



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENZIMA-SUPORTE ENVOLVIDAS NA INATIVAÇÃO
DE LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTES OCTIL-VINILSULFONA**

FORTALEZA

2022

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENZIMA-SUPORTE ENVOLVIDAS NA INATIVAÇÃO DE
LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTES OCTIL-VINILSULFONA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues.
Coorientador: Dr. Roberto Fernandez La-Fuente.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S234e Souza, Priscila Maria Paiva.
Estudo das interações enzima-suporte envolvidas na inativação de lipases imobilizadas em suportes octil-
vinilsulfona / Priscila Maria Paiva Souza. – 2023.
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.
Coorientação: Prof. Dr. Roberto Fernandez LaFuente.
1. Octil-VS-agarose. 2. TLL. 3. CALB. 4. Agente de bloqueio. 5. Interações enzima-suporte. I. Título.
CDD 660.6
-

PRISCILA MARIA PAIVA SOUZA

ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENZIMA-SUPORTE ENVOLVIDAS NA INATIVAÇÃO DE
LIPASES IMOBILIZADAS EM SUPORTES OCTIL-VINILSULFONA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em:14/10/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dra. Nathalia Saraiva Rios
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A meus pais, César e Cléa.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais César e Cléa, pela educação, incentivo, dedicação e por serem minha inspiração como pessoas e como profissionais.

Ao Madson, pelo companheirismo e apoio diário, além de todo o cuidado, amor e por tornar minha vida mais leve e feliz.

À Professora Dra. Sueli Rodrigues, pela excelente orientação, paciência e conhecimentos compartilhados desde a iniciação científica até o doutorado, e também pelo incentivo, oportunidades e por sempre buscar o melhor para seus alunos.

À Professora Dra. Luciana, pela pronta colaboração nesse projeto, pelo intermédio com o Roberto durante a seleção da bolsa de doutorado sanduíche e por me receber em seu laboratório de braços abertos sempre que foi necessário.

Ao Professor Dr. Cleiton, pela disponibilidade em participar da banca e pelas considerações muito importantes já feitas para meu trabalho.

À Professora Dra. Nathalia, pela disponibilidade em participar da banca, pelas considerações já feitas para meu trabalho, além de ter me recebido muito bem quando cheguei em Madri e por todo o auxílio que me deu nesse período.

Ao Professor Dr. Tiago, pela disponibilidade em contribuir com meu trabalho e participar da banca.

Ao Professor Dr. Roberto Fernandez La-Fuente, pela coorientação de Doutorado, por todos os ensinamentos, disponibilidade, por ter me recebido gentilmente em seu laboratório e compartilhado seus conhecimentos.

Aos meus colegas de trabalho do Labiotec (Thaty, Betina, Cristiano, Bianca, Thaiz, Elenilson e Ítalo) pelo companheirismo do dia-a-dia, auxílio nos experimentos e momentos de descontração. Agradeço especialmente às grandes amigas que fiz no laboratório Karol, Elaine, Fátima e Brenda, a rotina com vocês se tornou muito mais leve e divertida.

Agradeço mais especialmente ainda à Brenda, por ter sido um verdadeiro apoio pra mim durante os últimos anos de doutorado, pela escuta, por todos os dias que ficou até tarde no laboratório pra me fazer companhia e me ajudar nos experimentos, pelos conselhos e amizade que levarei para sempre comigo.

Aos grandes amigos da Biotecnologia (Janise, Débora, Cadu, Luca, Amanda, Juliany, Guilherme e Ludmilla) e às amigas da vida (Amanda, Beatriz, Viviane, Dayane, Luma e Ívyna) pela amizade que mesmo com a distância se mantém sempre presente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nesse estudo, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foram covalentemente imobilizadas no suporte heterofuncional octil-agarose ativado com divinilsulfona. Os biocatalisadores foram bloqueados usando hexilamina (HA), etilenodiamina (EDA), glicina (GLI) e ácido aspártico (ASP) e tiveram a atividade, estabilidade, especificidade e interações estruturais analisadas. Ambas enzimas mostraram diferenças na estabilidade dos biocatalisadores após a inativação em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 70 °C (TLL) e 80 °C (CALB), tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 e 70 °C (TLL) e 75 °C (CALB) e tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9 e 65 °C (TLL) e 60 °C (CALB), além de variações na especificidade utilizando substratos estruturalmente diferentes como o *p*NPB, triacetina e (*R*)- e (*S*)- metil mandelato. Para os biocatalisadores compostos pela enzima TLL, o bloqueio com glicina apresentou a maior estabilidade em todos os pH avaliados. Analisando a atividade dos biocatalisadores de TLL contra os diferentes substratos, a triacetina foi o substrato que apresentou uma perda de atividade mais rápida entre todos os bloqueios e pH testados. Em pH 7, por exemplo, a atividade residual do biocatalisador bloqueado com ASP se mantém em 75 % da atividade inicial usando (*R*)-metil mandelato como substrato enquanto com triacetina foi somente 5 %. Para os biocatalisadores compostos pela enzima CALB, o bloqueio com GLI se mostrou o mais estável em pH 5 e 7, enquanto a pH 9 o bloqueio com EDA foi o mais estável, mantendo cerca de 25 % da atividade inicial após 10 horas de incubação à 60 °C. Considerando a especificidade aos substratos pelos biocatalisadores CALB, o *p*NPB foi o substrato que manteve maiores atividades em todos os bloqueios e porcentagens de inativação. Pode-se concluir que tais diferenças encontradas foram moduladas pelo protocolo de imobilização e pelas condições de inativação, sendo confirmadas por estudos de fluorescência. Entre os biocatalisadores de TLL, a fluorescência mostrou que, durante o curso de inativação, as distorções estruturais de TLL bloqueada com HA foram mais drásticas (valores I_{\max} baixos e λ_{\max} desviados para o vermelho). Para os biocatalisadores de CALB, a análise do espectro de fluorescência novamente revelou alterações estruturais no bloqueio com HA, o que pode justificar a menor atividade deste biocatalisador com *p*NPB. A análise funcional e estrutural dos biocatalisadores parcialmente inativados mostraram que a via de inativação é dependente das características do suporte e condições de inativação.

Palavras-chave: octil-VS-agarose; TLL; CALB; agente de bloqueio; interações enzima-suporte.

ABSTRACT

In this study, lipases from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and lipase B from *Candida antarctica* (CALB) were covalently immobilized on the heterofunctional support octyl-agarose activated with divinyl sulfone. The biocatalysts were blocked using hexylamine (HA), ethylenediamine (EDA), glycine (GLI), and aspartic acid (ASP) and had their activity, stability, specificity and structural interactions analyzed. Both enzymes showed differences in stability after inactivation in 50 mM sodium acetate buffer pH 5 and 70 °C (TLL) and 80 °C (CALB), 50 mM sodium phosphate buffer pH 7 and 70 °C (TLL) and 75 °C (CALB) and 50 mM sodium carbonate buffer pH 9 and 65 °C (TLL) and 60 °C (CALB), in addition to showing variations in specificity using substrates with distinct structures such as pNPB, triacetin and (*R*)- and (*S*)-methyl mandelate. For the TLL biocatalysts, blocking with glycine showed the highest stability under all pH conditions. Analyzing the activity of TLL biocatalysts against different substrates, triacetin was the substrate that showed the fastest loss activity among all the blocked agents and pH tested. At pH 7, for example, the residual activity of the biocatalyst blocked with ASP remained at 75 % of the initial activity using (*R*)-methyl mandelate as substrate while with triacetin it was only 5 %. For CALB biocatalysts, the one blocked with glycine was the most stable at pH 5 and 7, while at pH 9, the blocking with EDA was the most stable, maintaining about 25 % of the initial activity after 10 hours of incubation at 60 °C. Considering the substrate specificity of CALB biocatalysts, pNPB was the substrate that maintained the highest activities in all blocked preparations and inactivation percentages. It can be concluded that such differences were modulated by the immobilization protocol with different blocking agents and by the inactivation conditions and were confirmed by fluorescence studies. Among the TLL biocatalysts, fluorescence showed that, during the inactivation course, the structural distortions of HA-blocked TLL were more drastic (low I_{\max} and redshifted λ_{\max} values) than with the other biocatalysts. For the CALB biocatalysts, the fluorescence spectrum analysis again revealed structural changes in the blocking with HA, which may explain the lower activity of this biocatalyst using *p*NPB. The functional and structural analysis of the immobilized and partially inactivated enzymes showed that the inactivation pathway depends on the support characteristics and inactivation conditions.

Keywords: octyl-VS-agarose; TLL; CALB; blocking agent; enzyme-support interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Equilíbrio conformacional e ativação interfacial das lipases	21
Figura 2	– Crescimento em números de publicações relacionadas aos termos “immobilization” e “enzyme” na base de dados SCOPUS (busca por título, resumo, palavras chave)	23
Figura 3	– Métodos de imobilização enzimática. (A) Imobilização por ligação ao suporte; (B) imobilização por encapsulamento e (C) imobilização por ligações cruzadas	24
Figura 4	– Estrutura química da molécula de divinilsulfona	28
Figura 5	– Ativação da agarose com divinilsulfona e reação do suporte ativado com proteínas	30
Figura 6	– Estrutura 3D da forma fechada e aberta de TLL	31
Figura 7	– Estrutura química dos nucleófilos usados para o bloqueio dos biocatalisadores	35
Figura 8	– Cursos de inativação dos biocatalisadores OC-VS-TLL-ASP (■), OC-VS-TLL-GLI (●), OC-VS-TLL-EDA (▲) e OC-VS-TLL-HA (◆). Condições de inativação: (A) Tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 74 °C; (B) Tampão Tris HCl 50 mM p H 7,0 e 73 °C; (C) Tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e 71 °C	46
Figura 9	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com ácido aspártico contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos <i>p</i> NPB (■), triacetina (●), (<i>R</i>)-metil mandelato (▲) e (<i>S</i>)-metil mandelato (▼)	51
Figura 10	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com glicina contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos <i>p</i> NPB (■), triacetina (●), (<i>R</i>)-metil mandelato (▲) e (<i>S</i>)-metil mandelato (▼)	52
Figura 11	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com EDA contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C	

	contra os substratos <i>p</i> NPB (■), triacetina (●), (<i>R</i>)-metil mandelato (▲) e (<i>S</i>)-metil mandelato (▼)	53
Figura 12 –	Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com hexilamina contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos <i>p</i> NPB (■), triacetina (●), (<i>R</i>)-metil mandelato (▲) e (<i>S</i>)-metil mandelato (▼)	55
Figura 13 –	Efeito da inativação a pH 5 e 74 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (<i>R</i>)-metil mandelato e (C) (<i>S</i>)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)	56
Figura 14 –	Efeito da inativação a pH 7 e 73 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (<i>R</i>)-metil mandelato e (C) (<i>S</i>)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)	57
Figura 15 –	Efeito da inativação a pH 9 e 71 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (<i>R</i>)-metil mandelato e (C) (<i>S</i>)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)	58
Figura 16 –	Espectro de fluorescência intrínseca de biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes e inativados a pH 5 e 74 °C (A), pH 7 e 73 °C (B) e pH 9 e 71 °C (C)	61
Figura 17 –	Análise de fluorescência dos biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes. (A) Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência. (B) Intensidade de fluorescência em Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) no comprimento de onda máximo (λ_{max}) excitadas a 280 nm	62
Figura 18 –	Fluorescência intrínseca (λ_{max}) dos biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes e inativados a diferentes pH. Foram plotados a intensidade de fluorescência para diferentes biocatalisadores e graus de	

	inativação. A atividade residual é a atividade do biocatalisador após ser incubado a diferentes pH e tempos	63
Figura 19	– Fluorescência intrínseca (I_{\max} a λ_{\max}) dos biocatalisadores de TLL bloqueados plotadas por diferentes graus de inativação dos mesmos. A porcentagem de inativação corresponde a atividade perdida pelos diferentes biocatalisadores ao serem incubados a determinada temperatura e pH	64
Figura 20	– Curso de imobilização de CALB (1 mg/g) em octil (linha tracejada) e octil-VS (linha sólida) a pH 5 e 25 °C. Atividade de referência (■); atividade da suspensão (▲); atividade do sobrenadante (●)	66
Figura 21	– Análise de eletroforese SDS-PAGE das diferentes preparações de CALB. Poço 1: marcador de peso molecular. Poço 2: CALB livre (1 mg/ml). Poço 3: OC-CALB. Poço 4: OC-VS-CALB-Asp. Poço 5: OC-VS-CALB-Gly. Poço 6: OC-VS-CALB-EDA. Poço 7: OC-VS-CALB-HA	68
Figura 22	– Cursos de inativação dos biocatalisadores OC-CALB (□), OC-VS-CALB-ASP (■), OC-VS-CALB-GLI (●), OC-VS-CALB-EDA (▲) e OC-VS-CALB-HA (◆). Condições de inativação: (A) Tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 80 °C; (B) Tampão Tris HCl 50 mM p H 7,0 e 75 °C; (C) Tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e 60 °C. Na inativação foi usado pNPB como substrato	71
Figura 23	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com ácido aspártico contra os substratos pNPB (■), (S)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C	76
Figura 24	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com glicina contra os substratos pNPB (■), (S)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C	77
Figura 25	– Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com EDA contra os substratos pNPB (■), (S)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C	78

Figura 26 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com hexilamina contra os substratos <i>p</i> NPB (■), (<i>S</i>)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C	79
Figura 27 – Espectro de fluorescência intrínseca de biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes	81
Figura 28 – Análise de fluorescência dos biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes. (A) Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência. (B) Intensidade de fluorescência em Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) no comprimento de onda máximo (λ_{\max}) excitadas a 280 nm	82
Figura 29 – Fluorescência intrínseca (λ_{\max}) dos biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes e inativados a diferentes pH. Foram plotados a intensidade de fluorescência para diferentes biocatalisadores e graus de inativação. A atividade residual é a atividade do biocatalisador após ser incubado a diferentes pH e tempos	83
Figura 30 – Fluorescência intrínseca (I_{\max} a λ_{\max}) dos biocatalisadores de CALB bloqueados plotadas por diferentes graus de inativação dos mesmos. A porcentagem de inativação corresponde a atividade perdida pelos diferentes biocatalisadores ao serem incubados a determinada temperatura e pH	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades físico-químicas do composto divinilsulfona	29
Tabela 2	– Atividade enzimática durante a imobilização de TLL (2 mg/g) em octil-VS usando <i>p</i> -NPB como substrato. As condições de imobilização estão descritas na sessão 4.2 de Materiais e Métodos	42
Tabela 3	– Atividade enzimática de TLL medida com <i>p</i> NPB durante a incubação em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 8	43
Tabela 4	– Efeito do agente de bloqueio no biocatalisador OC-VS-TLL. A atividade enzimática foi medida com <i>p</i> NPB durante a incubação com diferentes nucleófilos por 24h a pH 8	44
Tabela 5	– Atividade em U/g de diferentes biocatalisadores TLL imobilizados contra (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- metil mandelato, triacetina e <i>p</i> NPB	45
Tabela 6	– Atividade residual dos diferentes biocatalisadores durante o curso de inativação, a pH 5 e 74 °C, pH 7 e 73 °C e pH 9 e 71 °C, e após 24 h de incubação a pH 7 e 25 °C usando <i>p</i> NPB como substrato	49
Tabela 7	– Atividade enzimática de CALB usando <i>p</i> NPB como substrato durante a incubação em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 8	66
Tabela 8	– Efeito do agente de bloqueio no biocatalisador OC-VS-CALB. A atividade enzimática foi medida com <i>p</i> NPB durante a incubação com diferentes nucleófilos por 24 h a pH 8.....	67
Tabela 9	– Atividade em U/g de diferentes biocatalisadores CALB imobilizados utilizando (<i>S</i>)- metil mandelato, triacetina e <i>p</i> NPB como substrato	69
Tabela 10	– Atividade residual dos diferentes biocatalisadores de CALB durante o curso de inativação, a pH 5 e 80 °C, pH 7 e 75 °C e pH 9 e 60 °C, e após 24 h de incubação a pH 7 e 25 °C usando <i>p</i> NPB como substrato. Médias na mesma linha e mesmo agente de bloqueio que compartilham da mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o Teste de Tukey ($p > 0,05$)	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP	Ácido aspártico
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
DVS	Divinilsulfona
EDA	Etilenodiamina
GLI	Glicina
HA	Hexilamina
I_{\max}	Intensidade de fluorescência no comprimento de onda máximo
OC-VS-CALB	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima CALB imobilizada
OC-VS-CALB-Asp	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima CALB imobilizada e bloqueado com ácido aspártico
OC-VS-CALB-EDA	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima CALB imobilizada e bloqueado com etilenodiamina
OC-VS-CALB-Gli	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima CALB imobilizada e bloqueado com glicina
OC-VS-CALB-HA	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima CALB imobilizada e bloqueado com hexilamina
OC-VS-TLL	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima TLL imobilizada
OC-VS-TLL-Asp	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima TLL imobilizada e bloqueado com ácido aspártico
OC-VS-TLL-EDA	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima TLL imobilizada e bloqueado com etilenodiamina
OC-VS-TLL-Gli	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima TLL imobilizada e bloqueado com glicina
OC-VS-TLL-HA	Octil ativado com divinilsulfona com a enzima TLL imobilizada e bloqueado com hexilamina
<i>p</i> NPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
sn	Numeração estereoespecífica (do inglês “ <i>stereospecific numbering</i> ”)
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
Trp	Triptofano

VS

Grupos vinilsulfona

λ_{\max}

Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Enzimas	20
3.1.1	<i>Lipases</i>	21
3.2	Imobilização de enzimas	23
3.2.1	<i>Suportes para imobilização de enzimas</i>	27
3.2.2	<i>Grupos funcionais</i>	28
3.3	Ativação de suportes com divinilsulfona.....	29
3.4	Imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	31
3.5	Imobilização da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	33
3.6	Bloqueio com nucleófilos	35
3.7	Espectroscopia de fluorescência	36
4	METODOLOGIA	39
4.1	Ativação do suporte Octil-VS	39
4.2	Imobilização enzimática	39
4.3	Determinação da atividade enzimática usando diferentes substratos	40
4.4	Inativações enzimáticas	41
4.5	Análise de fluorescência	41
4.6	Análise estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
	PARTE I: Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	43
5.1	Artigo publicado	43
5.2	Imobilização de TLL em suporte octil-VS	43
5.3	Efeito do bloqueio nos biocatalisadores OC-VS-TLL	44
5.4	Efeito da atividade dos biocatalisadores versus diferentes substratos.....	45
5.5	Inativações térmicas dos biocatalisadores TLL.....	47
5.6	Reativação enzimática usando <i>pNPB</i> como substrato.....	49
5.7	Especificidade enzimática de preparações de TLL inativadas	51

5.8	Espectroscopia de fluorescência dos biocatalisadores TLL	60
	PARTE II: Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	66
5.9	Imobilização de CALB em suportes de octil e octil-VS	66
5.10	Efeito do bloqueio nos biocatalisadores OC-VS-CALB	67
5.11	Análise de SDS-PAGE	68
5.12	Efeito da atividade dos biocatalisadores versus diferentes substratos.....	69
5.13	Inativações térmicas dos biocatalisadores CALB	71
5.14	Reativação enzimática usando <i>p</i> NPB como substrato.....	73
5.15	Especificidade enzimática de preparações de CALB inativadas.....	76
5.16	Espectroscopia de fluorescência dos biocatalisadores CALB	81
	PARTE III: Análise das interações dos biocatalisadores imobilizados de TLL e CALB..	87
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que possuem diversas aplicações na indústria (HERRERA-MÁRQUEZ et al., 2019; ROY CHOUDHURY, 2020; SHAHEDI et al., 2021), principalmente devido às suas características como a alta atividade sob condições brandas de pH e temperatura, alta especificidade e seletividade (REETZ, 2013; SCHMID et al., 2001). Em 2020, o mercado global de enzimas foi estimado em USD 10,68 bilhões, e a projeção de crescimento anual desse mercado é de 6,5 % de 2021 a 2028 (SAMPAIO et al., 2022). Isso pode ser explicado pela maior procura por processos ecologicamente sustentáveis e pelo desenvolvimento de estratégias como a imobilização de enzimas, que pode reduzir os custos da aplicação de enzimas em larga escala por permitir o reuso do catalisador e melhor controle do processo.

As características das enzimas são determinadas pela conformação da sua estrutura tridimensional. Mudanças nessa estrutura podem alterar tais propriedades, como por exemplo mudanças por modificações químicas ou técnicas de Biologia Molecular (KATSIMPOURAS; STEPHANOPOULOS, 2021) e por imobilização de enzimas, que podem ocorrer por imobilização em diferentes suportes (CHAUBEY et al., 2006; FACCHINI et al., 2018; RODRIGUES et al., 2013; TAKAÇ; BAKKAL, 2007) ou por uso de diferentes condições experimentais em um mesmo suporte (ABREU SILVEIRA et al., 2019; ARANA-PEÑA et al., 2020a, 2020b; LOKHA et al., 2020). A inativação de uma enzima promove mudanças na sua conformação, e essa nova estrutura pode apresentar atividade catalítica, seletividade e especificidades distintas (RODRIGUES et al., 2013).

As lipases fazem parte do grupo de enzimas mais usadas em processos biotecnológicos e são enzimas bastante versáteis (ABREU SILVEIRA et al., 2019; PALOMO, 2009; RODRIGUES et al., 2009). Nesse trabalho, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase do tipo B de *Candida antarctica* foram imobilizadas por ativação interfacial em superfície hidrofóbica, garantindo a imobilização na sua forma monomérica e com estrutura aberta (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019). Foi utilizado o suporte heterofuncional octil agarose-vinilsulfona no qual permite a ligação covalente após a primeira etapa de adsorção (ALBUQUERQUE et al., 2016; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017a). A matriz de agarose foi escolhida por se tratar de um suporte inerte, que pode facilmente ser funcionalizado, além de ser transparente e permitir a análise das moléculas de enzima por espectroscopia de UV-Vis e fluorescência (LOKHA et al., 2020; ZAAK et al., 2017b; ZUCCA; FERNANDEZ-

LAFUENTE; SANJUST, 2016). Os grupos octil permitem a imobilização via ativação interfacial e os grupos vinilsulfona possuem um duplo objetivo: prevenir a perda da enzima sob condições extremas por causa da ligação covalente formada, o que descarta a perda como causa da inativação, e o bloqueio dos grupos vinilsulfona remanescentes com diferentes agentes de bloqueio permitem alterar as interações enzima-suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015d, 2015e). O bloqueio final dos biocatalisadores com diferentes agentes permite alterar a estabilidade, atividade e especificidade da enzima (DOS SANTOS et al., 2015a; ZAAK et al., 2017b).

As lipases possuem uma ampla especificidade, permitindo acompanhar sua inativação utilizando diferentes substratos. Neste trabalho foram empregados como substrato o metil mandelato (isômeros (*R*) – e (*S*) –, dessa forma, também podem ser detectadas alterações da enantioespecificidade), o *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB), e a triacetina que é o mais semelhante aos substratos naturais das lipases (triglicerídeos).

Assim, pode-se formular a hipótese de que essas diferentes interações enzima-suporte também podem alterar a via de inativação da lipase, produzindo diferentes estruturas enzimáticas parcialmente inativadas com diferentes propriedades funcionais. Esta informação pode ser relevante para entender a inativação de enzimas imobilizadas. Nesse caso, temos orientação enzimática idêntica, o número exato de ligações covalentes, e a única diferença são as propriedades físicas da superfície do suporte obtidas após a etapa de bloqueio.

Portanto, o objetivo desse trabalho é o estudo das mudanças conformacionais sob diferentes condições de inativação (tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 70 °C (TLL) e 80 °C (CALB), tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 e 70 °C (TLL) e 75 °C (CALB) e tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9 e 65 °C (TLL) e 60 °C (CALB)) de lipases imobilizadas em suporte octil-agarose ativado com divinilsulfona e bloqueado com diferentes agentes nucleófilos. Tais mudanças serão analisadas com o uso de diferentes substratos, no qual pode-se avaliar as mudanças na especificidade enzimática, e pelo estudo de fluorescência, para analisar se, juntamente com as alterações funcionais, diferentes alterações estruturais podem ser encontradas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os biocatalisadores imobilizados e parcialmente inativados da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e analisar se as interações produzidas entre enzima e suporte podem alterar a via de inativação das lipases pela produção de estruturas enzimáticas distintas e, como consequência, alterar as propriedades funcionais dessas enzimas.

2.2 Objetivos específicos

- Imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) covalentemente em octil-agarose ativada com divinilsulfona;
- Bloquear os grupos vinilsulfona remanescentes do suporte com 4 agentes nucleófilos diferentes: ácido aspártico, glicina, etilenodiamina e hexilamina;
- Avaliar a estabilidade térmica dos diferentes derivados produzidos em pH 5, 7 e 9;
- Avaliar a atividade enzimática dos diferentes biocatalisadores parcialmente inativados contra os substratos *p*NPB, triacetina, (*S*) – metil mandelato e (*R*) – metil mandelato;
- Analisar a estrutura, dinâmica e interações dos biocatalisadores bloqueados e parcialmente inativados por espectroscopia de fluorescência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos eficientes e responsáveis por acelerar diversos processos químicos e biológicos. Elas se destacam por sua alta especificidade e atuação sob condições de temperatura e pH amenas, minimizando problemas de reações indesejadas. O mercado de enzimas industriais pode ser segmentado em setor têxtil, alimentício, ambiental, farmacêutico, entre outros (HERRERA-MÁRQUEZ et al., 2019; NAGHDI et al., 2018; PATEL, 2018; XIAOKANG; HAITAO; JIANYONG, 2019). A alta seletividade das enzimas colabora para que as reações sejam eficientes e gerem poucos subprodutos, o que é uma alternativa ecologicamente melhor aos catalisadores químicos convencionais (SCHMID et al., 2001). Além disso, processos mediados por enzimas podem ser mais econômicos no uso de matérias-primas, consumo de água e energia, geram menos resíduos e muitas vezes são mais eficientes em termos energéticos (SHELDON, R. A.; VAN PELT, 2013).

Em meio a grande variedade de enzimas já descobertas e suas diferentes funções, a classificação numérica de enzimas foi instituída pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, chamado de número E.C. (*Enzyme Commission*), ele é composto por quatro números sendo classificadas conforme a reação em que é catalisada. Atualmente, existem sete classes de enzimas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases (MCDONALD; TIPTON, 2021; NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2018).

As hidrolases fazem parte da classe de enzimas mais usada em biotransformações devido a sua ampla especificidade a diferentes substratos, boa acessibilidade comercial, não dependência de cofatores e capacidade de catalisar reações em altas concentrações de substrato (RODRIGUES et al., 2019). As reações de clivagem hidrolítica podem ter diferentes funções biológicas, como digestão, desativação, degradação ambiental e desintoxicação. Embora a função natural das hidrolases seja a clivagem de ligações catalíticas pela reação com a água para quebrar moléculas em estruturas menores, outras reações, como condensações, também podem ser catalisadas (WOHLGEMUTH, 2010).

As hidrolases são classificadas com número E.C 3 do sistema de classificação das enzimas, subdivididas em 12 subclasses conforme o tipo de ligação hidrolisada. A sua grande disponibilidade justifica o amplo uso dessa classe de enzimas na indústria. Elas possuem

robustez e escalabilidade, podendo ser aplicadas em diversas funções (WOHLGEMUTH, 2010). Como exemplo dessa classe estão as amilases, proteases, celulasas e lipases, sendo estas as mais utilizadas em síntese orgânica (LIMA et al., 2019).

3.1.1 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol, acilgliceróis e ácidos graxos livres. Estudando a modificação física e química dos alimentos no intestino dos mamíferos. Claude Bernard observou em 1856 a hidrólise de gotas de óleos insolúveis, convertendo-as em produtos solúveis. Ele então atribuiu essa reação a uma enzima que foi posteriormente chamada de lipase pancreática (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Seu uso é amplamente descrito tanto em escala laboratorial quanto na indústria, por possuir características como enantioselectividade, alta estabilidade na presença de solventes orgânicos, e especificidade sob uma grande variedade de substratos (CAVALCANTE et al., 2020; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SARMAH et al., 2018).

