

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**INCORPORAÇÃO DE LIPASE NS-40116 EM MEMBRANA DE CELULOSE
BACTERIANA COM MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIE**

Victória Fonseca Silveira

Joinville – SC
2023

Victória Fonseca Silveira

**INCORPORAÇÃO DE LIPASE NS-40116 EM MEMBRANAS DE CELULOSE
BACTERIANA COM MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE – como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Saúde e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider

Coorientação: Therezinha Maria Novaes de Oliveira

Joinville – SC

2023

Termo de Aprovação

“Incorporação de Lipase NS-40116 em Membrana de Celulose Bacteriana com Modificações de Superfície”

por

Victória Fonseca Silveira

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coorientadora (UNIVILLE)

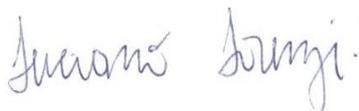
Profa. Dra. Glória Maria Vinhas
(UFPE)

Profa. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 15 de fevereiro de 2023

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S587i Silveira, Victória Fonseca
Incorporação de lipase NS-40116 em membrana de celulose bacteriana com modificações de superfície/ Victória Fonseca Silveira; orientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider; coorientadora Dra. Therezinha Maria Novaes de Oliveira. – Joinville: UNIVILLE, 2023.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Óleos e gorduras – Reaproveitamento. 2. Agentes de Imobilização de Enzimas. 3. Lipase. 4. Komagataeibacter hansenii. I. Schneider, Andréa Lima dos Santos (orient.). II. Oliveira, Therezinha Maria Novaes de (coorient.). III. Título.

CDD 664.3

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar. E também por sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Agradeço a minha mãe Suely Consolação Fonseca Silveira e ao meu pai Marcio Luís Silveira por todos os ensinamentos e construção do meu caráter e me apoiarem em todas as minhas escolhas, por terem acreditado em mim. A minha irmã Beatriz que me ajudou no laboratório e por me entender nos momentos de loucura do mestrado.

À professora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, pela orientação, conhecimentos passados, atenção comigo, oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, amizade e por ter me dado a oportunidade de estar no mestrado.

À Professora MSc. Michele Cristina Formolo Garcia, pela colaboração com seus conhecimentos, ter me inserido no grupo de pesquisa e me dado a oportunidade de conhecer essa área tão ampla que é a biotecnologia e amizade.

À professora Dra. Ana Paula Testa Pezzin, pela colaboração, conhecimento transmitido, oportunidades de conhecimento e crescimento pessoal/profissional e amizade.

Agradeço aos amigos: Bruna Segat, Geasi L., Victória Mendes pelo auxílio nas atividades experimentais, companheirismo, força, parceria em todas as horas, ombro de desabafos e risadas nos dias cinzentos

Ao amigo e Sandro R. K. Junior por me auxiliar nas atividades e experimentos, companheirismo, desabafos, surtos e risadas no laboratório.

Às técnicas dos laboratórios de pesquisa Aline Scheller e Paula Roberta Perondi Furtado pela ajuda no laboratório, desabafos, risadas e amizade.

A todas as pessoas que conheci durante o Mestrado, cada uma tem uma importância e lembrança na minha vida.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE e a CAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudos, aos professores pelos conhecimentos transmitidos e aos meus colegas de curso pelo conhecimento compartilhado, desabafos, risadas e companheirismo.

Aos membros da banca examinadora, agradeço por aceitarem avaliar este trabalho, certamente acrescentando valiosas contribuições.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

RESUMO

Óleos e gorduras estão presentes tanto no uso doméstico quanto industrial, podendo ser encontrados nos efluentes pelo seu descarte indevido, causando um desequilíbrio no ecossistema dos corpos hídricos. Para minimizar os impactos nesses ecossistemas vários métodos de recuperação são aplicados. No entanto, o alto teor de hidrocarbonetos, bem como a sua composição diversificada torna os óleos e gorduras difíceis de serem eliminados. Diante disso, o uso de enzimas como a lipase, um grupo de enzimas hidrolíticas, apresenta-se como uma alternativa biotecnológica devido à sua atividade catalítica e especificidade por estes substratos. No entanto, uma vez no ambiente ou estocadas, podem estar sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Sendo assim, a imobilização destas enzimas em suportes com intuito de favorecer a estabilidade enzimática, garantir uma catálise eficiente e facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador vem sendo cada vez mais explorada. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo de produzir um produto enzimático em matriz de celulose bacteriana capaz de degradar óleos e gorduras. Neste trabalho, a membrana de celulose bacteriana (CB) foi sintetizada pelo microrganismo *Komagataeibacter hansenii* e depois de purificada foi realizada a incorporação *ex situ* da enzima lipase sendo posteriormente feita a modificação de superfície com Zeína ou PLLA. As membranas de CB modificadas com Zeína ou PLLA foram caracterizadas pela análise de TGA que demonstrou que as membranas incorporadas e modificadas tiveram uma maior estabilidade quando comparada a CB pura. Pela análise de FTIR foi possível observar as bandas características da enzima incorporada na matriz. A enzima pura foi caracterizada quanto à estabilidade enzimática em relação ao pH e temperatura. Na análise de MEV conseguimos ver que ocorreu as modificações de superfície na CB pois alterou a sua morfologia e estruturação das nanofibrinas de celulose. Com a teste de índice de acidez conseguimos atestar que a enzima se manteve ativa mesmo após passar pelas modificações de superfície e conseguir ter melhor desempenho do que as CB pura o imobilizada com enzima.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, *Komagataeibacter hansenii*, lipase NS-40116, imobilização, óleo e gordura.

Incorporation of lipase NS-40116 into cellulose membrane bacterial with surface modifications

ABSTRACT

Oils and fats are present both in domestic and industrial use, and can be found in effluents due to improper disposal, causing an imbalance in the ecosystem of water bodies. To minimize the impacts on these ecosystems, several recovery methods are applied. However, the high hydrocarbon content, as well as its diverse composition, makes oils and fats difficult to eliminate. Therefore, the use of enzymes such as lipase, a group of hydrolytic enzymes, presents itself as a biotechnological alternative due to its catalytic activity and specificity for these substrates. However, once in the environment or stored, they may be subject to inactivation by chemical, physical or biological factors. Therefore, the immobilization of these enzymes on supports in order to favor enzymatic stability, ensure efficient catalysis and facilitate the recovery and reuse of the biocatalyst has been increasingly explored. Thus, this work aimed to produce an enzymatic product in a bacterial cellulose matrix capable of degrading oils and fats. In this work, the bacterial cellulose (BC) membrane was synthesized by the microorganism *Komagataeibacter hansenii* and, after being purified, ex situ incorporation of the lipase enzyme was carried out, followed by surface modification with Zein or PLLA. CB membranes modified with Zein or PLLA were characterized by TGA analysis which demonstrated that the incorporated and modified membranes had greater stability when compared to pure CB. By FTIR analysis it was possible to observe the characteristic bands of the enzyme incorporated in the matrix. The pure enzyme was characterized for enzymatic stability in relation to pH and temperature. In the SEM analysis, we were able to see that surface modifications occurred on the BC because it altered its morphology and structuring of cellulose nanofibrins. With the acidity index test, we were able to attest that the enzyme remained active even after going through the surface modifications and managed to perform better than the pure BC or immobilized with enzyme.

Keywords: Bacterial cellulose, *Komagataeibacter hansenii*, lipase NS-40116, immobilization, oil and fats.

Incorporación de Lipase NS-40116 a membrana de celulosa bacteriana con modificaciones superficiales

RESUMEN

Los aceites y grasas están presentes tanto en el uso doméstico como industrial, y se pueden encontrar en los efluentes debido a una disposición inadecuada, provocando un desequilibrio en el ecosistema de los cuerpos de agua. Para minimizar los impactos sobre estos ecosistemas, se aplican varios métodos de recuperación. Sin embargo, el alto contenido de hidrocarburos, así como su diversa composición, hace que los aceites y grasas sean difíciles de eliminar. Por tanto, el uso de enzimas como la lipasa, un grupo de enzimas hidrolíticas, se presenta como una alternativa biotecnológica por su actividad catalítica y especificidad para estos sustratos. Sin embargo, una vez en el medio ambiente o almacenados, pueden estar sujetos a inactivación por factores químicos, físicos o biológicos. Por ello, se ha explorado cada vez más la inmovilización de estas enzimas sobre soportes con el fin de favorecer la estabilidad enzimática, asegurar una catálisis eficiente y facilitar la recuperación y reutilización del biocatalizador. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo producir un producto enzimático en una matriz de celulosa bacteriana capaz de degradar aceites y grasas. En este trabajo se sintetizó la membrana bacteriana de celulosa (BC) por el microorganismo *Komagataeibacter hansenii* y, tras ser purificada, se procedió a la incorporación ex situ de la enzima lipasa, seguida de la modificación superficial con Zeína o PLLA. Las membranas CB modificadas con Zein o PLLA se caracterizaron mediante análisis TGA que demostraron que las membranas incorporadas y modificadas tenían una mayor estabilidad en comparación con CB puro. Mediante análisis FTIR fue posible observar las bandas características de la enzima incorporada en la matriz. La enzima pura se caracterizó por su estabilidad enzimática en relación con el pH y la temperatura. En el análisis SEM, pudimos ver que se produjeron modificaciones superficiales en el BC porque alteró su morfología y estructuración de nanofibrinas de celulosa. Con la prueba del índice de acidez, pudimos atestiguar que la enzima se mantuvo

activa incluso después de pasar por las modificaciones de la superficie y logró desempeñarse mejor que el BC puro o inmovilizado con enzima.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, *Komagataeibacter hansenii*, lipase NS-40116, inmovilización, aceite y grasas.

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema do funcionamento enzimático	17
Figura 2- Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose.....	20
Figura 3- Bactéria Komagataeibacter excretando fibrilas de celulose em fitas para formação da membrana: (a) micrografia eletrônica de transmissão - MET e (b) imagem durante a síntese	24
Figura 4- Fluxograma da metodologia geral	29
Figura 5- Metodologia da incorporação da Lipase e das modificações de superfície com Zeína e PLLA.....	32
Figura 6- Gráfico da comparação da atividade enzimática da enzima livre, CB/ENZ, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE	36
Figura 7- Efeito do pH na atividade da NS-40116 Livre	37
Figura 8- Estabilidade térmica da NS-40116 Livre.....	37
Figura 9- Comparação da membrana de celulose bacteriana (CB) na figura(A) e com membrana incorporada (CB/ENZ) (B).....	39
Figura 10- Membrana de celulose bacteriana (A) CB (B) CB/ENZ/ZE	40
Figura 11- Membrana de celulose bacteriana (A) CB (B) CB/ENZ/PLLA	40
Figura 12- Gráfico da liberação da proteína em relação ao tempo(dias).....	41
Figura 13- Gráfico da liberação da proteína em relação ao tempo(min).	41
Figura 14- Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB.....	42
Figura 15- Curvas de análise termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB.	43
Figura 16- Espectros a) todas as amostras, b) CB, PLLA e CB/PLLA com identificação das bandas, c) CB, ZE e CB/ZE e d) CB pura e CB/ENZ.....	46
Figura 17 – Micrografias das amostras com ampliação de 5000x de a) CB, b) PLLA, c) ZE, e) CB/ENZ/PLLA, f) CB/ENZ e com ampliação de 1000x de d) ZE e g) CB/ENZ/ZE	50
Figura 18- Angulo de contato das amostras CB (a), CB/ENZ/PLLA (b), CB/ENZ/ZE(c) e CB/ENZ (d).....	54
Figura 19- Gráficos das curvas de clabração de protreina BSA(a) e da enzima(b)	76

Lista de Tabela

Tabela 1- Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB, CB/ENZ, PLLA, ZE, CB/PLLA, CB/ZE, CB/ENZ/PLLA, CB/ENZ/ZE.	43
Tabela 2- Bandas comuns da CB pura, bandas correspondentes no espectro deste trabalho e suas respectivas atribuições.....	47
Tabela 3- Bandas comuns do PLLA puro, bandas correspondentes no espectro deste trabalho e suas respectivas atribuições.....	48
Tabela 4 - Valores dos angulos de contato das amostras CB,CB/ENZ, PLLA, ZE, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE.....	54
Tabela 5- Valores médios de massa de NaOH e de índice de acidez para as amostras de CB, CB/ENZ, CB/ENZ/ZE e CB/ENZ/PLLA.....	55

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Objetivo.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. Revisão de literatura.....	17
3.1 Enzimas.....	17
3.2 Imobilização de enzimas.....	18
3.3 Lipase.....	19
3.4 Celulose.....	20
3.5 Celulose Bacteriana.....	21
3.6 Incorporação.....	24
3.6.1 Incorporação <i>in situ</i>	25
3.6.2 Incorporação <i>ex situ</i>	26
3.7 Modificação de superfície.....	26
3.7.1 Zeína.....	26
3.7.2 PLLA.....	28
4 Material e Métodos.....	29
4.1 Produção de CB.....	30
4.1.1 Síntese da CB.....	30
4.1.2 Purificação.....	30
4.2 Caracterização enzimática.....	30
4.2.1 Atividade enzimática.....	30
4.2.2 Estabilidade enzimática em relação ao pH e temperatura.....	31
4.3 Imobilização da Lipase e Modificações de superfície.....	31
4.4 Determinação do conteúdo de proteína.....	32
4.5 Teste de liberação da proteína.....	33
4.6 Caracterização das membranas de CB incorporadas e modificadas.....	33
4.6.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	33
4.6.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	34
4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV.....	34
4.6.4 Ângulo de contato.....	34

4.7	Teste de degradação de óleo (índice de acidez).....	34
5	Resultados e discussões	35
5.1	Produção da CB.....	35
5.2	Caracterização enzimática	35
5.2.1	Atividade e estabilidade enzimática	35
5.2.2	Estabilidade enzimática em relação ao pH e Temperatura	36
5.3	Imobilização enzimática e modificações de superfície	39
5.4	Teste de liberação da proteína	40
5.5	Caracterização das membranas da CB incorporada e modificadas.....	42
5.5.1	Análise Termogravimétrica TGA	42
5.5.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura MEV.....	49
5.5.4	Ângulo de contato.....	53
5.7	Teste de degradação de óleo (índice de acidez).....	55
6	Conclusão.....	56
7	Sugestões para trabalhos futuros.....	57
8	Referências	57
9	Apêndices.....	75
9.1	Determinação do teste de proteína.....	76

1.Introdução

Países em desenvolvimento tem um grande problema de poluição ambiental proveniente de descarga de águas residuais, sendo as indústrias têxteis, cosmético, plástico, papeis, borrachas e farmacêuticas as principais fontes de poluição. O descarte inadequado das águas residuais, compromete a vida aquática, selvagem e os seres humanos com consequência a curto e longo prazo (YAO *et al.*, 2022).

As águas residuais podem ser de origem doméstica ou industrial que contém diferentes contaminantes como metais tais como zinco, cobre, chumbo, mercúrio e óleos. Esses contaminantes são fontes de contaminação de corpos d'água causando danos na fauna e flora ao redor do mundo (ALJABERI *et al.*, 2023; CALDERÓN-MESÉN *et al.*, 2023). Os óleos e seu derivados são um dos principais contaminantes encontrados em águas residuais principalmente no descarte doméstico (ABDULLAHI; ISMAIL; ALSHANA, 2023; MUMIVAND *et al.*, 2023).

Os óleos são utilizados como matéria-prima de diversos produtos pelas indústrias oleoquímicas. São compostos de triglicerídeos e ácidos graxos com diferentes tamanhos e de cadeia saturada. Óleos e graxas são substâncias orgânicas de origem mineral, vegetal ou animal que possuem uma complexa mistura de compostos químicos, como ésteres, ácidos graxos, derivados da glicerina e hidrocarbonetos. Os segmentos que usam esses compostos como matéria prima são a indústria alimentícia em recheios, doces, margarina, manteiga até a produção de plásticos, biocombustíveis, lubrificantes, tensoativos entre outros. Quando encontrados em águas naturais, podem ser oriundos de fontes difusas como despejos e resíduos industriais, esgotos domésticos, efluentes de oficinas mecânicas, postos de gasolina, estradas e vias públicas entre outros (BERTI; DÜSMAN; SOARES, 2009; YAO *et al.*, 2022)

A pequena solubilidade de óleos e graxas constitui um fator negativo com relação à sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para

abastecimento público, causam problemas no tratamento de água. Quando descartados com águas residuárias ou efluentes tratados, os óleos e graxas podem formar filmes sobre a superfície das águas e se depositarem nas margens. Esta fina película de óleo sobre a água reduz a penetração de luz e oxigênio no recurso hídrico, causando alterações no meio aquático, como a escassez de oxigênio e eutrofização, provocando a asfixia dos animais e impossibilitando o processo de fotossíntese de alguns vegetais (Ahmed & Huddersman, 2022).

As espécies mais vulneráveis aos processos de degradação são as que ocupam os níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar, pois, de acordo com Aguilera et al. (2010), os componentes do óleo são bioacumuláveis e migram ao longo da cadeia alimentar sem sofrer degradação, aumentando a concentração de poluentes orgânicos que podem causar efeitos nocivos aos seres humanos que consomem alimentos contaminados com essas substâncias.

Os métodos mais utilizados para a remediação de contaminantes orgânicos em meio aquoso podem ser classificados em métodos químicos, métodos físicos e biorremediação. Os métodos químicos são eficientes, no entanto são métodos caros e não favoráveis ao meio ambiente, visto que agentes químicos são necessários para realizar o processo. Os métodos físicos (sorção) apresentam eficiência limitada na remoção de óleo, embora recentemente, a sorção do óleo sobre a água tem se mostrado um método de baixo custo e consumo energético, além de fácil operação, a ponto de se tornar o método mais comumente utilizado (YANG *et al.*, 2014). A biorremediação, ainda que muito utilizada, é lenta e permite pouco controle sobre o processo, já que se trata do uso de microrganismos (bactérias, fungos) e plantas para degradar os hidrocarbonetos e sua eficiência é afetada dramaticamente por temperatura e oxigênio, desta forma o processo pode ser ineficiente, ou resultar em compostos com toxicidade mais elevadas.

As enzimas são utilizadas em diversos processos, inclusive em tratamento de água residuais para a degradação de poluentes. São amplamente utilizadas em diferentes reações atuando como catalisadores eficientes que minimizam

as etapas e o tempo de reação e os diversos produtos químicos tornando os processos mais econômicos e ecológicos (KUJAWA *et al.*, 2021). Sua utilização, no entanto, apresenta algumas dificuldades como o reaproveitamento e a perda da enzima livre no meio reacional. Dessa forma, a imobilização de enzimas vindo sendo uma resposta eficaz, além da enzima apresentar uma maior estabilidade quando comparada com a enzima livre (CAVALCANTI, 2020; DANTAS, 2017). A imobilização enzimática é um processo de adesão da molécula enzimática em suporte sólido insolúvel para o melhor desempenho da enzima. A enzima imobilizada tem um melhor desempenho, maior estabilidade térmica e operacional, maior tolerância em condições extremas de pH e temperatura, maior facilidade de recuperação e reutilização e finalmente possuem custo de produção reduzidos quando comparados à enzima livre.

As técnicas de imobilização, utilizadas para melhorar o desempenho da enzima, podem ser por adsorção, ligação covalente, reticulação, aprisionamento e encapsulação. O suporte onde a enzima vai ser imobilizada precisa ter grupos funcionais reativos, alta afinidade e uma interação estável com a enzima, alta disponibilidade e custo-benefício. Existem uma infinidade de materiais que podem ser utilizados como suporte sendo de origem orgânica, inorgânica, híbrida e compostas. Os suportes utilizados para a imobilização enzimática são inúmeros tais como sílica, argilas, nanopartículas, fibras e a celulose.

