS NO SUPORTE DE CARVÃO ATIVADO MAGNETIZADO

Michelle C. Murakami [1], Leonardo A. Miguel [2], Mairlis S. Sá[3], Mateus P. F. Santos [4], Cristiane M. Veloso [5], Daniela B. Hirata [6]

[1]*Curso de Biotecnologia da UNIFAL-MG, Alfenas, Brasil (Michelle.mcmurakami@gmail.com)*
[2]*Mestrado em Ciências Ambientais da UNIFAL-MG, Alfenas, Brasil*
[3] *Curso de Biotecnologia da UNIFAL-MG, Alfenas, Brasil*
[4]*Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga BA, Brasil*
[5]*Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga BA, Brasil*
[6] *Instituto de Química da UNIFAL-MG, Alfenas, Brasil*

Resumo: Neste trabalho, um suporte proveniente da carbonização das cascas do café foi magnetizado e utilizado na imobilização de diferentes lipases. A imobilização foi feita por adsorção pelo mecanismo de ativação interfacial e os derivados obtidos comparados entre si. O derivado produzido, utilizando-se a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, foi selecionado para ser aplicado na produção de oleato de etila.

Palavras-chave: Imobilização; enzimas; carvão magnetizado; atividade catalítica; esterificação.

INTRODUÇÃO

Muitas indústrias, como alimentícia, farmacêutica, papel e celulose e biocombustíveis, se utilizam de enzimas como biocatalizadores ao invés de catalisadores químicos por diversos fatores: as enzimas possuem elevada seletividade (quimio, régio e estereoseletividade) e essa característica facilitam a purificação de produtos, gerando menos resíduos tóxicos. Ainda, as enzimas atuam em temperaturas e pH moderados, diminuindo o gasto energético durante o processo (Zhang et al., 2026).

Entretanto, uma limitação no uso de enzimas livres é que sua aplicação em reações no qual o meio esteja fora das suas condições de estabilidade pode se tornar inviável. A maioria das proteínas atuam em temperaturas moderadas, pH próximo ao neutro e em meio aquoso. Porém muitas reações industriais utilizam solventes orgânicos ou elevadas faixas de temperatura. Essa mudança do meio reacional afeta diretamente a atividade enzimática, aumentando o custo operacional e dificultando a aplicação em larga escala industrial das enzimas livres (Pei., 2026).

Nesse contexto, a imobilização é uma metodologia indicada para aumentar a vida útil da enzima, pois ela pode conferir uma maior estabilidade, evitando a sua inativação. Além disso, possibilita a fácil recuperação pós-reação e a reutilização da enzima em mais de um ciclo reacional. Apesar dos benefícios promovidos pela imobilização, a sua aplicação também pode gerar consequências negativas incluindo a perda parcial de atividade catalítica em razão da deformação estrutural ou rigidificação do sítio ativo ou do impedimento estérico entre a enzima e o substrato, causado pela interação com o suporte (Cong et al., 2026).

Há diversos tipos de suportes e também diferentes métodos de imobilização. Quando se visa à aplicação industrial, a escolha do tipo de imobilização e de suporte pode influenciar diretamente no desempenho do derivado. Assim é necessário conhecer a reação pretendida e as condições do meio reacional (Song et al., 2025).

Um dos métodos mais utilizados por conta de seu baixo custo e fácil aplicação é a imobilização por adsorção física, no qual a enzima se liga a superfície do suporte por ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas. Por essas interações entre o suporte e a enzima não formarem ligações químicas fortes, a morfologia da enzima tende a ser preservada minimizando, desta forma, a perda de sua atividade catalítica. Entretanto a imobilização por adsorção pode aumentar o risco de lixiviação (Nur et al., 2020).

Para as lipases, a imobilização por adsorção física pode ocorrer pelo mecanismo conhecido como ativação interfacial, o qual permite que elas sejam facilmente adsorvidas em superfícies hidrofóbicas (Giefer *et al*., 2025). O sítio ativo da maioria das lípases possui uma tampa de polipeptídios, que se abre e fecha, controlando assim, o seu acesso ao substrato. Esse mecanismo permite a modificação da estrutura conformacional da enzima tornando seu sítio ativo sempre disponível para o substrato, aumentando a sua atividade catalítica (Girelli e Chiappini., 2023).