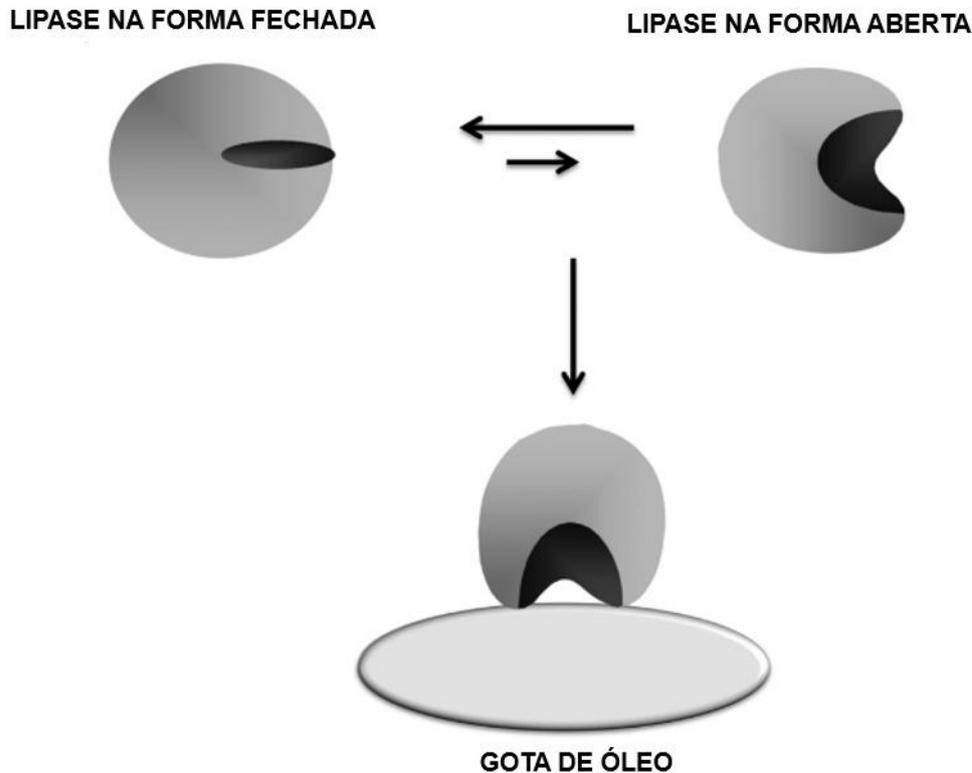
A estrutura tridimensional das lipases tem sido elucidada por técnicas cristalográficas de difração de raios-X, revelando que todas as lipases exibem um padrão de dobramento característico, chamado de dobra α/β -hidrolase (STAUCH et al., 2015; UPPENBERG et al., 1994). O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica de serina, aspartato/glutamato e histidina (DAVID et al., 1992).

Algumas lipases possuem o sítio ativo coberto por uma cadeia polipeptídica no formato de “tampa”, que permite isolar o sítio ativo do meio de reação. Essa “tampa” é bastante flexível e pode ser deslocada permitindo a exposição do sítio ativo, configurando a conformação aberta (ativa) e fechada (inativa), sendo a forma aberta ativada na presença de superfícies hidrofóbicas. Esse mecanismo, chamado de ativação interfacial (Figura 1), permite que as lipases sejam adsorvidas em sua forma aberta nessas superfícies e atuem na sua interface (LIU, J.; MA; SHI, 2020; MANOEL *et al.*, 2015; SCHMID, R. D; VERGER, 1998). Tais superfícies hidrofóbicas podem ser óleos (ARANA-PEÑA et al., 2020b), proteínas hidrofóbicas (PALOMO, J. M *et al.*, 2003), outra lipase na sua forma aberta (PALOMO, J. M. *et al.*, 2005) ou um suporte hidrofóbico (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

A “tampa” que isola o sítio ativo das lipases pode variar de tamanho entre as diferentes lipases conhecidas. Em alguns casos, ela é tão pequena que não isola completamente o sítio ativo do meio de reação em sua forma fechada, como no caso da lipase do tipo B de

Candida antarctica (UPPENBERG et al., 1994), enquanto a lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* possui uma estrutura de “tampa” dupla (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

Figura 1 - Equilíbrio conformacional e ativação interfacial das lipases



Fonte: Ortiz *et al.* (2019).

A heterogeneidade de seus substratos naturais (POPPE et al., 2015, 2018; RODRIGUES; AYUB, 2011) transformou as lipases em enzimas de ampla especificidade, aceitando substratos muito diferentes dos glicerídeos. Assim, além das reações de hidrólise (PRECZESKI et al., 2018), as lipases são usadas em esterificação (RIOS, N. S. *et al.*, 2018), transesterificação (BAYRAMOGLU et al., 2015), aminólise (LIMA; PORTO, 2017), acidólise (CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018; PALLA; CARRÍN, 2014), entre outras, como as chamadas reações promíscuas (GUEZANE-LAKOUD; TOFFANO; ARIBI-ZOUIOUCHE, 2017). Essas reações podem ser aplicadas na produção de biodiesel (BINHAYEEDING et al., 2020), medicamentos (YUAN et al., 2020), alimentos (GERITS; PAREYT; DELCOUR, 2014), detergentes (PHUKON et al., 2020) ou tratamento de efluentes (PATEL et al., 2020).

As lipases podem ser produzidas por animais, plantas, insetos e micro-organismos, sendo estes as fontes mais usadas devido ao potencial industrial, disponibilidade, fácil manuseio e possibilidade de aumento de escala (SARMAH et al., 2018; ZHENG, 2018). Lipases de

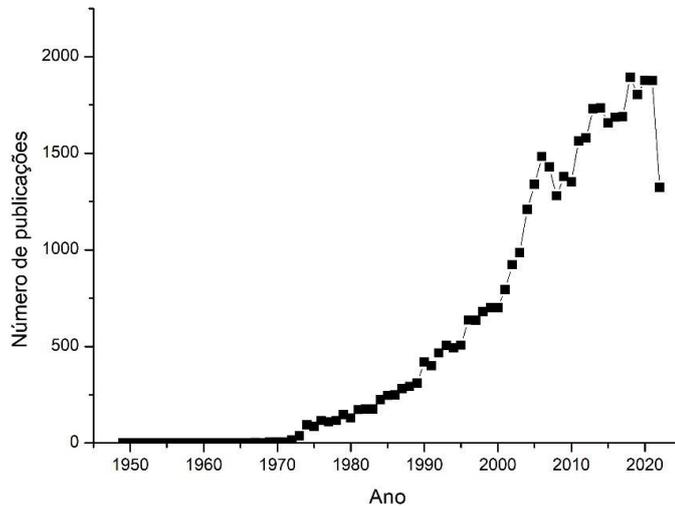
diferentes fontes podem apresentar diferentes especificidades quanto ao substrato, o que é chamado de regioespecificidade. Elas são classificadas em dois grupos: sn-1,3-específicas, que hidrolisam as ligações éster nas posições sn-1 e sn-3 do glicerol, e as não específicas ou aleatórias, que agem em todas as três posições (TONGBORIBOON; CHEIRSILP; H-KITTIKUN, 2010).

3.2 Imobilização de enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que evoluíram para conseguirem responder às mudanças do meio e condições de estresse. Assim, elas podem ser inibidas por diversos componentes, sua estabilidade é moderada mesmo em condições fisiológicas e suas excelentes propriedades são exibidas apenas em reações e substratos fisiológicos (SCHOEMAKER; MINK; WUBBOLTS, 2003). Essas propriedades, apesar de fisiologicamente necessárias, são um problema se forem usadas como biocatalisadores industriais, onde se espera que desempenhem sua função em condições padronizadas (ORTIZ et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Além disso, existem algumas limitações que dificultam o uso na sua forma original em larga escala, como, por exemplo, o alto custo, a baixa estabilidade operacional e recuperação e reuso insuficientes (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Diante dessas limitações, técnicas como a imobilização (MATEO, C. *et al.*, 2007, 2010), metagenômica (FERNÁNDEZ-ARROJO et al., 2010; FERRER et al., 2016) e engenharia de proteínas (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ; BERNAL; MARTÍNEZ, 2021) podem ser usadas como alternativas para explorar melhor o potencial das enzimas.

Uma busca realizada no banco de dados SCOPUS dos termos “immobilization” e “enzyme” em títulos, resumos e palavras-chave resultaram em aproximadamente 41 745 documentos publicados até o ano de 2022, revelando um número anual crescente de publicações relacionadas à imobilização enzimática a partir da década de 1970 (Figura 2). Esse aumento mostra que essa técnica se destacou nos últimos anos e segue se desenvolvendo com a contribuição de novas publicações. Por exemplo, no ano de 2021 foram publicados 1 876 documentos associados aos termos imobilização e enzimas.

Figura 2 - Crescimento em números de publicações relacionadas aos termos “*immobilization*” e “*enzyme*” na base de dados SCOPUS (busca por título, resumo, palavras-chave)

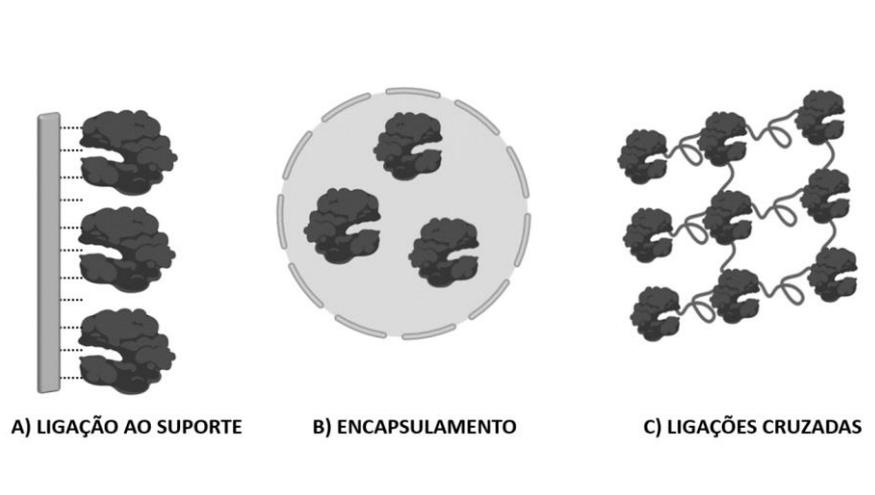


Fonte: SCOPUS (2022).

A imobilização se destaca pela simplicidade e diversidade de métodos que se adequam a uma grande variedade de enzimas, conseguindo melhorar a estabilidade, atividade, especificidade e resistência a inibidores (MATEO, C. *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013). Além disso, possui a vantagem de permitir a separação do biocatalisador do meio de reação e recuperação dos produtos, reduzindo o custo operacional total.

As estratégias de imobilização mais utilizadas atualmente podem ser categorizadas em três tipos, como descrito a seguir e demonstrado na FIGURA 3.

Figura 3 - Métodos de imobilização enzimática. (A) Imobilização por ligação ao suporte, (B) imobilização por encapsulamento e (C) imobilização por ligações cruzadas



Fonte: elaborada pela autora (2022).

- Imobilização por ligação ao suporte (FIGURA 3A):

A ligação física, que pode ser por interações hidrofóbicas ou força de van der Waals, é mais fraca, sendo menos estável sob condições adversas. A imobilização por adsorção iônica é um método mais efetivo se comparado à adsorção física, e se dá por atrações eletrostáticas entre as cargas opostas do suporte e da enzima. As ligações covalentes podem ser consideradas as mais interessantes do ponto de vista industrial, pois são as que fornecem uma maior estabilidade da ligação. Esse método pode ser usado para manipular a orientação correta de uma enzima por meio das interações do suporte com determinados resíduos de aminoácidos, permitindo que a enzima se ligue de forma controlada (FU; REINHOLD; WOODBURY, 2011; SHELDON, R. A.; VAN PELT, 2013; WAHAB *et al.*, 2020).

- Imobilização por encapsulamento (FIGURA 3B):

A imobilização por encapsulamento corresponde ao aprisionamento físico de enzimas livres ou ligadas, física ou covalentemente, em uma matriz polimérica ou membrana que permita a passagem de substratos e produtos. Nesse método, a estrutura da enzima não é afetada e pode reduzir a desnaturação por agentes externos, como as proteases, entretanto, pode haver limitações na transferência de massa e perda da enzima (HOMAEI *et al.*, 2013; SHELDON, R. A.; VAN PELT, 2013; THOMPSON *et al.*, 2019).

- Imobilização por ligações cruzadas (FIGURA 3C):

As ligações cruzadas entre moléculas de enzimas, também chamadas de reticulação, surgiram como alternativa às estratégias de imobilização em suportes sólidos. Entre as vantagens dessa estratégia estão o seu baixo custo e também por resultar em um biocatalisador de atividade enzimática bastante concentrada, já que em outros métodos ocorrem a diluição da atividade enzimática resultante da adição de uma grande proporção de massa não-catalítica (suporte) (SHELDON, R. A., 2007; SHELDON, R. A.; VAN PELT, 2013).

Existem dois tipos principais de uso de ligações cruzadas, em uma é feita a cristalização da enzima (CLECs) e na outra ocorre a formação de agregados enzimáticos (CLEAs), ambas formam uma estrutura enzimática insolúvel enquanto mantém sua estrutura terciária e, deste modo, sua atividade catalítica (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Uma desvantagem dos CLECs é a necessidade da cristalização da enzima, que é um processo laborioso e necessita de enzimas com alta pureza.

As enzimas reticuladas são preparadas por etapas de agregação e precipitação, seguidas do uso de um agente bifuncional que vai promover a reticulação, comumente se utiliza o glutaraldeído. A reticulação ocorre pela reação dos grupos amino livres dos resíduos de lisina da superfície das moléculas de enzimas com os oligômeros ou polímeros de glutaraldeído resultantes da condensação aldólica inter e intramolecular (NGUYEN et al., 2019; SHELDON, 2011).

Cada estratégia de imobilização possui vantagens e desvantagens, é necessário o estudo para adequação dos métodos às enzimas e suportes utilizados no processo. A imobilização vai causar alterações físicas que afetarão a atividade e estabilidade enzimática, portanto, problemas como distorções, limitações difusionais e o bloqueio físico do sítio ativo podem ser comuns.

Para ocorrer a catálise de uma enzima imobilizada, os substratos devem se difundir através de uma solução para o sítio ativo da enzima e os produtos liberados também devem se difundir para a solução. Nesse processo, por exemplo, podem ocorrer problemas dentro dos poros de um suporte que recebe uma menor concentração de substratos do que as enzimas localizadas na superfície. Em outros casos, as limitações difusionais podem ser vantajosas na ocorrência de inibição por substrato, pois menores concentrações de substrato dentro dos poros

promove uma maior atividade enzimática se comparada a altas concentrações dele (RODRIGUES et al., 2013; WAHAB et al., 2020).

A imobilização de enzimas também fornece uma alternativa para diminuir problemas de inibição devido à alta concentração de substrato ou formação de produtos inibidores na reação. Isso pode ser alcançado quando a ligação com o suporte bloqueia o sítio de inibição da enzima, evitando a ligação do inibidor, ou em casos que o inibidor necessita induzir alguma mudança conformacional na enzima, nessa situação, a imobilização covalente multipontual pode fornecer maior resistência a este efeito inibitório (GARCIA-GALAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

A estabilização operacional é uma característica fundamental para a aplicação de um biocatalisador imobilizado em larga escala. Portanto, a utilização de protocolos que visem a prevenção de dissociação de subunidades, agregação, autólise ou proteólise são muito importantes (WAHAB et al., 2020). As ligações covalentes multipontuais são ligações fortes que permitem aumentar a rigidez da estrutura formada entre enzima e suporte, reduzindo a flexibilidade da conformação e modificações estruturais causadas por fatores externos (RODRIGUES et al., 2013). As ligações covalentes multipontuais são comumente empregadas em protocolos de imobilização de enzimas multiméricas (formadas por diferentes subunidades), pois elas atuam prevenindo a dissociação de uma ou mais subunidades após a imobilização, o que pode causar a inativação completa da enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011; WAHAB et al., 2020).

3.2.1 Suportes para imobilização de enzimas

Os suportes desenvolvidos para imobilização enzimática devem possuir características e funcionalidades que permitam a interação com as enzimas. Destacam-se a não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de reutilização e a disponibilidade de sítios ativos que permitam a funcionalização de grupos reativos (BILAL; IQBAL, 2019).

Existem outros fatores que influenciam na escolha do suporte, como: o custo da matriz e reagentes para a funcionalização, o uso de suportes e reagentes inofensivos para a saúde e meio ambiente e as suas propriedades mecânicas devem ser compatíveis com as aplicações. Além disso, a área superficial, porosidade e tamanho da partícula também devem

ser consideradas para a seleção da matriz (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Uma grande variedade de matrizes tem sido usada para a imobilização enzimática, elas podem ser compostas de polímeros sintéticos orgânicos, como as matrizes Sepabeads (TORRES; BATISTA-VIERA, 2012) e Eupergit C (KNEZEVIC et al., 2006); biopolímeros como a quitosana (PINHEIRO et al., 2019), alginato (DE OLIVEIRA et al., 2018) e agarose (RIOS, N. S. *et al.*, 2019); ou polímeros inorgânicos como a sílica (ARCA-RAMOS et al., 2016) e nanopartículas magnéticas (SINGH et al., 2016).

O uso de matrizes à base de agarose tem se mostrado eficiente para imobilização de enzimas, pois podem ser facilmente manipuladas e ativadas, além de poderem ser analisadas por métodos espectrofotométricos (ARANA-PEÑA et al., 2019; GUISÁN, 1988; LOKHA et al., 2020). A agarose é um biopolímero extraído de algas marinhas que possui caráter hidrofílico, grânulos porosos, resistência mecânica e é inerte química e fisicamente (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Os grupos hidroxilas presentes na sua estrutura podem ser funcionalizados quimicamente por agentes bifuncionais como a epiclorigrina (DA SILVA et al., 2019), divinilsulfona (DOS SANTOS et al., 2015a) ou glutaraldeído (SATAR; ANSARI, 2017). Ela pode ser comercializada no formato de microesferas com diâmetros e tamanhos de poros variados, sendo a Sepharose® um dos produtos mais conhecidos.

3.2.2 Grupos funcionais

Para otimizar a estabilização de um biocatalisador imobilizado é importante o uso de protocolos de ativação que forneçam uma alta densidade superficial de grupos reativos. Os suportes heterofuncionais são materiais que possuem pelo menos dois grupos funcionais com diferentes funções em sua superfície. Eles podem produzir uma primeira imobilização, geralmente por adsorção, enquanto o outro grupo é responsável por promover a ligação covalente, permitindo o controle da imobilização e a possibilidade de formar ligações covalentes multipontuais (BARBOSA et al., 2013; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018).

Os grupos funcionais do suporte que vão se ligar à enzima são chamados de braços espaçadores. Eles podem ser longos, evitando que o suporte seja um obstáculo estérico para a reação, ou podem ser curtos, fornecendo maior rigidez para a ligação e, conseqüentemente,

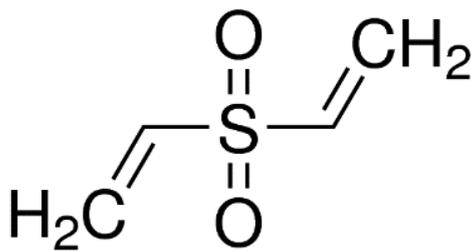
maior estabilidade (GARCIA-GALAN et al., 2011). Entre os grupos funcionais mais usados na ativação de suportes sólidos estão os grupos glioxil (ARANA-PEÑA et al., 2019), epóxido (DA SILVA et al., 2019), aldeídos (SATAR; ANSARI, 2017), glutâmico (RUEDA et al., 2016) e divinilsulfona (DOS SANTOS et al., 2015a).

3.3 Ativação de suportes com divinilsulfona

A divinilsulfona é uma molécula que pode ser utilizada para a ativação de matrizes contendo grupos hidroxila. Originalmente, ela foi aplicada na reticulação do gel de agarose para obter carreadores cromatográficos mais rígidos (PORATH; LS; JANSON, 1975). Suportes ativados com divinilsulfona (DVS) são adequados para a estabilização de enzimas por formar ligações covalentes multipontuais intensas, além de não necessitar de uma etapa de redução. Eles podem ser usados para imobilização em um amplo intervalo de pH (5 – 10), diferente do suporte octil-glioxil que requer pH alcalino para a imobilização, permitindo a ligação da enzima com diferentes orientações (DOS SANTOS et al., 2015a).

A divinilsulfona é composta por dois grupos vinil ($R-CH = CH_2$) e um grupo sulfona ($R-S(=O)(=O)-R'$), ao se ligar a um suporte um dos grupos vinil é desfeito, sendo chamado de grupo vinilsulfona. A estrutura química da divinilsulfona está demonstrada na FIGURA 4 e suas propriedades físico-químicas na TABELA 1.

Figura 4 - Estrutura química da molécula de divinilsulfona



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do composto divinilsulfona

Propriedades Físico-Químicas	
Nome (IUPAC)	1-ethenylsulfonylethene
Classe química	Compostos sulfurosos
Fórmula molecular	C ₄ H ₆ O ₂ S
Peso molecular	118.15
Cor	Incolor
Forma	Líquida
Ponto de ebulição	234.5 °C
Ponto de fusão	- 26.0 °C
Ponto de fulgor	217 °F
Densidade	1.18 g/cm ³ a 20 °C
Pressão de vapor	0.78 [mmHg]

Fonte: PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 6496, DIVINYL SULFONE (2022).

Alguns suportes homo e heterofuncionais têm sido ativados com grupos vinilsulfona para imobilização enzimática, como, por exemplo, a agarose, octil-agarose, SBA-15 funcionalizado com grupos amino, nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ revestidas com ácido oleico, entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015b; MEDINA-CASTILLO et al., 2012; RIOS et al., 2016).

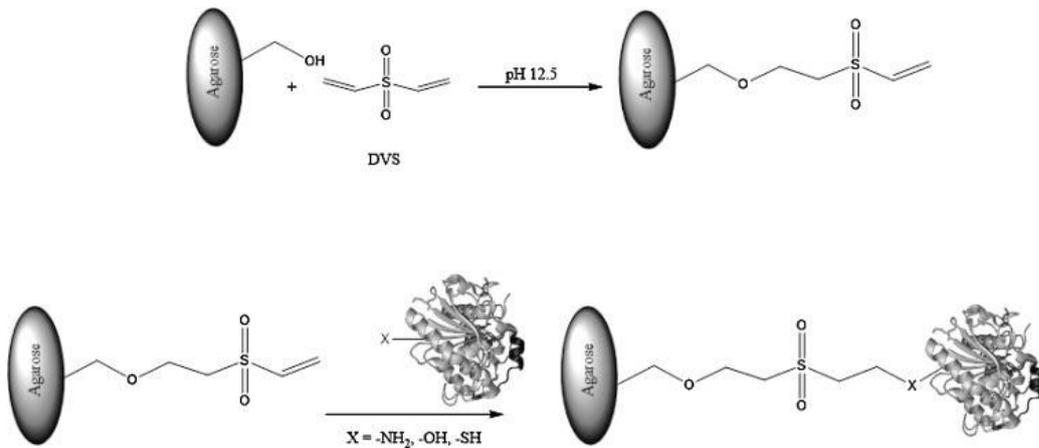
Com a ativação usando DVS, foram obtidos melhores resultados que os encontrados com o suporte glioxil, que já foi descrito como o mais adequado para essa estratégia (MATEO, C. *et al.*, 2006). Os grupos vinilsulfona podem reagir com aminas primárias e secundárias, hidroxilas, imidazol ou grupos tiol (ILAN; MORTON; CHANG, 1993; ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010) sendo estáveis em um amplo intervalo de pH (de 4 a 10) (DOS SANTOS et al., 2015a).

De acordo com o pH escolhido para a imobilização, os grupos vinilsulfona apresentam reatividades distintas com os aminoácidos cisteína, lisina, histidina e tirosina, desse modo, é possível imobilizar a enzima sob diferentes orientações alterando os parâmetros de imobilização. Além disso, incubação em pH alcalino após a imobilização permite o aumento do número de ligações entre a enzima e o suporte ativado com divinilsulfona, aumentando a rigidez da ligação e evitando mudanças na estrutura da enzima (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015b).

O suporte ativado com divinilsulfona é caracterizado por ter braços espaçadores relativamente longos, como pode ser observado na FIGURA 5, reduzindo possíveis obstáculos estéricos, entretanto, pode diminuir a rigidez da ligação covalente multipontual, obtendo uma menor estabilização enzimática se comparado aos suportes ativados com grupos glioxil (DOS

SANTOS et al., 2015b, 2015c). Apesar disso, suportes ativado com divinilsulfona foram empregados para a imobilização de diversas enzimas como lipases de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica B*, quimotripsina e β -galactosidase (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a; PINHEIRO et al., 2019; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018).

Figura 5 - Ativação da agarose com divinilsulfona e reação do suporte ativado com proteínas

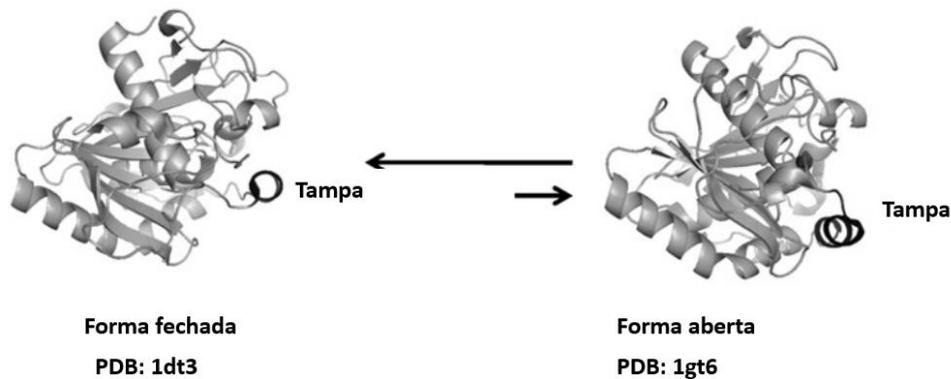


Fonte: Dos Santos; Rueda; Barbosa; Millán-linares *et al.* (2015).

3.4 Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus é um fungo filamentosso termófilo responsável pela produção de muitas enzimas de interesse comercial, como as lipases. A lipase de *T. lanuginosus* (TLL) contém 269 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 31,7 kDa e ponto isoeletrico 4,4 (JHA et al., 1999). Ela possui forma esférica de dimensões de 35Å × 45Å × 50 Å, com sítio ativo composto pela típica tríade catalítica Ser-His-Asp e uma tampa que cobre o sítio ativo em formato de alça móvel, correspondendo aos aminoácidos de posição 86 – 93 (DEREWENDA et al., 1994). A tampa possui resíduos hidrofóbicos na face interna que interagem com as regiões hidrofóbicas ao redor do sítio ativo, mantendo a enzima na conformação fechada e inativa. Enquanto na presença de superfícies hidrofóbicas a tampa é aberta conduzindo a enzima a sua forma ativa, pois o sítio ativo está acessível aos substratos (JACOB; SUTHINDHIRAN, 2020; MATEO, C. *et al.*, 2007; ŠIBALIĆ *et al.*, 2020). Este mecanismo, chamado de ativação interfacial, está demonstrado na TLL na FIGURA 6.

Figura 6 - Estrutura 3D da forma fechada e aberta de TLL



Fonte: Protein Data Bank (PDB) obtido no Pymol vs. 0.99 Fernandez-lafuente (2010).

A TLL na sua forma livre apresenta alta estabilidade entre 55 e 60 °C e máxima atividade próximo de pH 9. A alta atividade e estabilidade da TLL permitem a sua aplicação em diversos meios de reação (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MONTEIRO et al., 2021; SHAHEDI et al., 2021). Preparações de TLL são comercializadas pela Novozymes como a Lipolase®, obtida a partir de TLL recombinante expressa em *Aspergillus oryzae*, além de também ser vendida na forma imobilizada em sílica por adsorção iônica, com o nome de Lipozyme TL IM® (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; PENG et al., 2002). Apesar de ser uma enzima bastante estável, métodos de ativação de TLL podem promover melhor atividade catalítica e estabilidade, como, por exemplo, a imobilização pode mantê-la na sua conformação aberta constantemente (BASTIDA et al., 1998).

