



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM RESINA DE
INTERAÇÃO HIDROFÓBICA STREAMLINE™ PHENYL**

FORTALEZA

2022

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM RESINA DE
INTERAÇÃO HIDROFÓBICA STREAMLINE™ PHENYL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra Luciana Rocha Barros
Gonçalves

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)

S58i Silva, João Matheus Fonteles.

Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em resina de interação hidrofóbica StreamlineTM Phenyl / João Matheus Fonteles Silva. – 2022.

65 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios.

1. Biotecnologia. 2. Engenharia Química. 3. Enzimas. 4. Imobilização enzimática. 5. Suportes hidrofóbicos. I. Título.

CDD 661

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM RESINA DE
INTERAÇÃO HIDROFÓBICA STREAMLINE™ PHENYL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 31/01/2022

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Eliete Fonteles e João Batista.

A todos aqueles que de alguma forma me
ajudaram nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos me dando força e sabedoria.

Aos meus pais, Eliete Fonteles de Assis e João Batista dos Santos Silva, por sempre me educarem da melhor forma possível e serem minha inspiração na vida.

Ao meu irmão, Paulo Gustavo, por nossas brincadeiras e implicância do dia a dia.

A minha namorada, Ana Maria, por estar comigo durante toda a caminhada, proporcionando os melhores momentos, me fazendo sorrir todos os dias e deixando a vida um pouco mais leve.

A turma “Bolabos” (Lucas, Lara, Melissa, Cléber, Isabela, Daniel, Nicole, Pedro e Liandra) pelas brincadeiras, risadas e diversos momentos engraçados e felizes dentro e fora da universidade.

Aos colegas de turma, por serem a melhor turma de Biotecnologia da UFC.

Aos amigos do Colégio 7 de setembro, PH, Filipe e Pedro, pela amizade que ficou para toda a vida e os encontros que quase sempre acontecem.

A Professora Luciana, pela excelente orientação, ensinamentos, conselhos e paciência.

A Co-orientadora Nathalia, por todos os seus ensinamentos, orientação e ajuda com os experimentos.

Aos demais integrantes do GPBIO, especialmente Kim e Ravena, por me ajudarem com os experimentos do laboratório sempre que possível.

Ao professor Cleverson Diniz e a professora Marjory Holanda, por disponibilizarem seu tempo e pelas valiosas sugestões e colaborações.

A todos os professores que tive durante o curso, pela preciosa transmissão de conhecimento que ajudaram na minha formação profissional.

A Coordenação do Curso de Biotecnologia pelo excelente trabalho e atendimento ao corpo discente.

A CAPES e a FUNCAP, por financiarem este trabalho e tornarem possível sua realização.

“Se você sentir que chegou ao seu limite, lembre-se do motivo pelo qual você cerra os punhos, lembre-se porque resolveu trilhar esse caminho e permita que essa memória o carregue além de seus limites” – Kōhei Horikoshi

RESUMO

Lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em níveis industriais devido a sua capacidade de catalisar diferentes tipos de reações e manter uma elevada estabilidade e atividade sob diferentes condições reacionais. Principalmente na área industrial, é desejável que essas enzimas sejam utilizadas em sua forma imobilizada, uma vez que o catalisador imobilizado exibe diversas vantagens em comparação com sua forma livre. O processo de imobilização permite a reutilização da enzima em múltiplos ciclos de reação, reduzindo o custo do processamento e recuperando a enzima pós reação, evitando a contaminação do produto final. Desta forma, este trabalho procura estabelecer um protocolo eficiente de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em uma resina hidrofóbica *Streamline phenyl*, produzindo derivados estáveis e ativos (iTLL) para aplicação industrial. Para isso foram produzidos quatro tipos de derivados utilizando, ou não, glutaraldeído (GLU) como agente reticulante e polietilenoimina (PEI) para estabilizar os derivados. Os biocatalisadores imobilizados, iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI e iTLL-PEI-GLU foram avaliados conforme alguns parâmetros de imobilização, quanto a atividade recuperada em relação à enzima livre e quanto estabilidade térmica a 65°C e estabilidade operacional em ciclos consecutivos de hidrólise de *p*NPB. Além disso, avaliou-se a dessorção da enzima do suporte utilizando o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0,6 % e investigou-se o efeito do aumento da carga proteica nos parâmetros de imobilização. Os resultados mostraram que a imobilização via interação hidrofóbica com a resina produziu derivados (iTLL) com valores de atividade recuperada acima de 100%, com o maior valor alcançando 106%. Os biocatalisadores imobilizados apresentaram vantagens e desvantagens em relação a atividade enzimática, entretanto o derivado iTLL-PEI-GLU foi o mais estável dentre os demais, apresentando a melhor estabilidade térmica, com tempo de meia vida de 4h e 27 minutos e a melhor estabilidade operacional, retendo 90% da sua atividade relativa após o 5º ciclo de hidrólise de *p*NPB. Além disso, notou-se que a taxa de dessorção foi inferior a 30% utilizando o surfactante CTAB para os derivados iTLL e iTLL-GLU. Por fim, avaliou-se que o aumento da carga oferecida gerou um aumento proporcional da atividade teórica e das atividades nos derivados sem influenciar no rendimento de imobilização e na atividade recuperada. Dessa forma, este trabalho permitiu comprovar que a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via interação hidrofóbica foi eficiente gerando derivados passíveis de serem utilizados em processos industriais.

Palavras-chave: *thermomyces lanuginosus*; lipase; imobilização; resina.

ABSTRACT

Lipases are among the most used enzymes at industrial levels due to their ability to catalyze different reactions and maintain high stability and activity under several reaction conditions. Mainly in the industrial area, these enzymes should be used in their immobilized form since the immobilized catalyst exhibits several advantages compared to its free form. The immobilization process allows the reuse of the enzyme in multiple reaction cycles, reducing processing cost and recovering the enzyme after reaction, avoiding contamination of the final product. Thus, this work seeks to establish an efficient protocol for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase in a hydrophobic resin, Streamline phenyl, producing stable and active derivatives (iTLL) for commercial application. For this, four types of biocatalysts were prepared using, or not, glutaraldehyde (GLU) as a crosslinking agent and polyethyleneimine (PEI) to stabilize the immobilized enzymes. The immobilized biocatalysts, iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI, and iTLL-PEI-GLU were evaluated according to some immobilization parameters, such as recovered activity to the free enzyme, thermal stability at 65 °C, and operational stability in consecutive cycles of *p*NPB hydrolysis. Furthermore, the desorption of the enzyme from the support was evaluated using the surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 0.6%. Increasing the protein load on the immobilization parameters was also investigated. The results showed that immobilization via hydrophobic interaction with the resin produced biocatalysts (iTLL) with recovered activity values above 100%, with the highest value reaching 106%. The immobilized biocatalysts had advantages and disadvantages compared to enzymatic activity. Still, the iTLL-PEI-GLU derivative was the most stable among the others, despite losing little activity compared to iTLL, presenting the highest thermal stability, with a half-life time of 4h and 27 minutes and the best operational stability retaining 90% of its relative activity after the 5th cycle of *p*NPB hydrolysis. Furthermore, the enzyme desorption rate was less than 30% using CTAB surfactant for the iTLL and iTLL-GLU. Finally, the increase in enzyme load during immobilization rendered a proportional increase in theoretical activity and biocatalyst activities without influencing the immobilization yield and the recovered activity. Thus, this work showed that the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* via hydrophobic interaction was efficient, generating derivatives that could be used in industrial processes.