Ainda, a seleção do suporte que será utilizado deve considerar o seu custo de produção, a resistência mecânica, a estabilidade química e a capacidade de absorção. Além de avaliar também a área superficial, porosidade e dimensão dos poros, assim como o tamanho da enzima que será imobilizada. Todos esses parâmetros são de extrema importância para se alcançar uma imobilização efetiva (Chandra et al., 2025)

Há diversos materiais que podem ser usados como suporte de imobilização, sendo classificados de acordo com sua origem: materiais orgânicos (naturais e sintéticos), inorgânicos (naturais e sintéticos) ou híbridos (materiais de origem orgânica e inorgânica). Os materiais orgânicos naturais usados como suporte são bastante promissores em estudos de imobilização de enzimas devido ao seu baixo custo de síntese e aplicação (Queissada., 2020).

Dentre os materiais orgânicos, o carvão ativado vem ganhando destaque por possuir características vantajosas. Por ser muito poroso apresenta uma grande área superficial, também é estável quimicamente e possui uma resistência mecânica alta. Além disso, o custo da produção desse suporte é muito baixo, pois pode ser obtido de resíduos agroindustriais, adicionando o apelo sustentável ao promover o reaproveitamento de biomassas, reduzindo impactos ambientais (Nascimento et al., 2025).

Um método que auxilia na recuperação do derivado é a magnetização do carvão ativado a ser utilizado como suporte. Esse método proporciona ao carvão a propriedade superparamagnética presente nas partículas de magnetita. Desta forma quando as partículas estão próximas de um campo magnético elas são atraídas por ele, mas se afastadas não apresentam propriedades magnéticas entre si. (Oliveira et al., 2022).

MATERIAL E MÉTODOS

As lipases utilizadas foram: *Pseudomonas fluorescens* (LPF), *Candida rugosa* (LCR), Pancreática suína (LPP), *Aspergillus oryzae* (LAO) e *Thermmomyces lanuginosus* (TLL). Elas foram imobilizadas em suporte em carga alta (50mg/g de suporte) e em carga baixa (5mg/g de suporte) utilizando-se tampão fosfato pH 7 (5mM) a 25°C, com agitação de 200 rpm durante 17 horas.

O suporte utilizado foi o carvão ativado, produzido a partir da carbonização das cascas do café, e magnetizado por coprecipitação de Fe(II)/Fe(III) em atmosfera de nitrogênio a 40°C conforme descrito previamente por Oliveira et al (2022).

Os parâmetros de imobilização, mostrados nas tabelas 1 e 2, foram determinados de acordo com Ferreira et al. (2018).

Para o calculo de rendimento de imobilização foi utilizado o método de quantificação de proteínas descrito previamente por Bradford (1976).

A atividade enzimática da lipase livre e do derivado produzido foram determinados pelo método de emulsão do azeite de oliva com goma arábica (7%), previamente descrito por Ferreira et al (2018). A amostra foi incubada por 5 minutos a 37°C em shaker com agitação orbital de 200 rpm.

O ensaio de esterificação utilizando o ácido oleico foi realizado somente para LPF, imobilizada em carga alta (50mg/g de suporte). A reação ocorreu na proporção estequiométrica (1:1) de álcool etílico e ácido oleico e concentração de 100 mM, utilizando hexano como solvente orgânico. A reação ocorreu sob agitação orbital de 200 rpm, 37°C por 2 horas em frascos fechados contendo o substrato e o derivado, 5% m/v. O branco foi realizado sob as mesmas condições das amostras, contendo o suporte porém sem a presença da enzima.

A análise de potencial zeta do carvão magnetizado e do carvão ativado foram realizadas, em meio tamponado em diferentes pH (4-9,5) utilizando o equipamento Zetasizer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão os dados obtidos para o rendimento de imobilização em carga baixa (5mg/g de suporte) de cada enzima no suporte de carvão ativado, a atividade do derivado e a atividade recuperada.