A celulose bacteriana é secretada por uma bactéria gram negativa não patogênica, composta por uma cadeia de nanofibras, sendo polímeros biodegradáveis, que podem ter suas propriedades químico-físicas mudadas de acordo com o material que é adicionado. A modificação na CB pode ser feita por dois métodos o *in situ* e *ex situ*. Por conta da membrana de CB ser muito hidrofílica para que haja a incorporação da enzima e a degradação de óleos e gorduras é necessário mudar sua característica para hidrofóbica com um modificação *ex situ* de superfície com algum agente hidrofóbico como silano, sílica, etanol, zeína, PLLA (CACICEDO *et al.*, 2016; NAVYA *et al.*, 2022; PORTELA *et al.*, 2019) (Navya *et al.*, 2022; CACICEDO *et al.*, 2016; Portela *et al.*, 2019).

A zeína é um biopolímero não solúvel em água, proveniente do resíduo agrícola do milho muito utilizada na área alimentícia e fármacos. Nos últimos anos a pesquisa com a zeína vem se diversificando e seu potencial vem sendo cada vez mais explorado por ser de fácil utilização e manipulação. A zeína é composta de aminoácidos hidrofóbicos que permite que ela seja utilizada para encapsular ou modificar matérias de natureza hidrofílicas para hidrofóbicas como o exemplo fármacos (capsula de comprimido) e celulose bacteriana (CJ CHENG, 2019; TROVATTI *et al.*, 2016; XUE *et al.*, 2022).

O poli(ácido L-láctico) (PLLA) é um polímero biodegradável utilizado na substituição materiais a bases de petróleo. Possui ampla aplicabilidade em áreas de biomedicina, e na área ambiental como um material alternativo e menos poluente. O PLLA é hidrofóbico e biocompatível com uma ampla quantidade de materiais a exemplo da quitosana e celulose bacteriana (CAO *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022).

Nesse estudo a celulose bacteriana foi utilizada como suporte para a imobilização da Lipase NS-40116 e depois passou por dois processos de modificação de superfície para à degradação de óleos.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um produto enzimático em matriz de celulose bacteriana capaz de degradar óleos e gorduras.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a estabilidade enzimática em relação ao pH e temperatura
- Produzir a membrana de celulose bacteriana.
- Incorporar a lipase na CB de modo *ex situ*
- Verificar os efeitos dos 2 métodos de hidrofobização de superfície da CB por meio do ângulo de contato

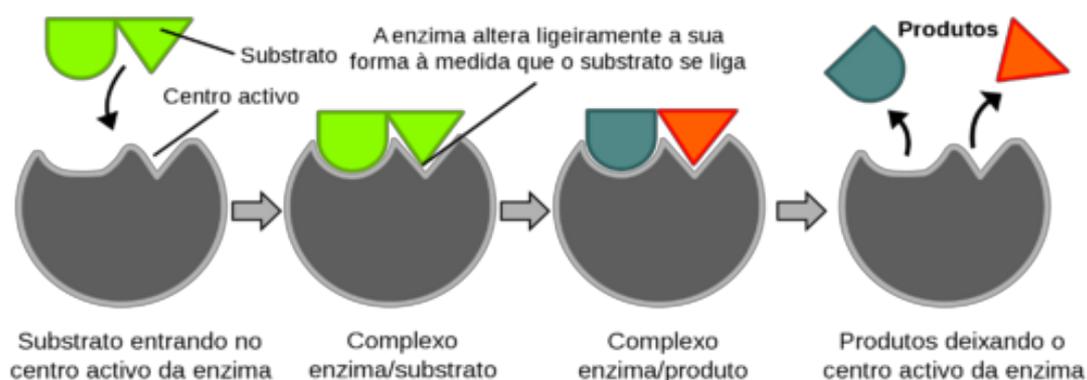
- Caracterizar a CB incorporada e modificada por meio das análises morfológica MEV, térmica TGA e físico-química FTIR e ângulo de contato

3. Revisão de literatura

3.1 Enzimas

Enzimas são proteínas essenciais para o metabolismo e atuam como biocatalisadores, com a função de decompor moléculas complexas em moléculas menores (QUEIROZ; SOUSA, 2020). As enzimas têm uma atuação baseada no conceito de sítio ativo, devido a sua especificidade em relação ao substrato interagindo (sistema chave-fechadura) como mostra a Figura 1.

Figura 1- Esquema do funcionamento enzimático



(Fonte: CAVALCANTI, 2020)

As enzimas são ativadas em faixas de pH e temperaturas e cada uma delas possui seu próprio pH e temperatura ótimos (CAVALCANTI, 2020; SILVA, 2012) (CAVALCANTI, 2020; SILVA, 2012). São amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, energética (produção de biocombustível e bioetanol) e farmacêuticas devido à sua elevada eficiência catalítica, condições brandas de reação e ausência de poluição (GAO *et al.*, 2013). A aplicação da enzima livre tem um alto custo, baixa estabilidade operacional e dificuldade na recuperação. Porém a recuperação com o uso das enzimas livres pode ser superada com a imobilização delas sobre substrato. A imobilização de enzimas

é um método potencial para aumentar a estabilidade de enzimas, diminuir o custo e, em consequência, tornar o biocatalizador mais eficiente e amigável ambientalmente (GHIDE *et al.*, 2022; MOHAMMADI *et al.*, 2022).

O mercado mundial de enzimas vem crescendo, foi avaliado em 7,1 bilhões de dólares em 2017, podendo chegar em 10,5 bilhões de dólares em 2024, possui o crescimento anual de 5,7% ao ano. Setenta por cento da produção das enzimas é obtida por microrganismos e 1/3 da produção mundial se localiza na Europa. As lipases, cuja produção ocorre por animais, vegetais, fungos, bactérias e leveduras, são o terceiro grupo de enzimas mais usados de elevado valor econômico possuindo ainda uma ampla utilização em diferentes segmentos industriais (RIGO *et al.*, 2021)(RIGO *et al.*, 2021).

3.2 Imobilização de enzimas

Os benefícios derivados da utilização dos biocatalisadores na fabricação de produtos variados, muitas vezes são prejudicados pela falta de estabilidade, armazenamento e recuperação das enzimas. Quando não imobilizada (enzima livre), a recuperação da enzima pode contaminar um novo processo com resíduos do processo anterior ou ainda perder a atividade (da enzima) na reação. Esses obstáculos são superados com a imobilização da enzima proporcionando mais estabilidade e facilidade de recuperação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; DANTAS, 2017; TAN *et al.*, 2010).

A imobilização pode ser dividida em 3 categorias: ligação da enzima com um suporte, encapsulamento em uma matriz polimérica orgânica ou matriz inorgânica e por reticulação das moléculas de proteína. A ligação e o encapsulamento podem afetar a atividade catalítica enquanto a imobilização por reticulação (grupos funcionais) é o que possibilita que 100% do sítio ativo da enzima fique em contato com o substrato(DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MESSIAS; COSTA; *et al.*, 2011).

Para que a imobilização ocorra é necessário que haja um suporte adequado para o método de imobilização e para a enzima que vai ser imobilizada. Na literatura é encontrado diversos tipos de suporte sendo testados. Quanto à composição química, os suportes são classificados em

orgânicos (naturais ou sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados). Como exemplo de suportes orgânicos podem ser citados ágar, quitina, quitosana, amido, colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda, em fibra de algodão, celulose entre outros(SHELDON, 2012) (Arieenejad et al., 2021, Sheldon, 2012, De Castro et al., 2008). Como inorgânicos pode-se citar nanopartículas de sílica, partículas magnéticas, polipropileno(NEMATIAN; SALEHI; SHAKERI, 2020; SOSE; GAWAS; RATHOD, 2020) (Silveira *et al.*, 2019; Waghmare, Mudaliar, Rathod, 2020; Sose, Gawas, Rathod, 2020; Nematian, Salehi, Shankeri, 2020).

3.3 Lipase

A grande versatilidade da utilização da lipase ocorre pela ampla quantidade de microrganismo que a produzem(REMONATTO *et al.*, 2022; RIGO *et al.*, 2021; SAYURI SHIKI *et al.*, 2022).

Essas enzimas catalisam a quebra de gorduras e óleos, com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. A catálise ocorre na interface de um substrato insolúvel e da fase aquosa, logo, as lipases atuam sobre moléculas polares e apolares (BORNSCHEUER, 2002). Quando atuam na interface óleo-água a porção lipolítica hidrofóbica se liga às gotículas de óleo, enquanto o sítio ativo alinha o substrato e catalisa a reação (REMONATTO *et al.*, 2022; SAYURI SHIKI *et al.*, 2022).

As lipases possuem a sua faixa de pH ótimo que varia de 4 a 9 e temperatura ótima de 25 a 70°C (CAVALCANTI, 2020). Cada enzima vai possuir sua faixa de temperatura e pH ótimo onde a sua atividade vai ser máxima. Sabendo que cada enzima é única e seu tempo de estocagem vai interferir nas suas propriedades é importante que seja avaliado a estabilidade térmica e de pH para que a enzima tenha seu desempenho máximo ou próximo disso gerando assim uma maior efetividade nas reações de biocatalização.

A lipase NS-40116 é uma formulação líquida proveniente do cultivo de um microrganismo geneticamente modificado – *Thermomyces lanuginosus* (PRICE

et al., 2016), produzida e comercializada pela empresa Novozymes (LIU; DONG, 2020).

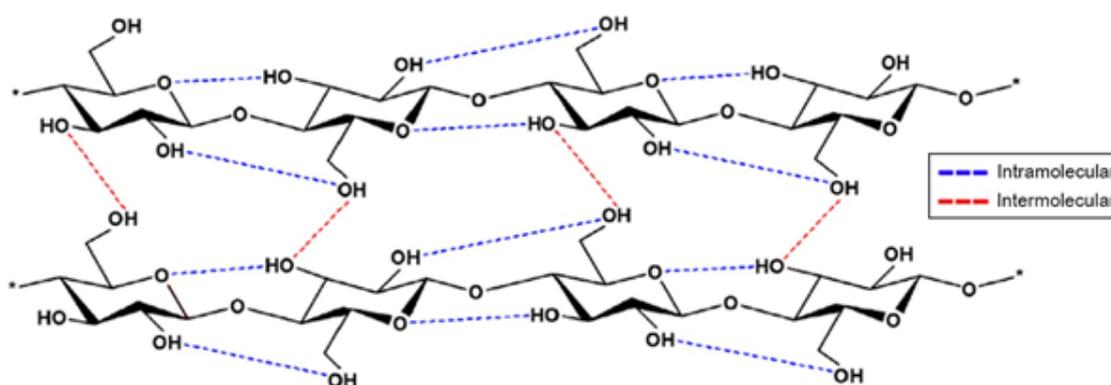
Considerando a importância tecnológica da lipase *Thermomyces lanuginosus* – TLL a empresa Novozymes vem trabalhando no mercado de produção de biodiesel e no mercado de enzimas cujo crescimento tem sido significativo nos últimos anos (LIU; DONG, 2020; SAYURI SHIKI *et al.*, 2022).

3.4 Celulose

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o material orgânico mais abundante na natureza e possui grande importância econômica, pois pode ser utilizada para a produção de papéis e fibras, além de ser utilizada como agente dispersante, agente gelificante, emulsificante, entre outros (TURECK, 2017).

A formação da estrutura polimérica é iniciada quando duas moléculas de glicose se unem e formam a celobiose, que é a unidade estrutural de repetição da molécula de celulose. Na Figura 2 são representadas as ligações intra e intermoleculares dispostas na cadeia polimérica, sendo que o primeiro tipo de ligação promove a rigidez das cadeias e o segundo é responsável pela formação das fibras. Devido às interações de hidrogênio, a celulose possui uma tendência a se aglomerar em forma de cristais, tornando-a completamente insolúvel em água e em grande parte dos solventes orgânicos (DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010a; RECOUVREUX, 2012; SILVA *et al.*, 2009)

Figura 2- Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose



Fonte: (PHANTHONG *et al.*, 2018)

Esse biopolímero pode ser dividido entre celulose complexa e celulose pura. A celulose complexa, principal componente da parede celular de plantas, contém impurezas como lignina, pectina e hemicelulose. Esta é normalmente obtida industrialmente para a produção de pasta celulósica, sendo designada de celulose vegetal (CV). Por outro lado, impurezas não são encontradas no grupo da celulose pura, que pode ser sintetizada por microrganismos como algas, fungos e bactérias, sendo denominada celulose bacteriana (CB) (DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010a; GOMES, 2011).

3.5 Celulose Bacteriana

O relato de síntese de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum*, foi descrito pela primeira vez em 1886 por Brown, quando este observou a formação de uma fina membrana gelatinosa na interface líquido-ar durante a fermentação do vinagre (BROWN, 1886; CACICEDO *et al.*, 2016; DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010a) (BROWN, 1886; Cacicedo *et al.*, 2016; Donini *et al.*, 2010). Porém, estudos intensivos sobre a síntese CB utilizando *A. xylinum* como uma bactéria modelo, tiveram início somente em 1947 por Hestrin e colaboradores que demonstraram que essas bactérias são capazes de sintetizar celulose na presença de glicose e oxigênio (BIELECKI *et al.*, 2002; BROWN, 1886; TURECK, 2017). Para sintetizar CB diversos fatores devem ser considerados, tais como o microrganismo produtor, as condições nutricionais e de cultivo (CHAWLA *et al.*, 2009; TURECK, 2017).

A celulose bacteriana foi descoberta dois séculos atrás, mas apenas na última década, com o desenvolvimento de nanotecnologias e da Química Verde, recebeu atenção dos pesquisadores. A CB pode ser produzida por diversas espécies de bactérias, como as dos gêneros *Komagataeibacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella* e *Escherichia* (CACICEDO *et al.*, 2016; SHODA; SUGANO, 2005).

As espécies do gênero *Komagataeibacter* como a *K. xylinus* e *K. hansenii* são os produtores mais eficientes de celulose em comparação com outras cepas (RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015). *K. hansenii* é uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica, não-patogênica, comumente encontradas na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre e em bebidas alcoólicas (ASHTAVINAYAK *et al.*, 2016; CACICEDO *et al.*, 2016; DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010a; LYNCH *et al.*, 2019; TURECK, 2017). Essa bactéria destaca-se entre os microrganismos que possuem maior potencial de produção de celulose, sendo que uma única célula pode converter até 10^8 moléculas de glicose por hora em celulose (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010b; PECORARO *et al.*, 2007; RECOUVREUX, 2012). A espécie *K. hansenii* apresenta morfologia de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, alongados variando de $0,6$ a $0,8 \times 10^{-4}$ μm não móveis, a faixa de temperatura para crescimento fica entre 15 e 34 $^{\circ}\text{C}$, em um pH entre 3 e 7 e temperatura para inativação entre 65 e 70 $^{\circ}\text{C}$ (CACICEDO *et al.*, 2016; KLEMM *et al.*, 2005).

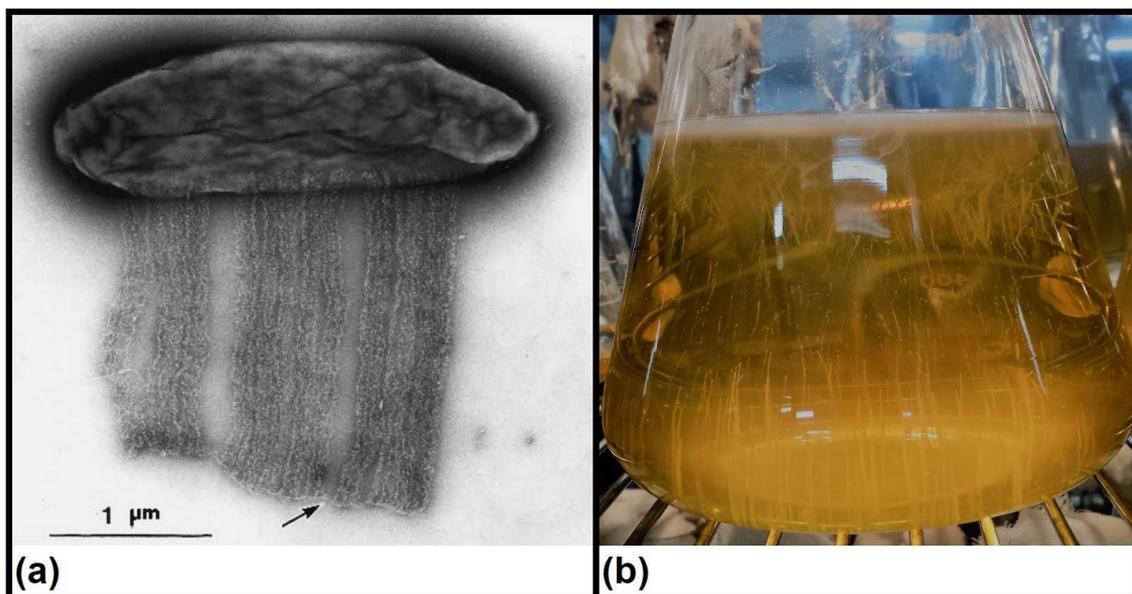
Decorrente do seu mecanismo aeróbio, produz uma membrana de celulose na interface líquido-ar do meio de cultivo (TURECK, 2017). *K. hansenii* produz celulose extracelular livre de lignina ou hemicelulose, tornando-a uma excelente fonte de celulose pura (CASTRO *et al.*, 2011; MOHITE; PATIL, 2014; MONA *et al.*, 2019; PORTELA *et al.*, 2019). As bactérias desse gênero convertem etanol a ácido acético, logo, apresentam uma alta capacidade de tolerância a substância ácidas e são capazes de converter várias fontes de carbono e nitrogênio em celulose, mas o seu mecanismo de síntese ainda não foi completamente elucidado, porém, acredita-se que seja semelhante ao da *K. xylinus*, que começa sempre com o precursor de UDP-glicose e termina formando uma cadeia polissacarídica (CACICEDO *et al.*, 2016; CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; IGUCHI, 1986; KESHK, 2014; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015).

As propriedades mecânicas da CB podem ser comparadas a outros polímeros e fibras complexas e sintéticas, sendo que essas características estão diretamente relacionadas à sua estrutura cristalina de nano e microfibrilas. Além disso, a combinação da alta cristalinidade com o seu alto

conteúdo de água é responsável pela estabilidade térmica da CB, o que torna possível a sua esterilização por autoclave. Uma maneira simples e barata de esterilização de biomateriais e vantajosa na biomedicina, uma vez que poucos polímeros suportam altas temperaturas sem que ocorra alguma alteração em suas propriedades (CACICEDO *et al.*, 2016).

Durante a fermentação estática a membrana formada na interface ar/líquido permite às bactérias aeróbicas moverem-se para a superfície possibilitando obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento, conforme visualizado na Figura 3 (CACICEDO *et al.*, 2016; DONINI, Ígor Augusto Negri, 2011). Além disso, esse mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato (devido ao caráter higroscópico da CB), serve como proteção contra a luz ultravioleta e atua como uma barreira contra o crescimento de outros microrganismos (DONINI, Ígor Augusto Negri, 2011; PORTELA *et al.*, 2019; ROSS *et al.*, 1991; SOUZA, 2014). É importante salientar que, o processo de formação da membrana ocorre somente nas áreas próximas da superfície e não em todo o meio de cultivo. Enquanto o sistema for mantido imóvel, a membrana se mantém suspensa na parede interna do frasco por coesão (TURECK, 2017). As bactérias contidas na membrana podem ser facilmente removidas, pela imersão em soluções alcalinas diluídas em água, seguido pela lavagem exaustiva com água (DONINI, Ígor A.N. *et al.*, 2010a; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

Figura 3- Bactéria *Komagataeibacter* excretando fibrilas de celulose em fitas para formação da membrana: (a) micrografia eletrônica de transmissão - MET e (b) imagem durante a síntese



Fonte: Adaptado de (HIRAI; TSUJI; HORII, 2002).