Keywords: *Thermomyces lanuginosus*; lipase; immobilization; resin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Lipase: funções e propriedades	10
1.2	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> e suas aplicações.....	12
1.3	Imobilização enzimática.....	15
1.4	Resina <i>Streamline phenyl</i>	19
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivos específicos.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	Materiais.....	23
4.2	Determinação da concentração de proteínas.....	23
4.3	Caracterização estrutural da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	23
4.4	Determinação da atividade enzimática da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	23
4.5	Lavagem da resina <i>Streamline phenyl</i>	24
4.6	Imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> em resina <i>Streamline phenyl</i>	25
4.7	Reticulação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> com glutaraldeído e revestidos com Polietienimina (PEI).....	26
4.8	Ensaio de estabilidade térmica da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	26
4.9	Ensaio de estabilidade e dessorção da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> com o surfactante Brometo de Cetiltrimetilâmônio (CTAB).....	27
4.10	Ensaio de eletroforese dos biocatalisadores imobilizados.....	28
4.11	Ensaio de estabilidade operacional.....	29
4.12	Estudo da carga de enzima oferecida para imobilização.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Caracterização do extrato enzimático.....	31
5.2	Imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> via resina hidrofóbica.....	38
5.3	Efeito da diluição na atividade enzimática da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	39

5.4	Efeitos da reticulação com glutaraldeído e revestimento com PEI na atividade dos biocatalisadores imobilizados.....	40
5.5	Estabilidade térmica dos biocatalisadores imobilizados.....	41
5.6	Ensaio de dessorção e estabilidade da enzima livre com o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB).....	44
5.7	Eletroforese dos biocatalisadores imobilizados.....	45
5.8	Estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados em reações sucessivas de hidrólise.....	47
5.9	Efeito da concentração de enzimas durante a imobilização.....	49
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

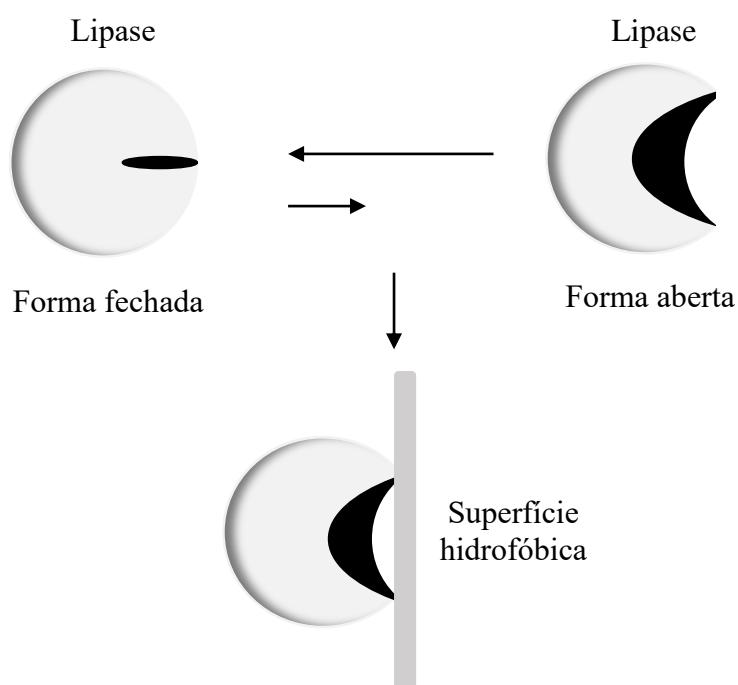
1 INTRODUÇÃO

1.1 Lipase: funções e propriedades

As enzimas são proteínas capazes de catalisar reações metabólicas, permitindo que aconteça em um tempo necessário para manter a vida, sendo consideradas catalisadores naturais (**HASAN *et al.*, 2006**). Essas moléculas reduzem a energia de ativação necessária para uma reação ocorrer sem interferir no equilíbrio da reação catalisada, acelerando o processo, sendo essenciais para manter o metabolismo de todos os seres vivos. Dentre as classes de enzimas, existem as lipases (EC 3.1.1.3), que fazem parte da família das hidrolases e são capazes de catalisar a hidrólise de ligações éster em tri, di e monoacilgliceróis, essenciais no metabolismo de lipídios (**DEREWENDA, 1994**). Por pertencerem à classe das $\alpha\beta$ -hidrolases, as lipases têm duas sequências consenso curtas comuns às enzimas nessa família. O sítio ativo de $\alpha\beta$ -hidrolases consiste em uma tríade catalítica altamente conservada: um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou ácido aspártico), um resíduo ácido catalítico (ácido aspártico ou glutâmico) e um resíduo histidina (**FILHO *et al.*, 2019**). No caso das lipases, estas foram classificadas como serina hidrolases por possuírem a tríade catalítica composta por uma serina nucleofílica e um ácido aspártico ou glutâmico ligado a uma histidina. As lipases possuem quatro bolsas de substrato, sendo um orifício do oxiânon e três bolsas que acomodam ácidos graxos anexados nas posições sn-1, sn-2 e sn-3 (**KRISHNA e KARANTH., 2002, BORDES *et al.*, 2010**). O papel fisiológico dessas enzimas é hidrolisar triglycerídeos em di e monoglycerídeos, ácidos graxos e glicerol, sendo vastamente encontradas no reino animal e vegetal, assim como em fungos e bactérias. Essas enzimas lipolíticas garantem o turnover desses compostos insolúveis em água e participam da degradação e mobilização de lipídios dentro dos organismos vivos. Dessa forma, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas na biocatálise, tanto em nível industrial quanto em nível acadêmico, porque reconhecem uma ampla gama de substratos (**KAPOOR *et al.*, 2012, JAVED *et al.*, 2017**) e catalisam diversas reações mantendo uma elevada estabilidade e atividade sob diferentes condições (**HOUDE *et al.*, 2004, ARANA-PEÑA *et al.*, 2020**). Essa versatilidade torna as lipases as enzimas favoritas para potenciais aplicações na indústria alimentar, de detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosmética e de papel. Dentre estas, as aplicações industriais mais significativas são encontradas nos setores de alimentos, de detergentes e farmacêuticos (**SHARMA *et al.*, 2001**). Este interesse aumentou ainda mais com novas restrições ambientais para tornar os processos químicos mais “verdes”.

As lipases são enzimas interfaciais e atuam na superfície de óleos e gorduras e o mecanismo catalítico dessas enzimas é conhecido como ativação interfacial, já que a atividade das lipases pode aumentar quanto em contato com tais estruturas hidrofóbicas (**ZECHNER et al., 2012, REIS et al., 2009**). Esse processo é regulado por uma cadeia polipeptídica conhecida como tampa, que, isola o centro ativo do meio quando a lipase está em sua forma fechada, uma vez que a face interna dessa tampa é hidrofóbica e interage com o ambiente hidrofóbico do sítio ativo. Na presença de superfícies hidrofóbicas, a tampa se move e o centro ativo é exposto ao meio, que se torna fortemente adsorvido, permitindo a interação com o substrato (**BRZOZOWSKI et al., 1991, CHENG et al., 2018, ALOULOU et al., 2006**), como observado na Figura 1 e 2. A forma fechada está em equilíbrio com a forma aberta da lipase, que é a forma ativa da enzima, onde a tampa é deslocada e expõe o sítio. Entretanto, a bolsa hidrofóbica nessas condições é instável e a enzima permanece principalmente na forma fechada em meio homogêneo salino (**GROCHULSKI et al., 1993, MARTINELLE et al., 1995**). A tampa pode ser muito pequena e simples, incapaz de isolar totalmente o centro ativo da lipase do meio, como no caso da lipase B de *Candida antarctica* (**UPPENBERG et al., 1994**) ou muito extensa e complexa, como a tampa dupla da lipase de *Geobacillus themocatenulatus* (**CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008**). Durante a catálise, o movimento da tampa repercute em mudanças estruturais em toda a estrutura da enzima. Devido a esta flexibilidade do sítio ativo de lipases, elas são altamente sensíveis a qualquer mudança nas condições experimentais, tornando possível alterar significativamente as propriedades da lipase sem comprometer sua atividade (**MATEO et al., 2007, PALOMO et al., 2003**).

Figura 1- Mecanismo de ativação interfacial

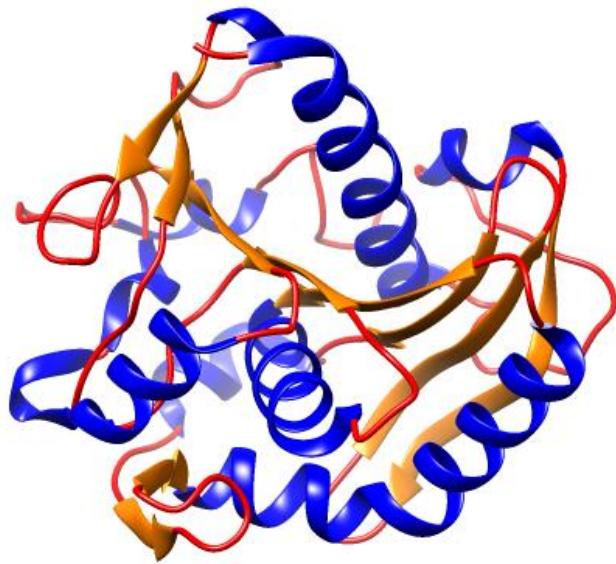


Fonte: **Virgen-Ortíz et al. (2019)**, modificado pelo autor. Equilíbrio conformacional e ativação interfacial de lipases.