Os rendimentos de imobilização foram todos próximos a 100%, indicando a existência de uma interação entre as enzimas e o suporte utilizado. O suporte de carvão ativado e magnetizado possui uma elevada porosidade, possibilitando desta forma, que todas as lipases presentes no meio sejam adsorvidas.

As atividades dos derivados utilizando a LCR e LPP foram nulas, indicando que a imobilização em baixa carga pode ter causado uma distorção do sítio ativo das lipases, levando a perda da atividade enzimática. Ferreira et al (2018) reportaram resultados parecidos na imobilização da lípase *G. candidum* em baixa carga por ativação interfacial, em diferentes suportes. Os autores concluíram que além da possibilidade de ocorrer a distorção do sítio ativo, para as lipases imobilizadas em baixa carga, também era possível que a utilização de substratos insolúveis como o azeite de oliva, causasse problemas difusionais.

Esse fenômeno ocorreria porque na imobilização por ativação interfacial em suportes hidrofóbicos, o sítio ativo da enzima está orientado na direção do suporte, e essa orientação impediria ou dificultaria o acesso de substratos grandes como os triglicerídeos, caso o espaço entre o suporte e a enzima fosse pequeno.

Para as imobilizações com LPF, TLL e LAO, foram observados que os derivados formados possuíam atividade catalítica. Os derivados de LPF e TLL apresentaram também elevadas atividades recuperadas (acima de 90%), sugerindo que estas enzimas sofreram uma menor distorção conformacional ou que o espaçamento entre o suporte e o sítio ativo das lípases foi maior, possibilitando um livre acesso do substrato.

Tabela 1: Rendimento de imobilização (RI), atividade do derivado (AD) e atividade recuperada (AR) para as enzimas imobilizadas em baixa carga (5mg/g de suporte).

Enzima	RI (%)	AD*	AR (%)
LPF	90,0	35,0 ± 0,3	100,0
LCR	89,8	0,0 ± 0,0	0,0
LPP	83,5	0,0 ± 0,0	0,0
LAO	95,7	407,2 ± 0,1	32,3
TLL	98,0	72,9 ± 0,5	96,1

AD* = U/g de suporte

Na tabela 2 estão os dados de rendimento de imobilização em alta carga (50mg/g de suporte), atividade do derivado e a atividade recuperada obtida para cada enzima.

O aumento da carga para 50mg/g de suporte reduziu os rendimentos de imobilização de todas as enzimas. Esse resultado se deve, provavelmente, à saturação dos poros do carvão, impedindo as enzimas restantes em solução de serem imobilizadas. Apesar da diminuição do rendimento de imobilização a atividade do derivado teve um aumento causado pela maior concentração de proteínas presentes no derivado, aumentando a sua atividade catalítica.

Dentre as lípases avaliadas, a LPP foi a que apresentou a menor atividade para o derivado. Componentes presentes no pó liofilizado da LPP comercial, para torná-la estável, podem estar interferindo em sua imobilização.

O estudo feito por Gonçalves et al (2021) obteve um rendimento para a LPP de 89,5 mg de enzima/g de suporte, em pH 4 e uma atividade para o derivado de 131,05 U/g de suporte, quando imobilizada em pH 5. Esses valores estão próximos ao ponto isoelétrico da enzima (4,9), o que pode explicar o baixo rendimento de imobilização quando utilizado tampão de pH 7.

As demais enzimas tiveram um bom desempenho de imobilização, na atividade do derivado e na atividade recuperada. A LCR foi a lipase que mais se destacou na comparação dos ensaios realizados a baixa e alta carga. Tanto para atividade do derivado, que saiu de 0,0 para 202,8 U/g de derivado, quanto para a atividade recuperada, de 18,9% para 82,0%.

Um fator que pode influenciar o processo de imobilização é o ponto isoelétrico (pI). O pI é um parâmetro a ser analisado para melhorar a imobilização, pois determina a carga líquida da proteína em função do pH do meio. Quando o valor do pH está acima do pI, há um aumento de cargas negativas na superfície levando a uma repulsão entre a enzima e o suporte e diminuindo a adsorção (Brahmi et al., 2025).