3.6 Incorporação

A síntese de um polímero pode ocorrer de diversas maneiras dependendo da sua composição, o que pode mudar de acordo com a sua aplicabilidade. A síntese do polímero com mais de um material (síntese composta) é uma estratégia utilizada para as incorporações de matérias no polímero a fim de melhorar as suas propriedades. Existem os dois métodos básicos de incorporação na síntese composta sendo ela a *in situ* e a *ex situ*. O método *in situ* consiste na adição do material ou substâncias durante a síntese do polímero para que o material se torne parte da estrutura do polímero. O método *ex situ*, a matriz polimérica é infiltrada com o material ou substâncias para a produção de um compósito, sendo essa técnica aplicada posteriormente à síntese do polímero. A CB é um biopolímero compatível com os dois métodos de síntese composta (DOMENEGUETTI, 2018; PINTO, 2013; SUN *et al.*, 2020).

A síntese composta é vantajosa pois traz ao polímero propriedades que originalmente ele não possui e que vão melhorar seu desempenho, como

exemplos a capacidade antimicrobiana com a adição de algum fármaco, biocompatibilidade médica com a inserção de nanopartículas de prata, alteração na sua polaridade, tornando o material hidrofílico ou hidrofóbico, com modificação de superfície com diversos compostos etc. (MULLER, 2012; SHAH *et al.*, 2013a).

3.6.1 Incorporação *in situ*

Esse método adiciona o material de reforço no início do processo de síntese da CB. Durante o processo de formação da membrana de CB a teia de fibras que é formada é capaz de reter vários materiais. Esse material retido fica encapsulado em torno da rede de fibrilas (DOMENEGUETTI, 2018; PINTO, 2013; SHAH *et al.*, 2013a; SUN *et al.*, 2020).

A síntese *in situ* na cultura de CB estática é difícil de ser realizada pois as partículas do material de reforço têm que ficar suspenso no meio de cultura pelo tempo de formação da membrana de CB. Como a membrana é formada na interface líquido-ar pode não ocorrer a associação do material suspenso, podendo haver a precipitação do material antes da formação da rede das fibras. A cultura agitada vem sendo utilizada para resolver o problema de manter a material em suspensão, mas traz outros problemas na formação da membrana de CB (DE AMORIM *et al.*, 2020; DOMENEGUETTI, 2018; PINTO, 2013; SHAH *et al.*, 2013a; SUN *et al.*, 2020).

Indiferente do tipo de cultivo a incorporação *in situ* tem algumas vantagens ao formar um polímero com uma ampla aplicabilidade e funcionalidade. Porém esse método também tem suas desvantagens, como por exemplo a dificuldade em quantificar o material em suspensão incorporado, avaliar se esse material continua ativo, e se haverá alguma alteração do material durante a síntese do polímero (DE AMORIM *et al.*, 2020; DOMENEGUETTI, 2018; PINTO, 2013; SUN *et al.*, 2020).

3.6.2 Incorporação *ex situ*

Na incorporação *ex situ* a ligação do material pode ocorrer por ligações químicas, afinidade de polaridade, a inserção do material a ser incorporado é por através de substâncias líquidas e pequenas partículas solidas em suspensão. Na CB o tamanho da partícula tem que ser compatível com o tamanhos ou menor que os poros para que a entrada seja facilitada. Esse método de incorporação é mais fácil e mais utilizado do que a incorporação *in situ*, pois o método não altera a composição da estrutura original da CB (DE AMORIM *et al.*, 2020; DOMENEGUETTI, 2018; MULLER, 2012; PINTO, 2013; SHAH *et al.*, 2013b).

As desvantagens do método *ex situ* recaem sobre o tamanho e a natureza do material a ser incorporado. O tamanho da partícula vai ser determinante para que a partícula consiga entrar no emaranhado de microfibrilas da CB. Materiais hidrofóbicos não são capazes de serem incorporados nas membranas de CB em seu estado natural. Para que a incorporação de material hidrofóbico ocorra é necessário que haja uma modificação química na CB (SUN, 2020; PINTO, 2013; DOMENEGUETTI, 2018 AMORIM, 2020; MÜLLER, 2012).

3.7 Modificação de superfície

3.7.1 Zeína

A zeína pertence ao grupo das prolaminas e a sua composição consiste majoritariamente em aminoácidos apolares como leucina, alanina, fenilalanina e prolina, tornando-a uma proteína hidrofóbica (XU, Hui; CHAI; ZHANG, 2012).

Ao longo dos anos, muitas teorias foram desenvolvidas para elucidar a estrutura secundária da zeína, deduzindo-se que ela se assemelha a um prisma cilíndrico tridimensional alongado composto por unidades helicoidais repetidas sucessivamente (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013; LARKINS, 2019).

Os aminoácidos apolares estão organizados em hélices empilhadas, formando as unidades helicoidais de carácter hidrofóbico, que são estabilizadas por pontes de hidrogênio e ligações dissulfureto intramoleculares como mostra a figura xxx (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013) as extremidades ricas em glutamina, proporcionam um carácter hidrofílico, interligam e empilham as unidades entre si (PAPALIA; LONDERO, 2015; ZHANG *et al.*, 2022). Apesar desta natureza anfipática que permite uma grande extensão da molécula e justifica o fato dela se manter agregada ao invés de monômeros separados, a hidrofobicidade prevalece devido ao elevado número de aminoácidos apolares (KASAAI, 2018; ZHANG *et al.*, 2022).

A zeína é solúvel em soluções aquosas de etanol 60-95% e soluções muito alcalinas (pH>11), porém insolúvel em água (LUÍS; DOMINGUES; RAMOS, 2019). A sua solubilidade varia conforme a sua estrutura maioritária, assim a α -zeína é solúvel em soluções aquosas de etanol a 75-90%, a β -zeína é solúvel em etanol a 60% e insolúvel a 95%, já a estrutura da γ -zeína apenas é solúvel em etanol por ação de um agente redutor (KASAAI, 2018) Etanol a 50-90% é o solvente mais utilizado na solubilização de zeína, sendo possível aumentar a sua solubilidade por aumento de temperatura (LAWTON, 2002).

Devido à sua hidrofobicidade, solubilidade característica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, abundância, proveniência de recursos renováveis e ser geralmente reconhecida como segura (Generally Recognized As Safe - GRAS) a zeína é considerada um biopolímero alimentar versátil e promissor (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013; ZHANG *et al.*, 2022).

O método mais utilizado em laboratório para a preparação de filmes de biopolímeros é o da evaporação do solvente. Este método requer que a zeína seja dissolvida num solvente adequado, como etanol 60-95%, seguido de secagem sob condições específicas de temperatura e ventilação (ZHANG *et al.*, 2022). Durante a secagem, estabelecem-se interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio intramoleculares e ligações dissulfureto intermoleculares, isto é, entre cadeias de zeína (Kasaai, 2018). A elevada polimerização da zeína permite uma boa formação de filmes, sendo a sua integridade assegurada através de interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto. No entanto, filmes

unicamente constituídos por zeína são frágeis e quebradiços (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013). De forma a melhorar essa característica dos filmes, são acrescentados à sua composição plastificantes. As diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos plastificantes implicam múltiplos efeitos nas propriedades dos filmes. É comum a combinação de plastificantes com o intuito de se obterem filmes de biopolímeros com propriedades mecânicas, óticas e de barreira próximas às dos polímeros sintéticos (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2013; XU, Hui; CHAI; ZHANG, 2012). Os filmes de zeína possuem propriedades de produzir uma barreira a vapor de gases e a adição de glicerol e ácido oleico, como agente plastificante permite melhorar as suas propriedades mecânicas. Verificou-se ainda que a zeína tem grande potencial para produzir filmes de misturas de biopolímeros e laminados (LUÍS; DOMINGUES; RAMOS, 2019).

Além da área alimentar, a zeína pode ainda ser utilizada para o revestimento de comprimidos ou para entrega controlada de fármacos, essencialmente devido à sua hidrofobicidade e solubilidade em ambientes acídicos (MULLER, 2012). Em suma, a zeína apresenta diversas vantagens não só pelas suas propriedades, mas também por ser um subproduto valioso das indústrias. A sua utilização enquadra-se nos conceitos de sustentabilidade e de economia circular.

3.7.2 PLLA

O poli(ácido láctico) (PLA) pertence à família de poliésteres alifáticos comumente obtidos a partir de α -hidroxiácidos, que também inclui, por exemplo, poli(ácido glicólico) (PGA). O PLA pode ser obtido na forma semicristalina utilizando como monômero de partida o ácido láctico (AVÉROUS, 2008; MOTTA; DUEK; II, 2008)

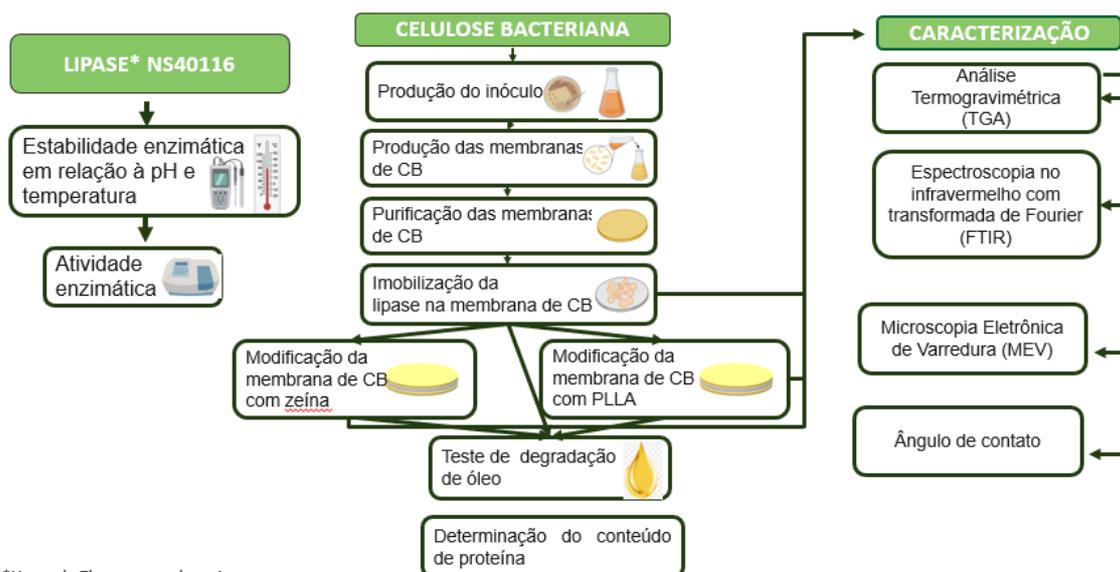
O PLLA é considerado um polímero biodegradável e biocompatível com tecidos vivos, podendo ser degradado abioticamente (hidrólise simples da ligação éster sem a exigência da presença de enzimas) e por degradação biótica (onde as enzimas degradam os oligômeros residuais até completa

mineralização), sendo transformado em ácido láctico, substância já presente naturalmente no organismo humano e que é eliminada do corpo por caminhos metabólicos naturais (AVÉROUS, 2008).

Além disso, segundo Price et al., (2016), o PLLA apresenta uma conformação em hélice de cadeias poliméricas, que contribui para que este apresente alto percentual de cristalinidade, boas propriedades mecânicas e degradação relativamente lenta no meio corpóreo. Por estes motivos é um polímero de grande interesse tecnológico devido às suas aplicações no campo ambiental, como plástico biodegradável, na área biomédica, como material biocompatível, e na área farmacêutica, como dispositivo para liberação de fármacos, devido às propriedades mecânicas, biocompatibilidade e bioreabsorção, além de apresentar pouca ou nenhuma toxicidade (LUÍS; DOMINGUES; RAMOS, 2019; PAPALIA; LONDERO, 2015). A modificação de superfície com PLLA é muito vantajosa para a CB pois vai alterar sua característica hidrofílica para hidrofóbica sem que altere a estrutura da CB ou do material incorporado (TANG *et al.*, 2010).

4 Material e Métodos

Figura 4- Fluxograma da metodologia geral



*Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

4.1 Produção de CB

4.1.1 Síntese da CB

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, conservada em placa de Petri sob refrigeração. Em sua ativação e cultivo utilizado foi o meio manitol composto de manitol (25 g·L⁻¹), peptona (5 g·L⁻¹), extrato de levedura (3 g·L⁻¹), sendo autoclavado a 121 °C por 20 min. As células foram ativadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio e pH = 7,0, incubadas à temperatura ambiente sob condições estáticas por 2 dias. Após este período, o inóculo foi transferido para o meio de cultivo a uma taxa de 20%. Esta etapa foi conduzida em tubos cônicos tipo Falcon® de 50 mL com 35 mL de meio de cultivo, incubado em estufa a 30 °C em condição estática durante 12 dias para a formação das mantas hidratadas de CB.

4.1.2 Purificação

As membranas formadas na superfície do meio de cultivo foram purificadas como descrito por (SILVEIRA; COSTA, 2016). As membranas puras foram lavadas com água corrente para remover o cultivo remanescente e em seguida tratadas com uma solução 0,1 mol·L⁻¹ de NaOH, em banho termostático a 80 °C por 60 min, para remover impurezas bacterianas e demais contaminantes. Após este tratamento, estas foram lavadas com água destilada até atingir pH 7,0 armazenadas em água destilada e autoclavadas para evitar contaminações e armazenadas em geladeira para uso futuro.

4.2 Caracterização enzimática

4.2.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi medida seguindo o método de Chiou e Wu (2004). 0,5 g de p-nitrofenil palmitato (p-NPP)(utilizado como substrato) foi dissolvido em 100 mL de etanol. 0,1 g de lipase (livre) e o substrato foram então incubados por 5 min a 30 °C na presença de 1 mL de solução tampão fosfato 0,05 M (pH = 7). A reação foi encerrada pela adição de 2 mL de NaOH 0,1 M, seguido de centrifugação por 10 min (10.000 rpm). 100 µL do sobrenadante foram diluídos 100 vezes com água destilada e medidos a 400

nm em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi U-1900). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de p-nitrofenol nas condições experimentais.

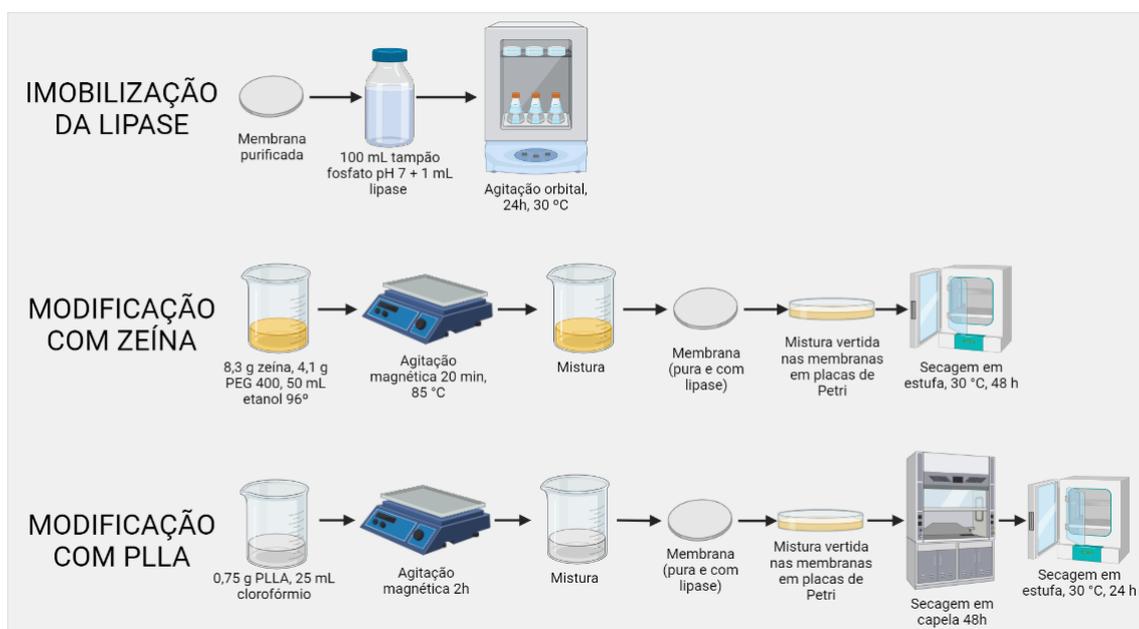
4.2.2 Estabilidade enzimática em relação ao pH e temperatura

Para realização dos testes de estabilidade com relação ao pH e temperatura, a enzima foi incubada por 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 minutos. Para os testes os tampões utilizados foram tampão citrato pH 3, 4, 5, 6 e 7, tampão fosfato pH 8 e tampão bicarbonato de sódio pH 9 e 10 e as temperaturas foram de 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C. Para os testes com pH a temperatura foi fixa em 30°C e nos testes de temperatura o pH foi fixo em Ph 7. Posteriormente, foi realizado o teste atividade enzimática como descrito no item 4.2.1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3 Imobilização da Lipase e Modificações de superfície

Para realização da incorporação da enzima na membrana de CB foram realizados 3 ciclos como mostras a Figura 5, no final de cada ciclo foi feita a lavagem da CB com água destilada com a finalidade de remover excesso de solução enzimática. As modificações de superfície com a Zeína e PLLA estão descritas na figura 5.

Figura 5- Metodologia da incorporação da Lipase e das modificações de superfície com Zeína e PLLA.



Após a incorporação da enzima e das modificações de com PLLA e zeína as membranas foram separadas em 3 grupos CB incorporada (CB/ENZ), CB incorporada e modificada PLLA (CB/ENZ/PLLA), CB incorporada e modificada Zeína (CB/ENZ/ZE).

4.4 Determinação do conteúdo de proteína

A partir do método de (BRADFORD, 1976) foi pesada a massa de 10 mg do corante azul brilhante “Commassie Brilliant Blue G-250” e dissolvido em 5 mL de metanol e posteriormente, 10 mL de ácido fosfórico (85% P.A) foram adicionados. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. Em seguida, procedeu-se uma filtração simples da solução e esta foi armazenada em um frasco âmbar revestido com papel alumínio e armazenada na geladeira a 4°C. A concentração de proteína foi expressa a partir da construção de uma curva analítica de calibração utilizando Bovine serum albumin (BSA) como padrão, na faixa de concentração entre 2 e 15 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Para isso, foram retiradas alíquotas de uma solução estoque de BSA 0,100 mg. mL^{-1} , 2700 μL do corante Bradford e o restante do volume foi preenchido com água deionizada até completar o volume de 3000 μL . Após o preparo das soluções utilizadas na

construção da curva de calibração, essas foram analisadas em um espectrofotômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 595 nm em triplicata. Para as medidas espectrofotométricas das amostras CB/ENZ, CB/ENZ/PLLA, CB/ENZ/ZE, foram pipetados 1000 µL de cada amostra, e 2700 µL do reagente de Bradford e incubado por 10 minutos. Após, em uma cubeta de vidro, foram realizadas as medidas de absorvância em triplicata no comprimento de onda de 595 nm. A partir da curva de calibração, foi determinada a concentração da enzima no sobrenadante do processo de imobilização, auxiliando na determinação do teor da enzima na superfície da CB. Os resultados vão ser encontrados no apêndice item 9.

4.5 Teste de liberação da proteína

As análises de liberação *in vitro* foram realizadas em triplicata no banho termostático. As membranas foram imersas em vidros tipo Duran com tampa rosqueada, previamente esterilizados em autoclave contendo solução tampão fosfato pH 7,4 em um banho termostático a 37 ± 1 °C, sendo retiradas após 10, 30, 60 e 120 minutos e 7, 30, 60 e 90 dias (ASTM F1635 - 11, 2011 adaptada). Após os tempos determinados, foi realizada a retirada de uma alíquota e feito os testes dos itens 4.2.1 e 4.6.