1.2 Lipase de *Thermomyces lanuginosus* e suas aplicações

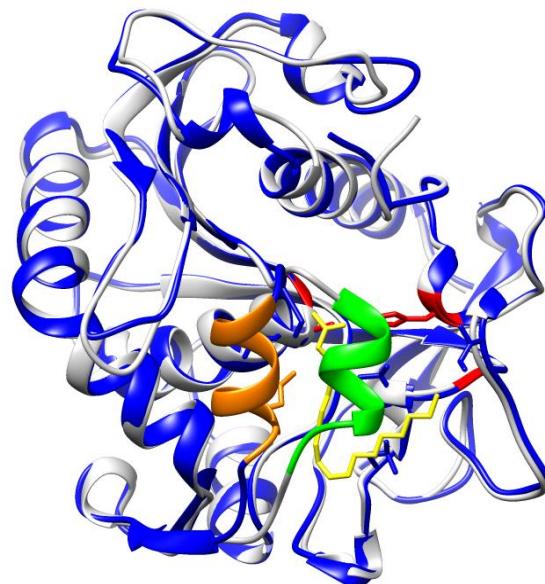
Thermomyces lanuginosus, conhecido anteriormente como *Humicola lanuginosa*, é um fungo termofílico costumeiramente isolado de detritos orgânicos auto aquecidos. Esse tipo de fungo é capaz de crescer bem em temperaturas de até 60°C e não cresce abaixo de 20°C, além de produzirem enzimas mais estáveis ao calor do que microrganismos mesófilos (**SINGH et al., 2003**). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma proteína de cadeia única que possui um total de 269 aminoácidos e peso molecular de 31,7 kDa, com pH ótimo 9 e faixa de temperatura ideal de 55°C a 60°C (**JHA et al., 1999**). Sua estrutura possui uma forma esférica com oito fitas centrais, predominantemente folhas betas paralelas com cinco interconexões alfa-hélices (**OLLIS et al., 1992**), como observado na Figura 2. A enzima contém uma tampa móvel composta pelos aminoácidos 86 a 93 que cobrem o sítio ativo, como resíduo Trp-89 sendo extremamente importante para garantir uma hidrólise eficiente, e o centro ativo é composto pela tríade catalítica Ser-His-Asp, nas posições 146, 258 e 201 respectivamente. (**HOLMQUIST et al., 1995**). Como explicado anteriormente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, assim como outras lipases realiza a catálise através de um mecanismo chamado de ativação interfacial, na qual essa tampa se move quando a enzima entra em contato com alguma superfície hidrofóbica, liberando o acesso do centro ativo ao substrato (Figura 3). Assim como a maioria das enzimas, a lipase requer uma imobilização prévia para ser usada na área industrial, de forma que a imobilização da TLL tem sido estudada intensamente, a fim de produzir biocatalisadores com potencial uso industrial. Atualmente já existe uma preparação imobilizada de TLL muito utilizada comercialmente pela empresa Novozymes com uma grande gama de aplicações (**PENG et al., 2002, FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2010**). O crescente aumento do uso de lipases em empreendimentos comerciais e industriais tem relação com a elevada especificidade dessas enzimas, uma vez que substitui métodos químicos convencionais que não apresentam tal especificidade.

Figura 2 – Estrutura tridimensional da forma fechada da lipase de *Thermomyces lanuginosus* com destaque para as estruturas secundárias



Fonte: elaborado pelo autor. Imagem produzida no software UCFS Chimera com código 1DT3 obtido no Protein Data Bank (PDB)

Figura 3 – Sobreposição entre as estruturas tridimensionais das formas aberta e fechada da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



Fonte: elaborado pelo autor. Estrutura tridimensional da sobreposição entre a forma fechada (Branco) e aberta (Azul) da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. As tampas em laranja e verde pertencem a forma aberta e fechada da enzima, respectivamente. O sítio ativo está representado em vermelho para ambas as formas e em amarelo, o ligante. Imagem produzida no software UCFS Chimera com os códigos 1DT3 e 1GT6 obtido no Protein Data Bank (PDB)

Por exibir uma elevada atividade e estabilidade, a TLL é utilizada em diversas condições reacionais e empregada em diversas aplicações industriais. Esta lipase é muito utilizada na indústria de alimentos principalmente na modificação de óleos e gorduras para produzir alimentos mais saudáveis (SIVAKANTHAN *et al.*, 2020). A TLL é muito empregada na indústria oleoquímica para produzir produtos de alto valor agregado como equivalentes de manteiga de cacau, substitutos do leite humano ou estruturas específicas de lipídios (XU *et al.*, 2000). Algumas aplicações que podemos citar utilizando esta estratégia poderiam ser a hidrólise, a alcoólise e a transesterificação de óleos, gorduras e ácidos graxos, uma estratégia muito empregada na hidrólise de óleos de peixe para produzir ácidos graxos poli-insaturados (LYBERG *et al.*, 2008). Além disso, lipídios semelhantes à gordura do leite humano contendo ácido linolênico podem ser sintetizados via interesterificação enzimática. Atualmente utilizam-se lipases específicas para as posições 1 e 3 para produzir substitutos da gordura do leite humano para incluí-los em formulações infantis, oferecendo grandes benefícios para a saúde humana devido ao conteúdo enriquecido com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados (SAHIN *et al.*, 2005, MADUKO *et al.*, 2007). Diversos tipos de óleos podem ser utilizados para este fim, como o óleo de palma, o azeite de oliva, o óleo de girassol e misturas de óleos marinhos. Utilizando reações de interesterificação também é possível preparar lipídios adequados para produzir margarinas mais saudáveis. Lipídios estruturados são preparados para incluí-los em preparações de margarina livre de gorduras trans através da interesterificação catalisada por TLL de misturas de óleo de canola, estearina de palma, implicando em potenciais benefícios nutricionais (ZHANG *et al.*, 2005, ZHANG *et al.*, 2006).

Uma outra aplicação da enzima TLL é na produção de biodiesel. Os problemas ambientais gerados pela queima do petróleo e a possível escassez desse combustível fóssil transformou o biodiesel em uma alternativa ao diesel, uma vez que é produzido a partir de óleo vegetal ou gorduras animais, sendo por isso considerado renovável e biodegradável (NIELSEN *et al.*, 2008, VASUDEVAN *et al.*, 2008). O biodiesel é produzido pela transformação de triglicerídeos em uma reação que pode ser catalisada por TLL, sendo capaz de realizar a transesterificação de uma ampla variedade de óleos, inclusive óleos reciclados. Imobilizados de TLL já foram usadas com sucesso para a produção de biodiesel a partir de óleo de girassol, de soja e de resíduos de óleos de cozinha (DIZGE *et al.*, 2009, QUAYSON *et al.*, 2020). Dessa forma, procura-se cada vez mais por biocatalisadores ativos para serem utilizados nesta rota biocatalítica, tornando-a mais economicamente competitiva. Outras aplicações da TLL que beneficiam o meio ambiente podem ser citadas, como a degradação de polímeros na natureza, um dos problemas mais relevantes atualmente. A TLL já foi utilizada, com sucesso, para

catalisar reações de degradação desses polímeros através da hidrólise da cadeia lateral do poliacetato de vinila., provando que a lipase pode encontrar aplicações na degradação de diferentes polímeros que representam um problema ambiental real (**MAHALIK *et al.*, 2006, SIVALINGAM *et al.*, 2003**). Ademais, algumas lipases microbianas já foram utilizadas no tratamento de águas residuais (**SONG *et al.*, 2011**).

Neste contexto, a TLL também pode ser utilizada para o tratamento de águas residuais de diversas indústrias, principalmente no setor de alimentos. Nessas indústrias, os resíduos apresentam um alto teor de óleos e gorduras que apresentam baixa biodegradabilidade. A TLL pode ser utilizada na hidrólise enzimática desses resíduos para contribuir com o aumento da biodegradação de águas residuais ricas em gorduras, acelerando o processo de tratamento e diminuindo a DBO nestas águas (**RIGO *et al.*, 2008**). Por fim, outro exemplo interessante da TLL é a degradação de óleos e gorduras para utilizar na limpeza de diversos materiais. A indústria de detergentes incorpora a TLL em suas formulações para utilizar na lavagem de superfícies variadas. O uso de lipases na remoção de sujeiras já foi intensamente testado e demonstrou efeitos positivos na limpeza de manchas oleosas diferentes, verificando que a lipase aumenta significativamente a detergência, evitando a subsequente deposição da sujeira removida (**JURADO *et al.*, 2007**).