Nas figuras 1 e 2 estão apresentados o potencial zeta para a superfície do carvão magnetizado e do carvão ativado, avaliados em diferentes valores de pH, respectivamente. É possível observar que há uma diferença entre os dois potenciais, decorrentes da inserção das partículas magnéticas de ferro, modificando a distribuição de cargas na superfície do suporte de acordo com os valores de pH avaliado.

Tabela 2: Rendimento de imobilização (RI), atividade do derivado (AD) e atividade recuperada (AR) paras

as enzimas imobilizadas em carga alta (50mg/g de suporte).

Enzima	RI (%)	AD*	AR (%)
LPF	30,1	489,4 ± 0,2	70,3
LCR	14,3	202,8 ± 0,1	82,0
LPP	33,4	4,5 ± 0,0	21,0
LAO	19,4	324,5 ± 0,3	82,2
TLL	9,2	17,38 ± 0,3	97,9

AD* = U/g de suporte

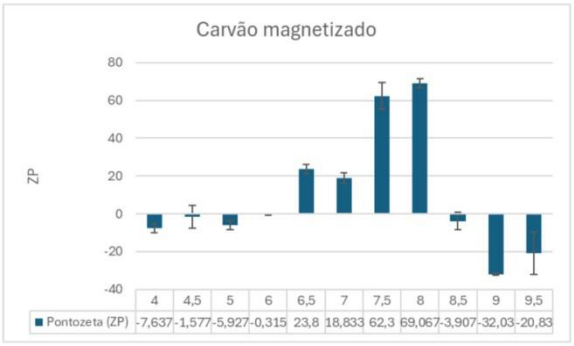


Figura1. Potencial zeta do carvão magnetizado avaliado em diferentes valores de pH.



Figura 2. Potencial zeta do carvão ativado avaliado em diferentes valores de pH.

Após a comparação dos resultados obtidos, a LPF imobilizada em carga alta foi escolhida como o derivado a ser usado para os ensaios de esterificação do oleato de etila, por apresentar um bom rendimento de imobilização (30,1 %) e a maior atividade para o derivado (489,4 ± 0,2 U/g de suporte).

A esterificação do ácido oleico obteve um valor de conversão de 43% (tabela 3), após duas horas de reação. Outros estudos, reportados na literatura, tais como o de Du et al (2026) e o de Corrêa et al (2026) obtiveram 100% de conversão, entretanto utilizaram um tempo de reação acima de 8 horas.

Desta forma, o suporte produzido a partir das cascas de café e magnetizado, demonstrou potencial para ser utilizado em reações de interesse industrial, pois a conversão de 43% em média (tabela 3), foi obtida após apenas duas horas de reação.

Em ensaios futuros, um delineamento experimental variando a proporção entre o ácido graxo e o álcool e a quantidade de derivado presente na reação será realizado, para se melhor avaliar a LPF como um biocatalizador para esta reação. A avaliação da estabilidade térmica e quantidade de reuso também são fatores que precisam ser estudados para a seleção de um derivado com a finalidade de aplicação em escala industrial.

Tabela 3: Conversão do ácido graxo em éster utilizando a LPF imobilizada em suporte de carvão magnetizado. Ensaios em duplicata.

Esterificação	Conversão (%)
1	44,1
2	41,8

CONCLUSÃO

Diferentes lipases foram avaliadas quanto a sua imobilização por ativação interfacial, utilizando-se o suporte previamente sintetizado, formado a partir da carbonização das cascas de café, ativado e posteriormente magnetizado com partículas de magnetita.

O derivado produzido a partir da imobilização da LPF foi escolhido para ser utilizado na reação de esterificação para síntese de oleato de etila, obtendo-se um rendimento médio de 43 %, após 2 h de reação. Desta forma, estudos futuros deverão ser realizados para a otimização desta reação, uma vez que o derivado obtido apresentou uma boa porcentagem de conversão para um tempo de reação considerado relativamente pequeno (2 h), quando comparado com o tempo de reação descrito em outros trabalhos na literatura (acima de 8 h).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-00404-23) a UNIFAL – MG pelo apoio para a realização do presente trabalho. A autora Michelle

Chmouri Murakami agradece ao CNPq por sua bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, A. A. *et al*. Microbial lipases: advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. **Microbial Cell Factories** v. 24, p. 1-20, Feb. 2025.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utiling the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May. 1976.