4.6 Caracterização das membranas de CB incorporadas e modificadas

4.6.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi realizada a fim de avaliar a estabilidade térmica das membranas de CB funcionalizadas e não funcionalizadas. Esta análise constitui-se em uma técnica destrutiva, que envolve a medida da variação de massa das amostras em estado sólido em função da temperatura, em um determinado intervalo de tempo. O equipamento utilizado para a análise foi o TGA-Q50 (TA Instruments) no Laboratório de Materiais da Univille. As amostras foram aquecidas de 25 a 1000 °C a 10 °C/min, atmosfera inerte (N₂). As curvas termogravimétricas (TG) e a 1ª derivada das mesmas (DTG) foram obtidas pelo *software* TA Universal Analysis.

4.6.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise estrutural, foi utilizada a técnica de FTIR no equipamento Perkin Elmer Spectrum, no Laboratório de Materiais da Univille. Foram realizadas 16 varreduras por amostra, de 650 a 4000 cm^{-1} , no modo de refletância total atenuada (ATR).

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV

Para esta análise as amostras de CB pura, CB/ENZ, CB/ENZ/ZE e CB/ENZ/PLLA foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com ouro e suas microestruturas foram caracterizadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O equipamento utilizado foi o microscópio MEV-FEG DSM 940A da marca Zeiss com 5 kV de tensão de aceleração no Laboratório de Materiais da UDESC.

4.6.4 Ângulo de contato

O método utilizado será o da gota séssil, no qual uma gota de água deionizada foi depositada sobre as amostras por meio de uma microseringa. A gota vai ser observada com uma lente de baixo aumento e o ângulo de contato foi medido através de um goniômetro (Ramé-Hart Inst. Co. modelo 250-F1).

4.7 Teste de degradação de óleo (índice de acidez)

Para este teste foi utilizadas membranas de CB/ENZ, CB/ENZ/ZE e CB/ENZE/PLLA. Todas as membranas foram colocadas em 100 mL de tampão citrato pH 7 (0,05 M), e foram adicionados 50 mL de éter etílico para solubilizar o óleo de soja 5,5% (m/v). Essa mistura foi incubada sob agitação a 150 rpm, a 30 °C, por 90 min. Após este período, foi realizada a titulação com NaOH 1 M para quantificar os ácidos graxos, usando fenolftaleína como indicador. O volume de NaOH gasto na titulação foi utilizado para calcular o índice de

acidez, conforme Equação 1 (CANESIN *et al.*, 2019). O teste foi realizado em triplicata para cada amostra.

$$AI = \frac{\text{Massa de NaOH}}{\text{Massa de gordura}} \quad (1)$$

Sendo:

AI = índice de acidez;

Massa NaOH = quantidade de NaOH que foi utilizada (g);

Massa de gordura = quantidade de gordura que foi utilizada no teste (g).

5 Resultados e discussões

5.1 Produção da CB

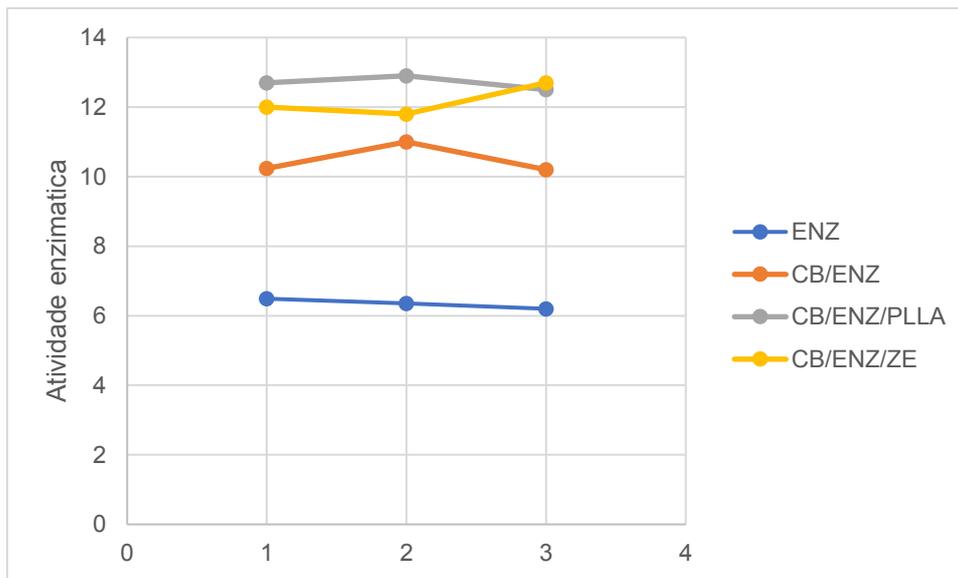
Após os 12 dias de produção, as membranas foram purificadas e depois separadas em 5 grupos sendo eles as CB pura (CB), CB incorporada (CB/ENZ), CB incorporada e modificada PLLA (CB/ENZ/PLLA), CB incorporada e modificada Zeína (CB/ENZ/ZE).

5.2 Caracterização enzimática

5.2.1 Atividade e estabilidade enzimática

A atividade enzimática foi realizada na enzima livre e nas amostras depois da incorporação e depois da degradação para saber se a enzima continua ativa ou se foi inativa. Como mostrado na figura 6 foi possível observar que a enzima incorporada na CB teve uma melhor atividade quando comparada com ela livre.

Figura 6- Gráfico da comparação da atividade enzimática da enzima livre, CB/ENZ, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE



Como mostrado na figura 6 é possível afirmar que a enzima se manteve ativa após ser incorporada na CB e depois passar pelas modificações que são processo que podem causar a inatividade do sítio ativo da enzima. A CB/ENZ/PLLA foi a que teve maior atividade, seguida das amostras CB/ENZ/ZE e CB/ENZ. Dantas (2017) mostra que a enzima imobilizada apresenta maiores valores de atividade quando comparada com a enzima livre e isso ocorre pois o processo de imobilização protege a região do sítio ativo da enzima reduzindo as chances de que algum fator externo inative a enzima.

5.2.2 Estabilidade enzimática em relação ao pH e Temperatura

A estabilidade enzimática foi realizada com o intuito de entender quais são as condições de atuação da enzima Lipase NS-40116 em relação ao pH e temperatura. Para avaliar a eficiência da enzima foi realizada a estabilidade enzimática em diferentes pH e temperaturas, em seguida foi realizado a atividade enzimática e os resultados são mostrados nos gráficos

Figura 7- Efeito do pH na atividade da NS-40116 Livre

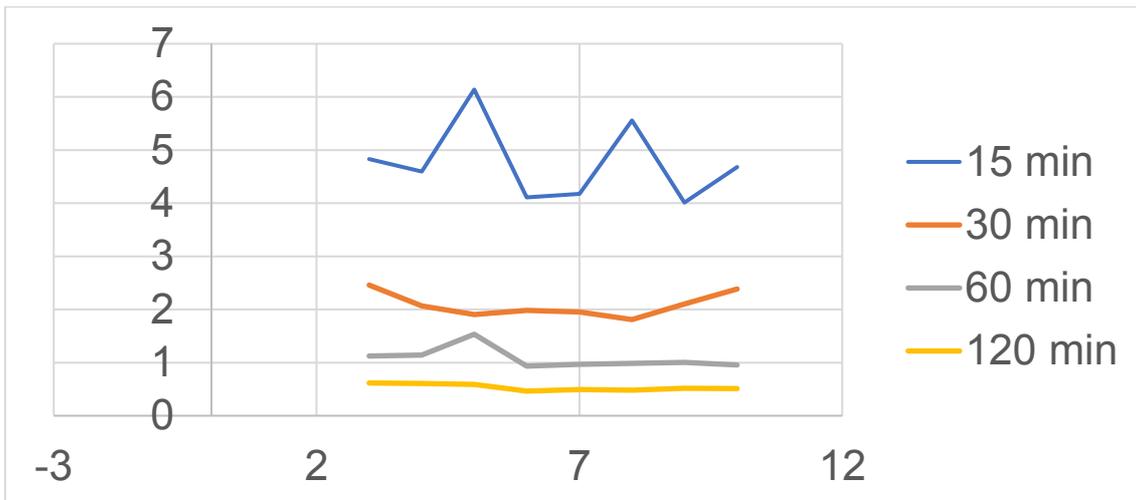
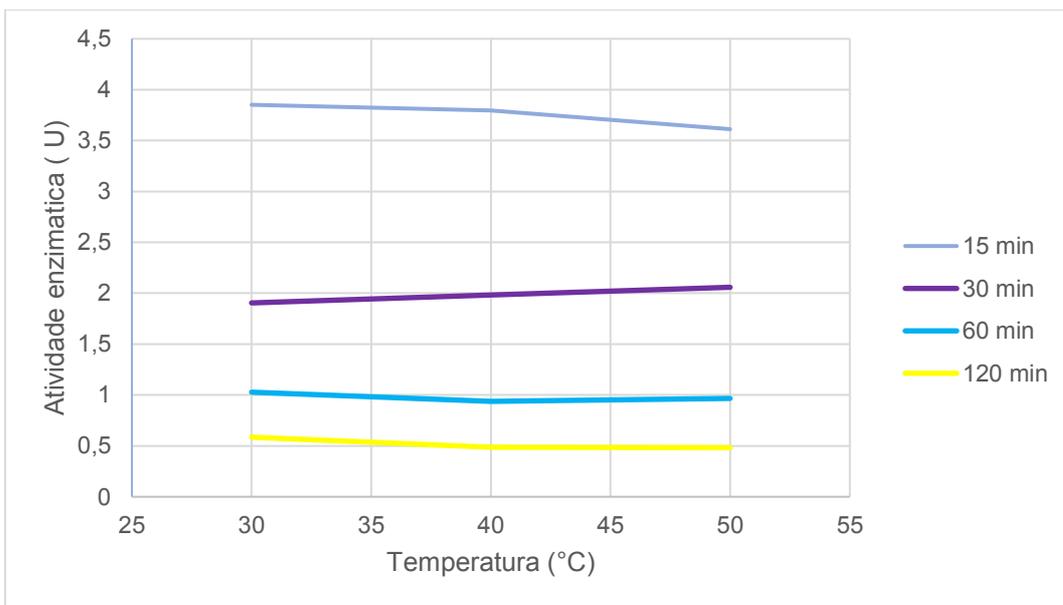


Figura 8- Estabilidade térmica da NS-40116 Livre



Na figura 7 é mostrado o comportamento da enzima em diferentes valores de pH. A enzima apresentou a maior atividade nos primeiros 15 min nos pH 5 e 8 e decaindo no tempo de 30 min e depois tendo um aumento na atividade no tempo de 60 min. Porém foi possível observar que a atividade enzimática foi maior no pH 8 pois a sua perda de atividade foi menor que o pH 5 que teve a uma perda de atividade de 79,5% entre o tempos de 15 a 60 min.

Por meio da figura 7 notou-se que a lipase não apresentou uma faixa de estabilidade expressiva em relação ao pH, porém apresentou o maior valor de atividade enzimática na faixa de pH alcalino de 8 a 9. Na literatura a lipase *Thermomyces lanuginosus* é descrita com uma enzima que possui a atividade enzimática alta na faixa de pH que varia de 7 a 11 (FERNANDES *et al.*, 2004).

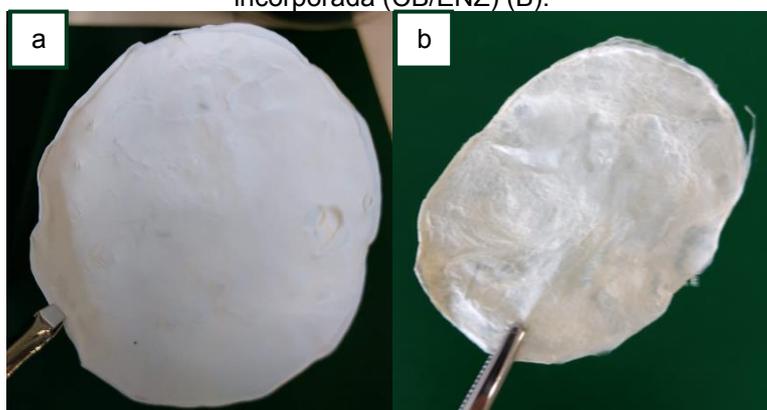
De acordo com MESSIAS; *et al.*, (2011), lipases microbianas de diferentes microrganismos (diferentes gêneros, espécies e cepas) possuem estrutura química e características cinéticas divergentes. As enzimas geralmente apresentam estabilidade em ampla faixa de pH, sendo a faixa alcalina a mais comum. RIBEIRO *et al.* (2011) expõem que, dependendo da fonte, as lipases geralmente apresentam maior atividade enzimática na faixa de pH de 4 a 9. A lipase de *Staphylococcus epidermis* apresentou estabilidade em ampla faixa de pH (5 a 9), com atividade ótima em torno de pH 6 (SIMONS *et al.*, 1998). Um comportamento bastante parecido foi observado para a lipase da levedura *Cryptococcus sp. S-2* com atividade lipolítica máxima em pH 7 e estabilidade entre pH 5 e 9 (KAMINI *et al.*, 2000).

Na Figura 8 é apresentado o comportamento da atividade enzimática em relação ao tempo para diferentes temperaturas sendo estes valores de atividade resultados da média das duplicatas medidas em cada tempo. A lipase apresentou maior atividade enzimática no tempo inicial de 15 min na temperatura de 50 °C, com menor desvio padrão das três temperaturas neste tempo e com uma queda de 76% nos próximos quinze minutos. Já na temperatura de 30 °C, essa queda foi de 69%. A literatura menciona que a termoestabilidade da lipase abrange uma ampla faixa de temperatura, podendo variar de 60 a 80 °C (LIN; KO, 2005). Contudo, a maioria dos estudos descreve a melhor faixa de temperatura para atividade da lipase entre 30 e 40 °C (KAMINI *et al.*, 2000; LOTRAKUL; DHARMSTHITI, 1997; NOLASCO MACEDO MURUCI *et al.*, 2013; SHU; XU; LIN, 2006). O fungo *Thermomyces lanuginosus* é um microrganismo termófilo com alta atividade enzimática entre 30 e 40 °C, mas que pode apresentar atividade significativa até 60 °C (COUTO, 2019; MATTE, 2015).

5.3 Imobilização enzimática e modificações de superfície

A imobilização enzimática na CB alterou a sua coloração padrão transparente após as purificações para uma coloração mais amarelada como mostra a figura 9. A alteração na coloração ocorre por conta de o extrato enzimático possuir uma coloração amarelada. A alteração da coloração da CB é um indicativo visual que as enzimas foram incorporadas, mas não é o único critério utilizado para comprovar a incorporação da lipase na membrana de CB.

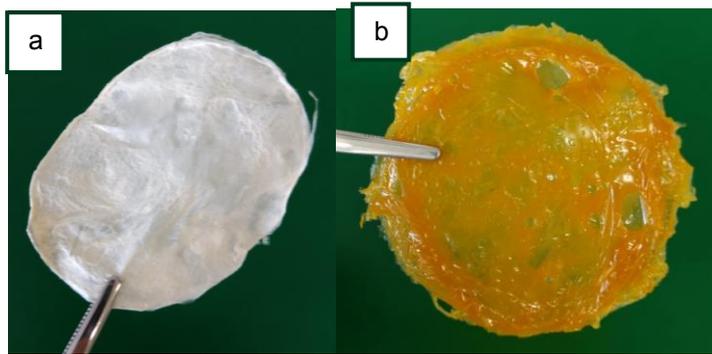
Figura 9- Comparação da membrana de celulose bacteriana (CB) na figura(A) e com membrana incorporada (CB/ENZ) (B).



As modificações com Zeína e PLLA ocorreram após a imobilização da enzima lipase. Foi realizado a avaliação macroscópica das amostras modificadas e comparadas a CB com as CB/ENZ/ZE e CB/ENZ/PLLA.

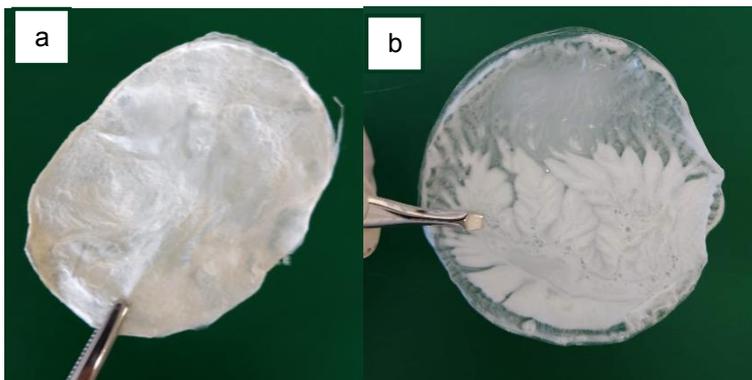
Através da avaliação macroscópica foi possível observar que a CB que passou pela modificação com a zeína (CB/ENZ/ZE) apresentou uma coloração amarelada formando um filme fino e homogêneo na superfície e mais quebradiça que a CB como mostra a figura 10.

Figura 10- Membrana de celulose bacteriana (A) CB (B) CB/ENZ/ZE



Pela avaliação macroscópica foi possível observar que houve a formação de uma película que envolveu a membrana de CB após modificação com PLLA (CB/ENZ/PLLA) e que a CB ficou com duas regiões uma mais opaca que outra mais translúcida e isso ocorreu por conta da evaporação do clorofórmio que não ocorreu de forma homogêneo como mostra a figura 11.

Figura 11- Membrana de celulose bacteriana (A) CB (B) CB/ENZ/PLLA



5.4 Teste de liberação da proteína

Na figura 12 e 13 é representado a liberação da proteína em dias e minutos respectivamente.

Figura 12- Grafico da liberação da proteína em relação ao tempo(dias).

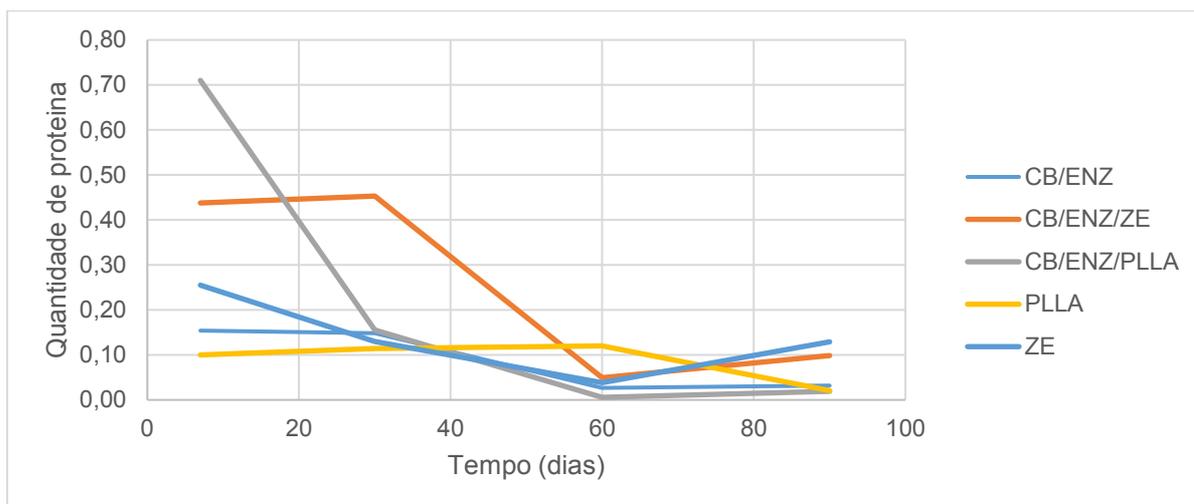
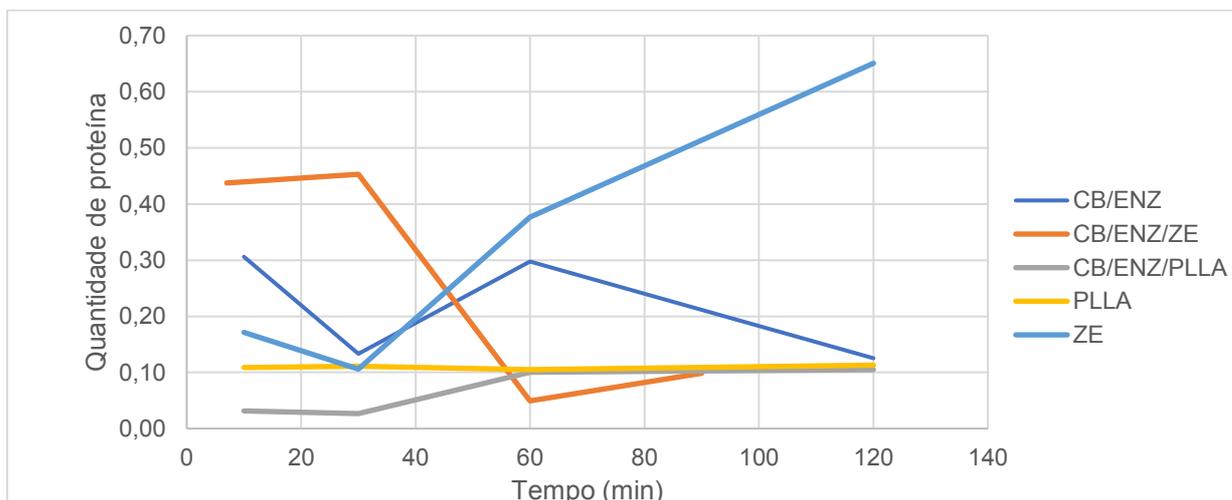


Figura 13- Grafico da liberação da proteína em relação ao tempo(min).