A estabilização de uma enzima pode ser alcançada por meio da imobilização covalente multipontual. Essa ligação intensa entre enzima e suporte, que ocorre em valores de pH acima de 10, é resultado de uma orientação da superfície do suporte na região que contém maior densidade de grupos lisina da enzima (MATEO, C. et al., 2010). Como a TLL possui apenas 7 resíduos de lisina (DEREWENDA et al., 1994), a imobilização covalente se torna mais lenta. A aminação química é uma alternativa para a obtenção desse tipo de ligação covalente, além de permitir a imobilização em valores de pH abaixo de 10. A imobilização de TLL aminada melhorou a estabilização em até 5 vezes se comparada a enzima não modificada e obteve atividade recuperada de aproximadamente 70 % (RODRIGUES et al., 2009).

Estudos de imobilização da TLL demonstraram que as propriedades da enzima podem ser moduladas pelas condições de imobilização em octil-agarose, alterando a estabilidade, atividade e especificidade (LOKHA et al., 2020). Similarmente, também foi demonstrado que a depender do pH de imobilização em resinas hidrofóbicas, a

regiosseletividade da enzima pode ser distinta. De tal modo que foram obtidas preparações de TLL capazes de hidrolisar a posição 2 dos triglicerídeos (ABREU SILVEIRA et al., 2017), apesar de a TLL ser reconhecida como uma lipase específica da posição 1,3 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A TLL imobilizada tem sido aplicada em processos de produção de biodiesel. Dizge e colaboradores (2009) imobilizaram a TLL covalentemente em uma matriz polimérica microporosa contendo grupos aldeídos, obtendo eficiências de imobilização acima de 80 % e manutenção da atividade enzimática por até 10 ciclos. Também foram desenvolvidos CLEAs de TLL combinados com nanopartículas magnéticas, o que permitiu combinar características como alta especificidade, estabilidade e fácil recuperação da enzima resultando em um catalisador promissor para a produção de biodiesel (ZHANG et al., 2015). A Lipozyme-TL IM também conseguiu catalisar a transesterificação de óleo de cozinha residual para a produção de biodiesel, retendo 36 % da atividade inicial a 45 °C e 1 % a 55 °C após o sétimo ciclo (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007).

3.5 Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

A levedura *Candida antarctica* foi inicialmente isolada de sedimentos coletados do fundo do lago hipersalino e coberto de gelo chamado Vanda, localizado na Antártida (NIELSEN; ISHII; KIRK, 1999). Duas α/β hidrolases desta levedura, denominadas lipase A (CALA) e lipase B (CALB) foram caracterizadas, purificadas, clonadas e superexpressas em *Aspergillus oryzae* (HØEGH et al., 1995). CALA e CALB estão entre as lipases mais usadas em biocatálise. CALA é uma enzima muito interessante, por possuir alta estabilidade térmica e por atuar na hidrólise das ligações éster na posição sn-2 dos triglicerídeos. Entretanto, a CALB tem se mostrado uma enzima com mais vantagens devido à melhor atividade dessa enzima em comparação com a CALA contra os substratos mandelato de metila ou triacetina (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019).

A CALB é uma enzima globular composta por 317 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 33 kDa, ponto isoelétrico 6 e seu sítio ativo é constituído pela tríade catalítica Serina 105/Histidina 224/Aspartato 187 (UPPENBERG et al., 1994). Aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, glicina e alanina contribuem com 40,1 % da sequência proteica, enquanto serina e treonina contribuem com 18,3 % do total de aminoácidos. Os demais aminoácidos consistem em 15,8 % de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina;

9,46 % para prolina; 7,6 % para triptofano, tirosina e fenilalanina; 5,6 % para arginina, lisina e histidina; e finalmente os últimos 3,15 % correspondem a cisteína e metionina (UPPENBERG et al., 1994).

O pH ótimo da CALB para a catálise é 7, embora seja estável em meio aquoso em um intervalo de pH 3,5 a 9,5. A temperatura de desnaturação varia entre 50 °C e 60 °C, dependendo do pH do tampão usado, valores de pH mais baixos dão mais estabilidade à enzima, suportando maiores temperaturas (ANDERSON; LARSSON; KIRK, 1998).

A CALB possui uma “tampa” muito pequena que não isola totalmente o centro ativo do meio, dessa forma ela não sofre um aumento de atividade pela ativação interfacial. Apesar disso, ela foi imobilizada com sucesso em diversos suportes hidrofóbicos como o Eupergit C (BARBOSA et al., 2010), octil-agarose (ARANA-PEÑA et al., 2020b) e octil-glioxil-agarose (RUEDA et al., 2015), pois ainda pode ficar adsorvida neles através das áreas hidrofóbicas próximas ao seu centro ativo (BASTIDA et al., 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). Além disso, a pequena “tampa” faz com que esta enzima não tenha tendência a formar dímeros lipase-lipase (PALOMO, J. M. *et al.*, 2005, 2004).

A CALB é encontrada comercialmente na forma imobilizada com o nome de Novozym 435, produzida pela Novozymes, ela foi imobilizada via ativação interfacial na resina acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600 e o primeiro documento que relata o seu uso é de 1992. Apesar de apresentar alguns problemas em seu uso, como lixiviação enzimática e fragilidade mecânica, ele é um biocatalisador de muito sucesso com aplicações em diversas áreas (ORTIZ et al., 2019).

A imobilização da CALB tem sido bastante descrita como uma alternativa para melhorar suas características e estabilidade. Dos Santos e colaboradores (2015d) imobilizaram a CALB em agarose ativada com divinilsulfona e concluíram que a mudança no pH de imobilização permitiu alterar a atividade, estabilidade e especificidade da enzima e a incubação em condições alcalinas também apresentou mudanças nas características iniciais da CALB.

Hernandez e colaboradores (2011) imobilizaram a CALB em octadecil-sepabeads e puderam demonstrar este biocatalisador é estável para uso na presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. A enzima não apresentou modificações pela incubação em peróxido de hidrogênio. Para obtenção desse resultado, foi feita uma comparação com a CALB da Novozym 435, esta aumentou sua mobilidade eletroforética, enquanto a CALB imobilizada em octadecil Sepabeads permaneceu quase inalterada.

A CALB também foi imobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona, o protocolo de ativação foi otimizado, produzindo um biocatalisador mais estável, além de apresentar melhores atividades na hidrólise do hexanoato de etila quando comparado aos resultados encontrados na literatura (PINHEIRO et al., 2019).

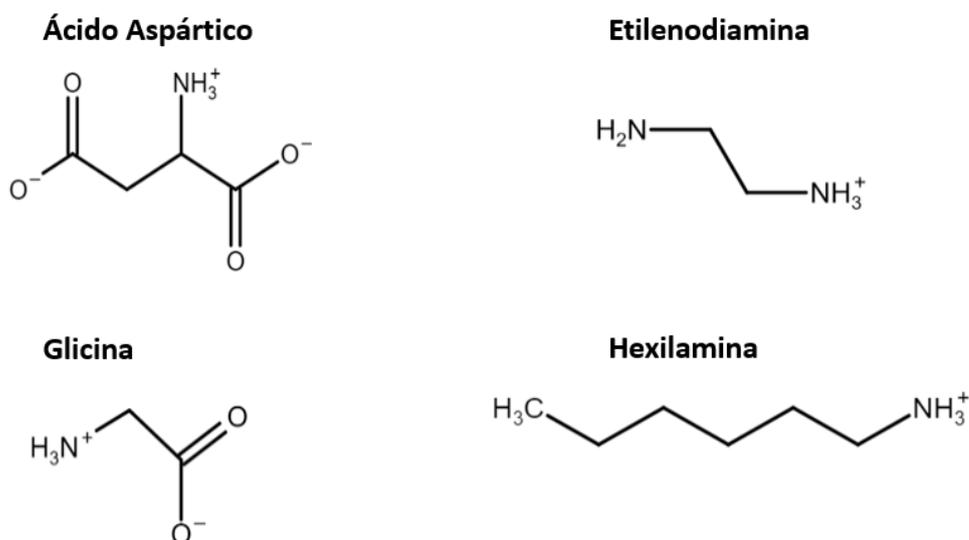
3.6 Bloqueio com nucleófilos

Como ponto final da reação de imobilização, é recomendado realizar o bloqueio dos grupos funcionais remanescentes não ocupados pela enzima. A escolha do agente para o bloqueio irá depender das propriedades da enzima, entre os mais utilizados estão a etilenodiamina, glicina, ácido aspártico, lisina, cisteína e mercaptoetanol.

Os protocolos de bloqueio costumam usar altas concentrações de agente, variando entre 1 e 3 molar, dependendo da solubilidade, e pH alcalino (BONOMI et al., 2013). Essa etapa previne reações não controladas entre enzima e suporte após a imobilização e também podem ser usados para solucionar problemas de hidrofobicidade do suporte (BARBOSA et al., 2013). A hidrofobicidade do suporte é favorável para a imobilização enzimática, mas pode ser um problema para a estabilização final da enzima. Foi demonstrado que o uso de compostos hidrofílicos (como os aminoácidos) na etapa de bloqueio pode compensar estes problemas (MATEO, C. *et al.*, 2002).

O bloqueio de grupos remanescentes também modifica as interações enzima-suporte, influenciando diretamente a estabilidade, atividade e especificidade do biocatalisador (DOS SANTOS et al., 2015e). Neste trabalho, foram escolhidos quatro agentes de bloqueio: ácido aspártico, glicina, etilenodiamina e hexilamina, cujas estruturas químicas estão demonstradas na FIGURA 7.

Figura 7 - Estrutura química dos nucleófilos usados para o bloqueio dos biocatalisadores



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Eles ficarão ligados ao suporte através de interações covalentes muito estáveis, tornando as superfícies dos biocatalisadores diferentes em cada bloqueio. O ácido aspártico possui dois grupos aniônicos e um catiônico, a etilenodiamina possui dois grupos catiônicos, a hexilamina possui um grupo amino secundário que se ligará ao suporte e também uma longa cadeia alifática que estará em contato com a enzima, e por fim, a glicina possui pequenos grupos muito hidrofílicos, sendo um grupo catiônico e um aniônico (SOUZA et al., 2021).

3.7 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método utilizado para o estudo da estrutura, dinâmica e interações de proteínas em solução (EFTIN, 1991). Este método é uma ferramenta importante no desenvolvimento de pesquisas em bioquímica por sua robustez, alta sensibilidade (pequena quantidade de amostra necessária) e por permitir a obtenção de informações sobre proteínas com pouca modificação da sua estrutura (CHAN et al., 2013).

Moléculas em seu estado natural, também chamado de estado fundamental, apresentam uma configuração cuja energia total é a menor possível. Após absorver radiação, a molécula assume uma nova configuração de maior energia, chamada de estado excitado, e então pode voltar ao estado fundamental emitindo ou não radiação. A fluorescência é um fenômeno que ocorre em uma molécula cromófora após ela absorver fótons do ambiente, eles elevam a

energia dos elétrons dessa molécula, passam pelo processo de transição do estado excitado ao fundamental e então emitem fótons (EFTIN, 1991; LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas, como é o exemplo da quinina. Grupos fluorescentes intrínsecos (que estão contidos na própria molécula) e extrínsecos (que podem ser adicionados ao sistema) são chamados de fluoróforos. Eles absorvem a luz em um comprimento de onda específico (chamado de comprimento de onda de excitação, λ_{EX}), e após um intervalo, denominado de tempo de decaimento da fluorescência (τ), a energia é emitida em um comprimento de onda mais longo e específico (chamado de comprimento de onda de emissão, λ_{EM}) (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

Proteínas contendo os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano absorvem e fluorescem na faixa ultravioleta de 250 – 400 nm. Entre eles, o triptofano é o mais estudado e possui o maior rendimento quântico, que é a medida correspondente à eficiência da conversão dos fótons absorvidos durante a excitação em fótons de emissão (CHAN et al., 2013). Uma propriedade que diferencia a fluorescência do triptofano das demais é o fato dele apresentar dois tempos de vida de fluorescência diferentes ($\sim 0,5$ e $\sim 3,1$ ns), estudos indicam que os dois tempos são inerentes à estrutura do Trp e independentes do comprimento de onda de excitação (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

A fluorescência do triptofano é muito sensível à polaridade do meio, pH ou presença de inibidores, assim, o seu comprimento de onda de emissão é bastante variável entre as proteínas. Por exemplo, o uso de suportes hidrofóbicos, como o octil-agarose, pode promover um ambiente mais hidrofóbico para os resíduos de triptofano e assim aumentar a sua intensidade de fluorescência intrínseca. Enquanto os resíduos de triptofano que se tornaram mais expostos ao solvente após a imobilização vão apresentar uma intensidade de fluorescência intrínseca mais baixa (LOKHA et al., 2020).

A aplicação de técnicas de fluorescência em estudos de imobilização de lipases contribui para elucidar a causa de variações na atividade, especificidade ou estabilidade da enzima que podem ser causadas por rearranjos estruturais. Suportes à base de agarose tornam possíveis tais estudos devido à transparência desse material (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada em suporte ativado com divinilsulfona sob diferentes condições. Como resultado, as características entre as preparações foram alteradas, sugerindo a ligação ao suporte por diferentes orientações da enzima. Essas

diferenças foram confirmadas pelo espectro de fluorescência, com a formação de diferentes estruturas após a imobilização (DOS SANTOS et al., 2015b).

Zaak e colaboradores (2017) imobilizaram as lipases Lecitase Ultra, CALB e TLL em suporte octil-glioxil para avaliar o efeito da natureza do tampão na estabilidade das enzimas. Nesse trabalho, a espectroscopia de fluorescência revelou um rearranjo estrutural nas enzimas imobilizadas na presença de alta de concentração de fosfato (ZAAK et al., 2017b).

Em outro estudo, a TLL foi imobilizada por ativação interfacial em octil-agarose sob 16 condições diferentes, sendo avaliadas as propriedades enzimáticas dos biocatalisadores preparados. Os resultados indicaram que as condições de imobilização determinaram as propriedades finais da enzima, então foi realizado uma análise de fluorescência que confirmou a existência de diferentes estruturas tridimensionais, correlacionando tais diferenças estruturais com as diferenças funcionais encontradas (LOKHA et al., 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Ativação do suporte Octil-VS

O suporte octil foi ativado conforme o protocolo descrito por Albuquerque e colaboradores (2016), com adaptações. Uma porção de 10 g de octil-agarose foram adicionados a uma solução de 2,5 mL de divinilsulfona e 66,6 mL de tampão carbonato de sódio 333 mM pH 11,5, obtendo uma concentração final de 0,35 M de divinilsulfona. A ativação ocorreu sob agitação leve por 2 horas e então o suporte octil-VS foi lavado abundantemente com água, seco à vácuo e armazenado a 4 °C.

4.2 Imobilização enzimática

Uma porção de 10 g do suporte octil-vinilsulfona (OC-VS) foi suspensa em 100 mL de cada solução enzimática, TLL (2 mg/g) e CALB (1 mg/g), ambas preparadas em tampão acetato de sódio 5 mM e pH 5. O pH de imobilização foi escolhido porque nele a taxa de imobilização de proteínas aos grupos vinilsulfona é baixa, permitindo apenas a imobilização por ativação interfacial com os grupos octil disponíveis no suporte (DOS SANTOS et al., 2015a). Após a completa imobilização da enzima, os biocatalisadores OC-VS-TLL e OC-VS-CALB foram incubados em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 8 durante 4 horas para permitir a formação das ligações covalentes (ALBUQUERQUE et al., 2016). A imobilização e a incubação foram acompanhadas periodicamente com medidas da atividade enzimática do suporte e do sobrenadante usando *p*NPB como substrato. Para a imobilização da CALB em suporte octil, foi seguido o mesmo protocolo citado acima, com exceção da etapa de incubação em pH 8.

4.2.1 Bloqueio com diferentes nucleófilos

Como etapa final da reação, o biocatalisador imobilizado OC-VS-TLL e OC-VS-CALB foram incubados com diferentes nucleófilos: etilenodiamina (EDA), hexilamina (HA), glicina (Gli) e ácido aspártico (ASP) na concentração de 2 M, pH 8 por 24 horas (10 mL de solução de bloqueio por grama de suporte). Essa etapa tem a função de bloquear os grupos

reativos remanescentes (ALBUQUERQUE et al., 2016). Os biocatalisadores foram lavados abundantemente com água, secos à vácuo e armazenados a 4 °C.

4.3 Determinação da atividade enzimática usando diferentes substratos

- ***p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB):** A atividade enzimática foi determinada pela medida de *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise do *p*NPB. 50 µL de *p*NPB 50 mM em acetonitrila foi adicionado em 2,5 mL de tampão fosfato 25 mM pH 7. A reação é iniciada com a adição de 50 µL de enzima (livre ou imobilizada) e quantificada a 348 nm por 90 segundos sob agitação magnética. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de *p*NPB por minuto a 25 °C e pH 7 (sob essas condições, $\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (LOMBARDO; GUY, 1981);
- **Triacetina:** Foi preparada de 2 a 4 mL de solução de 50 mM de triacetina em tampão fosfato de sódio 50 mM a 25 °C e pH 7. A essa solução foi então adicionado de 0,05 – 0,1 g do biocatalisador sob leve agitação. A esse pH, a produção de 1,2 diacetina sofre migração acil e uma mistura com 1,3 diacetina é obtida. A reação de conversão foi determinada por HPLC usando coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 cm). As amostras foram analisadas usando uma solução de 15-85 % (v/v) de acetonitrila-água como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min e a detecção foi realizada com um detector UV a 230 nm. Conversões na faixa de 15 a 20 % foram usadas para calcular as taxas de reação inicial. Os tempos de retenção foram de 4 minutos para ambos produtos e 18 minutos para o substrato;
- **(*R*)- e (*S*)- mandelato de metila:** A reação foi realizada usando 50 mM de *R*- ou *S*-mandelato de metila em 50 mM de tampão fosfato de sódio a pH 7,0 e 25 °C. De 0,5 – 3,5 mL do substrato foi adicionado a 0,025 – 0,5 g de biocatalisador, sob agitação leve. O produto foi analisado em HPLC usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 cm) tendo como fase móvel uma solução de 35 % de acetonitrila/65% água Mili-Q contendo 10 mM de acetato de amônio a pH 2,8 e fluxo de 1 mL/min. Os compostos foram determinados com detector UV/VIS a 230 nm e os tempos de retenção foram de cerca de 2,4 minutos para ácido mandélico e 4,2 minutos para mandelato de metila. Conversões entre 15 e 20 % foram usadas para calcular as taxas de reação inicial.

4.4 Inativações enzimáticas

As inativações dos biocatalisadores foram realizadas em pH 5, 7 e 9 e em diferentes temperaturas, pois devido as distintas estabilidades encontradas, foi necessário selecionar diferentes temperaturas para cada valor de pH. Amostras dos biocatalisadores obtidos pela imobilização de TLL em octil-VS e de CALB, em octil e octil-VS, foram incubadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 a 74 °C para a TLL e 80 °C para a CALB, tampão Tris 50 mM pH 7,0 a 73 °C para a TLL e 75 °C para a CALB (tampão fosfato não foi utilizado pelo seu efeito negativo na imobilização de lipases (KORNECKI et al., 2020; ZAAK et al., 2017b), e tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9 a 71 °C para a TLL e 60 °C para a CALB.

Periodicamente, a atividade residual foi mensurada usando *p*NPB como substrato. A atividade residual foi calculada como a porcentagem remanescente da atividade inicial. Para a análise das amostras dos biocatalisadores inativados, o curso de inativação foi interrompido quando a atividade residual estava em aproximadamente 75 %, 50 % e 25 %. Os biocatalisadores parcialmente inativados foram lavados com tampão Tris 50 mM pH 7, filtrados à vácuo e armazenados a 25 °C por 24 horas para permitir possíveis reativações das enzimas inativadas, e então foram armazenados a 4 °C para análise das atividades com os demais substratos e estudo de fluorescência.

4.5 Análise de fluorescência

A fluorescência intrínseca dos biocatalisadores imobilizados de TLL e CALB, suspensos em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7, foram analisadas e forneceram informações sobre as diferenças estruturais entre eles após passarem por distintos bloqueios e condições de inativação. O volume de 100 µL de uma suspensão 1:10 (m/v) de cada biocatalisador contendo 20 µg de proteína para a TLL e 10 µg de proteína para a CALB foram adicionados em uma placa escura de poliestireno de 96 poços. A análise foi feita com excitação a 280 nm, com espectro de emissão de 300 a 500 nm e intervalo de 2 nm, em leitor de microplacas Synergy Mx, BioTek® utilizando o software Gen5. A variação da intensidade de fluorescência máxima (ΔI_{\max}) e do comprimento de onda máximo ($\Delta \lambda_{\max}$) foram calculados subtraindo os espectros dos suportes bloqueados sem enzima imobilizada dos espectros contendo a TLL e a CALB imobilizada.

4.6 Análise estatística

Os dados de atividade enzimática obtidos durante e após as inativações foram avaliados estaticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 95 % de nível de significância. O software Origin Pro 8.5 foi usado para processar os dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

5.1 Artigo publicado

Priscila M. Paiva Souza, Diego Carballares, Nerea Lopez-Carrobles, Luciana R.B. Gonçalves, Fernando Lopez-Gallego, Sueli Rodrigues, Roberto Fernandez-Lafuente, Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine *Thermomyces lanuginosus* lipase inactivation pathways: Functional and florescence studies, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 191, 2021, Pages 79-91, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.061>.

5.2 Imobilização de TLL em suporte octil-VS

A enzima TLL foi imobilizada por ativação interfacial em octil-VS, usando uma concentração de 2 mg de enzima por g de suporte, sob as condições citadas anteriormente na sessão de Materiais e Métodos. O pH 5 para a imobilização foi escolhido para permitir apenas a imobilização por adsorção da enzima aos grupos octil, pois a taxa de imobilização de grupos VS é baixa nessa condição (DOS SANTOS et al., 2015a). A enzima foi imobilizada aos 30 minutos de reação, obtendo uma porcentagem de imobilização de 98 % e atividade final de 20,31 U/mL, como é possível observar na TABELA 2. O pouco tempo para a imobilização se deu pois, sob baixa força iônica, lipases de diversas fontes são adsorvidas rapidamente ao suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Tabela 2 – Atividade enzimática durante a imobilização de TLL (2 mg/g) em octil-VS usando *p*-NPB como substrato. As condições de imobilização estão descritas na sessão 4.2 de Materiais e Métodos

Tempo (minutos)	Atividade enzimática (U/mL)
0	25,56 ± 0,56
30 (sobrenadante)	0,45 ± 0,02
30 (suspensão)	20,31 ± 1,17

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Após a imobilização, o biocatalisador foi incubado em tampão carbonato 50 mM pH 8 durante 4 horas para permitir a formação de ligações covalentes entre a enzima e os grupos VS do suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016). A atividade enzimática durante a incubação (TABELA 3) inicialmente apresentou um aumento na atividade, possivelmente devido à mudança de pH e as novas interações formadas. Ao decorrer da incubação, houve uma queda na atividade relativa, finalizando esta etapa com 92 % de atividade em relação à etapa anterior de imobilização a pH 5.

O aumento e posterior diminuição na atividade relativa pode ser explicado por uma formação de um gradiente de pH. Gradientes internos de pH podem ser formados em enzimas imobilizadas em suportes porosos e isso pode ser considerado uma desvantagem, uma vez que o pH interno do suporte torna-se diferente daquele do meio. Se o valor de pH externo não corresponder ao pH ideal para a atividade enzimática, como na situação do início da incubação em pH 8, é possível que a presença de gradientes de pH resulte em aumento da atividade, mas ao passar do tempo de incubação ocorre um equilíbrio do pH interno e externo e a atividade diminui (RODRIGUES et al., 2013).

Tabela 3 – Atividade enzimática de TLL medida com *p*NPB durante a incubação em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 8

Biocatalisador	Atividade relativa (%)
OC-VS-TLL (após imobilização)	100 ± 5,7
OC-VS-TLL (0h de incubação)	121,5 ± 14
OC-VS-TLL (1h de incubação)	114,8 ± 0,7
OC-VS-TLL (2h de incubação)	118 ± 1,4
OC-VS-TLL (3h de incubação)	97,1 ± 5,6
OC-VS-TLL (4h de incubação)	92 ± 0,4

Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.3 Efeito do bloqueio nos biocatalisadores OC-VS-TLL

Após a incubação a pH 8, os grupos vinilsulfona remanescentes foram bloqueados com 4 diferentes nucleófilos visando modular as propriedades da enzima e também alterar as interações entre enzima e suporte. Estudos anteriores com lipases imobilizadas em suportes

divinilsulfona demonstraram que a etapa de bloqueio permite alterar a atividade enzimática, estabilidade e especificidade dessas enzimas (DOS SANTOS et al., 2015e). O bloqueio teve duração de 24 horas, e obtiveram-se os biocatalisadores OC-VS-TLL-ASP, bloqueado com ácido aspártico, OC-VS-TLL-GLI, bloqueado com glicina, OC-VS-TLL-EDA, bloqueado com etilenodiamina e OC-VS-TLL-HA, bloqueado com hexilamina.

Na TABELA 4, são apresentadas as atividades enzimáticas de cada biocatalisador após a incubação por 24 h em cada agente de bloqueio.

Tabela 4 – Efeito do agente de bloqueio no biocatalisador OC-VS-TLL. A atividade enzimática foi medida com *p*NPB durante a incubação com diferentes nucleófilos por 24h a pH 8

Biocatalisador	Atividade relativa (%)
OC-VS-TLL	100 ± 0,4
OC-VS-TLL-ASP	125,2 ± 9,6
OC-VS-TLL-GLI	127,9 ± 6,9
OC-VS-TLL-EDA	114,5 ± 3
OC-VS-TLL-HA	58,1 ± 3,8

Fonte: elaborada pela autora (2022).

As atividades de ASP, GLI e EDA apresentaram um aumento em relação à atividade antes do bloqueio, enquanto no bloqueio com HA houve maior redução de atividade, alcançando 58 % de atividade relativa. Esse comportamento é similar ao encontrado por Dos Santos (2015e), em que a enzima TLL imobilizada em octil-VS após incubação com hexilamina apresentou uma diminuição significativa da atividade enzimática. O que indica que esse reagente afeta negativamente as propriedades da enzima ou pode impedir uma interação adequada entre enzima e suporte. Para os outros agentes de bloqueio não ocorreram mudanças significativas na atividade.

5.4 Efeito da atividade dos biocatalisadores versus diferentes substratos

As atividades iniciais dos diferentes biocatalisadores bloqueados contra os 4 diferentes substratos usados nesse trabalho são mostrados na TABELA 5.