1.3 Imobilização enzimática

A busca crescente pela incorporação da química verde na indústria impulsionou processos mais “verdes”, ou seja, com o uso de insumos renováveis, a redução de resíduos não-biodegradáveis e processos mais eficientes. Essa demanda por processos mais economicamente saudáveis produziu um impulso para a biocatálise em contraposição a catalisadores químicos convencionais, utilizando a seletividade e a especificidade das enzimas (**SUN *et al.*, 2018, CASTILLA *et al.*, 2018**). Como essas moléculas desempenham funções biológicas fundamentais, elas são altamente seletivas e específicas e atuam em condições mais amenas de temperatura, pressão e pH, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser usadas em reações em cascata (**CHOI *et al.*, 2015, REETZ *et al.*, 2013**). Esses aspectos fizeram com que as enzimas fossem mais empregadas nos processos industriais, exibindo propriedades essenciais para esse setor. A elevada especificidade e seletividade reduz a produção de subprodutos e evita a modificação de moléculas semelhantes ao substrato, salvando etapas de purificação (**SCHMID *et al.*, 2001**). Entretanto, como visto anteriormente, estas moléculas não foram projetadas para suportar as condições industriais, visto que cumprem, naturalmente,

funções fisiológicas. Desta forma, em escala industrial, as enzimas respondem a mudanças no meio e são menos estáveis nestas condições, sendo desativadas em questões de horas. Por isso, algumas propriedades enzimáticas não cumprem os requisitos industriais (**SHOEMAKER et al., 2003**), a menos que sejam utilizadas na forma imobilizada, também conhecidas como derivados.

A imobilização enzimática surgiu como uma alternativa poderosa para melhorar de forma significativa as propriedades das enzimas, procurando resolver limitações de estabilidade, atividade, especificidade e seletividade, além de poder ser utilizada para purificar a enzima durante o processo de imobilização, evitando a contaminação do produto final (**GARCIA-GALAN et al., 2011, RODRIGUES et al., 2013**). A outra alternativa para a purificação e separação de enzimas seria a utilização de técnicas de cromatografia, que seriam completamente inviáveis em escala industrial, devido a quantidade de tempo e dinheiro que seria investido. Isto é mais um ponto a favor do uso da imobilização enzimática, uma vez que favoreceria a recuperação e reciclagem dessas moléculas. Essa técnica garante um melhor uso das enzimas em processos industriais, já que ao garantir o reuso dos catalisadores os custos são reduzidos e os lucros maximizados, pois as enzimas podem ser reutilizadas diversas vezes. Em resumo, podemos definir a imobilização enzimática como um conjunto de técnicas capazes de deixar a enzima insolúvel e promover suas propriedades catalíticas, garantindo a recuperação reutilização do biocatalisador continuamente (**BRADY et al., 2009, IYER et al., 2008**). Desse modo, atualmente, tem-se buscado cada vez mais enzimas que possuem características de interesse comercial e industrial e a imobilização tornou-se um pré-requisito para projetar um biocatalisador enzimático industrial.

Dentre os métodos de imobilização existentes, o uso de sólidos pré-existentes para imobilizar proteínas é possivelmente a estratégia mais difundida da área, utilizando métodos de imobilização física reversível ou protocolos de acoplamento covalente irreversível (**MOKHTAR et al., 2020**). O suporte a ser escolhido aumentará o custo final do biocatalisador, o dos aspectos que devem ser levados em conta durante a escolha do método de imobilização. Entre outras estratégias de imobilização temos a adsorção física, hidrofóbica e eletrostática, a ligação covalente, a encapsulação e a reticulação (**GARCIA-GALAN et al., 2011, RODRIGUES et al., 2021**). Uma outra alternativa seria a imobilização das enzimas sem o emprego de suportes, que tem se tornado cada vez mais popular. As estratégias de imobilização sem o uso de suportes mais amplamente usadas são os cristais de enzima reticuladas (CLEC) ou agregadas (CLEA), que são baseados na cristalização das enzimas puras seguidas de reticulação química e na agregação da enzima antes da reticulação, respectivamente (**ROY et**

al., 2004 e ROY et al., 2016). Com tantas opções disponíveis, devem ser considerados diferentes pontos relevantes antes de escolher um método de imobilização, como a resistência mecânica do biocatalisador final, a simplicidade do protocolo de imobilização, a possibilidade de acoplar o processo de imobilização com a purificação das enzimas e o impacto da imobilização na atividade e estabilidade.

Assim como qualquer enzima utilizada em escala industrial, as lipases precisam ser imobilizadas antes de aplicá-las a fim de maximizar o proveito da enzima imobilizada e tornando o processo mais lucrativo. No entanto, a preparação desses biocatalisadores imobilizados apresentam algumas complicações. Como dito anteriormente, o mecanismo catalítico das lipases é conhecido como ativação interfacial, onde estas enzimas se adsorvem em estruturas hidrofóbicas (**FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998**). Devido a esta propriedade, as lipases podem interagir com componentes hidrofóbicos indesejados ou até mesmo outras lipases (**ZHANG et al., 2007, FERNANDEZ-LORENTE et al., 2003**). Este problema pode ser resolvido com o uso de suportes hidrofóbicos para a imobilização de lipases que garantiria a imobilização da lipase já na forma aberta e, dessa forma, os suportes hidrofóbicos são os mais amplamente utilizados para imobilizar esta classe de enzimas (**RODRIGUES et al., 2019**). A imobilização em suportes hidrofóbicos ocorre por interação entre grupos adsorventes (fenil, butil, metil, octil) no suporte e aminoácidos hidrofóbicos que circundam o sítio ativo da lipase (**YAGMUROV et al 2017**). O uso de suporte hidrofóbicos apresentam vantagens que justificam seu amplo uso, por exemplo, a imobilização das lipases nesse tipo de suporte pode ser realizada mesmo em baixa força iônica. Em alta força iônica a imobilização da lipase ocorre mais lentamente e reduz a purificação alcançada no processo. Nessas condições, o equilíbrio entre a forma aberta e fechada favorece a forma fechada da lipase, de modo que a forma aberta (ativa) da lipase é desfavorecida e a imobilização acontece mais devagar (**MANOEL et al., 2015**). Além disso, em baixa força iônica, as lipases são as únicas proteínas solúveis capazes de serem imobilizadas de forma eficiente em suportes com certo nível de hidrofobicidade (**GHATTAS et al., 2014**). Outra vantagem é o fato das lipases poderem ser dessorvidas ao utilizar uma certa concentração de detergente, permitindo a reutilização do suporte para uma posterior imobilização. Um outro aspecto positivo seria a hiperatividade que algumas lipases sofrem quando são imobilizadas em suportes hidrofóbicos, mesmo não sendo uma regra geral, pois isto depende da enzima, do substrato e do próprio suporte (**TACIAS-PASCACIO et al., 2016**). Por fim pode-se ressaltar que este protocolo de imobilização é bem simples, podendo ser realizado em muitos faixas de pH desde que a enzima se mantenha solúvel e estável. Trata-se de um método rápido e eficiente pois reveste facilmente

o suporte com a enzima sem a necessidade de outros tratamentos enzimáticos (**FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998**).

Entretanto, cabe ressaltar que embora inúmeras vantagens, este protocolo de imobilização também pode apresentar alguns problemas. Primeiramente, um dos problemas seria a liberação da enzima para o meio em certas condições como elevadas temperaturas ou alterações no pH, visto que a imobilização acontece apenas por adsorção hidrofóbica, o que causaria a contaminação do produto e inativaria a lipase (**CHEN et al., 2007, NICOLÁS et al., 2015**). Em regra, as ligações covalentes geralmente são mais estáveis do que as interações hidrofóbicas, mas já foi relatado que lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos são mais termoestáveis do que enzimas covalentemente ligadas. No entanto, as lipases podem ser liberadas em altas temperaturas e então inativadas ou inativadas antes da liberação do suporte (**RUEDA et al., 2015**). Já com relação aos solventes orgânicos, estes reduzem a força de adsorção da enzima ao suporte hidrofóbico e facilita a dessorção da enzima (**SAUNDERS E BRASK., 2010**). Outro problema a se considerar é quanto ao uso desses biocatalisadores em catálises que envolvam substratos ou produtos com propriedades de detergentes. Na maioria das vezes, as lipases serão utilizadas para modificar triglicerídeos e ocorrerá a liberação de ácidos graxos livre e di- ou monoglicerídeos, que são moléculas com propriedades de detergente. Isso poderia ocasionar a liberação das lipases dos suportes hidrofóbicos, pois como já foi dito, o uso de detergentes pode causar a dessorção das enzimas do suporte hidrofóbico (**ORTÍZ et al., 2019, VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017**). Para evitar a liberação da enzima para o meio através da dessorção, algumas estratégias podem ser mencionadas. Para este objetivo pode-se tentar modificar os biocatalisadores imobilizados através da reticulação entre enzimas ou entre enzima e suporte ou até mesmo projetar suporte heterofuncionais, que são suportes com grupos específicos para promover a interação da enzima com o suporte.