As amostras que ficaram nos períodos de 7 a 90 dias foram a que obtiveram menor os menores valor de proteína sendo que as de 90 dias a quantidade de proteína foi a menor em todas as amostras. Nos tempos de 15 a 120 min foi possível observar que amostras tiveram uma maior liberação da proteína após 60 min onde foi obtido os menores valores de proteína das amostras incorporadas (CAVALCANTI, 2020; DANTAS, 2017; OLALERE; GAN, 2023).

As amostras de CB/ENZ/PLLA mostraram que a liberação da enzima foi controlada pois ela foi liberada após os tempos de 60 min e a liberação fica constantes até 120 min. A CB/ENZ/ZE teve a liberação da enzima do tempo 10 a 60 min e depois a liberação da enzima é menor o que mostra que talvez a

maior parte da enzima é liberada em 60 min e depois disso a liberação começa a ser reduzida (CAO *et al.*, 2021; MEDEIROS, 2018; SHEKARFOROUSH *et al.*, 2022).

5.5 Caracterização das membranas da CB incorporada e modificadas

5.5.1 Análise Termogravimétrica TGA

Nas figuras 14 e 15 são apresentadas as curvas termogravimétricas (curvas TG) e primeira derivada das curvas TG (curvas DTG) para amostras de CB, CB/ENZ, CB/PLLA, PLLA, ZE, CB/ZE, CB/ENZ/PLLA, CB/ENZ/ZE. Os dados obtidos das curvas TG e DTG (perda de massa (%), temperatura máxima de degradação (Tmax) e percentual de resíduo) estão relacionados na tabela 1.

Figura 14-Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB

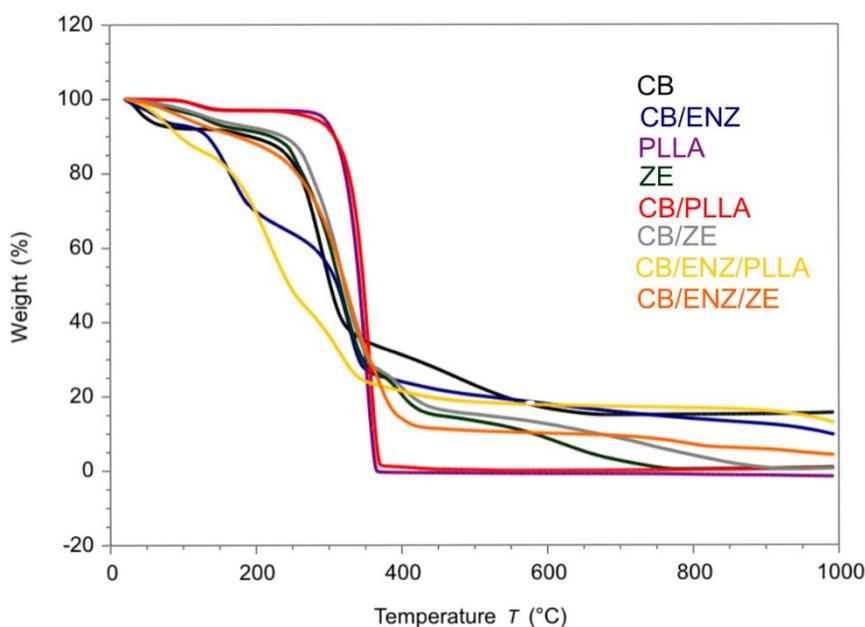


Figura 15- Curvas de análise termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB.

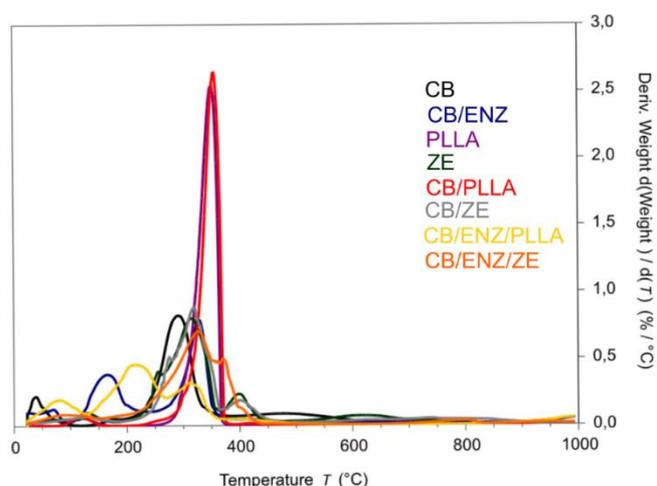


Tabela 1- Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB, CB/ENZ, PLLA, ZE, CB/PLLA, CB/ZE, CB/ENZ/PLLA, CB/ENZ/ZE.

Amostra	M1 (%)	T _{max} (1)	M2 (%)	T _{max} (2)	M3 (%)	T _{max} (3)	M4 (%)	T _{max} (4)	M5 (%)	T _{max} (5)	M6 (%)	T _{max} (6)	Resíduo (%)
CB	8,0	39,3	-	-	60,5	292,5	-	-	-	-	15,6	nd	15,6
PLLA	2,8	121,5	-	-	-	-	-	-	97,6	350,2	1,1	nd	0,0
ZE	6,8	131,2	-	-	-	-	66,2	322,3	-	-	25,9	396,7	0,9
CB/ENZ	6,6	71,4	29,1	163,6	40,0	329,6	-	-	-	-	14,2	nd	9,8
CB/ENZ/ZE	9,1	88,1	no	no	79,3	327,9	9,3	357,9	-	-	7,6	nd	4,2
CB/ENZ/PLLA	14,4	79,9	no	no	41,9	214,7	-	-	22,0	308,1	8,3	nd	12,9
CB/ZE	7,1	133,6	-	-	no	no	66,6	320,1	-	-	25,9	391,6	0,6
CB/PLLA	3,1	119,6	-	-	no	no	-	-	96,0	357,9	0,4	nd	0,6

nd = não determinado; no = não observado

Observa-se pelos dados da tabela 1 que a CB apresentou três regiões de perda de massa, com o valor mais expressivo de perda de massa na segunda região (60,5%), apresentando como T_{max} 292,5 °C. Conforme descrito na literatura, a CB possui três regiões de perda de massa: a primeira região ocorre até próximo de 150 – 200 °C devido à evaporação do resíduo de água do processo de secagem, sendo que neste trabalho apresentou uma perda de massa de 8% e T_{max} de 39,3 °C; a segunda região inicia em 150 °C

e está relacionada à degradação da celulose (DA COSTA *et al.*, 2018) (depolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, com formação de resíduo carbonizado) (LIMA *et al.*, 2015; ROMAN; WINTER, 2004), e a terceira região de degradação inicia em 400 °C e é característica da degradação termo-oxidativa e quebra do resíduo carbonizado, formando produtos gasosos de baixa massa molecular, apresentando 15,6% de perda de massa (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Por fim, ainda observa-se a presença de 15,6% de resíduos na amostra.

Em relação ao PLLA, nota-se que a primeira região de perda de massa relacionada à perda de água apresentou um valor bem menor se comparado com a CB, quantidade de água. Já a segunda região apresenta uma grande perda de massa (97,6%) com T_{max} uma vez que o PLLA é um material hidrofóbico, enquanto a CB é hidrofílica, absorvendo portanto uma maior em torno de 350 °C. Por fim, observa-se que não houve resíduos na amostra de PLLA, o que demonstra que a amostra foi completamente degradada na análise. A literatura traz que a degradação térmica do PLLA está associada à hidrólise, depolimerização, cisão oxidativa de cadeia aleatória, transesterificação inter e intramolecular, o que gera o monômero lactídeo e os oligômeros (ARMENTANO *et al.*, 2013; GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007). Essa degradação térmica do PLLA inicia em 310 °C e se completa em torno de 400 °C (GARLOTTA, 2001; KIM *et al.*, 1998).

A primeira região de perda de massa da ZE também está relacionada à evaporação de água, sendo o valor determinado neste trabalho (6,8%) semelhante ao da literatura (5%). A liberação dos ácidos graxos ocorre em torno de 200 °C. A segunda região ocorre com T_{max} de 322,4 °C e perda de massa de 66,2%, estando relacionada à degradação térmica da zeína, com a perda de massa mais expressiva, tendo como temperatura de início 280 °C (CORRADINI, 2010; TORRES, 2015). Essa região de perda de massa foi identificada com a cor verde na Tabela 1 para indicar a região atribuída à zeína. A baixa quantidade de resíduos da zeína pura também demonstra que quase todo material foi degradado ao longo da análise.

Em relação à amostra de CB/ENZ, nota-se que houveram quatro regiões de perda de massa e que a quantidade de resíduo foi menor se comparado à amostra de CB. A segunda região de perda de massa da amostra, identificada

pela cor azul na Tabela 1 pode ser um indicativo da região característica de degradação da lipase uma vez que os valores de perda de massa (29,1%) e $T_{m\acute{a}x}$ (163,6 °C) são divergentes daqueles apresentados pela amostra de CB pura.

A amostra CB/ENZ/ZE apresentou valores de T_{max} semelhantes aos da amostra de CB/ENZ, além da região atribuída à zeína destacada em verde. Além disso, apresentou menor quantidade de resíduos que a CB pura, porém maior que a CB/ZE, podendo estar relacionado à presença da enzima lipase, assim como pode ser observado na amostra CB/ENZ/PLLA.

A amostra de CB/ENZ/PLLA também apresentou três regiões de degradação térmica. É possível perceber que dentre as três amostras que contêm PLLA, a CB/ENZ/PLLA apresentou menor estabilidade térmica, com os menores valores de T_{max} , o que pode estar relacionado à presença da enzima lipase e a sua respectiva menor estabilidade térmica. Um comportamento semelhante foi observado no trabalho de (KIM *et al.*, 1998). Os autores relatam que o compósito de PLLA/amido de milho apresentou deslocamento da faixa de temperatura de degradação, passando de 310 – 400 °C do PLLA para 220 – 230 °C para o compósito.

Por fim, as amostras de CB/ZE e CB/PLLA apresentaram perfis de decomposição muito semelhantes aos materiais puros (ZE e PLLA, respectivamente), não sendo possível identificar a presença da CB nas amostras através da análise de TGA. No caso da amostra de CB/PLLA, é possível observar a presença de ambos os materiais, CB e PLLA, nas análises de FTIR e MEV apresentadas nos itens 5.5.2 e 5.5.3, respectivamente, através da identificação das bandas e superfícies características de ambos os materiais, respectivamente. Por outro lado, as análises de FTIR e MEV da amostra de CB/ZE também não permitiram identificar a presença da CB, o que pode ser resultado da cobertura mais homogênea e grossa do filme de zeína, que age como uma película que recobre toda a CB, deixando-a completamente revestida (SHEKARFOROUSH *et al.*, 2022; XUE *et al.*, 2022).

5.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR tem como objetivo caracterizar e identificar os grupos funcionais presentes nas amostras, através da identificação das bandas que caracterizam a orientação e a estrutura das moléculas da amostra (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2002). Na figura 8a são mostrados os espectros de FTIR todas as amostras deste trabalho, enquanto na tabela 3 são apresentadas as bandas comuns da CB encontradas na literatura, com suas respectivas atribuições, assim como as bandas correspondentes encontradas no espectro deste trabalho. As bandas encontradas no espectro podem ser observadas nas figuras 16b, 16c e 16d.

Figura 16- Espectros a) todas as amostras, b) CB, PLLA e CB/PLLA com identificação das bandas, c) CB, ZE e CB/ZE e d) CB pura e CB/ENZ.

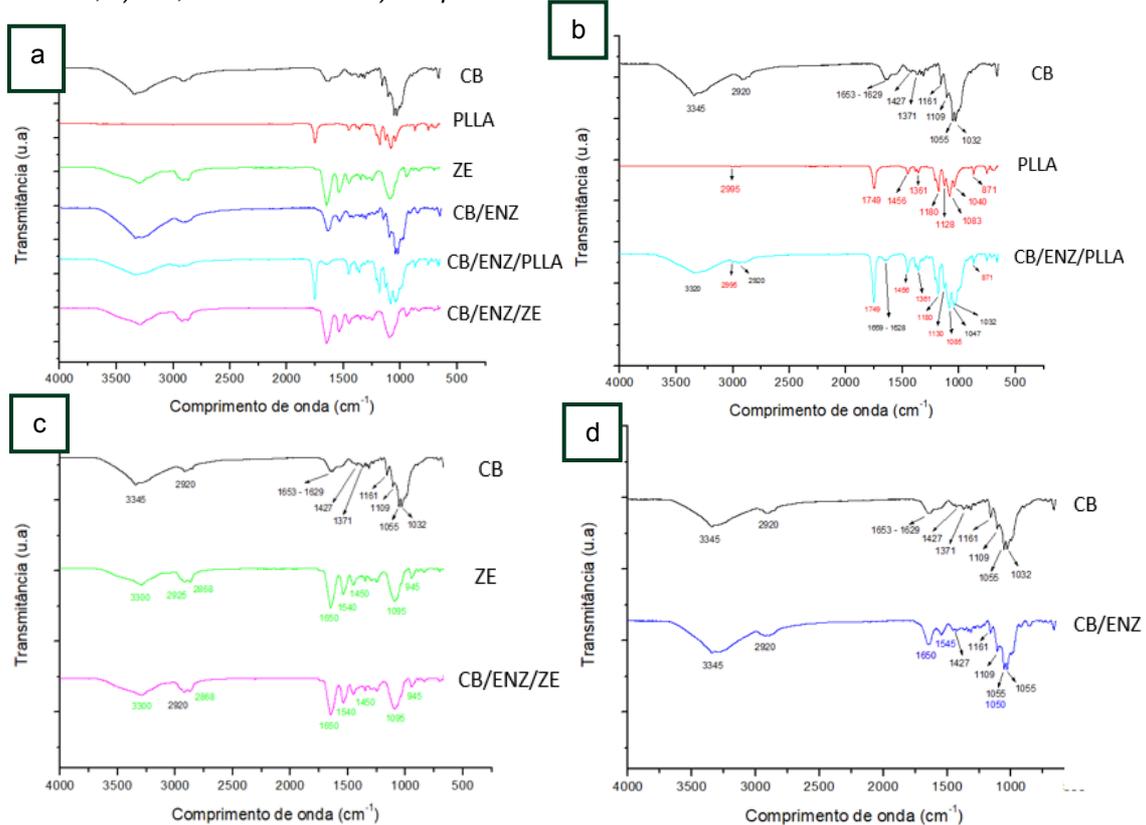


Tabela 2- Bandas comuns da CB pura, bandas correspondentes no espectro deste trabalho e suas respectivas atribuições

Banda de Absorção (cm^{-1})	Banda do Espectro (cm^{-1})	Atribuição
3345	3345	(O-H), estiramento celulose I
2860 - 2930	2920	(CH de CH_2 e CH_3), estiramento
1650	1653 – 1629	Água absorvida
1425 – 1435	1427	(HCH, OCH), torção
1373	1371	(C-H), torção
1146 – 1160	1161	(C-O-C), estiramento assimétrico na ligação β -1,4
1111	1109	(C-C, C-O), estiramento (celulose)
1055	1055	(C-O-C do anel piranose), vibração
1030	1032	(C-O, C-C), estiramento

Fontes: (GEA et al., 2011; KAČURÁKOVÁ et al., 2002; MOHARRAM; MAHMOUD, 2008; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; NUNES, 2012; PECORARO et al., 2007).

Na Figura 16b são mostradas as bandas características das amostras de CB, PLLA e CB/PLLA, enquanto a Tabela 2 apresenta as atribuições das bandas características do PLLA. A banda característica da vibração de estiramento da ligação -C-O- das unidades éster do PLLA em 1080 cm^{-1} foi observada em ambos os espectros (PLLA e CB/PLLA), enquanto a banda mencionada na literatura em 1778 cm^{-1} , também relacionada ao grupamento éster, não foi identificada (WARDHONO *et al.*, 2019; XU, Jia *et al.*, 2009). Apesar do PLLA apresentar bandas muito semelhantes as bandas da CB pura, é possível observar que várias bandas do PLLA foram identificadas no espectro da amostra de CB/PLLA, como em 1749 , 1456 e 871 cm^{-1} , o que demonstra a interação entre os dois materiais.

Tabela 3– Bandas comuns do PLLA puro, bandas correspondentes no espectro deste trabalho e suas respectivas atribuições.

Banda de Absorção (cm⁻¹)	Banda do Espectro (cm⁻¹)	Atribuição
2993	2995	CH, estiramento assimétrico
1747	1749	-C=O, estiramento carbonila
1454	1456	CH ₂ , torção angular
1361	1361	CH, deformação assimétrica
1182	1180	(-C-O-), estiramento
1128	1128	
1086	1083	
1043	1040	O-H, torção
870	871	(-C-C-), estiramento

Fontes: (CIRIGO Y PÉREZ, 2014; GARLOTTA, 2001; GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007; MOTTA; DUEK; II, 2008).

Os espectros das amostras de ZE e CB/ZE com identificação das bandas características estão dispostos na Figura 16c. Os espectros de proteína são resultado das absorções do grupo peptídico, identificados como bandas de amida I, II e III (ALMEIDA; FILHO, 2009). As bandas de amida A, I, e II são identificadas em 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1540 cm⁻¹, respectivamente, sendo que a amida A se refere ao estiramento do grupo N-H e O-H dos aminoácidos das proteínas, a amida I ocorre devido ao estiramento C=O do grupo amida, e a amida II está relacionada as vibrações de deformação angular da ligação N-H e estiramento da ligação C-N (ALMEIDA; FILHO, 2009; CORRADINI, 2010).

Por fim, no espectro da amostra CB/ENZ (Figura 16d) observa-se a banda em 1650 cm⁻¹ relacionada à amida I derivada de aminoácidos da lipase. A banda em 1530 cm⁻¹ descrita na literatura e relacionada à amida II apresentou deslocamento para 1545 cm⁻¹ (BRISOLA, 2018; NGUYEN *et al.*, 2021). Devido à presença da banda em 1055 cm⁻¹ referente à vibração da ligação -C-O-C- do anel de piranose da CB, a banda característica da lipase em 1050 cm⁻¹ referente à vibração de deformação do grupamento amino primário -NH₂ acaba não sendo evidente.