Tabela 5 – Atividade em U/g de diferentes biocatalisadores TLL imobilizados contra os substratos (*R*)- e (*S*)- metil mandelato, triacetina e *p*NPB

Atividade (U/g de biocatalisador)					
Preparação de TLL	Agente de Bloqueio	<i>p</i> NPB	Triacetina	(<i>R</i>)-Metil mandelato*	(<i>S</i>)-Metil mandelato*
OC-VS-TLL	ASP	197,5 ± 11,8	61,9 ± 3,9	5,52 ± 0,27	7,32 ± 0,51
	GLI	203,2 ± 14,2	67,3 ± 4,6	6,07 ± 0,29	6,68 ± 0,40
	EDA	222,9 ± 15,6	85,1 ± 6,8	6,22 ± 0,32	7,29 ± 0,49
	HA	88,4 ± 7,1	6,9 ± 0,4	2,38 ± 0,13	2.16 ± 0,11

*A atividade foi multiplicada por 100.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

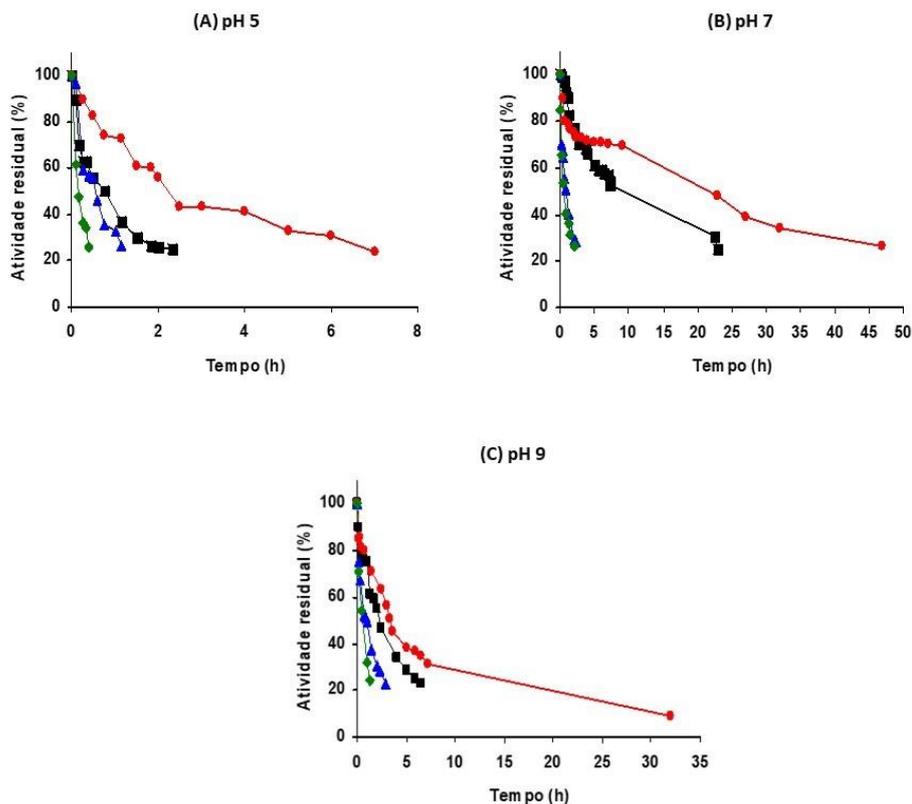
Usando *p*NPB como substrato, os biocatalisadores apresentaram maior atividade, e somente o biocatalisador bloqueado com hexilamina teve uma atividade menor se comparado às outras preparações. O biocatalisador bloqueado com EDA apresentou atividade aproximadamente 10 % maior se comparado com as outras duas preparações (ASP e GLI). Esse mesmo comportamento foi relatado em trabalhos anteriores, no qual a etapa de bloqueio com nucleófilos produziu um aumento na atividade enzimática de TLL usando *p*NPB como substrato (DOS SANTOS et al., 2015e).

Triacetina é o segundo melhor substrato para esses biocatalisadores, apesar do biocatalisador bloqueado com hexilamina ter atividade mais de 12 vezes menor se comparado ao biocatalisador bloqueado com EDA. Este é o de maior atividade, com aproximadamente 30 % a mais do que os outros dois biocatalisadores. A atividade de ambos os isômeros de metil mandelato são muito baixas, sem preferência relevante entre um dos isômeros. Os biocatalisadores bloqueados com EDA e glicina tiveram a maior atividade usando o isômero *R*, enquanto o bloqueado com HA foi novamente o menos ativo (menor que 40 %). Com o isômero *S* os biocatalisadores bloqueados com EDA e ácido aspártico foram os mais ativos, seguido do bloqueado com glicina. Desse modo, os biocatalisadores iniciais (sem inativação) apresentaram especificidades diferentes em relação a esses 4 substratos, sugerindo que os diferentes biocatalisadores podem ter uma estrutura inicial diferente como resultados dos diferentes bloqueios.

5.5 Inativações térmicas dos biocatalisadores TLL

A FIGURA 8 mostra o curso de inativação dos 4 biocatalisadores de TLL em pH 5, 7 e 9. Foram realizados testes para adequação da temperatura de cada inativação e então selecionadas 74 °C para o pH 5, 73 °C para o pH 7 e 71 °C para o pH 9. Essas temperaturas foram ajustadas para permitir a obtenção de cursos de inativação confiáveis para todos os biocatalisadores no pH determinado, pois foram obtidas preparações com diferentes estabilidades.

Figura 8 – Cursos de inativação dos biocatalisadores OC-VS-TLL-ASP (■), OC-VS-TLL-GLI (●), OC-VS-TLL-EDA (▲) e OC-VS-TLL-HA (◆). Condições de inativação: (A) Tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 74 °C; (B) Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0 e 73 °C; (C) Tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e 71 °C



Fonte: elaborada pela autora (2022).

A pH 5 e 9 (FIG. 8A e 8C), o biocatalisador bloqueado com glicina mostrou-se o mais estável, seguido do bloqueado com aspártico, EDA e por último o menos estável foi o bloqueado com hexilamina. A pH 7 (FIG. 8B) o biocatalisador bloqueado com glicina continua sendo o mais estável, seguido do aspártico, enquanto os cursos de inativação de EDA e hexilamina foram muito similares. Portanto, a glicina, que apresenta grupos catiônicos e aniônicos em sua estrutura (FIGURA 7), é o agente que fornece maior estabilidade no bloqueio de biocatalisadores OC-VS-TLL. Esse comportamento também foi observado por Albuquerque e colaboradores (2016) com a análise de estabilidade de preparações de lipases imobilizadas em OC-VS a pH 5.

Os agentes de bloqueio EDA e HA, que possuem natureza catiônica na superfície de suporte, apresentaram a menor estabilidade enzimática. Provavelmente, as interações produzidas no bloqueio ajudaram a manter estruturas enzimáticas errôneas durante a inativação enzimática, tornando-se negativas para a estabilidade da enzima (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2016, 2017b). O ácido aspártico, que possui natureza aniônica (2 grupos aniônicos e 1 grupo catiônico), apresentou diferenças na estabilidade do bloqueio se comparado à glicina. Essas diferenças podem ser causadas pelo segundo grupo aniônico ou pelo maior tamanho do aspártico, facilitando a interação com mais grupos da enzima imobilizada se comparados com a glicina.

Estudos sugerem que a superfície do suporte com caráter iônico semelhante ao da enzima pode colaborar positivamente para a estabilidade enzimática, pois certa repulsão entre enzima e superfície do suporte ajudam a manter a conformação da enzima (LIU, H. *et al.*, 2014; LIU, H.; DONG; SUN, 2015; WANG; DONG; SUN, 2011; YANG *et al.*, 2012; YU; DONG; SUN, 2012). No entanto, isso não é totalmente seguido com a TLL, pois a glicina foi o agente de maior estabilidade entre os biocatalisadores. Albuquerque e colaboradores (2016) utilizaram a TLL imobilizada em suporte octil ativado com divinilsulfona obtendo um tempo de meia vida de aproximadamente 30 minutos em uma inativação em tampão acetato 50 mM, pH 5 a 70 °C. Portanto, pode-se concluir que as preparações de TLL bloqueadas com ácido aspártico, glicina e EDA forneceram uma maior estabilidade aos biocatalisadores se comparados a essa mesma condição de inativação.

Após as inativações, foram obtidas preparações de diferentes atividades residuais, aproximadamente 75 %, 50 % e 25 %, e elas tiveram o efeito das inativações analisadas sob diferentes substratos e por espectro de fluorescência.

5.6 Reativação enzimática usando *p*NPB como substrato

As atividades de diferentes amostras dos biocatalisadores foram medidas por *p*NPB durante a inativação e após 24 h de incubação a pH 7 e 25 °C (TABELA 6) para permitir a reativação da enzima nesse período e evitar que a determinação da atividade pudesse sofrer interferências.

Na inativação a pH 5, o biocatalisador bloqueado com ácido aspártico apresentou uma maior recuperação da atividade após 24 h nas amostras mais ativas (75 % e 50 %), aumentando de 63 % para 90 % e de 50 % para 71 %. Enquanto no último ponto (25 %), a preparação bloqueada com EDA obteve maior reativação, passando de 26 para 57 % de atividade. Na inativação a pH 7, o biocatalisador bloqueado com EDA apresentou a maior recuperação de atividade em todos os pontos analisados. Em geral, as enzimas inativadas em pH 7 recuperaram menos atividade do que as inativadas em pH 5. Entretanto, para as amostras inativadas a pH 9, a preparação bloqueada com EDA apresentou menor recuperação de atividade, passando de 22 % para 31 % no último ponto (25 %), enquanto as bloqueadas com aspártico recuperaram a maior atividade no biocatalisador mais inativado (25 %), passando de 22 % para 62 %. No segundo ponto analisado (50 %), o biocatalisador bloqueado com glicina permitiu a maior reativação enzimática, passando de 45 % para 88 % após 24 horas.

Portanto, todos os biocatalisadores puderam recuperar parte da sua atividade perdida na inativação, como já foi reportado anteriormente (SOLER et al., 1997; SUESCUN et al., 2015). A recuperação da atividade enzimática depende das interações produzidas entre a enzima e a superfície do suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015b, 2015d, 2015e), e também das condições de inativação, o que pode alterar a via de inativação (SANCHEZ et al., 2016).

Tabela 6 – Atividade residual dos diferentes biocatalisadores de TLL durante o curso de inativação, a pH 5 e 74 °C, pH 7 e 73 °C e pH 9 e 71 °C, e após 24 h de incubação a pH 7 e 25 °C usando *p*NPB como substrato

Atividade residual (%)									
Condição de inativação		Asp		Gli		EDA		HA	
		Inativação	Após 24h						
pH 5	75%	63,3 ± 3,1	90,3 ± 1,3	74,3 ± 2,1	88,1 ± 4,0	59,4 ± 3,0	78,3 ± 3,3	61,4 ± 3,3	81,2 ± 3,9
	50%	50,3 ± 1,8	71,3 ± 3,1	43,6 ± 3,2	68,1 ± 2,9	46,5 ± 2,3	66,6 ± 2,8	47,9 ± 2,4	61,3 ± 3,1
	25%	24,9 ± 1,1	43,2 ± 2,1	24,1 ± 0,9	36,1 ± 2,4	26,9 ± 1,2	57,7 ± 3,1	26,1 ± 1,3	38,2 ± 2,5
pH 7	75%	77,4 ± 3,6	76,7 ± 3,6	70,7 ± 3,1	85,7 ± 3,7	60,7 ± 2,8	83,1 ± 2,4	65,7 ± 2,5	71,4 ± 3,2
	50%	52,6 ± 2,1	50,6 ± 2,6	47,8 ± 2,4	41,9 ± 2,2	50,7 ± 2,6	71,0 ± 3,1	53,8 ± 3,0	50,9 ± 2,8
	25%	24,8 ± 1,1	32,4 ± 1,3	26,1 ± 1,2	24,0 ± 2,1	28,9 ± 0,9	49,6 ± 2,3	26,6 ± 0,5	24,7 ± 2,0
pH 9	75%	61,4 ± 2,9	93,9 ± 3,7	70,9 ± 3,4	96,7 ± 4,3	67,2 ± 3,6	84,3 ± 3,3	71,1 ± 4,1	106,9 ± 4,1
	50%	47,0 ± 2,1	78,9 ± 3,2	45,6 ± 2,1	88,2 ± 4,1	49,2 ± 2,4	74,9 ± 4,1	54,4 ± 2,5	60,9 ± 3,2
	25%	22,6 ± 1,2	62,3 ± 3,4	19,2 ± 1,1	49,6 ± 2,8	22,7 ± 1,7	31,6 ± 2,3	24,6 ± 1,1	44,0 ± 2,9

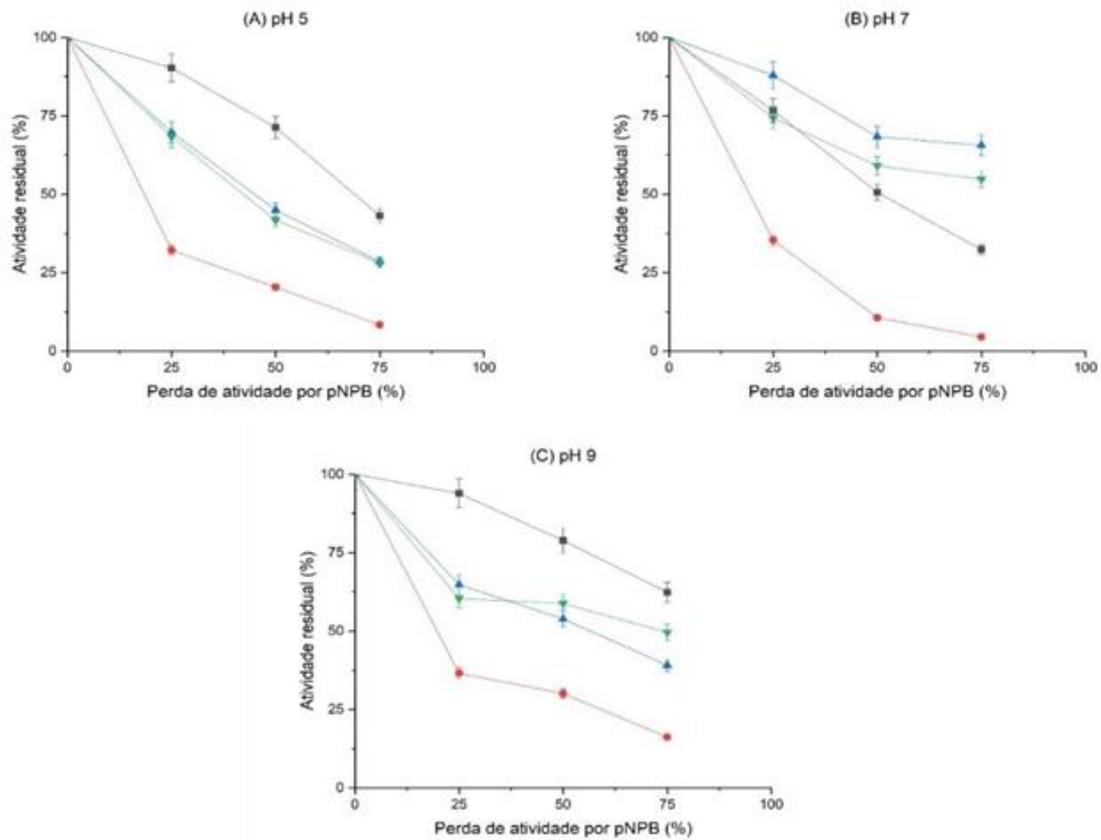
Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.7 Especificidade enzimática de preparações de TLL inativadas

Na FIGURA 9 é mostrada a atividade residual dos biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico contra os substratos *p*NPB, triacetina, (*R*)-metil mandelato e (*S*)-metil mandelato. Como no eixo X é usada a atividade residual contra *p*NPB, a comparação entre os diferentes biocatalisadores é feita de forma direta, independente de maior ou menor estabilidade do biocatalisador. Os valores de atividades residuais analisados no eixo Y correspondem à atividade após a reativação. Os valores iniciais (0 % de perda de atividade por *p*NPB) correspondem aos biocatalisadores bloqueados que não passaram pela etapa de inativação.

Em pH 5 (FIG. 9A), a porcentagem da atividade residual contra *p*NPB diminui mais lentamente quando comparada à de ambos metis mandelatos (que diminuem sua atividade em velocidade similar), enquanto a atividade contra triacetina é a que diminui mais rapidamente. A inativação dos biocatalisadores a pH 7 (FIG. 9B) já apresenta outro perfil, com a atividade residual de (*R*)-metil mandelato sendo uma das que melhor se manteve, seguida da atividade contra o (*S*)-metil mandelato e contra *p*NPB. A atividade contra triacetina continuou sendo a que mais rapidamente diminui. Os biocatalisadores inativados a pH 9 (FIG. 9C) apresentaram perfil similar aos inativados a pH 5, a atividade residual é melhor mantida contra *p*NPB e pior contra triacetina, enquanto os mandelatos permaneceram similares e entre ambos. Nas três inativações a atividade contra triacetina diminui de forma similar, ligeiramente mais lenta a pH 9 do que a pH 5 e um pouco mais rápida a pH 7. Enquanto o (*R*)-metil mandelato teve a atividade residual reduzida mais lentamente a pH 7 do que nos outros dois pH, e com o (*S*)-metil mandelato a atividade diminuiu mais rapidamente a pH 5 e manteve um perfil similar nos outros dois pH.

Figura 9 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com ácido aspártico contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos *p*NPB (■), triacetina (●), (*R*)-metil mandelato (▲) e (*S*)-metil mandelato (▼)

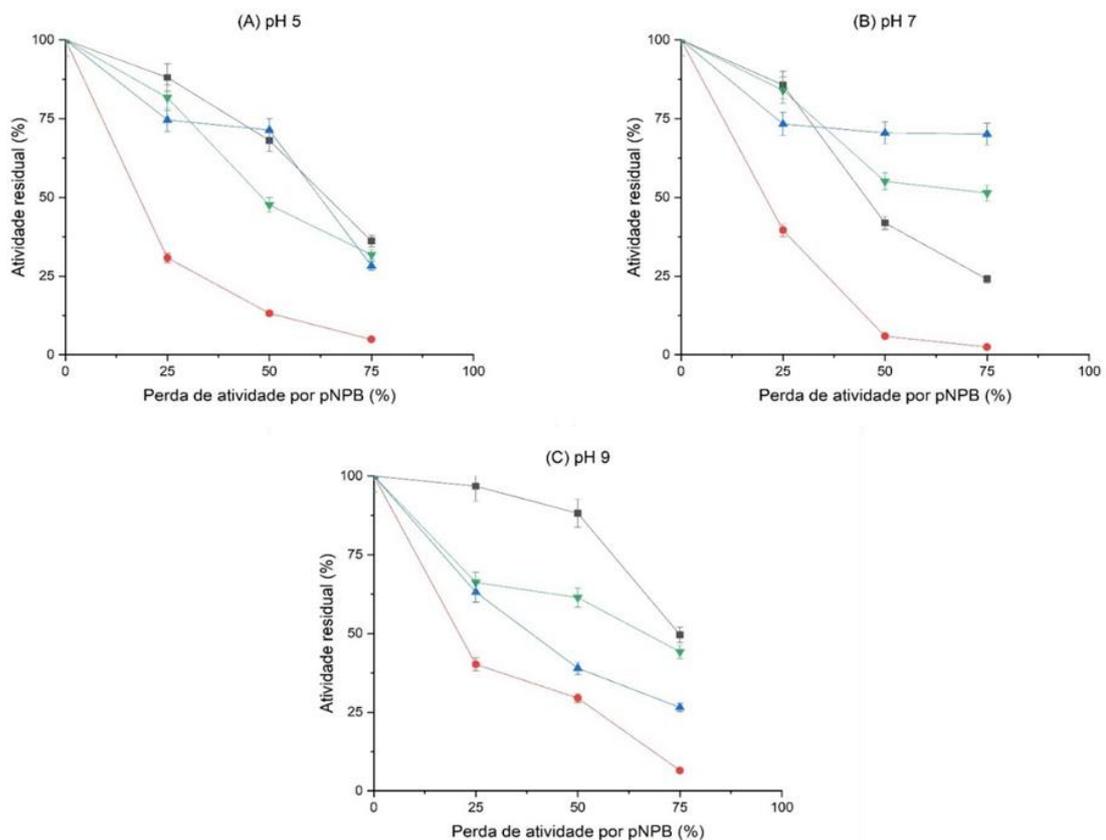


Fonte: elaborada pela autora (2022).

A evolução da atividade residual usando os biocatalisadores bloqueados com glicina é mostrada na FIGURA 10. A pH 5 (Fig. 10A), a atividade é melhor mantida usando *p*NPB como substrato, seguida dos isômeros de metil mandelato que decrescem similarmente, e a mais baixa atividade recuperada é vista usando triacetina como substrato. Em pH 7 (FIG. 10B), a atividade residual dos biocatalisadores é maior usando os isômeros de metil mandelato, sendo melhor mantida no isômero R. Triacetina é novamente o substrato que perde a atividade mais rapidamente. Quando ainda se mantém 75 % da atividade inicial usando (*R*)-metil mandelato como substrato, somente 5 % foi mantida usando triacetina. A pH 9 (FIG. 10C) o perfil da atividade residual mostrou-se similar ao pH 5, com a diferença de ter maior perda de atividade usando ambos isômeros de metil mandelato como substratos.

Analisando o efeito do pH, com (*R*)-metil mandelato, a atividade residual do biocatalisador 75 % inativado por *pNPB* foi de 70 % na inativação a pH 7, e somente 25-30 % nas inativações a pH 5 ou 9. Usando o isômero *S*, as diferenças na atividade recuperada causada pela inativação não são tão evidentes.

Figura 10 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com glicina contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos *pNPB* (■), triacetina (●), (*R*)-metil mandelato (▲) e (*S*)-metil mandelato (▼)

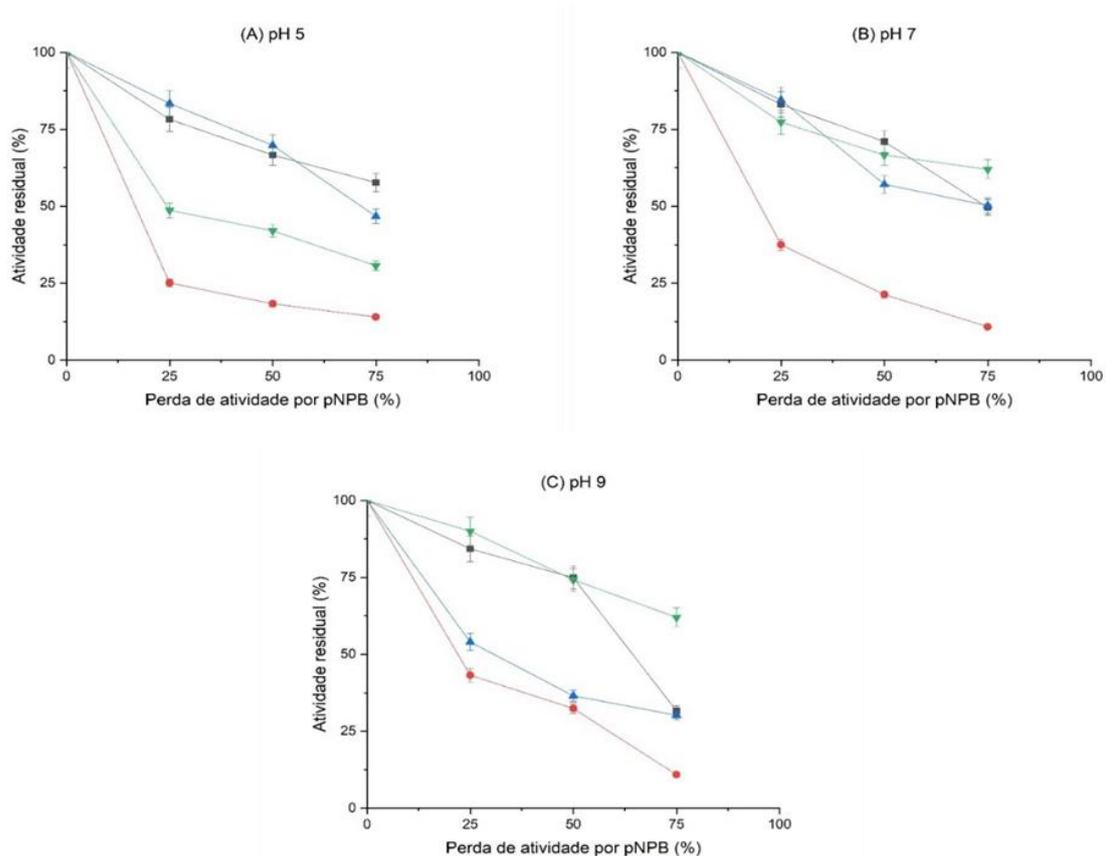


Fonte: elaborada pela autora (2022).

As atividades obtidas de diferentes inativações dos biocatalisadores bloqueados com EDA são mostradas na FIGURA 11. Em pH 5 (FIG. 11A), a maior atividade recuperada foi encontrada usando *pNPB* e (*R*)-metil mandelato, enquanto a atividade residual contra triacetina foi a que reduziu mais rapidamente, com atividade abaixo de 50 % para o biocatalisador menos inativado. De forma similar, em pH 7 (FIG. 11B), a atividade retida usando triacetina com substrato também diminuiu mais rapidamente. A pH 9 (FIG. 11C), as

atividades contra *pNPB* e (*S*)-metil mandelato mantiveram os maiores valores, com maior atividade usando o (*S*)-metil mandelato nos biocatalisadores com a menor atividade retida (62 % contra 32 %). A atividade usando triacetina se manteve sendo a de redução mais rápida, mas não se distancia muito da atividade residual usando (*R*)-metil mandelato. Neste caso, a enantioespecificidade da enzima é fortemente afetada, uma vez que a atividade contra (*S*)-metil mandelato foi mantida quase duas vezes melhor do que isômero (*R*). Isso fez com que este biocatalisador, após a inativação, tivesse uma preferência clara pelo isômero (*S*).

Figura 11 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com EDA contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos *pNPB* (■), triacetina (●), (*R*)-metil mandelato (▲) e (*S*)-metil mandelato (▼)



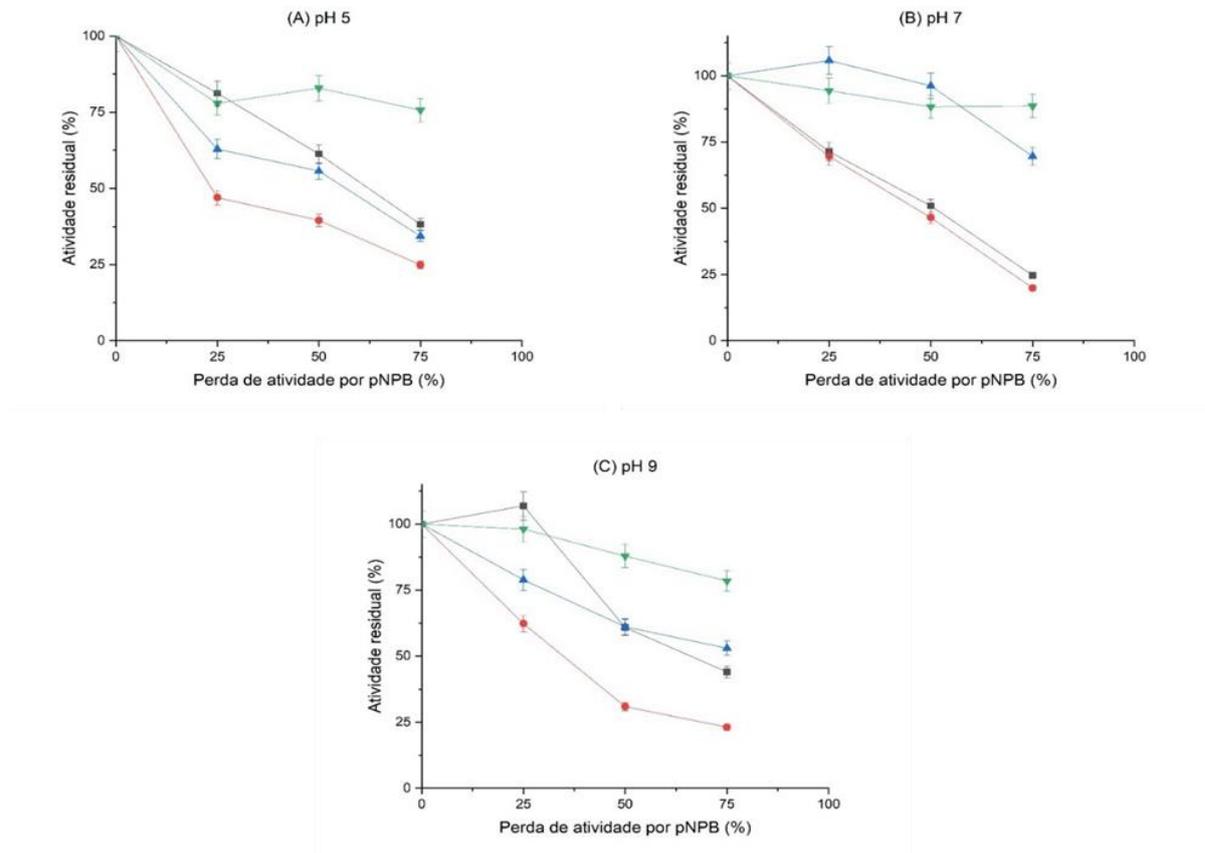
Fonte: elaborada pela autora (2022).