Com este tipo de suporte heterofuncional, primeiro obtêm-se uma primeira imobilização através da ativação interfacial e posteriormente estabelecem-se novas interações com a enzima, geralmente de natureza covalente, dificultando e reduzindo a possibilidade de dessorver a enzima (**BOROS et al., 2013**). Com relação a estratégia de reticulação, essa técnica garante a imobilização de lipases em vários pontos por adsorção em suportes hidrofóbicos, tornando a liberação das proteínas mais difícil devido a reticulação pós-imobilização. Um dos primeiros agentes reticulantes utilizados foi o glutaraldeído, um reagente bifuncional muito utilizado em processos de reticulação, onde grupos amino primários presentes nas enzimas são confrontados com grupos aldeído para produzir ligações covalentes (**KIM et al., 2013**). Uma outra alternativa seria a reticulação de lipases imobilizadas com polímeros iônicos como polietilenoimina (PEI).

A polietilenoimina já foi utilizada com em muitas lipases como forma de diminuir a liberação da enzima para o meio na presença de solventes orgânicos. Entretanto, este polímero também já foi utilizado para melhorar as propriedades das enzimas, como um aumento da atividade enzimática e estabilidade da enzima, diminuindo a possibilidade de inativação térmica (**PEIRCE et al., 2016**).

Em resumo, a imobilização em suportes hidrofóbicos apresenta vantagens e desvantagens e configuram como o protocolo de imobilização dominante na área. Mesmo com algumas desvantagens, esta estratégia permite a imobilização, a purificação e a estabilização em uma única etapa, ainda garantindo a hiperativação das lipases em certos casos (**BASTIDA et al., 1998**). Logo, para a imobilização de lipases, os suportes hidrofóbicos ainda mantêm a supremacia.

1.4 Resina *Streamline phenyl*

Streamline phenyl é uma resina de cromatografia de interação hidrofóbica que foi projetada para purificar proteínas usando adsorção de leito expandido. Em sua estrutura existem grupos fenil acoplados que estão ligados à matriz *Streamline* por meio de ligações éter altamente estáveis e sem carga, resultando em um meio hidrofóbico com propriedades iônicas mínimas (**FÄRENMARK et al., 1999**). Na literatura, embora não existam trabalhos de imobilização de lipases utilizando esta resina, existem estudos que mostram a purificação de diferentes proteínas utilizando uma coluna cromatográfica de *Streamline phenyl* usando adsorção em leito expandido (**NG et al., 2012, ABENDROTH et al., 2000, CAVALCANTI 2010**). Como explicado anteriormente, suportes com propriedades hidrofóbicas são os mais utilizados para a imobilização de lipases, uma vez que estas enzimas se adsorvem ao suporte na forma aberta e interação hidrofóbica entre a enzima e o suporte ocorre devido a presença de aminoácidos hidrofóbicos que circundam o sítio ativo das lipases. Logo, embora não tenha sido aplicada em processos de imobilização de lipase esta resina possui propriedades que fazem dela um potencial suporte para imobilização e purificação de lipases por meio da adsorção dos adsorventes fenil e os grupos hidrofóbicos na enzima.

2 JUSTIFICATIVA

A química industrial moderna demanda de processos menos danosos ao meio ambiente e essa demanda tende a aumentar cada vez mais conforme as indústrias produzem insumos mais complexos. Os catalisadores químicos envolvem normalmente condições mais agressivas e algumas vezes são menos eficientes e mais danosos ao meio ambiente quando comparamos com a catálise enzimática. As enzimas, por serem catalisadores naturais, são de grande interesse industrial, pois, atuam sob condições operacionais mais brandas e apresentam elevada atividade, especificidade e seletividade, possibilitando a geração de produtos mais puros. Nos últimos anos o uso de enzimas aumentou sobretudo no setor de alimentos, tecidos, fármacos, de cosméticos e biocombustíveis. Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível produzi-las em larga escala em um processo ainda mais viável (**CIPOLATTI et al., 2019, KATE et al., 2022**).

Nos dias atuais, a utilização de enzimas imobilizadas na indústria é uma realidade, inclusive na produção de substâncias biologicamente ativas, como derivados farmacológicos. O mercado de enzimas é altamente lucrativo e em 2020 foi avaliado em U\$ 10,69 bilhões e estima-se um crescimento com taxa anual de 6,5% de 2021 até 2028 (**GRAND VIEW RESEARCH, 2021**). Nesse mercado mundial, as lipases têm-se destacado nesses processos biocatalíticos devido sua grande especificidade e possibilidade de atuar em diferentes solventes, além de apresentarem extensas aplicações. Tendo em vista a elevada produtividade da catálise enzimática e o menor impacto ambiental é nítido a importância das lipases para a produção de produtos com alto valor agregado (**CHANDRA et al., 2020**).

A descoberta e desenvolvimento de processos mais verdes e economicamente viáveis tem despertado cada vez mais o interesse por novas tecnologias de imobilização enzimática, principalmente devido aos avanços biotecnológicos e ao surgimento de novos materiais. À medida que o uso de enzimas imobilizadas se torna mais difundido, uma variedade de métodos de imobilização está sendo desenvolvida para melhorar o desempenho desses biocatalisadores nas indústrias. Estudos mostram que o número de periódicos sobre esta área cresce cada vez mais e que China, Índia e Brasil são os países que mais produzem material acadêmico acerca de imobilização enzimática. Além disso, o número de patentes depositadas envolvendo o tema indicam o potencial das lipases imobilizadas para aplicação industrial (**GONÇALVES et al., 2018, ALMEIDA et al., 2021**).

Nesse sentido, este trabalho apresenta um protocolo para imobilizar de forma eficiente a lipase de *Thermomyces lanuginosus* na resina *Streamline phenyl*, a fim de produzir

biocatalisadores imobilizados ativos e estáveis com potencial aplicação na indústria. Embora na literatura não existam trabalhos de imobilização de lipases utilizando a resina *Streamline phenyl*, esta apresenta potencial para ser utilizada como suporte hidrofóbico para imobilizar a lipase, já que possui adsorventes fenil em sua composição capazes de interagir com resíduos de aminoácidos que circundam o sítio ativo da enzima, possibilitando a abertura da tampa e promovendo a ativação interfacial da lipase.

3 OBJETIVOS

Este trabalho propõe-se a estabelecer uma metodologia de imobilização da Lipase de *Thermomyces lanuginosus* em uma resina de interação hidrofóbica, *Streamine phenyl*, gerando biocatalisadores imobilizados ativos e estáveis.

3.1 Objetivos específicos

1. Imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* na resina hidrofóbica.
2. Avaliar a eficiência de imobilização da enzima no suporte.
3. Comparar parâmetros de atividade enzimática e estabilidade térmica entre enzima livre e imobilizada.
4. Testar o efeito da reticulação com glutaraldeído e recobrimento com polietilenoimina (PEI) na atividade e estabilidade térmica e operacional dos biocatalisadores imobilizados.
5. Verificar se a enzima é dessorvida utilizando o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB).
6. Avaliar a reutilização dos biocatalisadores imobilizados em ciclos operacionais na hidrólise do *p*-nitrofenil butirato.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

A lipase solúvel de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (15,72 mg de proteína/ml) foi adquirida junto à Novozymes (Espanha) e a resina hidrofóbica *Streamline phenyl* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O glutaraldeído, a polietilenoimina (PEI), o butirato de paranitrofenil (pNPB) e o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) foram comercializados pela Sigma-Aldrich. O marcador de baixo peso molecular foi adquirido por GE Healthcare e os demais reagentes foram utilizados de grau analítico.

4.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (**Bradford, 1976**) misturando-se a amostra com o reagente de Bradford na cubeta e deixando-se reagir por 10 minutos. Após isso, mediu-se a absorbância das amostras a 595nm, utilizando a albumina de soro bovino como referência.

4.3 Caracterização da estrutura proteica da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Utilizou-se o software de análise estrutural UCFS Chimera para observar e caracterizar a estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. A estrutura tridimensional da lipase foi obtida no banco de dados de proteínas (PDB), com código 1DT3 da forma aberta e 1GT6 da forma fechada, e colocada no software para análise. Foram demarcados grupos de aminoácidos importantes, como os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e grupos amino presentes na superfície da enzima. Além disso, demarcaram-se o sítio ativo, a tampa e o ligante. Além disso, as formas aberta e fechada da TLL foram abertas no software simultaneamente e apagou-se uma subunidade de cada uma delas para então alinhar as subunidades que restaram e observar diferenças estruturais.