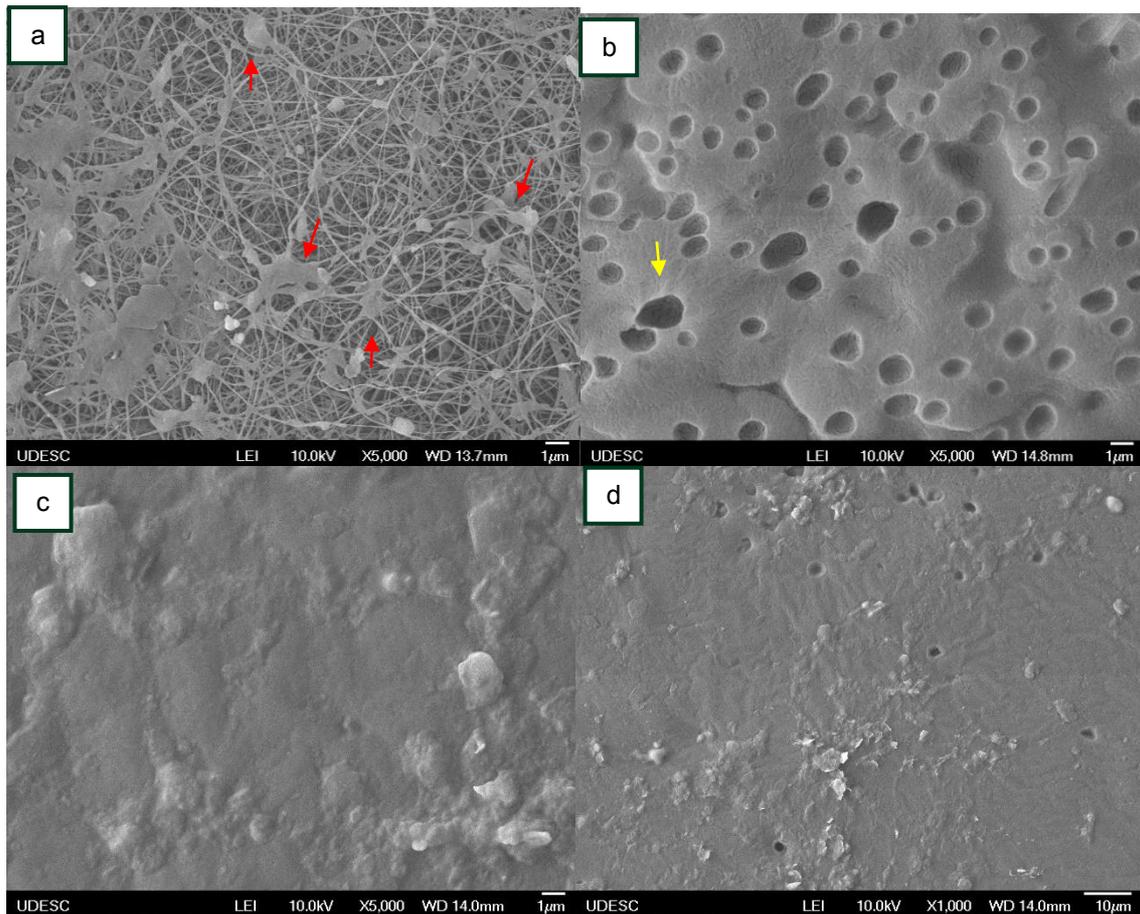
O PLLA apresentou as bandas em 1748 cm^{-1} que corresponde a deformação axial do C=O, 1452 cm^{-1} referente a deformação angular do CH_3 , 1358 cm^{-1} atribuída à deformação.

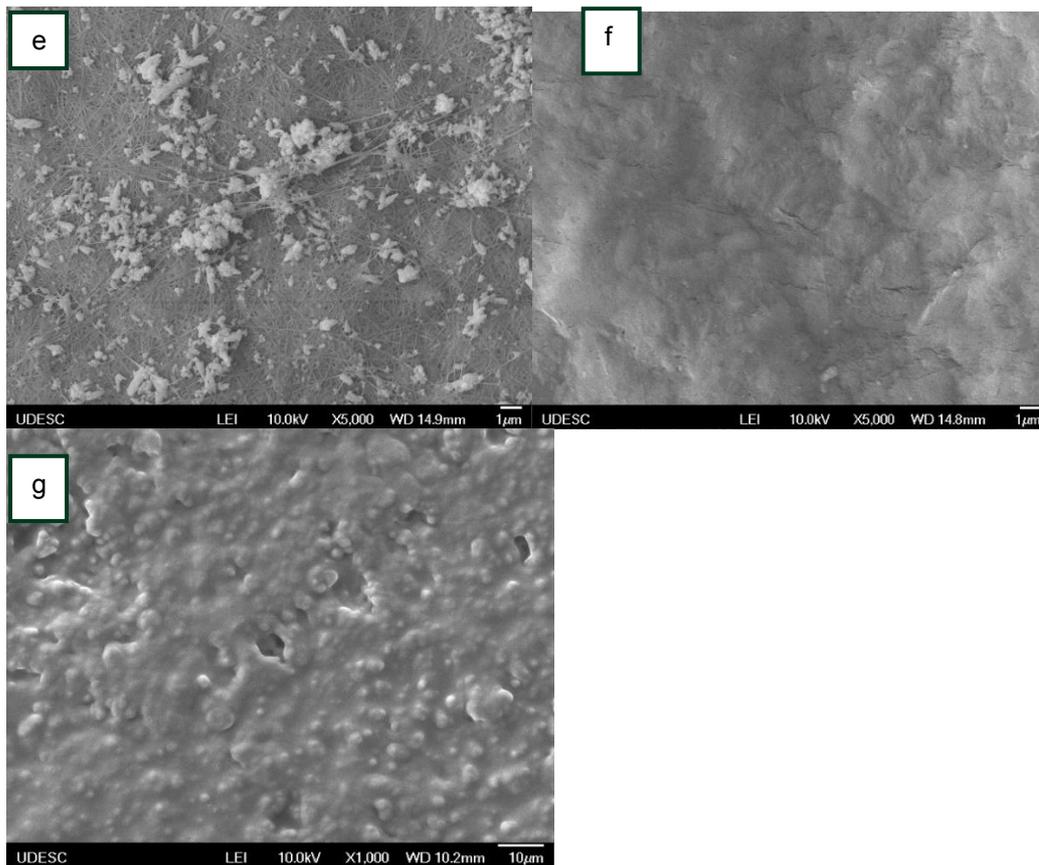
A CB/PLLA apresentou as bandas típicas da CB e do PLLA mostrando assim que modificação da superfície com PLLA ocorreu. A CB/ENZ/PLLA não apresentou a banda 2899 cm^{-1} que é característica da CB e alterou a intensidade das bandas. Não foi observado nem um deslocamento dos picos característico da CB, indicando que não ocorreu uma interação química entre o PLLA e a CB, podendo ser considerado que a interação entre esses dois polímeros foi apenas superficial (CIRIGO Y PÉREZ, 2014; LIU; DONG, 2020; MOTTA; DUEK; II, 2008).

5.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV

A análise de microscopia das amostras foi realizada com o objetivo de avaliar a estrutura das superfícies dos materiais puros e modificados deste trabalho. Na Figura 17 são mostradas as micrografias das amostras de CB, CB/ENZ, PLLA, ZE, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE.

Figura 17 – Micrografias das amostras com ampliação de 5000x de a) CB, b) PLLA, c) ZE, e) CB/ENZ/PLLA, f) CB/ENZ e com ampliação de 1000x de d) ZE e g) CB/ENZ/ZE.





A micrografia da CB (Figura 17a) mostra a estrutura típica da celulose bacteriana descrita na literatura. Trata-se de um material constituído por um emaranhado randômico de fibrilas com presença de poros. Essa estrutura é responsável pela retenção de água, resistência mecânica e porosidade do material. Na micrografia da CB é possível observar a presença de possíveis impurezas orgânicas do meio de cultura entre o emaranhado de fibrilas (setas vermelhas) com tamanho médio de 12 μm , o que pode ser diminuído ou eliminado com um processo de purificação mais eficiente (ANTONIO *et al.*, 2012; FRANCINE *et al.*, 2017). Gea et al. (2011) analisaram dois métodos de purificação das membranas: o primeiro somente com solução de NaOH durante o período chamado “overnight” e o segundo com a solução de NaOH seguida da solução de NaOCl. As imagens de MEV mostraram que as membranas tratadas com as duas soluções não apresentaram impurezas do meio de cultura nem a bactéria. Em relatos recentes da literatura vem se estudando que essas impurezas podem ser acúmulos ou emaranhados de nanofibrilas que acabam englobando os bacilos das bactérias prendendo-a e dando a entender que a purificação não foi efetiva (MINATTI; MINATTI, 2020; PALUDO, 2021).

Em relação à micrografia do PLLA (Figura 17b), é possível observar um material bastante poroso (setas amarelas), os poros tem abertura média de 50,4 μm de diâmetro. Essa estrutura porosa foi observada também por Shi et al. (2010) na amostra de PLLA preparada por volatilização natural, bem como amostras de diferentes concentrações de PLLA preparadas pelo método de separação de fase conhecido como “solvente-não-solvente”, método este de preparação de scaffolds multiporosos. Conoscenti et al. (2017) produziram PLLA e compósitos com bioglass (BG) por separação de fase induzida termicamente para serem usados como scaffolds e obtiveram scaffolds de PLLA com volume de poros de 93% e scaffolds de PLLA/BG 5% com volume de poros de 88,5%.

A micrografia de zeína na Figura 17c mostra um material com uma superfície homogênea e a presença de algumas rugosidades. Já na micrografia da Figura 17d com ampliação de 1000x, observa-se orifícios ou poros. TAVARES, (2010) estudou o efeito da adição de argilas modificadas em biofilmes a base de zeína e obteve um material no qual foi possível observar nas micrografias a presença destes poros, identificados como depósitos globulares no trabalho. Corradini (2010) desenvolveu blendas poliméricas de zeína e amido de milho e obteve um resultado muito semelhante. De acordo com Monterrey-Quintero e Sobral (2000), esses orifícios podem ser resultantes da existência de microbolhas ou frações de glicerol. Já para Corradini (2010) esses orifícios ou bolhas podem ser resultado da separação de fase entre o glicerol e a zeína, em função da baixa interação entre eles. No que diz respeito à amostra de CB/ENZ/PLLA, observa-se na Figura 17e que a estrutura altamente porosa da CB foi preenchida pelo PLLA, tornando as fibrilas mais compactadas. Comportamento semelhante foi observado por Cirigo Y Pérez (2014) que produziu biocompósitos de PLLA e CB através da policondensação direta de L-ácido láctico dentro dos hidrogéis de CB e observou que os poros da CB foram preenchidos com um material de massa regular e lisa, sendo este material provavelmente o PLLA. Por outro lado, nota-se também a presença de uma espécie de aglomerados na superfície das fibrilas, que podem ser indício da incorporação enzimática ou cristalização do PLLA, esses aglomerados tem

a largura média 47,8 μm .

Uma vez que a micrografia com ampliação de 5000x da Figura 17f não possibilitou análise da amostra CB/ZE, realizou-se também análise com ampliação de 1000x (Figura 8h), onde observa-se que a superfície da CB foi recoberta pela zeína, apresentando uma característica semelhante à do filme de zeína pura, com uma maior quantidade de rugosidades. Ghide et al. (2022) produziram nanocompósitos de nanofibrilas de CB e nanopartículas de zeína e observaram que o aumento da quantidade de zeína diminuiu o tamanho dos poros dos nanocompósitos, resultando em uma estrutura de rede mais compacta e densa.

Por fim, a amostra de CB/ENZ (Figura 17g) apresenta uma superfície homogênea, o que demonstra que a enzima lipase foi incorporada na membrana de CB, preenchendo os poros da membrana. Baron (2008) estudou a imobilização da lipase em dez suportes diferentes, sendo que o suporte Accurel EP 100 (polipropileno) foi o selecionado para a biocatálise por apresentar melhor eficiência na imobilização. As imagens de MEV mostraram que os poros deste suporte foram parcialmente preenchidos após a imobilização da lipase.

5.5.4 Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada com a finalidade de identificar se ocorreu a modificação na superfície da membrana de CB de hidrofílica para anfifílica para que possa ocorrer a interação da CB com enzima e depois modificada com a óleo e com a superfície aquosa que a CB vai se encontrar. A CB ter ficado anfifílica é vantajoso para a aplicação na degradação do óleo. O valor do ângulo da gota quando toca a amostra vai indicar o grau de hidrofobicidade sendo os valores menores de 90° indica que a amostra é hidrofílica por ocorre o espalhamento da gota, ângulos maiores que 90° indicam que a amostra é hidrofóbica por não ocorre a interação da gota com a amostra (MOLAEI *et al.*, 2022). Os ângulos foram medidos 4 vezes em cada amostra e depois foi calculada a média. Nas figuras 18 e na tabela 4 são mostrados os ângulos das amostras CB, CB/ENZ, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE.

Figura 18- Angulo de contato das amostras CB (a), CB/ENZ/PLLA (b), CB/ENZ/ZE(c) e CB/ENZ (d).

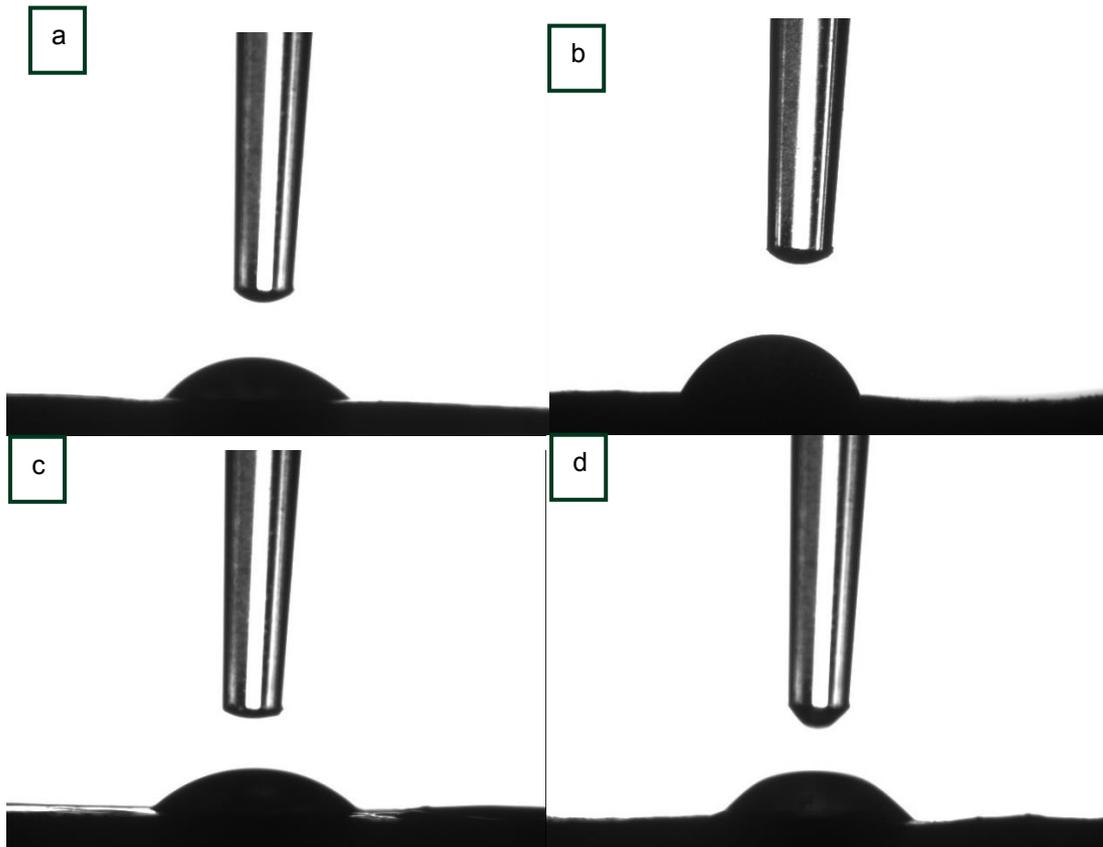


Tabela 4 - Valores dos angulos de contato das amotras CB,CB/ENZ, PLLA, ZE, CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE.

Amostras	Ângulo de contato	Classificação
	Média ± DP	
CB	45° ± 4,53	Hidrofílico
CB/ENZ	55° ± 4,81	Hidrofílico
PLLA	90° ± 14,32	Hidrofóbico
ZE	93° ± 4,05	Hidrofóbico
CB/ENZ/PLLA	71° ± 5,46	Anfifílico
CB/ENZ/ZE	80°± 3,66	Anfifílico

A CB apresentou o ângulo de 45,2° e a CB/ENZ teve um ângulo de 55° mostrando ambas são hidrofílicas, o que é característico da CB. A CB/ENZ/ZE teve o ângulo 80°, CB/ENZ/PLLA apresentou 71° mostra que as amostras ficaram anfifílicas assim as amostras não são nem hidrofóbicas e nem hidrofílicas

o que possibilita que haja a interação da CB com enzima com óleo e o meio aquoso onde ela vai ser utilizada. As amostras de PLLA e ZE apresentaram o ângulo de contato de 90° e 93° respectivamente mostrando que ambas as amostras são hidrofóbicas. O PLLA é considerado um material hidrofóbico devido ao seu grupos funcionais com -COOH,-OH a CB modificada com PLLA teve um ângulo de contato menor que o do PLLA e isso ocorreu por conta da ligação química que ocorre entres os grupos funcionais da CB com o do PLLA (SHUAI *et al.*, 2022)

5.7 Teste de degradação de óleo (índice de acidez)

Na tabela 5 são apresentados os dados do teste de degradação de óleo de soja (índice de acidez). Observa-se que mesmo com o processo de imobilização, a enzima lipase manteve a capacidade de hidrolisar o óleo de soja, apresentando valor mais expressivo para a amostra de CB/ENZ/ZE (97%), o que pode ser resultado da influência da presença da zeína, por também tratar-se de uma proteína. É possível observar também que a amostra de CB/ENZ/PLLA também apresentou um valor maior de índice de acidez (66,1%) do que a amostra CB/ENZ.

Tabela 5- Valores médios de massa de NaOH e de índice de acidez para as amostras de CB, CB/ENZ, CB/ENZ/ZE e CB/ENZ/PLLA

Amostra	Massa NaOH (g)	AI (%)
	Média±DP	Média±DP
CB	2,20 ± 0,1	45,57 ± 2,08
ZE	0,60 ± 0,06	12,50 ± 1,26
PLLA	0,34 ± 0,05	7,06 ± 0,95
CB/ENZ	2,84 ± 0,27	58,80 ± 5,5
CB/ZE	0,85 ± 0,17	17,64 ± 3,60
CB/PLLA	0,75 ± 0,67	15,60 ± 13,95
CB/ENZ/ZE	4,69 ± 0,17	97,02 ± 3,6
CB/ENZ/PLLA	3,20 ± 0	66,15 ± 0

Os maiores valores de índice de acidez das amostras de CB/ENZ/ZE e CB/ENZ/PLLA podem estar relacionados ao fato de ambos os materiais serem

hidrofóbicos e terem recoberto de forma quase que homogênea a membrana de CB. A característica de hidrofobicidade pode facilitar a interação das amostras com a parte oleosa do meio reacional, o que ocasionou melhores resultados de índice de acidez.