Na FIGURA 12 é mostrada a evolução das atividades do biocatalisador bloqueado com o agente mais instável, a hexilamina. A pH 5 (FIG. 12A), a atividade recuperada usando (*S*)-metil mandelato como substrato é a maior, seguida pela atividade usando *pNPB*, enquanto

a triacetina segue sendo o substrato com menor atividade recuperada. Em pH 7 (FIG. 12B), a atividade recuperada usando ambos os isômeros de metil mandelato são as mais altas, enquanto usando triacetina e *p*NPB, a atividade recuperada do biocatalisador inativado são bastante semelhantes. Em pH 9 (FIG. 12C), novamente, a atividade recuperada usando triacetina foi a mais baixa, e a usando (*S*)-metil mandelato a mais alta. Já a atividade dos biocatalisadores usando *p*NPB e (*R*)-metil mandelato foram semelhantes (exceto para o ponto do biocatalisador menos inativado, em que a atividade contra *p*NPB aumentou ligeiramente em comparação com o inicial).

Analisando o efeito do pH na diminuição da atividade usando os diferentes substratos, com a triacetina fica claro que em pH 7 a diminuição da atividade residual é mais intensa com o tempo, enquanto usando o (*R*)-metil mandelato é menos intensa. Usando (*S*)-metil mandelato, a atividade residual da enzima é mais alta em todos os valores de pH estudados (usando as preparações de enzima mais inativadas, a atividade observada variou de 75 – 80 % em pH 5 e 9, a quase 90 % em pH 7).

Figura 12 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores de TLL bloqueados com hexilamina contra diferentes substratos. Condições de inativação: (A) pH 5,0 e 74 °C (B) pH 7,0 e 73°C e (C) pH 9,0 e 71°C contra os substratos *p*NPB (■), triacetina (●), (*R*)-metil mandelato (▲) e (*S*)-metil mandelato (▼)

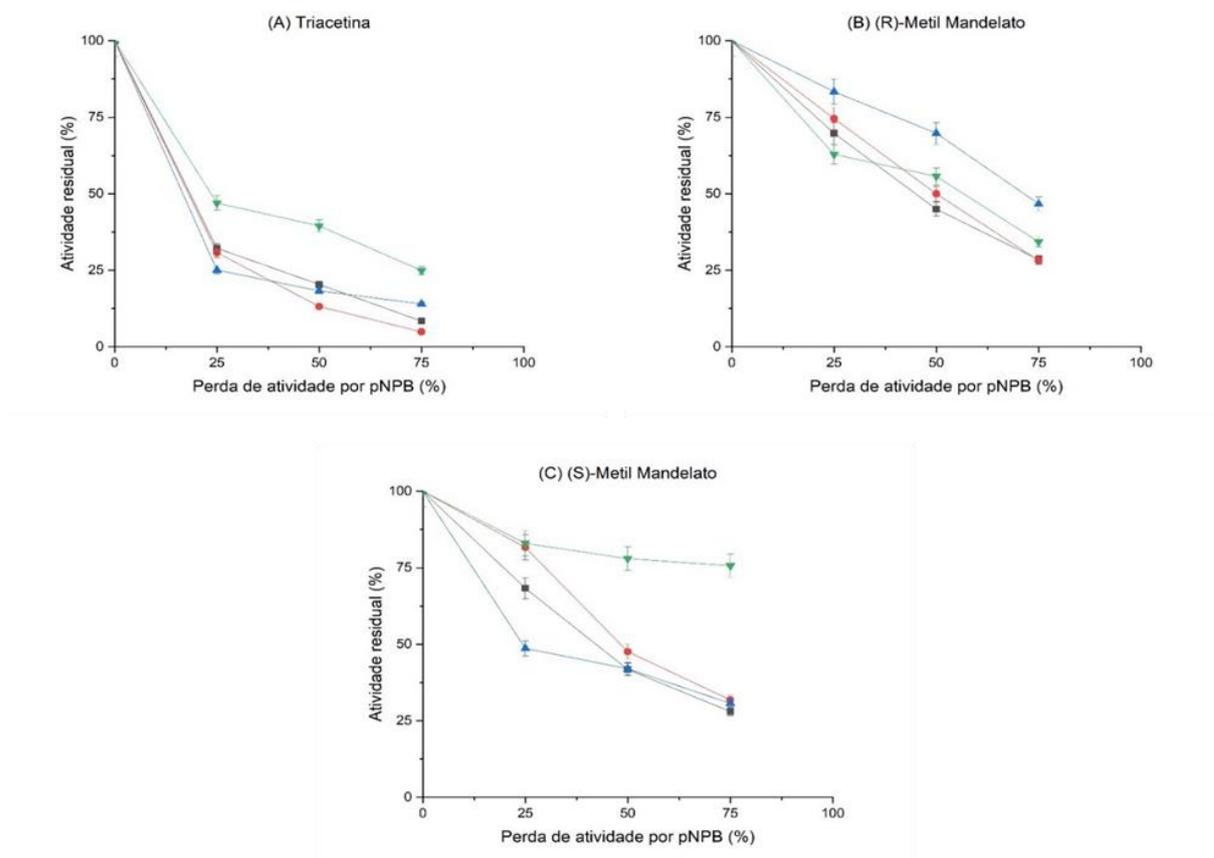


Fonte: elaborada pela autora (2022).

Foram realizadas análises comparativas entre os diferentes biocatalisadores contra o mesmo substrato e a mesma condição de inativação. Em pH 5 (Figura 13), usando Triacetina (Fig. 13A) como substrato para determinar a atividade enzimática, somente os biocatalisadores bloqueados com HA mostraram uma diferença significativa na retenção da atividade enzimática, obtendo a maior atividade recuperada. Usando o substrato (*R*)-metil mandelato (Fig. 13B), a maior porcentagem de atividade inicial foi recuperada pela preparação bloqueada com EDA (47% enquanto as demais preparações se mantiveram em torno de 30%). Ao passo que, com o (*S*)-metil mandelato (Fig. 13C), foi a preparação bloqueada com HA que manteve a maior atividade (a preparação mais inativada reteve 75% da atividade inicial). A preparação bloqueada com EDA foi uma das que recuperou menos atividade com esse substrato nos pontos

intermediários, porém, utilizando os biocatalisadores mais inativados, os três bloqueios (ASP, GLI e EDA) tiveram atividades semelhantes (cerca de 30%).

Figura 13 – Efeito da inativação a pH 5 e 74 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (*R*)-metil mandelato e (C) (*S*)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)

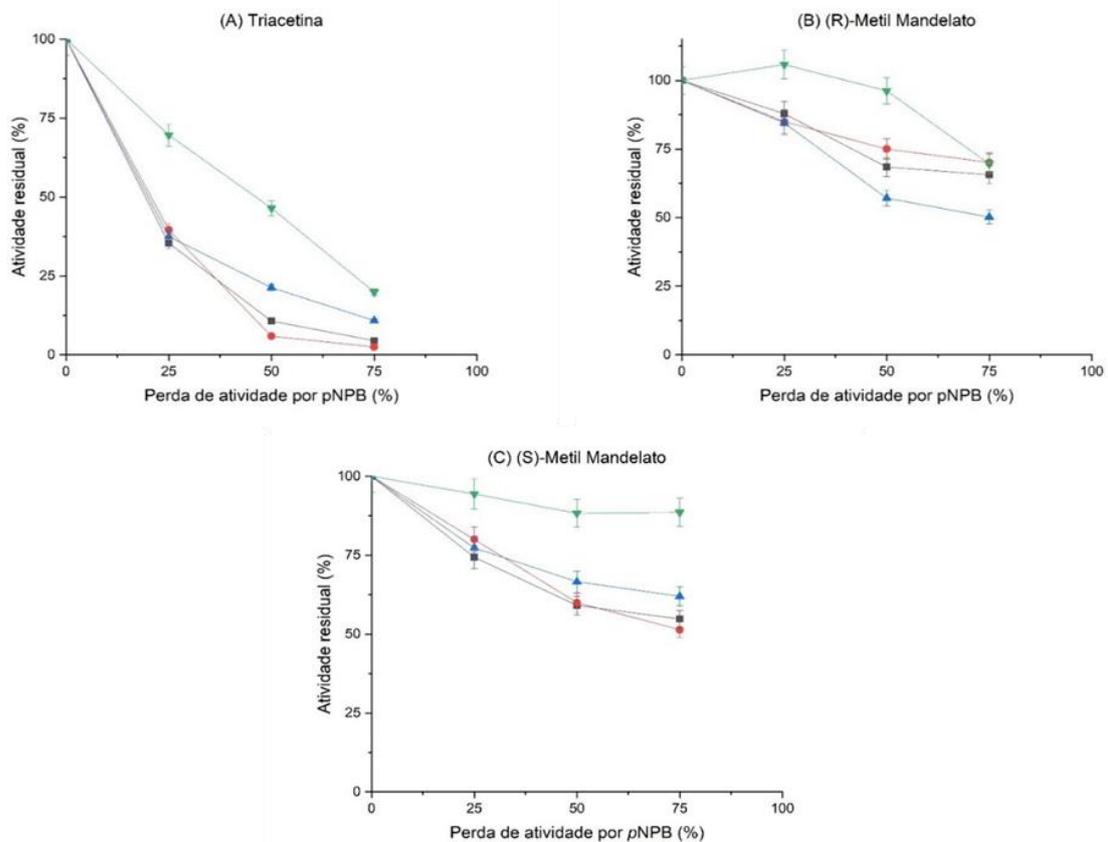


Fonte: elaborada pela autora (2022).

Em pH 7 (FIGURA 14), o biocatalisador bloqueado com HA foi o que reteve a maior atividade inicial em relação à triacetina (19 % com o biocatalisador mais inativado) (FIG. 14A), seguida do bloqueio com EDA. Os que retiveram a menor porcentagem da atividade inicial foram os biocatalisadores bloqueados com GLI ou ASP (com menos de 5 %). Usando (*R*)-metil mandelato (FIG. 14B), a maior porcentagem de atividade inicial é mantida pelos biocatalisadores bloqueados com HA. No entanto, o valor é semelhante ao da preparação bloqueada com ASP e GLI se olharmos apenas para o ponto mais inativado (cerca de 70 %), sendo o bloqueio com EDA o que reteve uma menor porcentagem de atividade. Utilizando

como substrato (*S*)-metil mandelato (FIG. 14C), apenas as preparações bloqueadas com HA diferem na retenção de atividade (cerca de 88 % para a preparação mais inativada) quando comparadas às demais, que variaram entre 52 e 60 %.

Figura 14 – Efeito da inativação a pH 7 e 73 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (*R*)-metil mandelato e (C) (*S*)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)

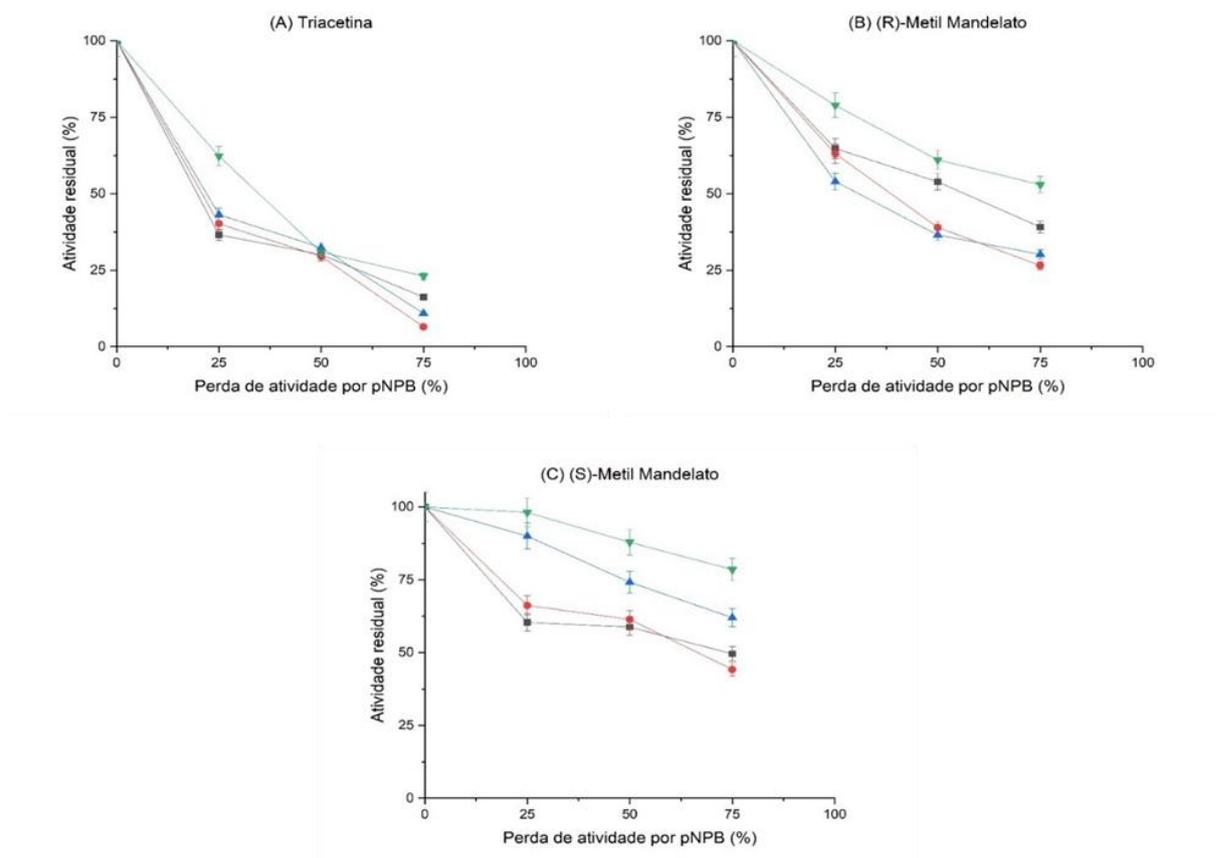


Fonte: elaborada pela autora (2022).

Finalmente, em pH 9 (FIGURA 15), usando a triacetina (FIG. 15A), as diferenças são relevantes apenas no bloqueio com HA, principalmente no primeiro ponto de inativação, em que a retenção da atividade é maior. Usando (*R*)-metil mandelato (FIGURA 15B), a preparação bloqueada com HA é a que reteve mais atividade (mais de 50 % no ponto mais inativado), seguida por aquela bloqueada com ASP (quase 40 % de retenção de atividade) e as outras duas preparações apresentaram cerca de 30 % da atividade inicial. Usando (*S*)-metil mandelato (FIGURA 15C), a maior retenção de atividade é mostrada pela preparação bloqueada

com HA (quase 80 %), seguida pelo bloqueio com EDA (mais de 60 %) e as outras duas preparações (menos de 50 %).

Figura 15 – Efeito da inativação a pH 9 e 71 °C na atividade residual de diferentes biocatalisadores da lipase de TLL contra diferentes substratos: (A) triacetina, (B) (*R*)-metil mandelato e (C) (*S*)-metil mandelato. Biocatalisadores bloqueados com ácido aspártico (■), glicina (●), EDA (▲) e hexilamina (▼)



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os resultados apresentados acima mostram que a perda de atividade quando a enzima é submetida à inativação térmica depende fortemente do substrato utilizado na determinação da atividade. Isso significa que durante a inativação, a especificidade da enzima muda, pois quando a enzima se inativa, a atividade contra um dos isômeros pode diminuir mais rapidamente que a atividade contra o outro isômero.

Uma prova das mudanças na especificidade da enzima durante sua inativação térmica é bem visível na atividade contra triacetina. Ela diminui mais rapidamente do que ao usar os outros substratos para todos os biocatalisadores e condições de inativação, em alguns

casos a atividade da enzima contra este substrato tornou-se quase nula, enquanto com alguns dos outros substratos, permaneceu acima de 70 %. Em relação à enantioespecificidade contra os isômeros do ácido mandélico, em alguns casos, a atividade diminuiu de forma semelhante com ambos os isômeros. Nesses casos, a enantioespecificidade permaneceu inalterada durante a inativação da enzima. No entanto, em outros casos, ela diminuiu mais rapidamente em relação ao isômero (*R*) ou (*S*), então a enantioespecificidade da enzima mudou durante o processo, alterando o desempenho do biocatalisador.

Além disso, o pH de inativação altera o modo em que a atividade de um biocatalisador é perdida em relação a cada substrato, sugerindo que as mudanças conformacionais produzidas durante a inativação podem ser diferentes, dependendo do pH de inativação. Pode-se observar que, em alguns casos, um biocatalisador perde mais rapidamente a atividade em relação a um substrato específico em um pH e isso ocorreu com outro substrato em outro valor de pH. Por exemplo, usando a preparação bloqueada com ASP (FIG. 9), a atividade residual é maior em pH 5 e 9 usando *p*NPB, mas em pH 7, a maior atividade residual após a inativação é usando (*R*)-metil mandelato. Usando EDA como agente de bloqueio (FIG. 11), em pH 5 a recuperação de atividade mais alta é obtida usando *p*NPB ou (*R*)-metil mandelato, enquanto em pH 9 a diminuição da atividade usando (*R*)-metil mandelato é a segunda pior. Da mesma forma, as mudanças na atividade contra os diferentes substratos não são semelhantes sob um valor de pH fixo usando um agente de bloqueio diferente.

Assim, infere-se que as mudanças conformacionais induzidas pela interação entre a enzima e o suporte, sob diferentes condições de inativação, produzem diferentes conformações enzimáticas. Para investigar conformações enzimáticas diferentes são geradas durante a inativação, foram realizadas análises dos espectros de fluorescência do Trp dos diferentes biocatalisadores.

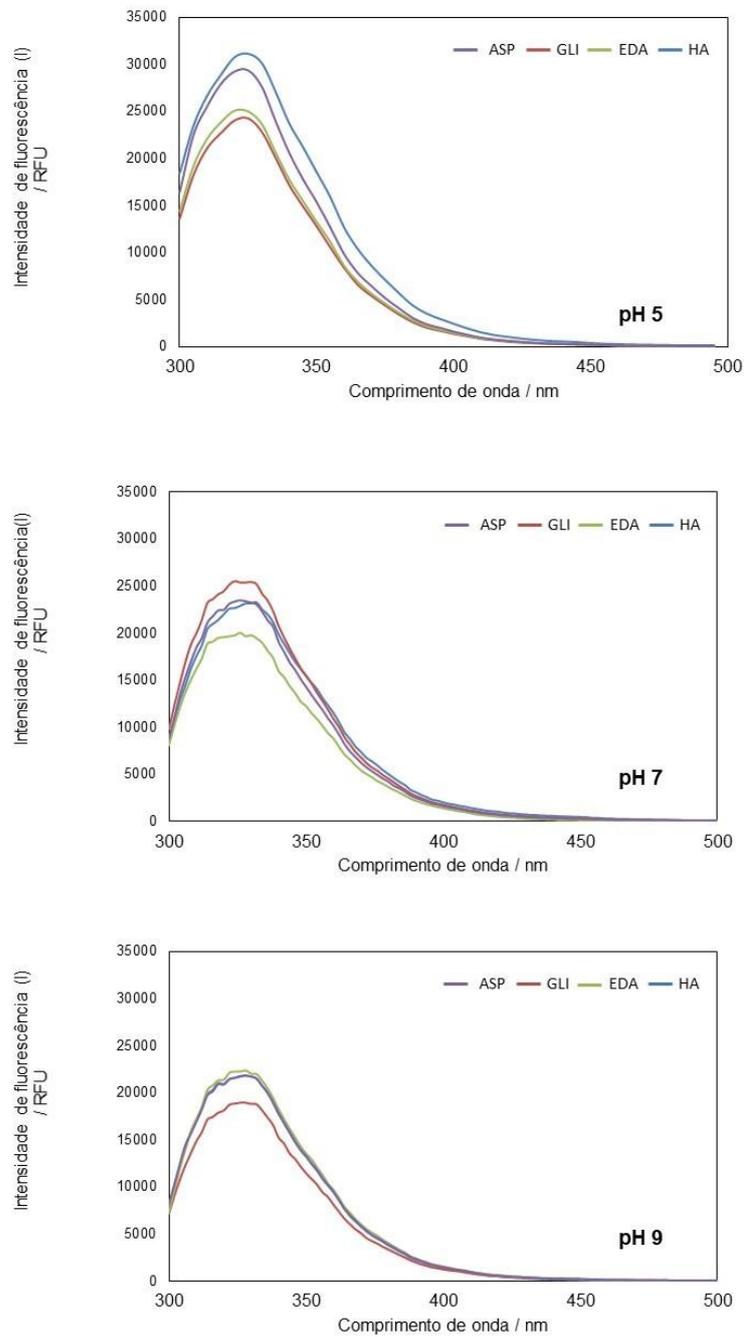
5.8 Espectroscopia de fluorescência dos biocatalisadores TLL

As amostras foram preparadas em Tris pH 7 por pelo menos uma semana antes de realizar as análises e, em seguida, elas foram realizadas sob as mesmas condições. Dessa forma, as diferenças encontradas devem ser derivadas de mudanças estruturais induzidas pelo agente de bloqueio ou pelas condições de inativação.

Primeiramente, foi analisado o efeito da natureza do agente de bloqueio na estrutura dos biocatalisadores imobilizados de TLL pela medida de seus espectros de fluorescência

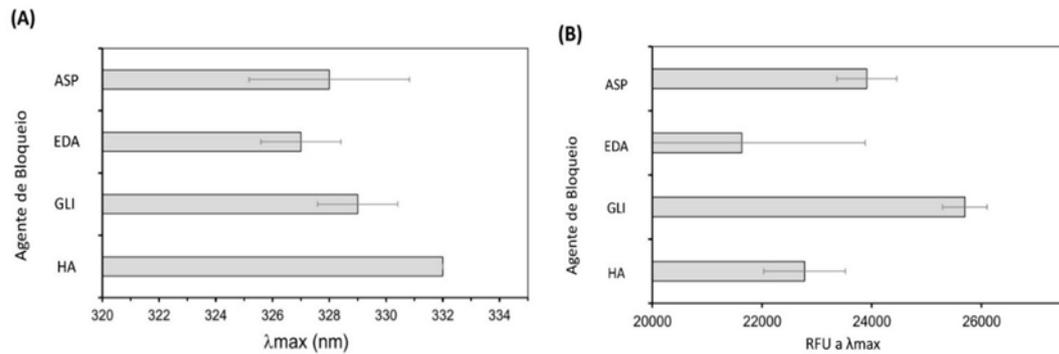
intrínseca (FIGURA 16). Foi possível observar que entre os biocatalisadores inativados a pH 5, 7 e 9 existem diferenças entre as intensidades de fluorescência de cada biocatalisador inativado. Em pH 5, HA foi o agente de bloqueio que mostrou a maior $I_{máx}$, já em pH 7, a glicina foi o bloqueio de maior $I_{máx}$, enquanto em pH 9, todos os agentes tiveram o $I_{máx}$ similar, com exceção da glicina, que teve um menor $I_{máx}$. A análise mais detalhada de tais espectros revelam que para os biocatalisadores bloqueados com ASP, EDA e GLI, o comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência ($\lambda_{máx}$) foi de aproximadamente 328 nm, enquanto usando HA como agente de bloqueio (FIGURA 17A), o $\lambda_{máx}$ apresentou um aumento de 4 nm. Este aumento é chamado de deslocamento para o vermelho (*red-shift*). Ao observar as intensidades de fluorescência ($I_{máx}$) no comprimento de onda máximo, existe uma relação dependente do tipo de agente de bloqueio (FIGURA 17B). O bloqueio com aminas como HA e EDA promoveu um decaimento significativo se o $I_{máx}$ for comparado ao observado para os biocatalisadores bloqueados com os aminoácidos GLI ou ASP. Esses espectros de fluorescência indicam que os biocatalisadores de TLL imobilizados sofreram grande distorção estrutural quando foram bloqueados com HA, explicando a atividade recuperada significativamente menor do biocatalisador imobilizado final (TABELA 5).

Figura 16 – Espectro de fluorescência intrínseca de biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes e inativados a pH 5 e 74 °C (A), pH 7 e 73 °C (B) e pH 9 e 71 °C (C)



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 17 – Análise de fluorescência dos biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes. (A) Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência. (B) Intensidade de fluorescência em Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) no comprimento de onda máximo (λ_{\max}) excitadas a 280 nm



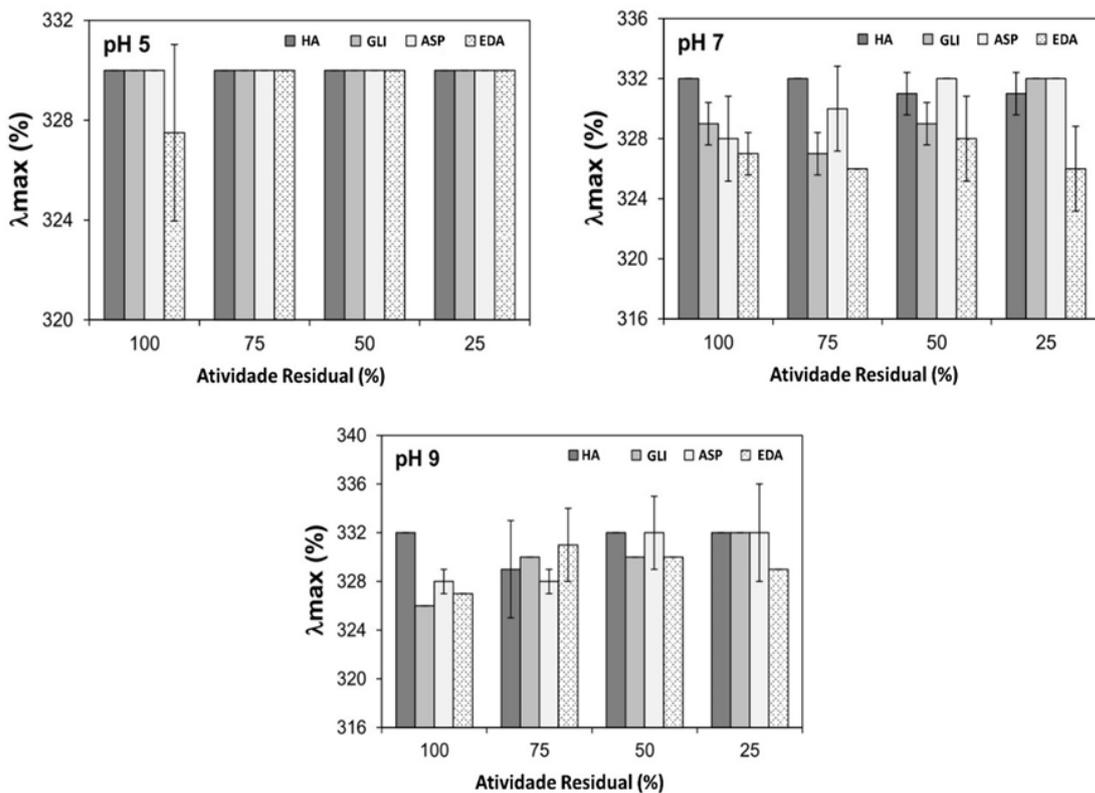
Fonte: elaborada pela autora (2022).

Durante o curso da inativação mostrado na FIGURA 8, foram retiradas amostras em diferentes porcentagens de atividade residual (75 %, 50 % e 25 %) para analisar sua fluorescência intrínseca. As FIGURAS 18 (λ_{\max}) e 19 (I_{\max}) evidenciam as diferentes distorções estruturais sofridas pelos biocatalisadores bloqueados com diferentes reagentes e inativados em diferentes condições de pH. Nos biocatalisadores inativados a pH neutro, observa-se um desvio para o vermelho de λ_{\max} quando os biocatalisadores foram bloqueados com ASP e GLI durante o curso de inativação (FIG. 18). Enquanto o λ_{\max} do biocatalisador bloqueado com HA permaneceu quase inalterado, independentemente do grau de inativação. Comportamentos semelhantes foram observados quando os biocatalisadores imobilizados foram inativados a pH 9. No entanto, em pH 5 o λ_{\max} foi invariável durante o curso de inativação em todos os casos (FIGURA 18).