4.4 Determinação da atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A atividade enzimática da lipase, tanto livre quanto imobilizada, foi determinada de acordo com **Arana-Peña et al. (2019)** medindo-se o aumento da absorbância no

espectrofotômetro a 348nm durante 1 minuto e 30 segundos pela liberação de *p*-nitrofenil da hidrólise do *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) 100 mM proveniente de sua incubação com a enzima em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 e à temperatura de 25°C. A medida da hidrólise do *p*NPB foi calculada utilizando em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0, a 25°C. Para a enzima livre, utilizou-se 50 µL de uma solução 0,1mg/ml e para os derivados, 50 µL de suspensão de concentração 1mg/ml em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM e 50 µL de *p*NPB. Com relação a hidrólise inespecífica do *p*NPB, a atividade foi feita com 50 µL do substrato em 2,55 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM. A atividade é dada em U/mL sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de *p*NPB por minuto sob as condições reacionais. A atividade foi calculada segundo a equação (1):

$$\text{Atividade (U/ml)} = \frac{\text{Slope (min}^{-1}) \cdot D \cdot V_r (\text{mL}) \cdot F (\mu\text{mol.ml}^{-1})}{V_e (\text{ml})} \quad (1)$$

Onde as variáveis são a variação da absorbância pelo tempo de leitura (Slope), o fator de diluição utilizada na amostra (*D*), o volume reacional (*V_r*), o fator de calibração do *p*-nitrofenil (*p*NP) (*F* = 0,19), o volume da enzima adicionado (*V_e*). Para as medidas de atividade do derivado utiliza-se a massa estimada na suspensão de derivado, que depende da proporção de massa de suporte e volume de solução empregado, sendo o valor de atividade dado em U/g. Além disso define-se a atividade teórica, em U, como a diferença entre a atividade total oferecida para imobilização e a atividade que restou no sobrenadante ao final. Além disso, a atividade recuperada é calculada como uma porcentagem da atividade de cada derivado em relação a atividade teórica

4.5 Lavagem da resina *Streamline phenyl*

A lavagem do suporte é necessária para retirar possíveis contaminantes e assim utilizar a resina para a imobilização da enzima. Esse processo de dessorção consiste em 3 lavagens com duração de 10 minutos em tampão fosfato de sódio 5 mM seguida de 3 lavagens de 1h cada com uma solução de NaOH 0,5-1M em etanol 70% (v/v) ou em isopropanol 30% (v/v) e por fim mais 3 lavagens com tampão fosfato de sódio 5mM. Para trocar a solução de lavagem esperou-se a decantação da resina, que ocorre rapidamente, retirando a solução anterior para

adicionar uma nova. Para todas as lavagens descritas foi utilizada a proporção de 1g de suporte para 5ml de solução de lavagem

4.6 Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em resina *Streamline phenyl*

Antes de iniciar a imobilização da lipase foi preparado uma solução branco de 0,1 mg/ml, ajustando o pH para 7,0, se necessário, com tampões saturados com ácido acético e acetato de sódio, pH 4,0, e um tampão saturado a base de soluções de bicarbonato e carbonato, pH 10,0. A solução enzimática de imobilização foi preparada misturando a solução branco com o suporte na proporção 1:10 (m/v) entre suporte e solução, respectivamente, sendo a carga oferecida para imobilização de 1 miligrama de proteína por grama de suporte (1mg/g). O processo de imobilização ocorreu durante 2h na temperatura ambiente sob agitação do agitador orbital. A atividade enzimática do branco foi medida imediatamente antes do início da imobilização (0h) e após o término do processo, com duração de 2h. As atividades dos sobrenadantes e dos derivados foram calculadas logo após o término da imobilização fornecendo os valores necessários para o cálculo do rendimento de imobilização, da atividade teórica e da atividade recuperada, conforme as equações 2, 3 e 4, respectivamente:

$$R (\%) = \frac{At0 (U/ml) - Atf (U/ml)}{At0 (U/ml)} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$At_{teo} (U/g) = At0 (U/ml) \cdot R (\%) \cdot \frac{Vi (ml)}{m (g)} \quad (3)$$

$$At_r (\%) = \frac{Atd (U/g)}{At_{teo} (U/g)} \cdot 100\% \quad (4)$$

Onde o Rendimento (R) refere-se a porcentagem da atividade oferecida (At_0) que foi imobilizada no suporte, a atividade teórica (At_{teo}) que consiste na diferença entre a atividade oferecida para imobilização e a atividade residual nos sobrenadantes (At_f) e a atividade recuperada (At_r) consiste na porcentagem que a atividade do derivado (At_d) representa em relação a atividade teórica. O rendimento de imobilização foi avaliado utilizando as medidas de atividade enzimática e por meio do cálculo da concentração de proteínas na solução branco e da concentração residual presente no sobrenadante utilizando o método de Bradford.

4.7 Reticulação da lipase imobilizada com glutaraldeído e revestimento com Polietilenoimina (PEI)

Após a imobilização, alguns biocatalisadores imobilizados foram separados para serem reticulados com glutaraldeído, revestidos com PEI e outros para serem revestidos com PEI para então serem reticulados com glutaraldeído, gerando 4 tipos diferentes de biocatalisadores imobilizados: iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI e iTLL-PEI-GLU. A reticulação da enzima com glutaraldeído foi realizada incubando a enzima imobilizada com uma solução de glutaraldeído 1% (v/v) na proporção 1:10 (m/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 por 1h em temperatura ambiente sob agitação no agitador orbital, conforme **Arana-Peña et al. (2019, 2020)**. Após 1h de reticulação com glutaraldeído, os derivados foram lavados com água mili-Q no filtro a vácuo até retirar toda a solução de glutaraldeído, em seguida foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio 25 mM para medir a atividade. Para revestimento das lipases imobilizadas com PEI utilizou-se o protocolo descrito em **Arana-Peña et al. (2020)** uma solução de Polietilenoimina na concentração 10% (p/v), pH 7,0, que foi colocada em contato com os derivados na proporção 1:10 (m/v). Estes derivados permaneceram incubados em shaker com agitação de 70 rpm e na temperatura de 4 °C por um total de 16h (overnight). No dia seguinte, retirou-se os sobrenadantes dos derivados com PEI, que foram ressuspensos com tampão fosfato de sódio 25 mM e mediu-se as atividades enzimáticas dos sobrenadantes e dos biocatalisadores imobilizados revestidos com PEI. Alguns destes derivados foram escolhidos para serem reticulados com glutaraldeído nas mesmas condições descritas anteriormente e tiveram suas atividades calculadas.

4.8 Ensaios de estabilidade térmica da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Para realizar o ensaio de estabilidade térmica da enzima livre foi feita a diálise do extrato enzimático para retirar os conservantes. Para isso, separou-se 3ml de extrato enzimático bruto, que foi colocado em um tubo Falcon com filtro de 10 kDa para ser lavado com 6 ml de tampão fosfato de sódio 5 mM. Após cada lavagem, o extrato foi centrifugado por 15min a 5000 rpm e 4°C e ao término adicionou-se mais 6 ml de tampão. Ao todo foram realizadas 4 lavagens para dialisar o extrato. Com o extrato dialisado foi feito o ensaio de estabilidade térmica da enzima livre em 3 temperaturas: 55 °C, 60 °C e 65 °C. Para a enzima livre foi preparada uma solução na proporção de 1:750 com o tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,0, previamente aquecido. Já para

a atividade dos biocatalisadores imobilizados (iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI, iTLL-PEI-GLU), estes foram misturados na proporção 1:10 com o tampão Tris-HCL, pH 7,0, previamente aquecido na temperatura de 65 °C. Durante o ensaio, as soluções foram mantidas a temperatura constante, sendo retiradas amostras para a medida da atividade enzimática com *p*NPB a cada 1h nos intervalos de 0 a 8h e de 16 a 24h para as 3 temperaturas. Com as suspensões, estas foram mantidas somente a temperatura constante de 65 °C e foram retiradas amostras a cada 1h nos intervalos de 0 a 8h para a medida da atividade com *p*NPB. Para representar o ensaio de estabilidade térmica foram construídas curvas de desativação térmica no software Origin 8.5, utilizando o modelo de desativação térmica já descrito anteriormente por **Sadana e Henley (1987)** relacionando a atividade residual como porcentagem da atividade inicial no tempo determinado. O modelo de desativação determinou os parâmetros de desativação pela seguinte equação (5):

$$Y = 100 \cdot ((1 - \alpha) \cdot e^{(-K_d \cdot t)} + \alpha) \quad (5)$$

Onde a constante de desativação térmica (K_d) e a fração da enzima que perde atividade (α) são parâmetros gerados pelo próprio software e as variáveis Y e t representam, respectivamente, a atividade relativa e o tempo. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado utilizando os parâmetros que foram gerados pelo software com base na equação (6):

$$t_{1/2} = \frac{-\ln \frac{(0,5-\alpha)}{(1-\alpha)}}{K_d} \quad (6)$$

4.9 Ensaio de estabilidade e dessorção da lipase de *Thermomyces lanuginosus* com o surfactante Brometo de Cetiltrimetilâmônio (CTAB)