FACIN et al. (2018) estudaram imobilização da lipase NS-40116 de *Thermomyces lanuginosus* em poliuretano e análise da capacidade de hidrólise de óleo vegetal mostrou que todas as amostras alcançaram acidez máxima (12 – 13%), o que confirmou que a enzima imobilizada no suporte de poliuretano manteve sua capacidade catalítica. Comparando com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que os valores foram ainda maiores mesmo após o processo de modificação da superfície das membranas de CB, o que demonstra a obtenção de um material que mantém a característica de degradação da enzima. As amostras CB/PLLA e CB/ZE apresentaram o menor índice de acidez assim como o PLLA e a ZE sozinha mostrando que esse material não tem propriedade para a degradação de óleo sozinho o que corrobora com os resultado encontrados nas amostras CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE.

6 Conclusão

A análise visual permitiu observar as modificações bem como a efetiva imobilização da lipase nas membranas de CB, uma vez que foi possível verificar as alterações físicas das amostras. Além disso, os testes de caracterização indicam as alterações realizadas nas amostras. As curvas de TGA identificaram uma região de degradação atribuída a lipase na amostra CB/ENZ, bem como as regiões características do PLLA e da zeína nas amostras modificadas. Os espectros de FTIR mostraram bandas características dos materiais puros nas respectivas amostras modificadas, com exceção da amostra CB/ENZ/ZE que não apresentou as bandas da CB. Já a análise de MEV demonstrou a alteração de superfície das amostras modificadas, com a diminuição do espaçamento entre as fibrilas de CB ocasionada pelo recobrimento das membranas por PLLA e zeína e imobilização da enzima. Por fim, o teste de degradação de óleo comprovou que, mesmo imobilizada e com filmes de PLLA e zeína recobrendo a matriz de imobilização (CB), a lipase

manteve sua capacidade de degradar o óleo vegetal, com destaque para as duas amostras modificadas com PLLA e zeína que obtiveram os maiores valores de índice de acidez, o que pode ser resultado do fato de ambos os materiais serem hidrofóbicos e terem facilitado o contato das amostras com a parte oleosa do meio. O teste de ângulo de contato mostrou que a amostras ficaram anfifílica o que possibilita a interação na interface água-óleo fazendo a degradação do óleo. Com esses resultados, observou que o material hidrofóbico desenvolvido tem potencial de aplicação em sistemas de tratamento de efluentes devido a sua capacidade de degradar o óleo, demandando, para isso, a realização de mais análises que permitam aprimorar esse produto.

7 Sugestões para trabalhos futuros

Ainda existe muitas possibilidades para aprofundamento de trabalhos futuros envolvendo esse estudo, a seguir algumas sugestões:

- Análise da eficiência da CB incorporada e modificada ao longo prazo e em larga escala de quantidade de gordura.
- Avaliar a liberação da enzima e degradação de óleo em caixas de gordura.
- Testar a CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE com graxas e petróleo para ver a eficiência de degradação das moléculas.
- Avaliar a durabilidade das amostras CB/ENZ/PLLA e CB/ENZ/ZE in vitro (degradação das amostras).
- Realizar outros tipos de modificações visando melhorar a eficiência da Lipase.

8 Referências

ABDULLAHI, Aliyu B.; ISMAIL, Saliu; ALSHANA, Usama. Edible oil-based switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction for the determination of lead in food samples using flame-atomic absorption

spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 118, p. 105189, 1 May 2023. DOI 10.1016/J.JFCA.2023.105189.

AGUILERA, Francisco; MÉNDEZ, Josefina; PÁSAROA, Eduardo; LAFFONA, Blanca. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 30, no. 4, p. 291–301, 1 May 2010. DOI 10.1002/JAT.1521.

AHMED, Rawaz; HUDDERSMAN, Katherine. Review of biodiesel production by the esterification of wastewater containing fats oils and grease (FOGs). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, vol. 110, p. 1–14, 25 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2022.02.045>.

ALJABERI, Forat Yasir; AHMED, Shaymaa A.; MAKKI, Hasan F.; NAJE, Ahmed Samir; ZWAIN, Haider M.; SALMAN, Ali Dawood; JUZSAKOVA, Tatjana; VIKTOR, Sebestyen; VAN, B.; LE, Phuoc Cuong; LA, D. Duong; CHANG, S. Woong; UM, Myoung Jin; NGO, Huu Hao; NGUYEN, D. Duc. Recent advances and applicable flexibility potential of electrochemical processes for wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, vol. 867, p. 161361, 1 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.161361>.

ALMEIDA, Crislene B; FILHO, José F Lopes. Caracterização estrutural de biomaterial a base de zeína. **Congresso brasileiro de polímeros**, 2009.

ANTONIO, Regina Vasconsellos; RECOUVREUX, Derce Oliveira Souza; NAZARIO, Ana Carla; TIMBONI, Diego; FERRARINI, Eduarda; RODOWANSKI, Giovana Pascoali; CAUDURO, Maria Tereza; PERES, Samira da Silva. PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE DIFERENTES SUBSTRATOS. **Revista Técnico-Científica do IFSC**, p. 176–176, 12 Nov. 2012.

ARCAN, Iskender; YEMENICIOĞLU, Ahmet. Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme. **Food Research International**, vol. 51, no. 1, p. 208–216, 1 Apr. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.12.011>.

ARMENTANO, I.; BITINIS, N.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; RESCIGNANO, N.; VERDEJO, R.; LOPEZ-MANCHADO, M. A.; KENNY, J. M. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, vol. 38, no. 10–11, p. 1720–1747, 2013. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2013.05.010>.

ASHTAVINAYAK, Paradh; ELIZABETH, Hill Annie; ASHTAVINAYAK, Paradh; ELIZABETH, Hill Annie. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. **Advances in Microbiology**, vol. 6, no. 3, p. 195–209, 10 Mar. 2016. DOI 10.4236/AIM.2016.63020.

ASTM F1635 - 11. 2011.

AVÉROUS, Luc. Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, , p. 433–450, 1 Jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1>.

BERTI, Alessandra Paim; DÜSMAN, Elisângela; SOARES, Lilian Capelari. EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO POR ÓLEOS E AGROTÓXICOS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, vol. 4, no. 1, 28 Jul. 2009.

BIELECKI, Stanislaw; KRYSZYNOWICZ, Alina; TURKIEWICZ, Marianna; KALINOWSKA, Halina. Bacterial Cellulose. **Biopolymers Online**, 27 Feb. 2002. DOI 10.1002/3527600035.BPOL5003.

BORNSCHEUER, Uwe T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS microbiology reviews**, vol. 26, no. 1, p. 73–81, Mar. 2002. DOI 10.1111/J.1574-6976.2002.TB00599.X.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, vol. 72, no. 1–2, p. 248–254, 7 May 1976. DOI 10.1006/ABIO.1976.9999.

BRISOLA, Juliano. Imobilização de lipase em celulose e nanocristais de celulose bacteriana. 2018.

BROWN, Adrian J. XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, vol. 49, no. 0, p. 432–439, 1 Jan. 1886. DOI 10.1039/CT8864900432.

CACICEDO, Maximiliano L.; CASTRO, M. Cristina; SERVETAS, Ioannis; BOSNEA, Loulouda; BOURA, Konstantina; TSAFRAKIDOU, Panagiota; DIMA, Agapi; TERPOU, Antonia; KOUTINAS, Athanasios; CASTRO, Guillermo R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource technology**, vol. 213, p. 172–180, 2016. DOI 10.1016/J.BIORTECH.2016.02.071.

CALDERÓN-MESÉN, P; JAIKEL-VÍQUEZ, D; BARRANTES-MADRIGAL, M D; SÁNCHEZ-SOLÍS, J; MENA-VEGA, JP; ARGUEDAS-MOLINA, J; UREÑA-ALVARADO, K; MAYNARD-HERNÁNDEZ, G; SANTAMARÍA-MONTERO, L; COB-DELGADO, M; ANGULO-PARDO, E; VALLEJO, Felipe; SANDOVAL, Mi; DURÁN-QUESADA, A M; REDONDO-SOLANO, M; HERRERA-SANCHO, O A; JOSÉ, San; RICA, Costa. Multidisciplinary approach to the study of large-format oil paintings. **Scientific Reports 2023 13:1**, vol. 13, no. 1, p. 1–16, 7 Feb. 2023. DOI 10.1038/S41598-023-28777-9.

CANESIN, Edmilson Antonio; AMORIN, Thais Marques; VERONEZE, Anna Flávia de Faria; SUZUKI, Rubia Michele; ALMEIDA, Vanessa Vivian de; SOUZA, Nilson Evelásio de; BONAFÉ, Elton Guntendorfer. Caracterização de biodiesel metílico obtido em transesterificação por catálise ácida a partir de óleos residuais de soja. **Brazilian Journal of Food Research**, vol. 10, no. 1, p. 77–92, 31 Dec. 2019. DOI 10.3895/REBRAPA.V10N1.5182.

CAO, Xing; WANG, Yaqi; CHEN, Hang; HU, Jinjing; CUI, Li. Preparation of different morphologies cellulose nanocrystals from waste cotton fibers and its effect on PLLA/PDLA composites films. **Composites Part B: Engineering**, vol. 217, p. 108934, 15 Jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2021.108934>. Accessed on: 14 Feb. 2023.

CASTRO, Cristina; ZULUAGA, Robin; PUTAUX, Jean Luc; CARO, Gloria; MONDRAGON, Iñaki; GAÑÁN, Piedad. Structural characterization of bacterial

cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, vol. 84, no. 1, p. 96–102, 11 Feb. 2011.

CAVALCANTI, MARCELLO HENRIQUE DA SILVA. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (Fe₃O₄) E SEU USO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE THERMOMYCES LANUGINOSUS (TLL)**. 2020. 1–87 f. 2020.

CHAWLA, Prashant R; BAJAJ, Ishwar B; SURVASE, Shrikant A; SINGHAL, Rekha S. *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*. 2009.

CIRIGO Y PÉREZ, Ericka. *Produção de biocompósitos por policondensação de L-ácido láctico em hidrogéis de celulose bacteriana*. 2014.

CJ CHENG, M Ferruzzi, OG Jones. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. **Food Hydrocolloid.**, vol. 87, p. 229–236, 2019.

CONOSCENTI, Giocchino; CARFÌ PAVIA, Francesco; CIRALDO, Francesca Elisa; LIVERANI, Liliana; BRUCATO, Valerio; LA CARRUBBA, Vincenzo;; BOCCACCINI, Aldo R. In vitro degradation and bioactivity of composite poly-l-lactic (PLLA)/bioactive glass (BG) scaffolds: comparison of 45S5 and 1393BG compositions. 2017.

CORRADINI, Elisângela. *Desenvolvimento de blendas de zeína e amido de milho*. São Carlos, 26 Jan. 2010. DOI 10.11606/T.88.2004.TDE-03092010-150253.

COUTO, Rafaella Ruiz do. *Degradação de petróleo por lipase de thermomyces lanuginosus imobilizada em nanofibras de poliamida-6: uma alternativa para descontaminação de ambientes aquosos*. 2019.

CZAJA, Wojciech; ROMANOVICZ, Dwight; BROWN, R. malcolm. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose** 2004 11:3, vol. 11, no. 3, p. 403–411, 30 Oct. 2004. DOI 10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61.

DA COSTA, Juliana Francine; GARCIA, Michele Cristina Formolo; APATI, Giannini Pasisnick; BARUD, Hernane da Silva; SCHNEIDER, Andrea Lima dos Santos; PEZZIN, Ana Paula Testa. Nanocristais de celulose bacteriana: da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli(L-ácido láctico). **Matéria (Rio de Janeiro)**, vol. 22, 8 Jan. 2018. DOI 10.1590/S1517-707620170005.0253.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria Da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol. 27, no. 4, p. 623–630, 2004. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000400017>.

DANTAS, Adriana. Imobilização e caracterização da lipase NS-40116 em poliestireno. 2017.

DE AMORIM, Julia Didier Pedrosa; DE SOUZA, Karina Carvalho; DUARTE, Cybelle Rodrigues; DA SILVA DUARTE, Izabelle; DE ASSIS SALES RIBEIRO, Francisco; SILVA, Girlaine Santos; DE FARIAS, Patrícia Maria Albuquerque; STINGL, Andreas; COSTA, Andrea Fernanda Santana; VINHAS, Glória Maria; SARUBBO, Leonie Asfora. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters** 2020 18:3, vol. 18, no. 3, p. 851–869, 23 Mar. 2020. DOI 10.1007/S10311-020-00989-9.

DOMENEGUETTI, Rafael Romano. Desenvolvimento “in situ” de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita. 17 Apr. 2018. DOI 10.17616/R31N39..

DONINI, Ígor A.N.; DE SALVI, Denise T.B.; FUKUMOTO, Fabiana K.; LUSTRI, Wilton R.; BARUD, Hernane S.; MARCHETTO, Reinaldo; MESSADDEQ, Younes; RIBEIRO, Sidney J.L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, vol. 35, no. 4, p. 165–178, 2010a. DOI 10.1590/S0100-46702010000400021.

DONINI, Ígor A.N.; DE SALVI, Denise T.B.; FUKUMOTO, Fabiana K.; LUSTRI, Wilton R.; BARUD, Hernane S.; MARCHETTO, Reinaldo; MESSADDEQ,

Younes; RIBEIRO, Sidney J.L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, vol. 35, no. 4, p. 165–178, 2010b. DOI 10.1590/S0100-46702010000400021.

DONINI, Ígor Augusto Negri. Desenvolvimento de métodos de cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* para obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno Tipo I adicionado in situ. , p. 105, 2011. .

FACIN, Bruno R.; VALÉRIO, Alexsandra; BRESOLIN, Daniela; CENTENARO, Giselle; DE OLIVEIRA, Débora; OLIVEIRA, J. Vladimir. Improving reuse cycles of *Thermomyces lanuginosus* lipase (NS-40116) by immobilization in flexible polyurethane. **Biocatalysis and Biotransformation**, vol. 36, no. 5, p. 372–380, 2018. DOI 10.1080/10242422.2018.1458842.

FERNANDES, M. L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 30, no. 1, p. 43–49, 5 Jul. 2004. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2004.03.004>.

FRANCINE, Juliana; CRISTINA, Michele; GARCIA, Formolo; APATI, Giannini Pasisnick; BARUD, Silva. Nanocristais de celulose bacteriana : da obtenção , sob diferentes condições de hidrólise , à incorporação como reforço em poli (L-ácido láctico) Bacterial cellulose nanocrystals : from obtaining , under different hydrolysis conditions , the incorporati. 2017. .

GAO, Jing; SHI, Lianlian; JIANG, Yanjun; ZHOU, Liya; HE, Ying. Formation of lipase *Candida* sp. 99–125 CLEAs in mesoporous silica: characterization and catalytic properties. **Catalysis Science & Technology**, vol. 3, no. 12, p. 3353–3359, 12 Nov. 2013. DOI 10.1039/C3CY00412K.

GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment** 2001 9:2, vol. 9, no. 2, p. 63–84, 2001. DOI 10.1023/A:1020200822435.

GEA, Saharman; REYNOLDS, Christopher T.; ROOHPOUR, Nima; WIRJOSENTONO, Basuki; SOYKEABKAEW, Nattakan; BILOTTI, Emiliano;

PEIJS, Ton. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 19, p. 9105–9110, 2011. DOI 10.1016/j.biortech.2011.04.077.

GHIDE, Michael Kidane; LI, Kai; WANG, Jianhua; ABDULMALEK, Saadiah A.; YAN, Yunjun. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in sn-2 palmitic acid and sn-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use. **Food chemistry**, vol. 390, 1 Oct. 2022. DOI 10.1016/J.FOODCHEM.2022.133171.

GOMES, Fábio Pedro Almeida. Biossíntese de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. 2011.

GUPTA, Bhuvanesh; REVAGADE, Nilesh; HILBORN, Jöns. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science**, vol. 32, no. 4, p. 455–482, 1 Apr. 2007. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2007.01.005>.

HIRAI, Asako; TSUJI, Masaki; HORII, Fumitaka. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, vol. 9, no. 2, p. 105–113, Jun. 2002. DOI 10.1023/A:1020195205030/METRICS.

IGUCHI. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength. 16 Apr. 1986.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, vol. 35, no. 2, p. 261–270, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>.

KAČURÁKOVÁ, Marta; SMITH, Andrew C.; GIDLEY, Michael J.; WILSON, Reginald H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, vol. 337, no. 12, p. 1145–1153, 12 Jun. 2002. DOI 10.1016/S0008-6215(02)00102-7.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2.

Process Biochemistry, vol. 36, no. 4, p. 317–324, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00228-4).

KASAAI, Mohammad Reza. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 79, p. 184–197, 1 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.07.015>.

KESHK, Sherif M.A.S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate polymers**, vol. 99, p. 98–100, 2014. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2013.08.060.

KIM, Su Hyun; CHIN, In Joo; YOON, Jin San; KIM, Soo Hyun; JUNG, Jin Soo. Mechanical properties of biodegradable blends of poly(L-lactic acid) and starch. **Korea Polymer Journal**, vol. 6, no. 5, p. 422–427, 1998. DOI 10.2/JQUERY.MIN.JS..

KLEMM, Dieter; HEUBLEIN, Brigitte; FINK, Hans Peter; BOHN, Andreas. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, vol. 44, no. 22, p. 3358–3393, 30 May 2005. DOI 10.1002/ANIE.200460587.

KUJAWA, Joanna; GŁODEK, Marta; LI, Guoqiang; AL-GHARABLI, Samer; KNOZOWSKA, Katarzyna; KUJAWSKI, Wojciech. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. **Science of The Total Environment**, vol. 801, p. 149647, 20 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149647>.

LARKINS, Brian A. Proteins of the Kernel. **Corn: Chemistry and Technology, 3rd Edition**, , p. 319–336, 1 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00012-7>.

LAWTON, J. W. Zein: A History of Processing and Use. **Cereal Chemistry**, vol. 79, no. 1, p. 1–18, 1 Jan. 2002. DOI 10.1094/CCHEM.2002.79.1.1.

LI, Wenbo; SUN, Wuliang; JIA, Lu; DONG, Yue; WU, Lingling; SALDAÑA, Marleny D.A.; SUN, Wenxiu. Poly-L-lactic acid (PLLA)/anthocyanin nanofiber color indicator film for headspace detection of low-level bacterial concentration.

International journal of biological macromolecules, vol. 215, p. 123–131, 31 Aug. 2022. DOI 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.06.034.

LIMA, Lais R.; SANTOS, Daniele B.; SANTOS, Molíria v.; BARUD, Hernane S.; HENRIQUE, Mariana A.; PASQUINI, Daniel; PECORARO, Edison; RIBEIRO, Sidney J.L. NANOCRISTAIS DE CELULOSE A PARTIR DE CELULOSE BACTERIANA. **Química Nova**, vol. 38, no. 9, p. 1140–1147, 1 Nov. 2015. DOI 10.5935/0100-4042.20150131.

LIN, En Shyh; KO, Hui Ching. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 37, no. 2, p. 261–265, 1 Jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.03.012>.

LIU, Dong Mei; DONG, Chen. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, vol. 92, p. 464–475, 1 May 2020. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.02.005>.

LOTRAKUL, Pongtharin; DHARMSTHITI, Saovanee. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of biotechnology**, vol. 54, no. 2, p. 113–120, 25 Apr. 1997. DOI 10.1016/S0168-1656(97)01696-9.

LUÍS, Ângelo; DOMINGUES, Fernanda; RAMOS, Ana. Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties. **Microorganisms 2019, Vol. 7, Page 267**, vol. 7, no. 8, p. 267, 16 Aug. 2019. DOI 10.3390/MICROORGANISMS7080267.

LYNCH, Kieran M.; ZANNINI, Emanuele; WILKINSON, Stuart; DAENEN, Luk; ARENDT, Elke K. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, vol. 18, no. 3, p. 587–625, 1 May 2019. DOI 10.1111/1541-4337.12440.

MATTE, Carla Roberta. Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead 150, caracterização dos derivados e suas

aplicações em reatores contínuos e em batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel. 2015.