Analisando o I_{\max} (FIGURA 19), pode-se perceber que o bloqueio com HA promoveu a distorção enzimática mais significativa (valores I_{\max} mais baixos) de todos os biocatalisadores imobilizados em pH 7 e 5, mas não em pH 9. Esses dados sugerem que a conformação de TLL é significativamente menos compactada quando o grupo HA tem carga positiva (pH 5-7) do que quando é mais neutro (pH 9) de acordo com o pKa da HA (cerca de 10,7). Esses resultados estão de acordo com a funcionalidade desses biocatalisadores imobilizados. Na FIGURA 6 é mostrado como o bloqueio de HA torna um biocatalisador imobilizado menos estável do que o bloqueio de GLI em condições de inativação de pH 5 e 7, no entanto, essas diferenças de estabilidade foram mitigadas em pH 9. Assim, os espectros de

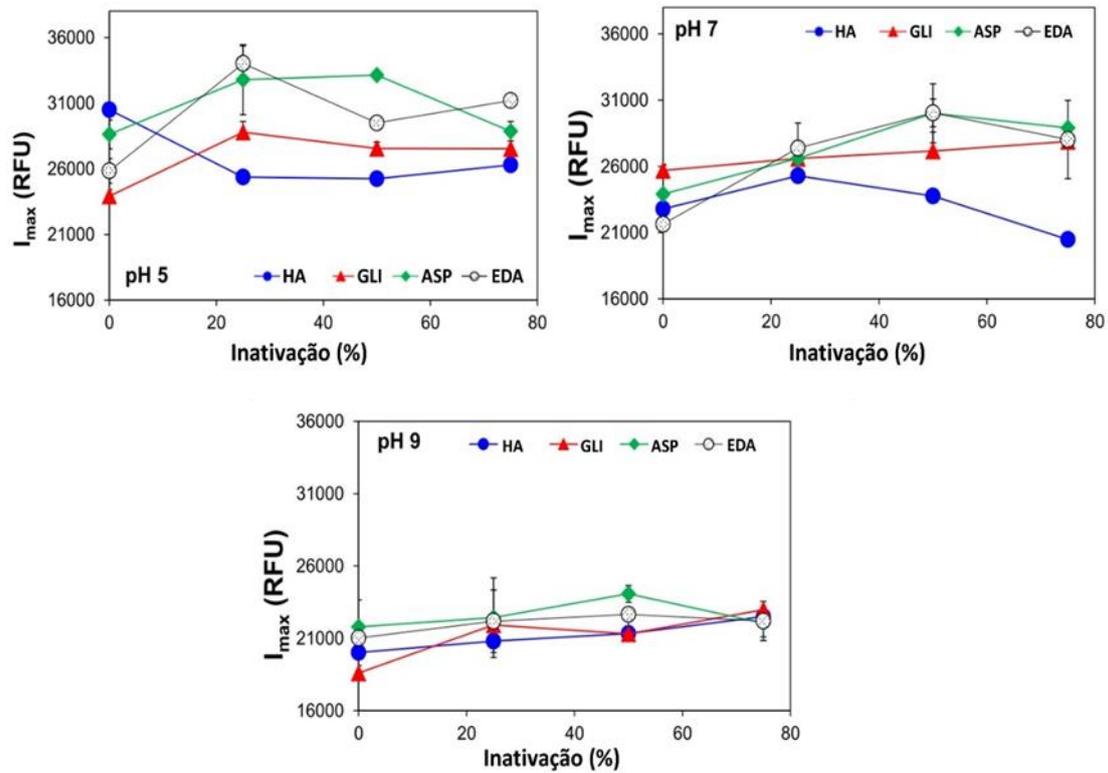
fluorescência dos biocatalisadores imobilizados inativados em pH neutro mostram que as distorções estruturais de TLL bloqueada com HA foram mais drásticas (valores baixos de I_{\max} e deslocamento de λ_{\max} para o vermelho) durante o curso de inativação do que aqueles observados usando biocatalisadores bloqueados com GLI. Em pH alcalino, essas diferenças estruturais entre as preparações bloqueadas com HA e GLI foram menos notórias, o que está de acordo com as estabilidades mais semelhantes exibidas pelo biocatalisador bloqueado com estes reagentes (FIGURA 8).

Figura 18 – Fluorescência intrínseca (λ_{\max}) dos biocatalisadores de TLL bloqueados com diferentes agentes e inativados a diferentes pH. Foram plotados a intensidade de fluorescência para diferentes biocatalisadores e graus de inativação. A atividade residual é a atividade do biocatalisador após ser incubado a diferentes pH e tempos



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 19 – Fluorescência intrínseca (I_{\max} a λ_{\max}) dos biocatalisadores de TLL bloqueados por diferentes graus de inativação dos mesmos. A porcentagem de inativação corresponde a atividade perdida pelos diferentes biocatalisadores ao serem incubados a determinada temperatura e Ph



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Dessa forma, os estudos de fluorescência confirmam que as estruturas iniciais dos biocatalisadores bloqueados com diferentes agentes são realmente distintas e que tanto o pH de inativação quanto o agente de bloqueio condicionaram a via de inativação da enzima.

PARTE II: Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

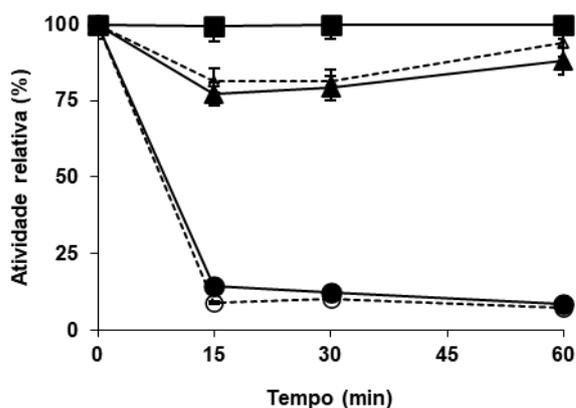
5.9 Imobilização de CALB em suportes de octil e octil-VS

CALB foi imobilizada utilizando a concentração de 1 mg de enzima por g de suporte. A baixa carga enzimática foi selecionada para evitar limitações difusionais (BAHAMONDES et al., 2017; BAHAMONDES; ILLANES, 2018) ou interações enzima-enzima que pudessem alterar os resultados (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017; ZAAK et al., 2017a). Apesar de a pH 5 a imobilização nos suportes ativadas com divinilsulfona ser muito baixa (DOS SANTOS et al., 2015a), a imobilização foi realizada nessa condição de pH (acetato de sódio 5 mM) para permitir, em uma primeira etapa, a ligação dos grupos octil via ativação interfacial e depois a formação das ligações covalentes com os grupos vinilsulfona.

Os cursos de imobilização são mostrados na FIGURA 20. Ambas as imobilizações foram rápidas, em torno de 15 minutos. Em soluções de baixa força iônica (por exemplo, fosfato de sódio 5-10 mM), lipases e diferentes fontes são adsorvidas rapidamente (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). A atividade do sobrenadante diminuiu rapidamente, enquanto a solução de enzima de referência foi mantida durante todo o curso da imobilização. A atividade enzimática de CALB diminuiu aproximadamente 10 % após imobilização em ambos suportes. Em geral, as lipases aumentam sua atividade quando imobilizadas em octil agarose (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019), entretanto isso não ocorre com a CALB, que apresentou uma diminuição na atividade. Esse fato se deve à sua composição estrutural apresentar uma “tampa” pequena que não isola totalmente o sítio ativo do meio reacional, assim ela não sofre a hiperativação proporcionada pela ativação interfacial (UPPENBERG et al., 1994).

Após a imobilização, o biocatalisador octil-VS-CALB foi suspenso em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 8,0 a 25 °C por 4 horas para favorecer a formação das ligações covalentes entre enzima e suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016). A TABELA 7 mostra a atividade enzimática durante a incubação. É possível observar que parte da atividade enzimática perdida pôde ser recuperada pela incubação em pH 8. Esse aumento na atividade enzimática pode ser explicado pelas alterações conformacionais produzidas pelas novas ligações covalentes formadas entre enzima e suporte que, neste caso, apresentou efeitos positivos na atividade enzimática (DOS SANTOS et al., 2015b, 2015d).

Figura 20 – Curso de imobilização de CALB (1 mg/g) em octil (linha tracejada) e octil-VS (linha sólida) a pH 5 e 25 °C. Atividade de referência (■); atividade da suspensão (▲); atividade do sobrenadante (●)



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Tabela 7 – Atividade enzimática de CALB usando pNPB como substrato durante a incubação em tampão carbonato de sódio 50 mM pH 8

Biocatalisador	Atividade relativa (%)
OC-VS-CALB (após a imobilização)	100 ± 4.2
OC-VS-CALB (0h de incubação)	78.7 ± 3.3
OC-VS-CALB (1h de incubação)	77.8 ± 1.5
OC-VS-CALB (2h de incubação)	85.5 ± 5
OC-VS-CALB (3h de incubação)	84.3 ± 2.2
OC-VS-CALB (4h de incubação)	84.1 ± 3.1

Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.10 Efeito do bloqueio nos biocatalisadores OC-VS-CALB

Após a formação de ligações covalentes no biocatalisador OC-VS-CALB, a etapa de bloqueio foi realizada para evitar reações descontroladas entre os grupos VS remanescentes (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015e; PINHEIRO et al., 2019). Desse modo, foi possível

analisar se eles conseguem modificar as interações enzima-suporte e, conseqüentemente, as características da enzima. Foram escolhidos agentes de bloqueio de diferentes naturezas físicas e químicas, como etilenodiamina (EDA), hexilamina (HA), glicina (GLI) e ácido aspártico (ASP). A incubação prosseguiu a pH 8,0 e à temperatura ambiente durante 24 horas.

A TABELA 8 mostra o efeito de cada agente de bloqueio na atividade dos biocatalisadores. Foi considerado como 100 % a atividade da preparação não bloqueada (incubada em pH 8 por 4 h). Apenas o biocatalisador bloqueado com EDA aumentou ligeiramente a atividade durante o bloqueio, e a preparação bloqueada com ASP apresentou a atividade mais diminuída, seguida pela bloqueada com HA e GLI. Portanto, o agente de bloqueio parece alterar as interações enzima-suporte, afetando a atividade final da enzima de forma diferente a depender das características adquiridas com o bloqueio, pois essa é a única diferença entre as preparações (ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018). Esse comportamento pode ocorrer devido à formação de mais ligações covalentes antes que o suporte seja bloqueado ou às novas interações físicas com os grupos do suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Tabela 8 – Efeito do agente de bloqueio no biocatalisador OC-VS-CALB. A atividade enzimática foi medida com *p*NPB durante a incubação com diferentes nucleófilos por 24 h a pH 8

Biocatalisador	Atividade relativa (%)
OC-VS-CALB	100 ± 3.7
OC-VS-CALB-Asp	75.9 ± 1
OC-VS-CALB-Gli	88.5 ± 4.7
OC-VS-CALB-EDA	104.6 ± 0
OC-VS-CALB-HA	77.6 ± 4.7

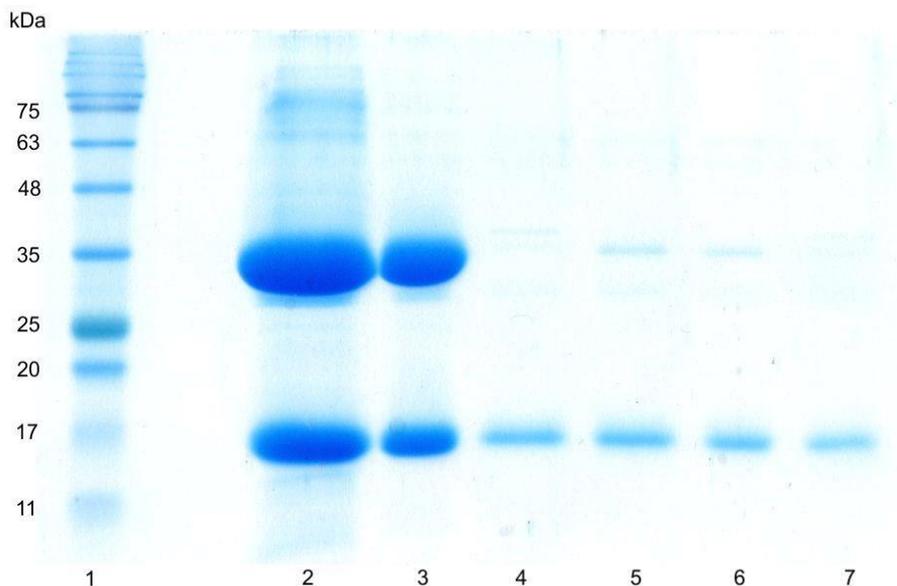
Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.11 Análise de SDS-PAGE

A análise de eletroforese em condições desnaturantes foi realizada para confirmar se as moléculas da enzima estão covalentemente ligadas ao suporte após a etapa de bloqueio. As amostras dos biocatalisadores foram inativadas a 100 °C na presença de tampão de ruptura,

estas condições devem liberar todas as enzimas adsorvidas ao suporte através de interações hidrofóbicas ou iônicas. A FIGURA 21 mostra o resultado da eletroforese de CALB livre (poço 2), os biocatalisadores OC-CALB (poço 3), OC-VS-CALB-ASP (poço 4), OC-VS-CALB-GLI (poço 5), OC-VS-CALB-EDA (poço 6) e OC-VS-CALB-HA (poço 7). As preparações bloqueadas revelaram que a maior parte da enzima estava covalentemente ligada ao suporte. No entanto, nos poços 5 e 6, uma pequena banda pode ser encontrada no peso molecular correspondente a CALB. O gel foi analisado no programa *Gel Analyzer* e representa menos de 10 % das moléculas de CALB imobilizadas. Isso mostra que alguma parte de toda a carga enzimática contida no biocatalisador não estava ligada covalentemente nas preparações bloqueadas com GLI e EDA.

Figura 21 – Análise de eletroforese SDS-PAGE das diferentes preparações de CALB. Poço 1: marcador de peso molecular. Poço 2: CALB livre (1 mg/ml). Poço 3: OC-CALB. Poço 4: OC-VS-CALB-Asp. Poço 5: OC-VS-CALB-Gly. Poço 6: OC-VS-CALB-EDA. Poço 7: OC-VS-CALB-HÁ



Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.12 Efeito da atividade dos biocatalisadores versus diferentes substratos

As atividades enzimáticas das diferentes preparações de CALB utilizando como substrato *p*NPB, triacetina e (*S*)-metil mandelato podem ser encontradas na TABELA 9. Para

todos os biocatalisadores analisados, a maior atividade foi obtida com *p*NPB, seguido de triacetina e (*S*)-metil mandelato. Usando *p*NPB, a atividade foi semelhante entre os agentes de bloqueio, exceto para HA, que foi cerca de 30 % menos ativo que o biocatalisador bloqueado com ASP com este substrato. A atividade versus triacetina foi maior para a preparação não bloqueada, enquanto a menos ativa foi aquela bloqueada com GLI e EDA, com atividades semelhantes.

Usando o isômero (*S*)- do metil mandelato, a atividade dos diferentes biocatalisadores foi menor do que os outros substratos, exceto para a preparação não bloqueada, que foi semelhante à sua atividade de triacetina e com cerca de 40 % mais atividade do que a segunda maior preparação para este substrato. Ao contrário de outros substratos, com (*S*)-metil mandelato o biocatalisador bloqueado com ASP obteve menor atividade do que nas outras preparações. Portanto, os biocatalisadores apresentaram especificidades diferentes em relação aos substratos analisados, indicando que, após o bloqueio e sem passar por etapas de inativações, os diferentes biocatalisadores já podem apresentar estruturas diferentes resultantes das novas interações formadas.

Tabela 9 – Atividade em U/g de diferentes biocatalisadores CALB imobilizados utilizando (*S*)-metil mandelato, triacetina e *p*NPB como substratos

Atividade (U/g de biocatalisador)				
Preparação de CALB	Agente de bloqueio	<i>p</i>NPB	Triacetina	(<i>S</i>)-metil mandelato
OC-CALB	-	340,6 ± 22,8	22,2 ± 0,4	18,8 ± 0,4
	ASP	378,7 ± 22,7	18,6 ± 0	8,7 ± 0,3
OC-VS-CALB	GLI	323,2 ± 7,1	15,4 ± 0,5	9,4 ± 0,2
	EDA	367,9 ± 5,6	15,6 ± 0,5	11,1 ± 0,2
	HA	269,2 ± 9,3	17,7 ± 0,2	8,9 ± 0,3

Fonte: elaborada pela autora (2022).

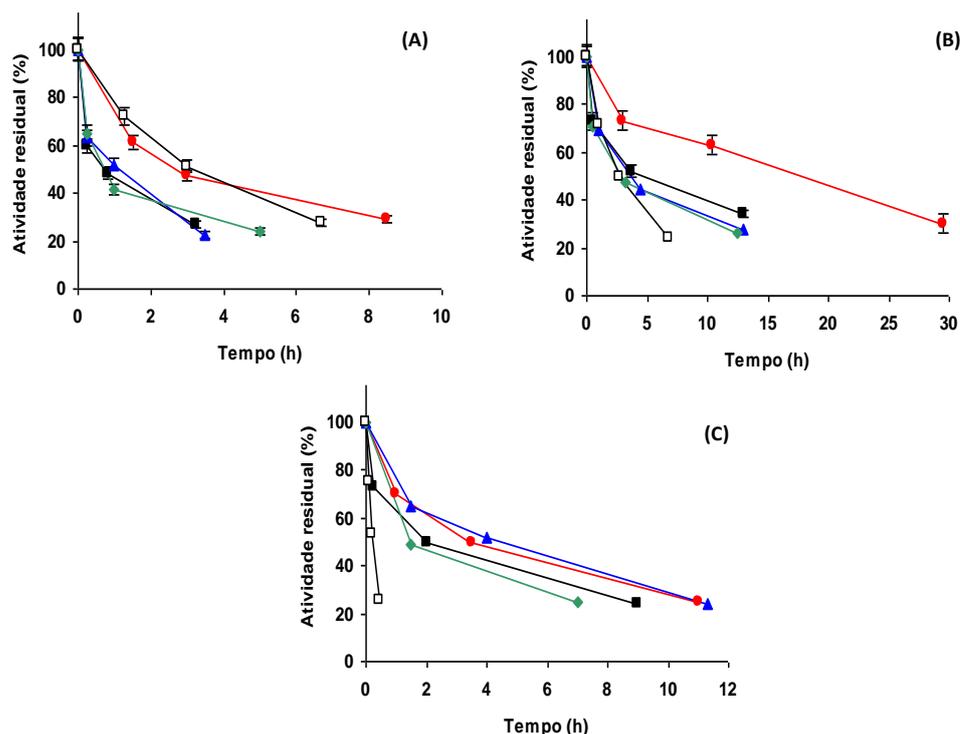
5.13 Inativações térmicas dos biocatalisadores CALB

Os biocatalisadores foram incubados em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 5,0 e 80 °C, Tris HCl 50 mM a pH 7,0 e 75 °C e carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0 e 60 °C. Durante cada incubação, amostras foram retiradas em diferentes porcentagens de atividade residual (75, 50 e 25 %) para analisar os efeitos da inativação térmica na especificidade da enzima e seu espectro de fluorescência.

A FIGURA 22 mostra os cursos de inativação de biocatalisadores em diferentes valores de pH. Em pH 5 e 7 (FIG. 22A e 22B), OC-VS-CALB-GLI foi a preparação bloqueada mais estável, enquanto em pH 9, o biocatalisador bloqueado com EDA foi o mais estável seguido pelo bloqueado com glicina. Como esperado, devido às ligações não covalentes deste biocatalisador, o OC-CALB, a preparação não bloqueada, perdeu sua atividade mais rapidamente. No entanto, isso somente ocorreu em pH 7 e 9 (FIG. 22B e 22C), já em pH 5, este biocatalisador foi o segundo mais estável.

De acordo com Dos Santos e colaboradores (2015), comparando a meia-vida obtida na inativação de preparações de CALB imobilizadas, a estabilidade de OC-CALB foi maior em pH 5 e 7 do que a de OC-VS-CALB bloqueado com EDA. A alta estabilidade térmica de lipases adsorvidas em suportes hidrofóbicos pode ser explicada pela conformação estável que a forma aberta das lipases adsorvidas apresenta. Dessa forma, são obtidas preparações mais estáveis do que as imobilizadas por ligação covalente em suportes ativados com grupos glioxil ou divinilsulfona (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Figura 22 – Cursos de inativação dos biocatalisadores OC-CALB (□), OC-VS-CALB-ASP (■), OC-VS-CALB-GLI (●), OC-VS-CALB-EDA (▲) e OC-VS-CALB-HA (◆). Condições de inativação: (A) Tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 80 °C; (B) Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0 e 75 °C; (C) Tampão carbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e 60 °C. Na inativação foi usado *p*NPB como substrato



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Considerando os biocatalisadores bloqueados, OC-VS-CALB-HA foi a preparação menos estável em pH 7 e 9 (FIG. 22B e 22C), enquanto em pH 5, OC-VS-CALB-ASP perdeu sua atividade mais rapidamente. A melhor estabilidade do biocatalisador bloqueado com glicina e a menor obtida com HA já foi descrita anteriormente (Seção 5.5 deste trabalho) com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). O uso da glicina como agente de bloqueio fornece ao biocatalisador uma natureza mista, contendo um grupo catiônico e aniônico, proporcionando maior estabilidade. Ao mesmo tempo, a hexilamina modifica o biocatalisador com uma superfície catiônica. Provavelmente as interações formadas entre enzima e suporte mantêm

estruturas enzimáticas errôneas durante a inativação, tornando-se prejudiciais à estabilidade da enzima (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2016).

5.14 Reativação enzimática usando *p*NPB como substrato

Para analisar se os biocatalisadores poderiam recuperar a atividade perdida durante a inativação térmica, quando incubados sob condições brandas, conforme relatado anteriormente (SOLER et al., 1997; SOUZA et al., 2021; SUESCUN et al., 2015), as atividades enzimáticas dos biocatalisadores parcialmente inativados foram medidas durante a inativação e após 24 h de incubação em pH 7 e 25°C para permitir a reativação enzimática (TABELA 10).

Nas amostras inativadas em pH 5, os biocatalisadores bloqueados com EDA apresentaram a maior atividade final na amostra mais inativada, passando de 23 para 64 % de atividade recuperada. Após 24 h de incubação, a maioria dos biocatalisadores recuperou alguma atividade, apresentando diferença estatística entre as amostras analisadas. No entanto, não houve aumento da atividade residual para o biocatalisador bloqueado com glicina. Para a amostra mais ativa (75 %), a atividade diminuiu e não houve diferença estatística entre as amostras mais inativadas (50 % e 25 %).

Analisando os biocatalisadores inativados em pH 7, o biocatalisador bloqueado com EDA mostrou uma maior recuperação de atividade para as amostras mais ativas (por exemplo, passou de 44 % para 69 %). O biocatalisador bloqueado com ASP aumentou a atividade após a incubação, mas apenas no ponto mais ativo. Os demais bloqueios não apresentaram diferença estatística. O biocatalisador bloqueado por glicina perdeu atividade em todos os pontos, e a perda mais acentuada foi no segundo ponto, cuja atividade diminuiu de 63 % para 39 %. O biocatalisador bloqueado por HA não apresentou diferença estatística entre as atividades durante e 24h após a inativação analisada neste pH.

Para a inativação a pH 9, os biocatalisadores bloqueados com glicina e EDA não apresentaram diferença estatística para os dois primeiros pontos e tiveram um aumento no último ponto (por exemplo, de 25 % para 34 %). Em contraste, o biocatalisador bloqueado por HA recuperou a maior atividade neste pH em todos os pontos (por exemplo, de 65 % a 83 %). O comportamento do biocatalisador bloqueado com EDA em pH 5 e 7, que recuperou maior atividade e em pH 9 aumentou levemente a atividade residual, é muito semelhante ao reportado para a enzima TLL (SOUZA et al., 2021).

Conforme relatado anteriormente, com uma simples reincubação em meio aquoso, os biocatalisadores podem sofrer processos de inativação/reativação e recuperar uma parte significativa de sua atividade perdida. Entretanto, esse processo é lento e fornece uma reativação incompleta (SOLER et al., 1997; SUESCUN et al., 2015). A superfície do suporte e as condições de inativação influenciam muito a atividade recuperada. Como mencionado anteriormente, o biocatalisador bloqueado com EDA pode recuperar valores de atividade mais elevados do que os demais agentes de bloqueio para todos os pHs analisados. Outro exemplo da influência das condições de inativação é a mudança na atividade recuperada do biocatalisador bloqueado com hexilamina. Em pH 7, não houve diferença na atividade recuperada após a incubação, mas em pH 9, foi possível recuperar a maior atividade entre os biocatalisadores.

Tabela 10 – Atividade residual dos diferentes biocatalisadores de CALB durante o curso de inativação, a pH 5 e 80 °C, pH 7 e 75 °C e pH 9 e 60 °C, e após 24 h de incubação a pH 7 e 25 °C usando *p*NPB como substrato. Médias na mesma linha e mesmo agente de bloqueio que compartilham da mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o Teste de Tukey ($p > 0,05$)

Condição de inativação		Atividade residual (%)							
		Asp		Gli		EDA		HA	
		Inativação	Após 24h	Inativação	Após 24h	Inativação	Após 24h	Inativação	Após 24h
pH 5	75%	60 ± 1,7 ^a	74 ± 0,2 ^b	61 ± 1,7 ^a	52 ± 0,5 ^b	63 ± 3,4 ^a	79 ± 0 ^b	65 ± 5,2 ^a	73 ± 1,7 ^a
	50%	48 ± 3,1 ^a	70 ± 3,2 ^b	47 ± 2,1 ^a	45 ± 2,1 ^a	52 ± 5,7 ^a	74 ± 0,2 ^b	41 ± 2,8 ^a	63 ± 0,2 ^b
	25%	27 ± 3 ^a	35 ± 0,2 ^a	29 ± 0,8 ^a	28 ± 0,4 ^a	23 ± 3,6 ^a	64 ± 0,2 ^b	24 ± 0,7 ^a	45 ± 0,9 ^b
pH 7	75%	73 ± 1,1 ^a	91 ± 1,2 ^b	73 ± 2,2 ^a	62 ± 1,1 ^b	69 ± 3,8 ^a	88 ± 2,3 ^b	71 ± 3 ^a	75 ± 2,8 ^a
	50%	52 ± 0,8 ^a	51 ± 3,1 ^a	63 ± 3,2 ^a	39 ± 0,7 ^b	44 ± 2,4 ^a	69 ± 3,4 ^b	47 ± 2,3 ^a	48 ± 1,8 ^a
	25%	34 ± 2,5 ^a	35 ± 1,4 ^a	29 ± 0,6 ^a	26 ± 0 ^a	28 ± 2,4 ^a	29 ± 0,8 ^a	26 ± 2,3 ^a	27 ± 1,2 ^a
pH 9	75%	73 ± 1 ^a	69 ± 2,3 ^a	70 ± 1,9 ^a	67 ± 1,2 ^a	65 ± 4,4 ^a	67 ± 1 ^a	65 ± 0 ^a	83 ± 2,1 ^b
	50%	49 ± 0 ^a	43 ± 2 ^b	49 ± 2,6 ^a	52 ± 0,9 ^a	52 ± 2,3 ^a	47 ± 1,6 ^a	49 ± 0 ^a	60 ± 1,4 ^b
	25%	24 ± 1 ^a	30 ± 0,8 ^b	25 ± 1,9 ^a	34 ± 0,6 ^b	24 ± 1,5 ^a	35 ± 0,3 ^b	25 ± 0,8 ^a	32 ± 1,8 ^b

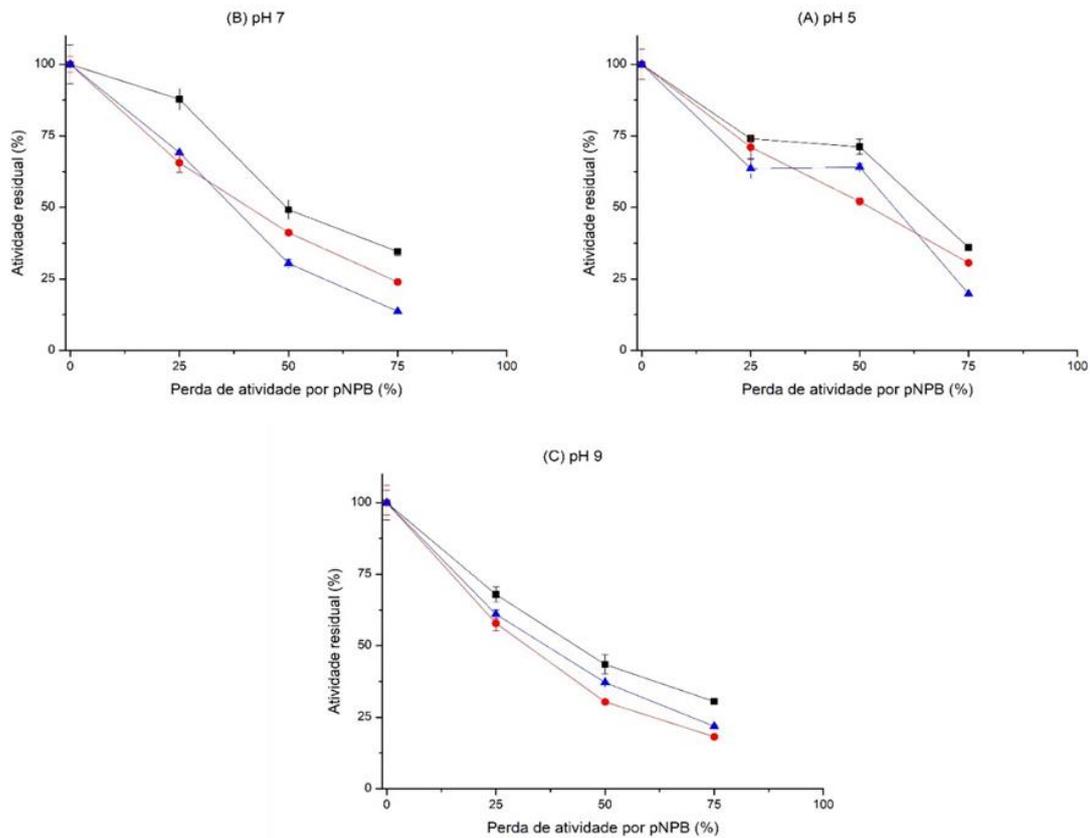
Fonte: elaborada pela autora (2022).