O ensaio de estabilidade da enzima livre ao CTAB foi feito preparando uma solução enzimática 0,6% (m/v) da enzima livre com o surfactante CTAB, que foi colocada sob agitação no agitador orbital por 24h, metodologia adaptada de **Rodrigues et al. (2009)**. Para verificar se houve perda de atividade, a atividade enzimática foi calculada imediatamente depois da preparação da solução com CTAB e após as 24h de incubação. Além disso, também foi feito um ensaio de dessorção dos derivados com CTAB preparando uma solução 0,6% (m/v) do surfactante em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, e incubando com os derivados na

proporção 1:10 (m/v) por 24h sob agitação no agitador orbital. Para confirmar se houve a dessorção da enzima do suporte foi calculada a atividade enzimática das enzimas imobilizadas antes da incubação com CTAB e após as 24h. Ao final do processo, deve-se retirar toda a solução de CTAB lavando os derivados no filtro a vácuo com água mili-Q. Os derivados foram ressuspensos com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, para medir a atividade enzimática e constatar se alguma proteína foi dessorvida da resina neste processo.

4.10 Ensaio de eletroforese dos biocatalisadores imobilizados

Os ensaios de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foram realizados de acordo com a metodologia de **Laemmli, U.K. (1970)**. Para realizar a eletroforese foram preparados dois tipos de géis. O gel de separação foi feito na concentração de 12% utilizando 1,25 ml de tampão de separação, 2 ml de acrilamida, 1,72 ml de água mili-Q, 15 μ l de persulfato de amônio (APS) e 7 μ l de Tetrametilelenodiamina (TEMED). Após a gelificação do gel de separação, o gel de concentração 5% é preparado acima do gel de separação. No gel de concentração foi utilizado 375 μ l de tampão de concentração, 150 μ l de acrilamida, 100 μ l de bis-acrilamida, 750 μ l de água mili-Q, 15 μ l de APS e 5 μ l de TEMED. Após o término da preparação colocou-se o pente no gel para a formação dos poços no gel. A eletroforese foi feita com os 4 tipos de biocatalisadores (iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI, iTLL-PEI-GLU) antes e depois de passarem pela desativação térmica a 65 °C. Para cada tipo de biocatalisador foi a mesma concentração de proteínas nos poços, dessa forma um certo volume de tampão de ruptura foi calculado, com base na equação (7):

$$Ce \cdot Md = Cp \cdot Vt \quad (7)$$

Onde as variáveis representam a carga enzimática nos derivados (Ce), a massa dos derivados separados para eletroforese (Md), a carga de proteínas no poço (Cp) e o volume de tampão de ruptura a ser adicionado a massa de derivado (Vt). O tampão de ruptura foi preparado e utilizado de acordo com a metodologia apresentada por **Garcia-Galan et al. (2014)**. A carga de todos os derivados selecionados para o ensaio de eletroforese foi 1 mg/ml e a carga nos poços no gel de 0,5 mg/ml. A massa separada para a eletroforese foi de 0,04g de derivado e com base na equação o volume de tampão de ruptura a ser adicionado foi de 80 μ l. Uma amostra com o branco de imobilização também foi preparada utilizando a proporção de 150 μ l de enzima para 50 μ l de tampão de ruptura. Após a mistura do tampão de ruptura com os biocatalisadores imobilizados

e com o branco de imobilização eles foram centrifugados em mini centrifugas por 5 minutos e colocadas em banho quente de 100 °C por 10 minutos. Para finalizar, 5 µL do marcador de baixo peso molecular (14,4-97kDa) da eletroforese foi colocado no segundo poço do gel, 15 µL do branco de imobilização foi colocado no poço 3 e apenas 15 µL dos sobrenadantes das amostras com derivados, ainda quentes, foram colocados nos poços 5 a 8 do gel, que tiveram seus volumes completados com tampão de corrida, inclusive os poços vazios.

As amostras foram colocadas para correr o gel a 110V. e após terminar a eletroforese o gel foi lavado com 3 soluções específicas, A, B e C. Para a solução A, utilizou-se 45 ml de etanol e 3 ml de ácido fosfórico e completou-se o volume com água mili-Q até 150ml de volume total e para a solução B, a partir de 3 ml de ácido fosfórico completou-se para 150ml com água mili-Q. Por fim, para a solução C misturou-se 7,5 g de sulfato de amônio, 45 ml de etanol e 3ml de ácido fosfórico e completou-se para 100 ml com água mili-Q. O gel foi lavado com a solução A por 3 vezes de 30 minutos, por 2 vezes de 30 minutos com a solução B e por mais 30 minutos 1 vez com a solução C. Ao final dos últimos 30 minutos adicionou-se ao gel uma solução de 20mg/ml de Comassie Blue e verificou-se o aparecimento das bandas no dia seguinte.

4.11 Ensaio de estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos biocatalisadores iTLL, iTLL-GLU, iTLL-PEI-GLU foi avaliada através de 5 ciclos consecutivos de hidrólise do *p*NPB, com duração de 1 minuto e 30 segundos cada. A massa inicial utilizada foi proveniente de uma suspensão com 1 mg dos derivados diluídos em 1:5. Após cada medida de atividade, a massa de derivado era lavada 5 vezes em eppendorf com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 para medir novamente a atividade enzimática.

4.12 Estudo da carga de enzima oferecida para imobilização

A avaliação da carga de enzima oferecida para imobilização na resina foi feita preparando-se brancos de imobilização de carga 1 mg/g, 2 mg/g, 4 mg/g, 8 mg/g, 10 mg/g e 14 mg/g. Estas soluções tiveram seus pH ajustados para 7,0 com tampões saturados de pH 4,0 e pH 10,0 e iniciou-se as imobilizações colocando as soluções enzimáticas em contato com os suportes. O processo de imobilização ocorreu durante 2h na temperatura ambiente sob agitação do agitador orbital. A atividade enzimática dos brancos ocorreu imediatamente antes do início da imobilização (0h) e após o término do processo, com duração de 2h. As atividades dos

sobrenadantes e dos derivados foram calculadas logo após o término da imobilização fornecendo os valores necessários para o cálculo do rendimento de imobilização, da atividade teórica e da atividade recuperada com base nas equações (2), (3) e (4) mencionadas anteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do extrato enzimático

Com base nos resultados do ensaio de Bradford determinou-se que o valor da concentração proteica no extrato é de 15,72 mg/ml. Esse resultado consiste na média dos valores de concentração proteica das soluções enzimática que foram diluídas em 1:25 e 1:50 durante a realização do ensaio de Bradford, como visto na Tabela 1.

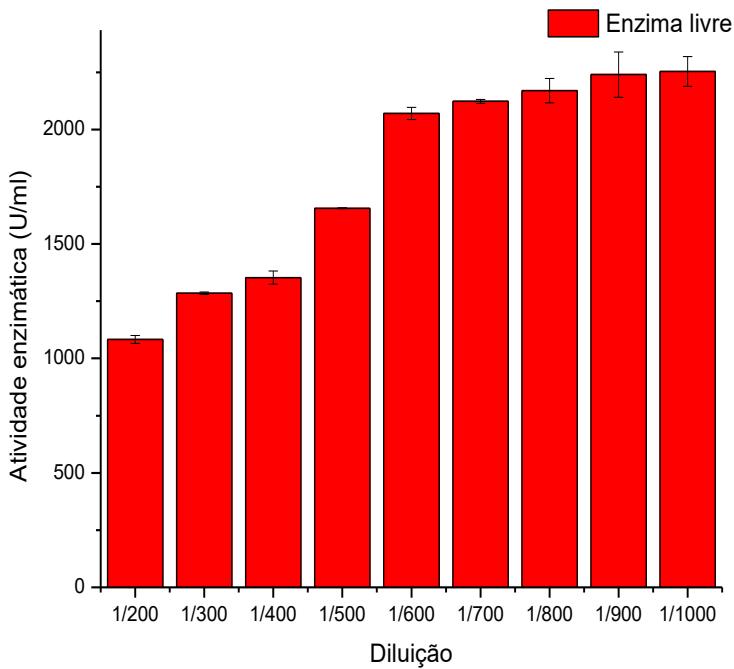
Tabela 1- Concentração proteica do extrato enzimático de lipase de *Thermomyces lanuginosus* com base no ensaio de Bradford

Diluição	Concentração (mg/ml)
1:25	15,30 ± 1,66
1:50	16,44 ± 2,99

Fonte: elaborado pelo autor. As soluções enzimáticas utilizadas no ensaio de Bradford estavam diluídas em 1:25 e 1:50 com Tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0.