BRAHMI, M. *et al*. Impacto of pH on sodium caseinate binding and structural changes on montmorillonite surface. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 290, n. 138978, Feb. 2025.

CHANDRA, K. *et al*. Advancements in lipase immobilization: Enhancing enzyme efficiency with nanomaterials for industrial applications. **International Journal og Biological Macromolecules**, v. 311, n 143754, Jun. 2025

CONG, W. *et al*. A comprehensive review of hydrophobic MOF desing for lipase immobilization. **Journal og Environmental Chemical Engineering**, v. 14, n. 122371, Jun 2026

CORRÊA, W. M. *et al*. Biocatalytic synthesis of isoamyl oleate using polyethylene glycol-stabilized *Burkholderia ceácia* lípase immobilized on poly(3-hidroxybutyrate). **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 19, n. 2656027, Apr. 2026

DU, M. *et al*. Utilizing immobilized lípase for selectiv esterification in non-aqueous media: A strategy to enrich and purify conjugated linoleic acid isomers. **Bioresource Technology**, v. 442, n. 133751, Feb. 2026.

FERREIRA, M. M. *et al*. Different strategies to immobilize lípase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, Apr. 2018.

GIEFER, P. et al. Immobilization and interfacial activation of lipase at liquid and solid interfaces. **Soft Matter**, v. 21, p. 5398-5412, Mar. 2025.

GIRELLI, A. M. e CHIAPPINI, V. Renewable, sustainable and natural lignocellulosic carriers for lipase immobilization: a review. **Journal of Biotechnology**, v. 365, p. 29-47, Mar. 2023.

GIRELLI, A. M. *et al*. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v.244, n. 125368, Apr. 2020.

GONÇALVES, G. R. F. *et al*. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111 p. 114–123, Oct. 2021.

HE, C. et al. Highly stable lipase immobilization and efficient waste oil hydrolysis via polyphenolic network composite carrier. **Chemical Engineering Journal**, v. 504, n. 177256, May. 2026.

MOKHTAR, N. F. *et al*. The immobilization of lípases on porous support by adsorpition and hydrophobic interaction method. **Catalyst**s, v. 10, n. 744, July. 2020.

MORALES-MARTÍNEZ, J. L. *et al*. Optimization of Chemical Pretreatments Using Response Surface Methodology for Second-Generation Ethanol Production from Coffee Husk Waste. **BioEnergy Research**, v. 14, p. 815–827, Sep. 2021.

NASCIMENTO, P. A. *et al*. Revealing the potential of a novel approach for assessing the effect of pyrolysis conditions on sisal waste-based activated carbon for lipase immobilization and ethyl lactate biosynthesis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 15, p. 16987-17002, Nov 2024.

NGAN, T.T. *et al*. Synthesis of magnetic activated carbons derived from *Artocarpus heterophyllus* peel with different magnetization methods: comparative characterizations and hexavalen chromium adsorption study. **BMC Chemistry**, v. 18, n. 251, Dec. 2024.

OLIVEIRA, T. P. *et al*. Incorporation of metallic particles in activated carbon used in lípase immobilization for production Fo isoamyl acetate. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, p, 1736-1746, Feb. 2022.

PEI, R. Mechanism underlying the tolerance of lipase immobilized in porous organic frameworks in organic solvents. **Colloids and Surface B: Bioenterfaces**, v 265, n 115773, Sep. 2026.

QUEISSADA, D.D.; SILVA, J.A Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, v. 20, p. 272-286, 2020.

RUEDA, N. *et al*. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **RSC Advances**., v. 5, n. 1121211222, Jan.2015.

SONG, J. *et al*. Immobilization technology of lípase and application progress research. **International Journal of Food Engineering**, v. 21, p.285-303, May. 2025.

WANG, G. *et al*. Recent advances in engineering microbial lípases for industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 83, n. 108658, Oct. 2025.

ZHANG, S. *et al*. Application and mechanisms of biochar-immobilized enzymes in environmental remediation: a review. **Biochar**, v. 8, n. 4, Jan. 2026.