5.15 Especificidade enzimática de preparações de CALB inativadas

Diferentes estudos relatam que pequenas alterações no protocolo de imobilização enzimática podem alterar sua estrutura e modificar fortemente a especificidade da enzima (DOS SANTOS et al., 2015d; HERNANDEZ et al., 2011; LOKHA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2013; SOUZA et al., 2021; VERDASCO-MARTÍN et al., 2018). Então, foram analisadas as atividades dos diferentes biocatalisadores versus 3 substratos estruturalmente diferentes: triacetina, o mais semelhante aos substratos naturais da enzima (triglicerídeos), o isômero (*S*)-metil mandelato, e o monofuncional sintético *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB).

A FIGURA 23 mostra o efeito do pH da inativação nos biocatalisadores bloqueado com ASP, para isso, foram realizadas medidas de atividade contra os 3 substratos citados anteriormente. Em pH 5 (FIG. 23A), a atividade residual é melhor mantida usando *p*NPB como substrato, e a pior atividade retida é observada usando triacetina como substrato. Para os biocatalisadores inativados em pH 7 (FIG. 23B), a situação é muito semelhante à pH 5, com maior atividade recuperada usando *p*NPB como substrato. Por outro lado, quando foi usada a triacetina como substrato, a atividade diminuiu mais rapidamente. Em pH 9 (FIG. 23C), a situação foi um pouco diferente, o *p*NPB permaneceu como o substrato de maior atividade recuperada, mas o (*S*)-metil mandelato apresentou atividade ligeiramente inferior à triacetina. Considerando os níveis de inativação de cada biocatalisador, a atividade retida versus triacetina diminuiu de forma bastante semelhante, ligeiramente mais lenta em pH 5 do que em pH 7 e 9. Com (*S*)-metil mandelato, a atividade residual em pH 5 diminuiu mais lentamente do que nos outros dois valores de pH, enquanto em pH 9 foi ligeiramente mais rápida.

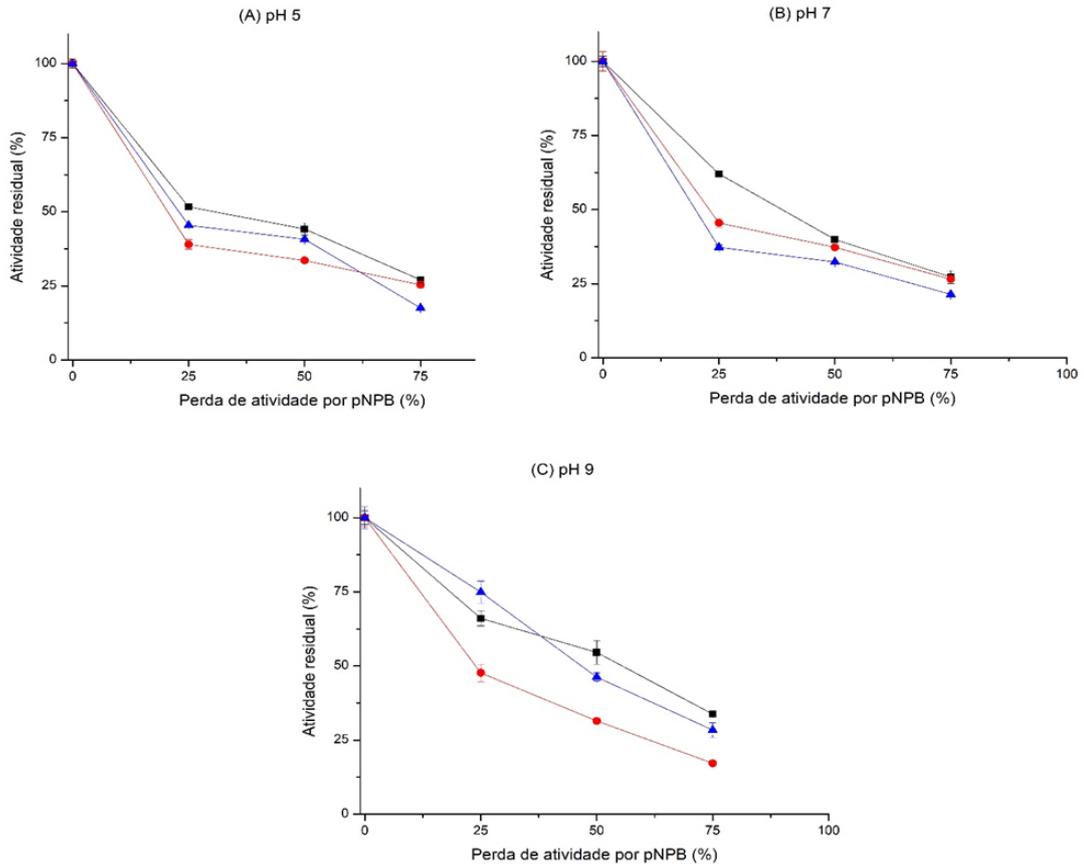
Figura 23 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com ácido aspártico contra os substratos *p*NPB (■), (*S*)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C



Fonte: elaborada pela autora (2022).

O efeito da inativação na atividade dos biocatalisadores bloqueados com glicina pode ser encontrado na FIGURA 24. Em pH 5 e 7 (FIG. 24A e 24B), observou-se que no primeiro ponto de inativação (25 % de perda de atividade de *p*NPB) houve uma queda acentuada na atividade para todos os substratos analisados. Entretanto, isso somente ocorreu em pH 9 (FIG. 24C) ao usar (*S*)-metil mandelato como substrato. Em pH 5 e 9, (*S*)-metil mandelato foi o substrato que teve a menor recuperação de atividade; enquanto a pH 7, foi a triacetina. Mais uma vez, *p*NPB foi o substrato que diminuiu sua atividade mais lentamente.

Figura 24 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com glicina contra os substratos *p*NPB (■), (*S*)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C

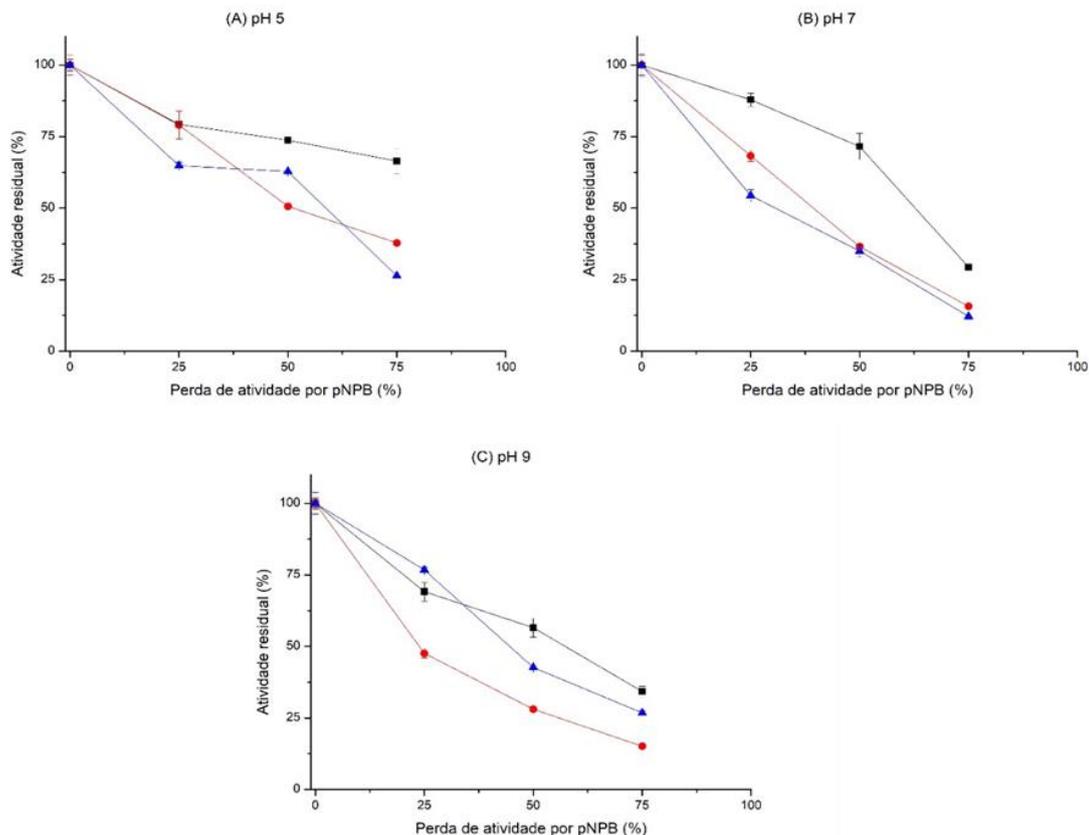


Fonte: elaborada pela autora (2022).

A FIGURA 25 mostra o efeito da atividade retida usando os biocatalisadores bloqueados com EDA. A pH 5 (FIG. 25A), a atividade residual é melhor mantida usando *p*NPB como substrato. Mesmo o biocatalisador mais inativado (75 % de perda de atividade de *p*NPB) aumentou sua atividade em 66 %. A pior recuperação de atividade é observada usando triacetina como substrato. Em pH 7 (FIG. 25B), a porcentagem de atividade retida versus *p*NPB diminuiu mais lentamente do que com os outros substratos, que se comportaram de forma semelhante. Por exemplo, em 50 % de perda de atividade, a recuperação da atividade por *p*NPB foi de 70 %, enquanto a triacetina e o (*S*)-metil mandelato foram cerca de 35 %. A pH 9 (FIG. 25C), a atividade enzimática residual diminuiu rapidamente com (*S*)-metil mandelato. No biocatalisador menos inativado (25 % de perda de atividade com *p*NPB), apenas 47 % de recuperação de

atividade foi obtida com (*S*)-metil mandelato, enquanto usando *p*NPB e triacetina foram cerca de 70 %.

Figura 25 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com EDA contra os substratos *p*NPB (■), (*S*)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60°C

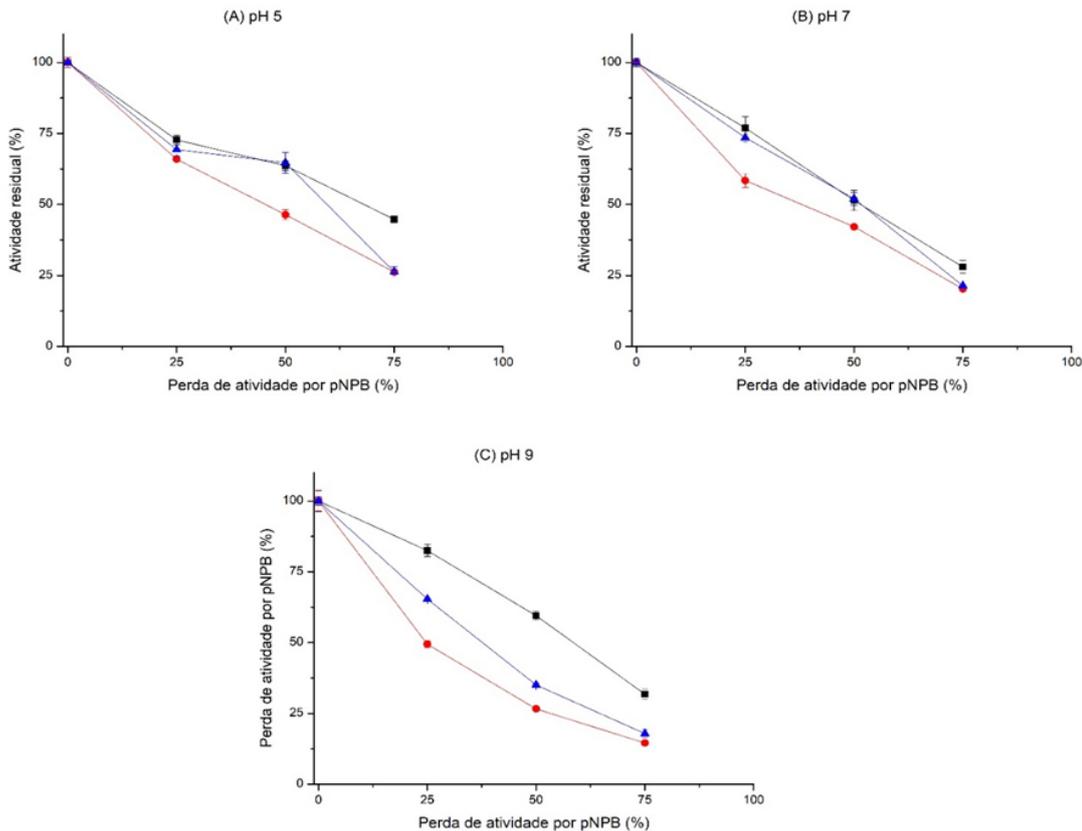


Fonte: elaborada pela autora (2022).

A FIGURA 26 mostra os biocatalisadores bloqueados com HA. Em pH 5 (FIG. 26A), a atividade recuperada no biocatalisador menos inativado (25 % de perda de atividade *p*NPB) foi muito semelhante para todos os substratos. Para os demais pontos, *p*NPB continuou sendo o substrato com maior atividade, seguido por triacetina e (*S*)-metil mandelato com menor recuperação de atividade. Em pH 7 (FIG. 26B), a recuperação da atividade de *p*NPB e triacetina foram similares para todas as porcentagens analisadas. A principal diferença neste pH foi a atividade do (*S*)-metil mandelato que diminuiu ligeiramente mais rápido do que com os outros dois substratos. As diferenças entre os substratos analisados em pH 9 (FIG. 26C) foram mais pronunciadas. A atividade recuperada usando *p*NPB como substrato foi a mais alta, seguida por

triacetina, e (*S*)-metil mandelato permanece como o substrato com a menor recuperação de atividade.

Figura 26 – Efeito do pH de inativação na atividade residual dos biocatalisadores CALB bloqueados com hexilamina contra os substratos *p*NPB (■), (*S*)-metil mandelato (●) e triacetina (▲). Condições da inativação: (A) pH 5,0 e 80 °C, (B) pH 7,0 e 75 °C e (C) pH 9,0 e 60 °C



Fonte: elaborada pela autora (2022).

As mudanças na atividade enzimática causadas por inativação térmica observadas ao utilizar diferentes substratos, evidenciam diferentes especificidades obtidas a partir das condições de preparo de cada biocatalisador. Por exemplo, usando EDA como agente de bloqueio em pH 5 e 7 (FIG. 25A e 25B), a atividade medida por *p*NPB é melhor mantida com uma diferença significativa se comparada as atividades recuperadas dos outros dois substratos (por exemplo, 71 % versus *p*NPB e cerca de 35 % versus triacetina e (*S*)-metil mandelato), mostrando uma preferência por *p*NPB. Em pH 9, essa diferença foi reduzida, e as atividades ficaram mais próximas entre os substratos.

Portanto, foi proposto que as diferentes interações produzidas entre enzima e suporte utilizando diferentes agentes bloqueadores e inativação térmica sob diferentes condições produziram mudanças conformacionais na enzima resultando em alterações na sua especificidade. O espectro de fluorescência do triptofano dos diferentes biocatalisadores foi realizado para analisar se diferentes conformações enzimáticas foram formadas durante a inativação.

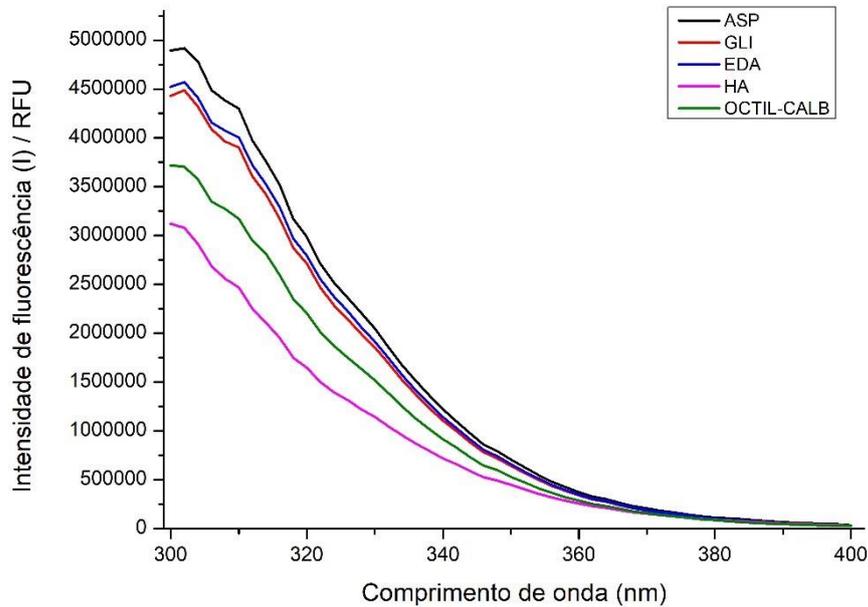
5.16 Espectroscopia de fluorescência dos biocatalisadores CALB

Com os resultados mostrados até agora, sugere-se que alterações na superfície da enzima causadas por diferentes agentes de bloqueio nos grupos vinilsulfona remanescentes e por diferentes condições de inativação alteraram significativamente as características da enzima, incluindo atividade, especificidade e estabilidade. A espectroscopia de fluorescência de resíduos de triptofano pode fornecer informações úteis sobre a estrutura de biomoléculas, dinâmica e interações de proteínas em solução (STOBIECKA; WYSOCKI; BRZOWSKI, 1998). Esta análise está relacionada principalmente à exposição dos resíduos de triptofano (Trp) ao solvente e é altamente suscetível à polaridade do microambiente (YADAV et al., 2020). A sequência de aminoácidos de CALB apresenta 5 resíduos de triptofano em sua estrutura (W52, W65, W104, W113 e W155) (UPPENBERG et al., 1994).

Antes da análise de fluorescência, todos os biocatalisadores foram mantidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7 por pelo menos uma semana. Assim, as alterações estruturais mostradas pela análise de fluorescência podem ser resultantes do agente de bloqueio ou das condições de inativação. O espectro de fluorescência intrínseca pode ser observado na FIGURA 27.

O espectro de fluorescência revela que antes das inativações já existe um perfil de fluorescência distinto entre os biocatalisadores, obtido a partir dos diferentes bloqueios. O biocatalisador bloqueado com ASP emitiu a maior intensidade de fluorescência, seguido pelo bloqueio com EDA e GLI. Em seguida, o octil-VS, biocatalisador não bloqueado, foi o que apresentou a segunda menor intensidade de fluorescência, e por fim o biocatalisador bloqueado com HA com a menor intensidade de fluorescência, o que corrobora com os baixos valores obtidos na atividade enzimática dos biocatalisadores bloqueados com este agente.

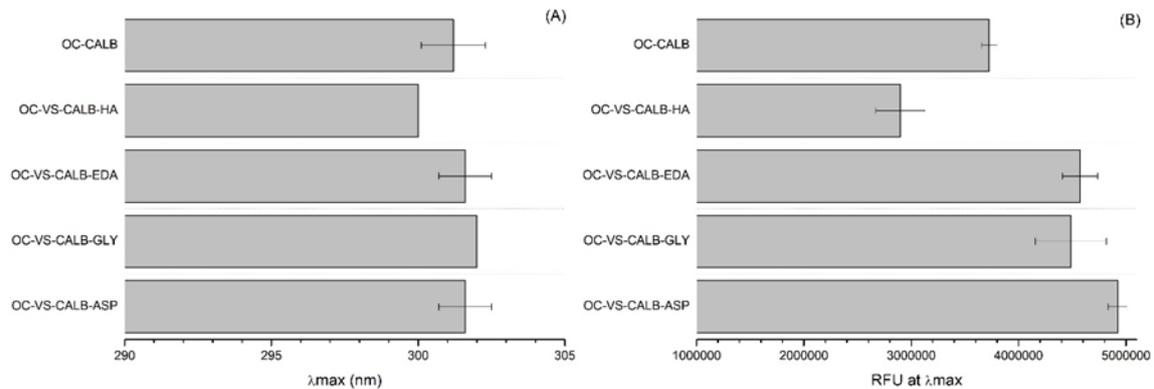
Figura 27 – Espectro de fluorescência intrínseca de octil-CALB e biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Analisando os dados do espectro com mais detalhes (FIGURA 28), usando ASP, GLI e EDA, o comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência (λ_{max}) foi de aproximadamente 302 nm, enquanto usando HA como agente de bloqueio, o λ_{max} foi de cerca de 300 nm (FIG. 28A). Na FIG. 28B, o I_{max} mostra que o bloqueio com HA promoveu uma diminuição na intensidade máxima de fluorescência quando comparado aos outros agentes. Esses espectros de fluorescência indicam que a CALB imobilizada sofre uma alteração estrutural quando bloqueado com HA, explicando a menor atividade recuperada do biocatalisador imobilizado (TABELA 9). Comportamentos semelhantes foram observados com HA como agente de bloqueio usando biocatalisadores TLL (SOUZA et al., 2021).

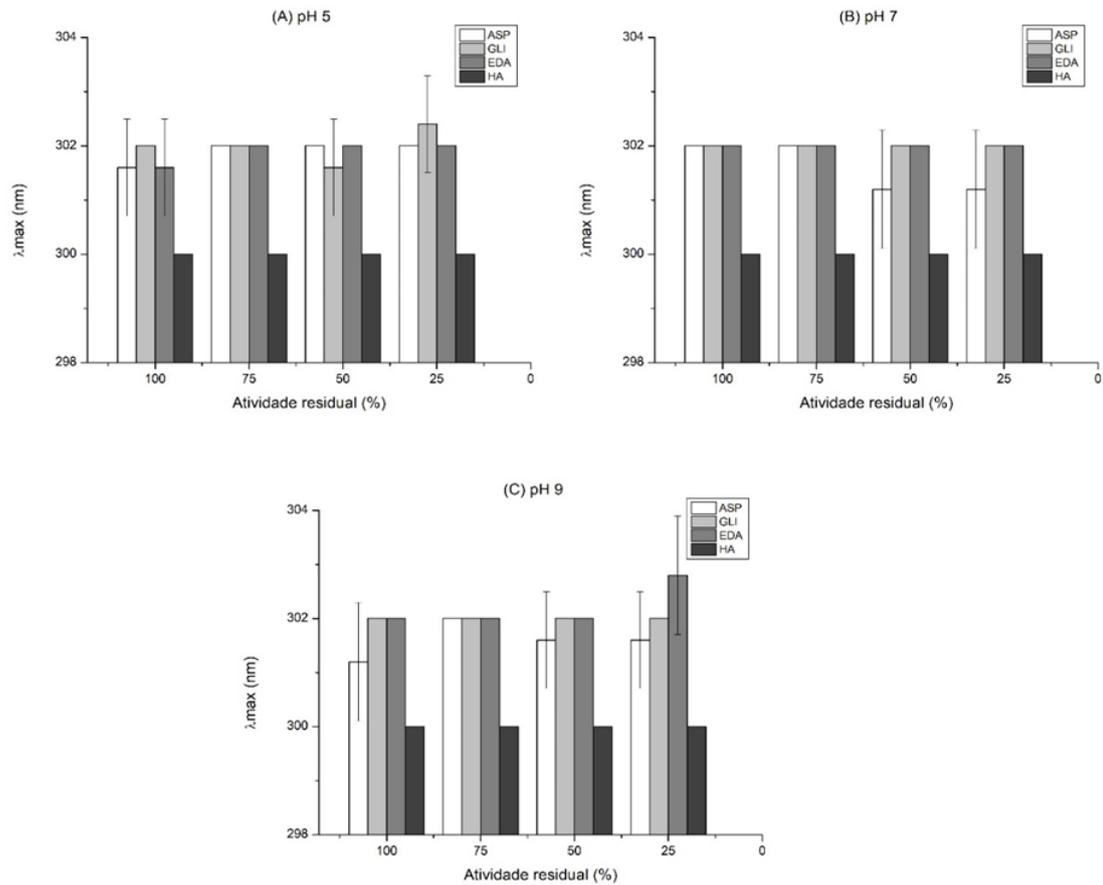
Figura 28 – Análise de fluorescência dos biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes. (A) Comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência. (B) Intensidade de fluorescência em Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) no comprimento de onda máximo (λ_{\max}) excitadas a 280 nm



Fonte: elaborada pela autora (2022).

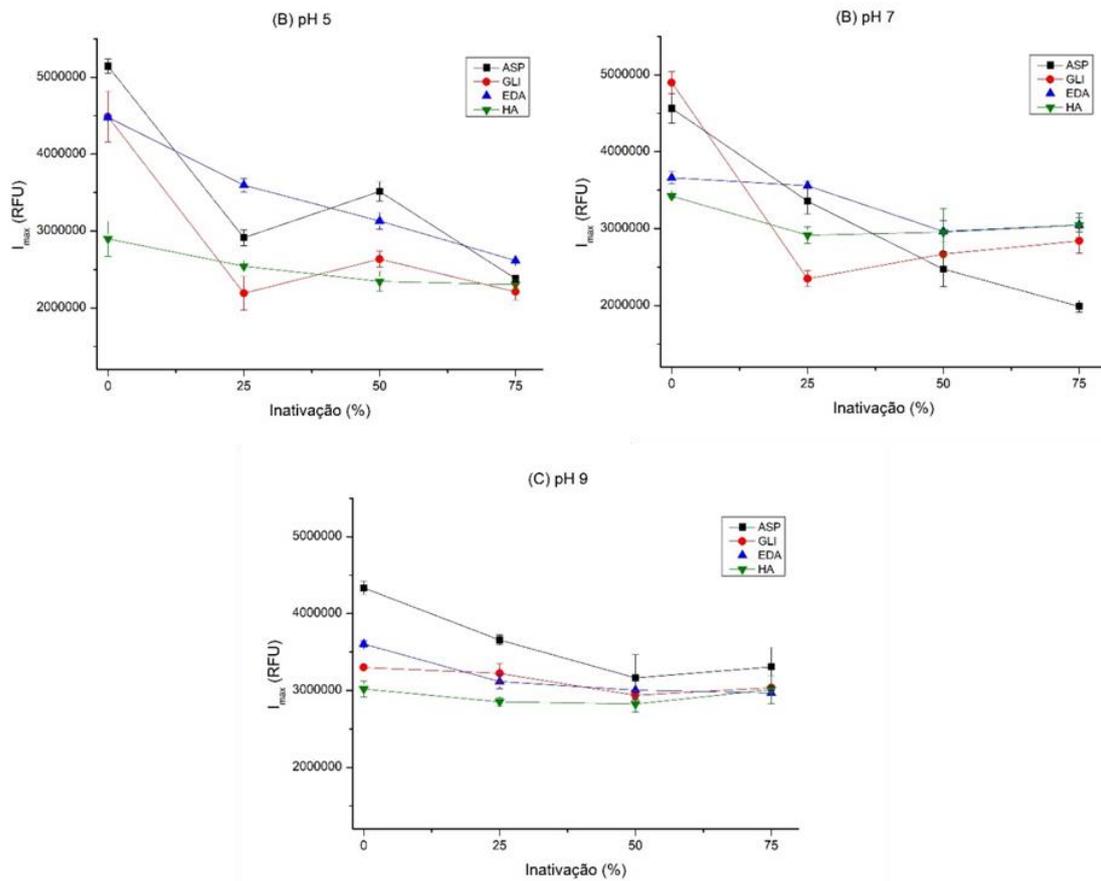
Analisando os espectros de fluorescência sob cada condição de pH, a FIGURA 29 mostra o comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência (λ_{\max}) e a FIGURA 30 mostra a fluorescência intrínseca (I_{\max}) em λ_{\max} . O bloqueio com HA não teve variação no comprimento de onda máximo em nenhuma porcentagem de inativação para todos os pH. Em pH 7, apenas no bloqueio com ASP, houve variação do comprimento de onda máximo. As demais foram mantidas para todas as porcentagens de inativação.