MEDEIROS, Gabriela Brunosi. Preparação e caracterização de nanofibras de zeína/poli (Óxido de etileno) por eletrofiação em solução. 10 Sep. 2018.

MESSIAS, Josana Maria; COSTA, Bruna Zucoloto da; LIMA, Valeria Marta Gomes de; GIESE, Cristine; DEKKER, Robert Frans Huibert; BARBOSA, Aneli de Melo. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, vol. 32, no. 2, p. 213–234, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>.

MESSIAS, Josana Maria; ZUCOLOTO DA COSTA, Bruna; LIMA, Valéria Marta Gomes de; GIESE, Ellen Cristine; DEKKER, Robert Frans Huibert; BARBOSA, Aneli Melo. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, vol. 32, no. 2, p. 213–234, 15 Dec. 2011. DOI 10.5433/1679-0375.2011V32N2P213.

MINATTI, Tatiane Cristina da Silva; MINATTI, Silva. Nanocompósito celulose bacteriana e hidroxiapatita para remoção de zinco de efluentes industriais. 2020.

MOHAMMADI, Seyed Amin; NAJAFI, Hanieh; ZOLGHARNIAN, Sheida; SHARIFIAN, Seyedmehdi; ASASIAN-KOLUR, Neda. Biological oxidation methods for the removal of organic and inorganic contaminants from wastewater: A comprehensive review. **Science of The Total Environment**, vol. 843, p. 157026, 15 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157026>.

MOHARRAM, M. A.; MAHMOUD, Osama M. FTIR spectroscopic study of the effect of microwave heating on the transformation of cellulose I into cellulose II during mercerization. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 107, no. 1, p. 30–36, 5 Jan. 2008. DOI 10.1002/APP.26748.

MOHITE, Bhavna v.; PATIL, Satish v. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and applied biochemistry**, vol. 61, no. 2, p. 101–110, 2014. DOI 10.1002/BAB.1148.

MOLAEI, Rahim; MORADI, Mehran; KAHYAOĞLU, Leyla Nesrin; FOROUGH, Mehrdad. Application of bacterial nanocellulose decorated with zeolitic imidazolate framework (ZIF-L) as a platform for food freshness monitoring. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 223, p. 713–721, 31 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.11.051>.

MONA, Sharma; BAJAR, Somvir; DEEPAK, Bansal; KIRAN, Bala; KAUSHIK, Anubha. Microbial cellulose: production and application. **Materials for Biomedical Engineering: Absorbable Polymers**, , p. 309–322, 1 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818415-8.00011-5>.

MOTTA, A C I; DUEK, E A R; II. Estudo inicial da degradação “in vitro” de poli (L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório. **Matéria (Rio de Janeiro)**, vol. 13, no. 3, p. 429–438, Sep. 2008. DOI 10.1590/S1517-70762008000300003.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham Ur. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>, vol. 43, no. 2, p. 134–179, 2008. DOI 10.1080/05704920701829043.

MULLER, Daliana. Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana. 2012. Available at: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99476>.

MUMIVAND, Hasan; IZADI, Zeinab; AMIRIZADEH, Fatemeh; MAGGI, Filippo; MORSHEDLOO, Mohamad Reza. Biochar amendment improves growth and the essential oil quality and quantity of peppermint (*Mentha × piperita* L.) grown under waste water and reduces environmental contamination from waste water disposal. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 446, p. 130674, 15 Mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.130674>.

NAVYA, P. v.; GAYATHRI, Varnakumar; SAMANTA, Debasis; SAMPATH, Srinivasan. Bacterial cellulose: A promising biopolymer with interesting properties and applications. **International journal of biological macromolecules**, vol. 220, p. 435–461, 1 Nov. 2022. DOI 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.056.

NEMATIAN, Tahereh; SALEHI, Zeinab; SHAKERI, Alireza. Conversion of bio-oil extracted from *Chlorella vulgaris* micro algae to biodiesel via modified superparamagnetic nano-biocatalyst. **Renewable Energy**, vol. 146, p. 1796–1804, 1 Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.08.048>.

NGUYEN, Thuy Kim Anh; HUYNH, Bao Ngan; THAI, Hoang Nguyen Vu; TRAN, Thi Nhu Hao; TRUONG, Thi Thu; VU, Tran Khanh Linh. Production of bacterial cellulose films by *Gluconoacetobacter xylinus* for lipase immobilization. **Journal of Technical Education Science**, no. 67, p. 1–13, 17 Dec. 2021. DOI 10.54644/JTE.67.2021.1083.

NOLASCO MACEDO MURUCI, Livia; RIBEIRO DOS SANTOS, Regiane; COURI, Sonia; DAS MERCÊS PENHA, Edmar; CAMEZ TRICHES DAMASO, Mônica. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPASE DE *ASPERGILLUS NIGER* VISANDO SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE LIPASE *ASPERGILLUS NIGER* AIMING ITS APPLICATION IN FOOD. 2013.

NUNES, Ana Sofia Costa. Bacterial cellulose as a nanostructured functional material for biomedical applications. 2012.

OLALERE, Olusegun Abayomi; GAN, Chee Yuen. Process optimisation of defatted wheat germ protein extraction in a novel alkaline-based deep eutectic solvent (DES) via Box–Behnken experimental design (BBD). **Food Chemistry**, vol. 409, p. 135224, 30 May 2023. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.135224>.

PALUDO, Natália. Obtenção e aplicação de nanofibras de resíduo industrial de kombucha em filmes biodegradáveis. 2021.

PAPALIA, Índira da Silva; LONDERO, Patrícia Medianeira Grigoletto. Extraction of zein and its application in food preservation. **Ciência Rural**, vol. 45, no. 3, p. 552–559, 1 Jan. 2015. DOI 10.1590/0103-8478CR20131649..

PECORARO, Édison; MANZANI, Danilo; MESSADDEQ, Younes; RIBEIRO, Sidney J.L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation,

Properties and Applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 369–383, 1 Jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00017-X>

PHANTHONG, Patchiya; REUBROYCHAROEN, Prasert; HAO, Xiaogang; XU, Guangwen; ABUDULA, Abuliti; GUAN, Guoqing. Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, vol. 1, no. 1, p. 32–43, 1 Apr. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.CRCON.2018.05.004>.

PINTO, Ana Margarida Cerqueira. Modificação in situ e ex situ da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades. 2013.

PORTELA, Raquel; LEAL, Catarina R.; ALMEIDA, Pedro L.; SOBRAL, Rita G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial biotechnology**, vol. 12, no. 4, p. 586–610, 1 Jul. 2019. DOI 10.1111/1751-7915.13392.

PRICE, Jason; NORDBLAD, Mathias; MARTEL, Hannah H.; CHRABAS, Brent; WANG, Huali; NIELSEN, Per Munk; WOODLEY, John M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 113, no. 8, p. 1719–1728, 1 Aug. 2016. DOI 10.1002/BIT.25936.

RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, Basavaraj S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. **International Journal of Polymer Science**, vol. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/280784>.

RECOUVREUX, Derce de Oliveira Souza. Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos. 2012.

REMONATTO, Daniela; MIOTTI, Rodney H.; MONTI, Rubens; BASSAN, Juliana C.; DE PAULA, Ariela Veloso. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Scopus**, vol. 114, p. 1–20, 1 Mar. 2022. DOI 10.1016/J.PROCBIO.2022.01.004.

RIBEIRO, Bernardo Dias; DE CASTRO, Aline Machado; COELHO, Maria Alice Zarur; FREIRE, Denise Maria Guimarães. Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, vol. 2011, no. 1, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/615803>.

RIGO, Diane; GAYESKI, Luana; TRES, Gabriela Albuquerque; CAMERA, Fernanda DalMaso; ZENI, Jamile; VALDUGA, Eunice; CANSIAN, Rogério Luis; BACKES, Geciane Toniazzi. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, vol. 7, no. 1, p. 9232–9254, 22 Jan. 2021. DOI 10.34117/BJDV7N1-624.

ROMAN, MAREN; WINTER, William T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, 2004. .

ROSS, P; MAYER, r; BENXIMAN, M; M, Benziman. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, vol. 55, no. 1, p. 35–58, Mar. 1991. DOI 10.1128/MR.55.1.35-58.1991.

SAYURI SHIKI, Priscila; NAYANA PERREIRA, Gabriela; CRISTINA DE MENESES, Alessandra; DE OLIVEIRA, Débora; ALBERTO LERIN, Lindomar. Novozym ® 435 and Lipozyme ® RM IM as Biocatalysts for Benzyl Benzoate Synthesis. vol. 12, no. 6, p. 8271–8284, 2022. DOI 10.33263/BRIAC126.82718284.

SHAH, Nasrullah; UL-ISLAM, Mazhar; KHATTAK, Waleed Ahmad; PARK, Joong Kon. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. **Carbohydrate polymers**, vol. 98, no. 2, p. 1585–1598, 2013a. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2013.08.018.

SHAH, Nasrullah; UL-ISLAM, Mazhar; KHATTAK, Waleed Ahmad; PARK, Joong Kon. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. **Carbohydrate polymers**, vol. 98, no. 2, p. 1585–1598, 2013b. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2013.08.018.

SHEKARFOROUSH, Elhamalsadat; JIANG, Xiaoyi; KEDIR MUHAMMED, Musemma; WHITEHEAD, Kathryn A.; ARNEBORG, Nils; RISBO, Jens. Enzymatic modification and adsorption of hydrophobic zein proteins on lactic acid bacteria stabilize Pickering emulsions. **Food Research International**, vol. 161, p. 111783, 1 Nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111783>.

SHELDON, R. A. 9.15 Industrial Applications of Asymmetric Synthesis using Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Comprehensive Chirality**, vol. 9, p. 353–366, 1 Jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00917-4>.

SHI, Shuai; WANG, Xiu Hong; GUO, Gang; FAN, Min; HUANG, Mei Juan; QIAN, Zhi Yong. Preparation and characterization of microporous poly(D,L-lactic acid) film for tissue engineering scaffold. **International journal of nanomedicine**, vol. 5, no. 1, p. 1049–1055, 2010. DOI 10.2147/IJN.S13169. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21179227/>.

SHODA, Makoto; SUGANO, Yasushi. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, vol. 10, no. 1, p. 1–8, 2005. DOI 10.1007/BF02931175/METRICS.

SHU, Chin Hang; XU, Chun Jun; LIN, Gee Chen. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, vol. 41, no. 3, p. 734–738, 1 Mar. 2006. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.09.007>. Accessed on: 16 Feb. 2023.

SHUAI, Cijun; WANG, Zhicheng; ZHANG, Haiyang; JIA, Jiye; HUANG, Liping; WANG, Dong; CHEN, Shijie; FENG, Pei. ARTICLE Biosoluble ceramic fiber reinforced poly(L-lactic acid) bone scaffold: degradation and bioactivity. 2022. DOI 10.1038/s41529-022-00297-3.

SILVA, Taisa Regina Stumpf da. Desenvolvimento De Hidrogéis De Celulose Bacteriana Para Cultura De Células E Permeação De Biomoléculas. 2012.

SILVA, Rafael; HARAGUCHI; SHIRANI, k;Muniz,; EDVANI, C; RUBIRA; ADLEY, F. Aplicações de fibrAs lignocelulósicas nA química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, vol. 32, no. 3, p. 661–671, 2009.

SILVEIRA, Juliana Francine; COSTA, D A. **NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA: DA OBTENÇÃO, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE, À INCORPORAÇÃO COMO REFORÇO EM POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO)**. 2016.

SIMONS, Jan Willem F.A.; VAN KAMPEN, Muriel D.; RIEL, Sabine; GÖTZ, Friedrich; EGMOND, Maarten R.; VERHEIJ, Hubertus M. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-- comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. **European journal of biochemistry**, vol. 253, no. 3, p. 675–683, 1 May 1998. DOI 10.1046/J.1432-1327.1998.2530675.X.

SOSE, Meera T; GAWAS, Sarita D; RATHOD, Virendra K. Enzymatic synthesis of cinnamyl propionate from cinnamyl alcohol and propionic acid in a solvent free condition. 2020. DOI 10.1007/s42452-020-2609-3.

SOUZA, Samara Silva de. Biologia sistêmica da produção de celulose bacteriana através da reconstrução metabólica da *Gluconacetobacter hansenii*. 2014.

SUN, Bianjing; ZHANG, Lei; WEI, Feng; AL-AMMARI, Abdulrahman; XU, Xuran; LI, Wenping; CHEN, Chuntao; LIN, Jianbin; ZHANG, Heng; SUN, Dongping. In situ structural modification of bacterial cellulose by sodium fluoride. **Carbohydrate polymers**, vol. 231, 1 Mar. 2020. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2019.115765.

TAN, Tianwei; LU, Jike; NIE, Kaili; DENG, Li; WANG, Fang. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 28, no. 5, p. 628–634, 2010. DOI 10.1016/j.biotechadv.2010.05.012.

TANG, Weihua; JIA, Shiru; JIA, Yuanyuan; YANG, Hongjiang. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 26, no. 1, p. 125–131, 20 Jan. 2010. DOI 10.1007/S11274-009-0151-Y/FIGURES/7.

TAVARES, LUCIANA LOPES. Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína. 2010.

TORRES, Sandro Junior Vessoni. OBTENÇÃO DE FIBRAS DE BLENDA DE ZEÍNA/PNIPAAm POR ELETROFIAÇÃO EM SOLUÇÃO 2015.

TROVATTI, Eliane; DOS SANTOS, Aline M.; AMARAL, André C.; MENEGUIN, Andreia B.; MATOS, Bruna D.M.; PACHECO, Guilherme; DE CARVALHO, Renata A.; LAZARINI, Silmara C.; CARDOSO, Valéria M.O.; LUSTRI, Wilton R.; BARUD, Hernane S. Biopolímeros: Aplicações farmacêutica e biomédica. **Ecletica Química**, vol. 41, no. 1, p. 1–31, 2016. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v41.1.2016.p01-31>.

TURECK, BIASSANDER CAMILA. EFEITO DO MEIO DE CULTIVO E DO TRATAMENTO DE PURIFICAÇÃO NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS E QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA. 2017.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi; ANDRADE, Fábila Karine; VIEIRA, Lídia de Araújo Pinto; VIEIRA, Rodrigo Silveira; VAZ, Juliana Miguel; CHEVALLIER, Pascale; MANTOVANI, Diego; BORGES, Maria de Fátima; ROSA, Morsyleide de Freitas. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. **Cellulose**, vol. 27, no. 6, p. 3055–3083, 1 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/S10570-020-02966-5>.

WARDHONO, Endarto Y.; KANANI, Nufus; ALFIRANO; RAHMAYETTY. Development of polylactic acid (PLA) bio-composite films reinforced with bacterial cellulose nanocrystals (BCNC) without any surface modification. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1626739>, vol. 41, no. 10, p. 1488–1495, 3 Aug. 2019. DOI 10.1080/01932691.2019.1626739.

XU, Hui; CHAI, Yanwei; ZHANG, Genyi. Synergistic effect of oleic acid and glycerol on zein film plasticization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, no. 40, p. 10075–10081, 10 Oct. 2012. DOI 10.1021/JF302940J/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2012-02940J_0006.GIF.

XU, Jia; ZHANG, Jinhui; GAO, Weiquan; LIANG, Hongwei; WANG, Hongyan; LI, Junfeng. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. **Materials Letters**, vol. 63, no. 8, p. 658–660, 31 Mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2008.12.014>.

XUE, Xiuheng; HE, Haiyong; LIU, Cunjun; HAN, Yanping; HE, Jingrui; ZHOU, Jiajia; GUO, Xinglei; WANG, Juhua; CHENG, Jianbo. Effects of zein modifying polar amino acids as surface stabilizers on the emulsification stability of milk cream diacylglycerol. **LWT**, vol. 165, p. 113676, 1 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113676>.

YANG, Jingxuan; LV, Xiangguo; CHEN, Shiyan; LI, Zhe; FENG, Chao; WANG, Huaping; XU, Yuemin. In situ fabrication of a microporous bacterial cellulose/potato starch composite scaffold with enhanced cell compatibility. **Cellulose**, vol. 21, no. 3, p. 1823–1835, 8 Mar. 2014. DOI 10.1007/S10570-014-0220-8/FIGURES/8.

YAO, Lim Wen; AHMED KHAN, Fahad Saleem; MUBARAK, Nabisab Mujawar; KARRI, Rama Rao; KHALID, Mohammad; WALVEKAR, Rashmi; ABDULLAH, Ezzat Chan; MAZARI, Shaukat Ali; AHMAD, Awais; DEHGHANI, Mohammad Hadi. Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. **Journal of Molecular Liquids**, vol. 354, p. 118849, 15 May 2022. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.118849>.

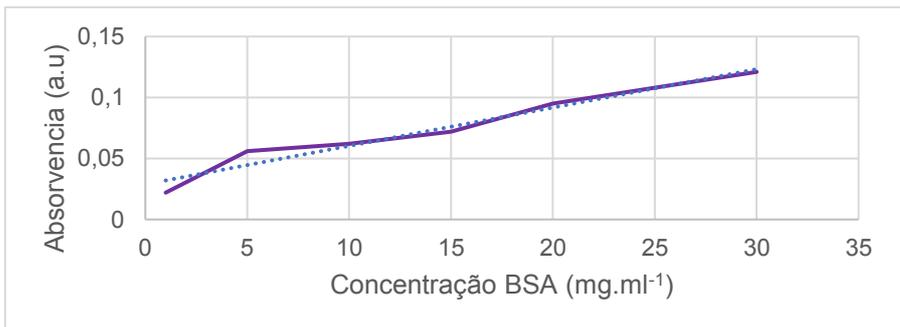
ZHANG, Hao; ZHAO, Yanyan; KANG, Xiaofeng; LI, Hongbo; MO, Haizhen. Effect of sodium trimetaphosphate modification on the structure and rheological properties of zein. **Food Science and Technology**, vol. 42, 2 Sep. 2022. DOI 10.1590/FST.65522.

9 Apêndices

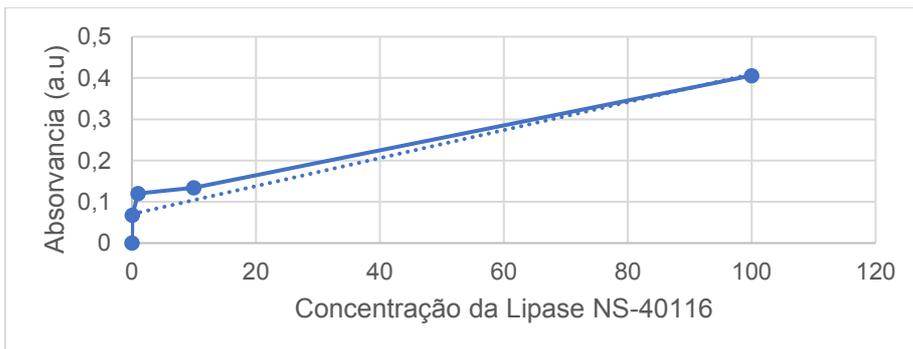
9.1 Determinação do teste de proteína

A curva de calibração foi realizada para testar a eficiência do reagente e ver a relação da concentração da enzima lipase NS-40116 como descrito em CAVALCANTI, 2020. Nas figuras 19 e 20 conseguimos observar a curva de calibração de proteína (BSA) e da enzima respectivamente.

Figura 19- Gráficos das curvas de clabração de protreina BSA(a) e da enzima(b)



R2= 0,96



R2= 0,92

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 30/04/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (x) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Victoria Fonseca Silveira

Orientador: Andrea Lima dos Santos Schneider Coorientador: Therezinha Maria Novais de Oliveira

Data de Defesa: 15/02/2023

Título: Incorporação de Lipase NS-40116 em membrana de celulose bacteriana com modificação de superfície.

Instituição de Defesa: UNIVILLE

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.



Assinatura do autor

 23/2/2023

Local/Data