Figura 29 – Fluorescência intrínseca (λ_{\max}) dos biocatalisadores de CALB bloqueados com diferentes agentes e inativados a diferentes pH. Foram plotados a intensidade de fluorescência para diferentes biocatalisadores e graus de inativação. A atividade residual é a atividade do biocatalisador após ser incubado a diferentes pH e tempos



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 30 – Fluorescência intrínseca (I_{\max} a λ_{\max}) dos biocatalisadores de CALB bloqueados por diferentes graus de inativação dos mesmos. A porcentagem de inativação corresponde a atividade perdida pelos diferentes biocatalisadores ao serem incubados a determinada temperatura e Ph



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Considerando as intensidades de fluorescência em pH 5 e 7 (FIG. 30A e 30B), foi observado que os biocatalisadores mais ativos apresentaram maior intensidade de fluorescência se comparados aos mais inativados. Assim, nesse caso, existe uma relação direta entre a atividade enzimática e a intensidade de fluorescência. Em pH 9 (FIG. 30C), o bloqueio com ASP resultou em uma maior intensidade de fluorescência nos biocatalisadores de maior atividade e intensidade reduzida nos mais inativados. Os demais agentes de bloqueio inativados a pH 9 apresentaram uma pequena variação na intensidade de fluorescência entre os níveis de inativação. Em pH 7 e 9 (FIG. 30B e 30C), o bloqueio com HA apresentou menor intensidade de fluorescência, indicando distorção estrutural mais significativa. Em pH 5 e 7 (FIG. 30A e 30B) a 25 % de inativação, o biocatalisador bloqueado com glicina apresentou redução na

intensidade de fluorescência. Da mesma forma, essa diminuição foi observada na atividade enzimática contra os diferentes substratos. Embora a variação no comprimento de onda de intensidade máxima tenha sido pequena, analisando a intensidade de fluorescência emitida, pode-se observar que houveram mudanças entre os biocatalisadores não inativados e aqueles com diferentes níveis de inativação. A fluorescência do triptofano confirma que ocorreram mudanças na estrutura da enzima causadas por variações na exposição dos resíduos com o incremento da inativação.

PARTE III: Análise das interações dos biocatalisadores imobilizados de TLL e CALB

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se realizar uma análise comparativa entre as interações e características encontradas para as enzimas TLL e CALB.

Inicialmente, a etapa de imobilização em suporte octil ativado com divinilsulfona apresentou semelhanças entre ambas as enzimas, com uma imobilização rápida por adsorção aos grupos octil e alcançando uma atividade relativa acima de 80 % após a incubação em pH 8.

Na etapa de bloqueio com diferentes nucleófilos, a TLL imobilizada em suporte octil-VS bloqueada com HA apresentou uma redução atividade relativa para 58 %, sendo o único agente que apresentou uma redução após a incubação por 24 h. Enquanto no bloqueio do biocatalisador CALB, houve uma redução na atividade relativa para o bloqueio com ASP, GLI e HA, mas em nenhum caso essa redução foi tão drástica como ocorreu para a TLL no bloqueio com HA.

Analisando as diferenças entre a especificidade enzimática dos biocatalisadores bloqueados e avaliados contra diferentes substratos, pode-se observar que para a CALB tais diferenças de especificidade entre os bloqueios foram menores que as encontradas anteriormente usando TLL. Portanto, as preparações imobilizadas com CALB e bloqueadas produziram maior variedade na especificidade aos substratos analisados.

Para os biocatalisadores bloqueados com glicina, as atividades residuais contra triacetina foram similares ao encontrado usando biocatalisadores bloqueados com aspártico, sendo a pior entre os substratos analisados. Em pH 7, quando ainda se mantém 75 % da atividade inicial usando (R)-metil mandelato como substrato, somente 5 % foi mantida usando triacetina.

Em relação às diferenças de estabilidade térmica sob diferentes pH causadas pelo agente de bloqueio, para ambas as enzimas o bloqueio com glicina foi o que forneceu maior estabilidade aos biocatalisadores, com no mínimo 7 horas para a perda de aproximadamente 75 % da atividade enzimática em todos os pH analisados.

Analisando o efeito do pH nos biocatalisadores parcialmente inativados, é possível notar que a TLL apresentou diferenças mais significativas entre as atividades de um mesmo biocatalisador quando medido com substratos diferentes. Indicando que a TLL ao ser inativada muda a sua especificidade. Isso pode ser notado pela diminuição mais rápida da atividade de um biocatalisador com um substrato e mais lenta com o mesmo biocatalisador e usando outro substrato em uma mesma condição de inativação. Por exemplo, no bloqueio com glicina, a TLL

inativada em pH 7 ainda mantém 75 % da atividade inicial usando (*R*)-metil mandelato como substrato, e somente 5 % foi mantida usando triacetina. Diferenças de especificidade foram mais sutis ao analisar o comportamento dos biocatalisadores de CALB.

Por fim, a análise da estrutura tridimensional dos biocatalisadores por fluorescência mostrou que, durante a inativação, as distorções estruturais sofridas tanto por TLL como por CALB bloqueada com HA foram mais drásticas do que com os outros bloqueios, justificando também a menor atividade desse biocatalisador em algumas condições. Como esse resultado se repetiu com ambas as enzimas, pode-se concluir que o bloqueio com HA não alcançou a estabilização, atividade e especificidade desejadas para o desenvolvimento de um biocatalisador robusto, sendo os demais bloqueios opções melhores para esse objetivo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a complexidade da inativação enzimática. Foi demonstrado que a inativação de biocatalisadores imobilizados de TLL e de CALB dependem da possibilidade de estabelecer diferentes interações enzima-suporte e das condições de inativação. Funcionalmente, foi demonstrado como a especificidade da enzima é alterada durante a inativação pela diminuição da atividade mais rápida com alguns substratos do que com outros substratos, e essas mudanças dependem da natureza do agente de bloqueio e do pH de inativação. Da mesma forma, foi demonstrado por análise de fluorescência que a conformação enzimática inicial já dependia do agente de bloqueio e que as mudanças causadas pelas condições de inativação também eram determinadas pela superfície do suporte e pelo pH de inativação. Este trabalho foi realizado com auxílio de estudos funcionais e estruturais, e permite que novas questões sobre o desenvolvimento e uso de biocatalisadores sejam estudadas, verificando a estabilidade do biocatalisador nas condições operacionais e usando substratos alvo.

Como trabalhos futuros, os estudos podem ser ampliados para a investigação da influência de outras condições de inativação na conformação enzimática. Como exemplo, pode-se citar o uso de solventes orgânicos, alta força iônica e presença de compostos estabilizantes/desestabilizantes. Também podem ser analisadas matrizes de diferentes grupos funcionais e enzimas com características distintas da TLL e CALB. Assim, pode-se aumentar a compreensão sobre o comportamento de biocatalisadores imobilizados sob condições de inativação, permitindo a utilização de substratos específicos e direcionados para cada aplicação dos biocatalisadores.

REFERÊNCIAS

- ABREU SILVEIRA, E.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; PESTANA MAMEDE, R.; TARDIOLI, P. W.; SANCHEZ FARINAS, C.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J. M. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017.
- ABREU SILVEIRA, E.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; PESTANA-MAMEDE, R.; TARDIOLI, P. W.; SANCHEZ-FARINAS, C.; CASTEJON, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ROCHA-MARTIN, J.; GUI SAN, J. M. Biocatalyst engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 289, p. 126–134, 2019.
- ALBUQUERQUE, T. L. D.; RUEDA, N.; DOS SANTOS, J. C.S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BINAY, B.; ÖZDEMİR, E.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 865–874, 2016.
- ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 181–204, 1998.
- ARANA-PEÑA, S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; RIOS, N. S.; ORTIZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 131, p. 989–997, 2019.
- ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES, D.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; LOKHA, Y.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effects of enzyme loading and immobilization conditions on the catalytic features of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl-agarose beads. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 36, p. 1–13, 2020a.
- ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES, D.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, [s. l.], v. 362, p. 130–140, 2020b.
- ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. e2735, 2019.
- ARCA-RAMOS, A.; KUMAR, V. V.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; CABANA, H. Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater. **Environmental Science and**

Pollution Research, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 8929–8939, 2016.

BAHAMONDES, C.; ÁLVARO, G.; WILSON, L.; ILLANES, A. Effect of enzyme load and catalyst particle size on the diffusional restrictions in reactions of synthesis and hydrolysis catalyzed by α -chymotrypsin immobilized into glyoxal-agarose. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 53, p. 172–179, 2017.

BAHAMONDES, C.; ILLANES, A. Effect of internal diffusional restrictions on the selectivity of α -chymotrypsin in a series-parallel reaction of peptide synthesis. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 68, p. 117–120, 2018.

BARBOSA, O. et al. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). **New Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 844–850, dez. 2010.

BARBOSA, O.; ARIZA, C.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, [s. l.], 2013.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.

BAYRAMOGLU, G.; AKBULUT, A.; OZALP, V. C.; ARICA, M. Y. Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 95, p. 12–21, 2015.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 130, p. 462–482, 2019.

BINHAYEEDING, N.; KLOMKLAO, S.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed immobilised lipases on polyhydroxyalkanoate. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 162, p. 1819–1827, 2020.

BONOMI, P.; BAVARO, T.; SERRA, I.; TAGLIANI, A.; TERRENI, M.; UBIALI, D. Modulation of the microenvironment surrounding the active site of penicillin G acylase immobilized on acrylic carriers improves the enzymatic synthesis of cephalosporins. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 14349–14365, 2013.

CARRASCO-LÓPEZ, C.; GODOY, C.; RIVAS, B. L.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; HERMOSO, J. A. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 7, p. 4365–4372, 2009.

CAVALCANTE, F. T. T.; SIMAO NETO, F.; FALCÃO, I. R. A.; SOUZA, J. E. S.; MOURA JUNIOR, L. S.; SOUSA, P. S.; ROCHA, T. G.; SOUSA, I. G.; GOMES, P. H. L.; SOUZA,

M. C. M. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, [s. l.], v. 288, p. 119577, 2020.

CHAN, F. T.s.; PINOTSI, D.; GABRIELE, S.; SCHIERLE, K.; KAMINSKI, C. F. Structure-specific intrinsic fluorescence of protein amyloids used to study their kinetics of aggregation. In: **Bio-nanoimaging: Protein Misfolding and Aggregation**, [s. l.], p. 147–155, 2013.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter sp.* lipase: Kinetic resolution of fluoxetine intermediate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 42, n. 1–2, p. 39–44, 2006.

CHOJNACKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Production of structured phosphatidylcholine with high content of myristic acid by lipase-catalyzed acidolysis and interesterification. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 281, 2018.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; YAMAGUCHI, S.; JOERGER, R.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. Current progress, in crystallographic studies of new upases from filamentous fungi. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 551–557, 1994.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 1983–1991, 2009.
EFTIN, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: **Methods of Biochemical Analysis**, [s. l.], v. 35, p. 127–205, 1991.

FACCHINI, F. et al. Immobilization effects on the catalytic properties of two *Fusarium verticillioides* lipases: Stability, hydrolysis, transesterification and enantioselectivity improvement. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 84, p. 1–17, 2018.

FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; GUAZZARONI, M.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; BELOQUI, A.; FERRER, M. Metagenomic era for biocatalyst identification, **Current Opinion In Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 725–733, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 98, p. 18–25, 2017.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W. R.;

GOLYSHINA, O. V.; GOLYSHIN, P. N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: Current status and future trends. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 22–34, 2016.

FU, J.; REINHOLD, J.; WOODBURY, N. W. Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. e18692, 2011.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [s. l.], v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GERITS, L. R.; PAREYT, B.; DELCOUR, J. A. A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 156, p. 190–196, 2014.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 2014.

GUEZANE-LAKOUD, S.; TOFFANO, M.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L. Promiscuous lipase catalyzed a new P–C bond formation: Green and efficient protocol for one-pot synthesis of α -aminophosphonates. **Heteroatom Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. e21408, 2017.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-VERDUGO, E.; PORCAR, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6–7, p. 510–517, 2011.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 873–878, 2011.

HERRERA-MÁRQUEZ, O.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; PILAMALA, M.; JÁCOME, M.B.; LUZÓN, G. Stability studies of an amylase and a protease for cleaning processes in the food industry. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 117, p. 64–73, 2019.

HØEGH, I.; PATKAR, S.; HALKIER, T.; HANSEN, M. T. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 73, n. S1, p. 869–875, 1995.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HBALIĆ, D.; ĆALIĆ, A.; TUŁEK, A. J.; SOKAČ, T.; BREKALO, K.; ZELIĆ, B.; TRAN, N.

N.; HESSEL, V.; TILMA, M. Sustainable production of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Process optimization and enzyme characterization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 59, n. 48, p. 21144–21154, 2020.

ILAN, E.; MORTON, P. G.; CHANG, T. M. S. The anaerobic reaction of bovine hemoglobin with divinyl sulfone: structural changes and functional consequences. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1163, n. 3, p. 257–265, 1993.

JACOB, J. J.; SUTHINDHIRAN, K. Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 25, p. e00422, 2020.

JHA, B.K.; SVENSSON, M.; KRONBERG, B.; HOLMBERG, K. Titration microcalorimetry studies of the interaction between Humicola lanuginosa lipase and ionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 213, n. 1, p. 262–264, 1999.

KATSIMPOURAS, C.; STEPHANOPOULOS, G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. **Current Opinion in Biotechnology Elsevier Ltd**, [s. l.], 2021.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 269–278, 2006.

KORNECKI, J. F.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLING, R.; SIAR, E. H.; KASHEFI, S.; CHAFIAA, M.; ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Influence of phosphate anions on the stability of immobilized enzymes. Effect of enzyme nature, immobilization protocol and inactivation conditions. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 95, p. 288–296, 2020.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Baltimore, Maryland, USA: Springer New York, NY, 2006.

LIMA, R. N.; ANJOS, C. S.; OROZCO, E. V. M.; PORTO, A. L. M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, [s. l.], v. 466, p. 75–105, abr. 2019.

LIMA, R. N.; PORTO, A. L. M. Biocatalytic aminolysis of ethyl (S)-mandelate by lipase from *Candida antarctica*. **Catalysis Communications**, [s. l.], v. 100, p. 157–163, 2017.

LIU, H.; DU, W.; DONG, X.; SUN, Y. Integrative refolding and purification of histidine-tagged protein by like-charge facilitated refolding and metal-chelate affinity adsorption. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1344, p. 59–65, 2014.

LIU, H.; DONG, X.; SUN, Y. Enhanced protein adsorption and facilitated refolding of like-charged protein with highly charged silica nanoparticles fabricated by sequential double modifications. **Langmuir**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 655–658, 2015.

LIU, J.; MA, R. T.; SHI, Y. P. Recent advances on support materials for lipase

immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods - A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1101, p. 9–22, 2020.

LOKHA, Y.; ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 133, p. 1–9, 2020.

LOMBARDO, D.; GUY, O. Effect of alcohols on the hydrolysis catalyzed by human pancreatic carboxylic-ester hydrolase. **BBA - Enzymology**, [s. l.], v. 657, n. 2, p. 425–437, 1981.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C.s.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 71, p. 53–57, 2015.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M.; TAM, A.; DAMINATI, M. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 629–634, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; BOLIVAR, J. M.; GODOY, C. A.; ROCHA-MARTIN, J.; PESSELA, B. C.; CURIEL, J. A.; MUÑOZ, R.; GUIBAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 2010.

MCDONALD, A. G.; TIPTON, K. F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. **The FEBS Journal**, [s. l.], 2021.

MEDINA-CASTILLO, A. L.; MORALES-SANFRUTOS, J.; MEGIA-FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ-SANCHEZ, J. F.; SANTOYO-GONZALEZ, F.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Novel synthetic route for covalent coupling of biomolecules on superparamagnetic hybrid nanoparticles. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 19, p. 3944–3953, 2012.

MONTEIRO, R. R. C.; ARANA-PEÑA, S.; ROCHA, T. N.; MIRANDA, L. P.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TARDIOLI, P. W.; SANTOS, J. C.s.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, [s. l.], v. 164, p. 1566–1587, 2021.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; KERMANSHAHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 234, p. 190-213, 2018.

NGUYEN, H. H.; LEE, S. H.; LEE, U. J.; FERMIN, C. D.; KIM, M. Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 121, 2019.

NIELSEN, T. B.; ISHII, M.; KIRK, O. Lipases A and B from the yeast. **Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms**, [s. l.], p. 49–61, 1999.

NC-IUBMB. **Enzyme Nomenclature**. 2023. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>>. Acesso em: 01 fev. 2022.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, O. S.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 1088–1093, 2018.

ORTEGA-MUÑOZ, M.; MORALES-SANFRUTOS, J.; MEGIA-FERNANDEZ, A.; LOPEZ-JARAMILLO, F. J.; HERNANDEZ-MATEO, F.; SANTOYO-GONZALEZ, F. Vinyl sulfone functionalized silica: A “ready to use” pre-activated material for immobilization of biomolecules. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 34, p. 7189–7196, 2010.

ORTIZ, C. et al. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2380–2420, 2019.

PALLA, C. A.; CARRÍN, M. E. Kinetics modeling of the acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases for production of structured lipids from sunflower oil. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 90, p. 184–194, 2014.

PALOMO, J. Modulation of enzymes selectivity via immobilization. **Current Organic Synthesis**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–14, 2009.

PALOMO, J. M.; PEÑAS, M. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; PISABARRO, A. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RAMÍREZ, L.; GUISÁN, J. M. Solid-phase handling of hydrophobins: Immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 204–210, 2003.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1038, n. 1–2, p. 267–273, 2004.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize

and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.

PATEL, H.; RAY, S.; PATEL, A.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 28, p. 101731, 2020.

PATEL, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1252–1274, 2018.

PENG, L.; XU, X.; MU, H.; HØY, C.; ADLER-NISSEN, J. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 523–532, 2002.

PHUKON, L. C.; CHOURASIA, R.; KUMARI, M.; GODAN, T. K.; SAHOO, D.; PARAMESWARAN, B.; RAI, A. K. Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 309, p. 123352, 2020.

PINHEIRO, B. B.; RIOS, N. S.; AGUADO, E. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T. M.; FECHINE, P. B. A.; SANTOS, J. C.; GONÇALVES, L. R. B. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 130, p. 798–809, 2019.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, [s. l.], v. 490, p. 50–56, 2015.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Transesterification of waste frying oil and soybean oil by combi-lipases under ultrasound-assisted reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 186, n. 3, p. 576–589, 2018.

PORATH, J.; LS, T.; JANSON, J. C. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. III. Rigid agarose gels cross-linked with divinyl sulphone (dvs). **Journal of chromatography**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 49–62, 1975.

PRECZESKI, K. P.; KAMANSKI, A. B.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; MODKOSKI, T. A.; ROSSETTO, V.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; MOSSI, A. J. Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 851–857, 2018.

PUBCHEM. **Divinyl sulfone**. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Divinyl-sulfone>>. Acesso em: 01 fev. 2022.

REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future.

Journal of the American Chemical Society, [s. l.], v. 135, n. 34, p. 12480–12496, 2013.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; SANTOS, J. C. S.; FONSECA, T. S.; LIMA, L. D.; MATTOS, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SILVA, I. J.; RODRÍGUEZ-AGUADO, E.; GONÇALVES, L. R. B. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 133, p. 246–258, 2016.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; LIMA, M. L. B.; FREIRE, D. M. G.; SILVA, I. J.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; SANT'ANA, H. B.; MACEDO, A. C.; GONÇALVES, L. R. B. Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 129, p. 12–24, 2018.

RIOS, N. S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; ARANA-PEÑA, S.; RUEDA, N.; ORTIZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1867, n. 9, p. 741–747, 2019.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 963–968, 2009.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C.s.; BERENQUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 682–688, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 64, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, K.; BERNAL, C.; MARTÍNEZ, R. Immobilized biocatalyst engineering: high throughput enzyme immobilization for the integration of biocatalyst improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 170, p. 61–70, 2021.

ROY CHOUDHURY, A. K. Enzyme applications in textile chemical processing. **Sustainable Technologies for Fashion and Textiles**, [s. l.], p. 91–115, 2020.

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 15, p. 11212–11222, 2015.

RUEDA, N.; SANTOS, C. S.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 128, p. 10–18, 2016.

SAMPAIO, C. S.; ANGELOTTI, J. A.F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: problems and prospects: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 215, p. 434-449, 2022.

SANCHEZ, A.; CRUZ, J.; RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; VILLALONGA, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 33, p. 27329–27334, 2016.

SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. F.; MEDINA-CASTILLO, A. L.; RAMÓN-MÁRQUEZ, T.; ARIAS-MARTOS, M. C.; MILLÁN-LINARES, M. C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015a.

SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015b.

SANTOS, J. C.s.; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; MILLÁN-LINARES, M. C.; PEDROCHE, J.; YUSTE, M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 117, p. 38–44, 2015c.

SANTOS, J. C.s.; RUEDA, N.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015d.

SANTOS, J. C.s.; RUEDA, N.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 77, p. 1–7, 2015e.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; RANI, K. Y.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases.

Biotechnology Progress, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SATAR, R.; ANSARI, S. A. Functionalized agarose as an effective and novel matrix for immobilizing *Cicer arietinum* β -galactosidase and its application in lactose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 451–457, 2017.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 258–268, 2001.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie**, [s. l.], v. 37, p. 1608–1633, 1998.

SCHOEMAKER, H. E.; MINK, D. L.; WUBBOLTS, M. G. Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis. **Science American Association for the Advancement of Science**, [s. l.], 2003.

SHAHEDI, M.; HABIBI, Z.; YOUSEFI, M.; BRASK, J.; MOHAMMADI, M. Improvement of biodiesel production from palm oil by co-immobilization of *Thermomyces lanuginosa* lipase and *Candida antarctica* lipase B: Optimization using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 170, p. 490–502, 2021.

SHELDON, R. A. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts**. Biochemical Society Transactions. Anais Biochem Soc Trans, 2007.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, R. M.; SOUZA, P. M. P.; FERNANDES, F. A. N.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, S. Co-immobilization of dextransucrase and dextransucrase in epoxy-agarose-tailoring oligosaccharides synthesis. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 78, p. 71–81, 2019.

SINGH, V.; RAKSHIT, K.; RATHEE, S.; ANGMO, S.; KAUSHAL, S.; GARG, P.; CHUNG, J. H.; SANDHIR, R.; SANGWAN, R. S.; SINGHAL, N. Metallic/bimetallic magnetic nanoparticle functionalization for immobilization of α -amylase for enhanced reusability in bio-catalytic processes. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 214, p. 528–533, 2016.

SOLER, G.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1339, n. 1, p. 167–175, 1997.

SOUZA, P. M. P.; CARBALLARES, D.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GONÇALVES, L. R. B.; LOPEZ-GALLEGO, F.; RODRIGUES, S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine *Thermomyces lanuginosus* lipase inactivation pathways: Functional and florescence studies. **International Journal of**

Biological Macromolecules, [s. l.], v. 191, p. 79–91, 2021.

STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida antarctica* Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 2348–2358, 2015.

STOBIECKA, A.; WYSOCKI, S.; BRZOZOWSKI, A. M. Fluorescence study of fungal lipase from *Humicola lanuginosa*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 45, n. 2–3, p. 95–102, 1998.

SUESCUN, A.; RUEDA, N.; SANTOS, J. C.s.; CASTILLO, J. J.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on glyoxyl-octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 1211–1217, 2015.

TAKAÇ, S.; BAKKAL, M. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward S-Naproxen production. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1021–1027, 2007.

THOMPSON, M. P.; PEÑAFIEL, I.; COSGROVE, S. C.; TURNER, N. J. Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals. **Organic Process Research and Development**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 9–18, 2019.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 67, p. 52–59, 2010.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 74, n. 3–4, p. 230–235, 2012.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994.

VERDASCO-MARTÍN, C. M.; GARCIA-VERDUGO, E.; PORCAR, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; OTERO, C. Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 245, p. 39–46, 2018.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; PEIRCE, S.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; CORTES-CORBERAN, V.; MARZOCHELLA, A.; RUSSO, M. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 1391–1396, 2016.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; HIRATA, D. B.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 96, p. 30–35, 2017a.

- VIRGEN-ORTÍZ, J.; PEDRERO, S.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 1, 2017b.
- WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 152, p. 104613, 2020.
- WANG, G. Z.; DONG, X. Y.; SUN, Y. Ion-exchange resins greatly facilitate refolding of like-charged proteins at high concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 1068–1077, 2011.
- WOHLGEMUTH, R. Large-scale applications of hydrolases in biocatalytic asymmetric synthesis. **Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions: Second Edition**, [s. l.], p. 249–264, 2010.
- XIAOKANG, Z.; HAITAO, R.; JIANYONG, L. Effects of different scouring methods on the catalytic efficiency of pectinase for cotton knitted fabrics. **Textile Research Journal**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 635–644, 2019.
- YADAV, N.; BHAKUNI, K.; BISHT, M.; BAHADUR, I.; VENKATESU, P. Expanding the Potential role of deep eutectic solvents toward facilitating the structural and thermal stability of α -chymotrypsin. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 27, p. 10151–10160, 2020.
- YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 134, n. 1–3, p. 262–267, 2007.
- YANG, C.; YU, L.; DONG, X.; SUN, Y. Mono-sized microspheres modified with poly(ethylenimine) facilitate the refolding of like-charged lysozyme. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 72, n. 11, p. 889–896, 2012.
- YU, L. L.; DONG, X. Y.; SUN, Y. Ion-exchange resins facilitate like-charged protein refolding: Effects of porous solid phase properties. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1225, p. 168–173, 2012.
- YUAN, X.; OU, J.; ZHANG, P.; XU, W.; JIANG, B.; TANG, K. PEG-modified lipase immobilized onto NH₂-MIL-53 MOF for efficient resolution of 4-fluoromandelic acid enantiomers. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 165, p. 1793–1802, 2020.
- ZAAK, H.; SIAR, E.; KORNECKI, J. F.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 56, p. 117–123, 2017a.

ZAAK, H.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; VELASCO-LOZANO, S.; ALCARAZ-FRUCTUOSO, M. T.; SASSI, M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 62, p. 128–134, 2017b.

ZAAK, H.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 64, 2017, p. 200–205, 2018.

ZHANG, W.; YANG, X.; JIA, J.; WANG, N.; HU, C.; YU, X. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 115, p. 83–89, 2015.

ZHENG, C. Screening and identification of Lipase Producing Bacterium Screening and identification of Lipase Producing Bacterium. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, [s. l.], v. 108, p. 42088, 2018.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1577, 2016.