O efeito da concentração de enzima na atividade da enzima livre foi conduzido com várias soluções enzimáticas preparadas com diferentes diluições e utilizando *p*NPB como substrato, como pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 – Comportamento da atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em diferentes diluições

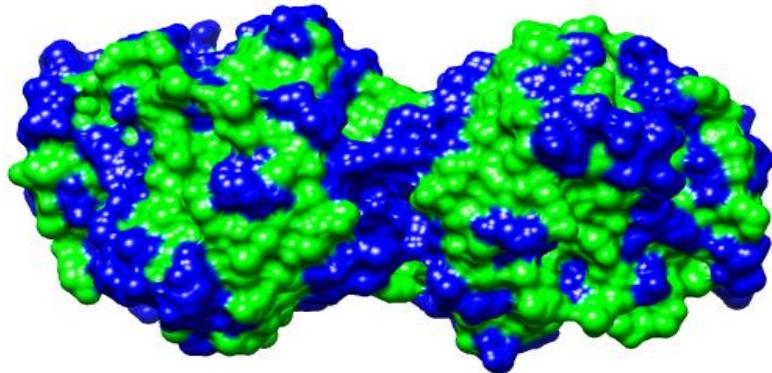


Fonte: elaborado pelo autor. As condições do experimento ocorreram em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 e temperatura 25 °C. As soluções enzimáticas utilizadas neste experimento foram diluídas em Tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 e tiveram suas atividades enzimáticas determinadas através da incubação com o substrato pNPB.

Nota-se que a atividade enzimática da enzima livre aumentou conforme o aumento da diluição e consequente diminuição da concentração de enzima. Além disso, ao chegar nas diluições 1:700 a 1:1000 as atividades enzimáticas permaneceram praticamente constantes com um valor de aproximadamente 2000 U/ml, evidenciando que esta é a faixa ideal de diluição. Vale lembrar que o ensaio de atividade de uma enzima consiste em um ensaio de velocidade inicial que deve ser conduzido em condições de saturação de substrato para garantir que a enzima está agindo constantemente. Dessa forma, a diluição garante que a concentração de enzima diminua enquanto a concentração de substrato permanece constante e assim a atividade enzimática aumenta até ficar constante e a partir daí, mesmo elevando a diluição, a atividade enzimática continua a mesma. (**NELSON; COX, 2014**)

Além de determinar a concentração de proteínas e a atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* é essencial estudar a estrutura tridimensional da proteína para determinar um método de imobilização. Para isto, abriu-se a estrutura 3D da lipase no software de análise estrutural e demarcou-se todos os aminoácidos hidrofóbicos presentes na superfície da TLL, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Visualização dos aminoácidos hidrofóbicos na superfície da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

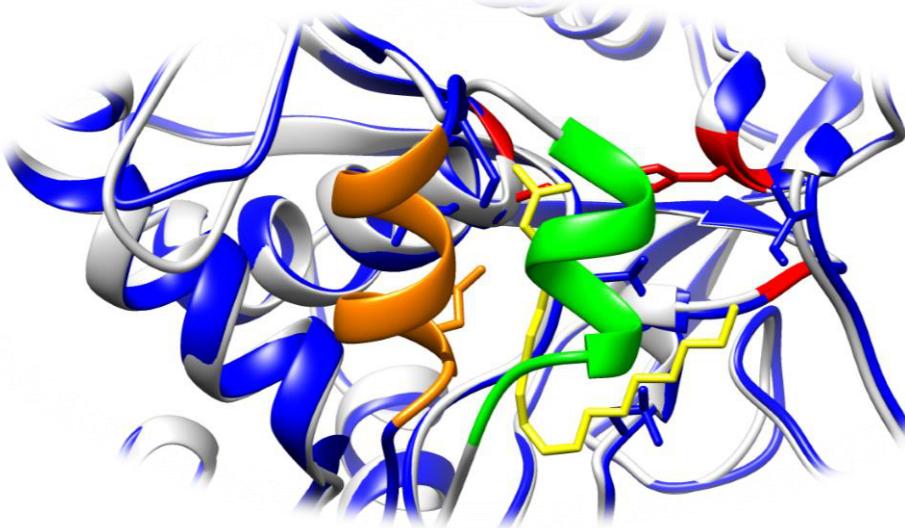


Fonte: elaborado pelo autor. Demarcação de todos os aminoácidos hidrofóbicos presentes na superfície da lipase de *Thermomyces lanuginosus* que podem ser usados como pontos de interação hidrofóbica durante a imobilização com a resina. Imagem gerada pelo software de análise UCFS Chimera a partir da estrutura tridimensional da TLL extraída do Protein Data Bank (PDB), com código 1DT3

Com base na Figura 5 fica claro que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* possui em sua superfície inúmeros resíduos hidrofóbicos para servirem como pontos de interação com o suporte hidrofóbico. A existência desta grande quantidade de grupos hidrofóbicos é um excelente indício de que a lipase pode ser imobilizada pela resina *Streamline phenyl*.

Vale ressaltar que a imobilização das lipases em suportes hidrofóbicos acontece devido a um fenômeno conhecido como ativação interfacial, que consiste no movimento da tampa da enzima quando a lipase interage com alguma estrutura hidrofóbica como descrito por **Fernandez-Lafuente et al. (1998)**, **Virgen-Ortíz et al. (2019)**, **Reis et al. (2009)**. Utilizando o software foi possível analisar este fenômeno e demonstrar o que acontece na estrutura da lipase quando a enzima muda da sua fechada para a estrutura aberta ao interagir com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no suporte (Figura 6).

Figura 6 – Sobreposição das estruturas aberta e fechada da lipase de *Thermomyces lanuginosus* evidenciando o movimento da tampa.

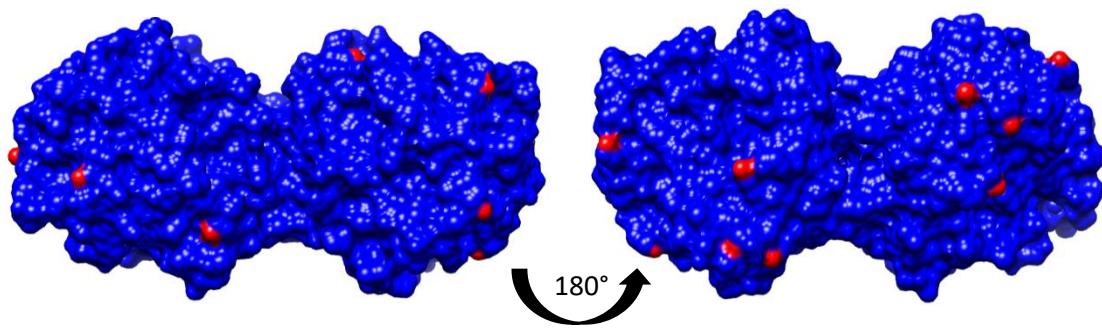


Fonte: elaborado pelo autor. Em verde temos a tampa da estrutura fechada (Branco), que recobre o sítio ativo em vermelho, impedindo-o de interagir com o substrato em amarelo. Em laranja vemos a tampa da forma aberta (Azul) que libera o acesso ao sítio ativo quanto em contato com uma estrutura hidrofóbica. Imagem gerada pelo software de análise UCFS Chimera a partir das estruturas tridimensionais da TLL extraídas do Protein Data Bank (PDB) com códigos 1GT6 (aberta) e 1DT3 (fechada).

Observando a Figura 6, vemos que a tampa é composta por um conjunto de resíduos de aminoácidos que cobrem o sítio ativo da enzima, isolando-o do meio reacional. Durante a imobilização, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos da enzima são capazes de interagir com grupos hidrofóbicos presentes no suporte, nesse caso, com os grupos fenil da resina *Streamline phenyl*, ativando a lipase (forma aberta). A tampa da TLL é considerada grande pois possui 8 aminoácidos, começando com o aminoácido Isoleucina-86 e finalizando com o aminoácido Leucina-93, e na forma fechada é menos ativa, pois o substrato tem maior dificuldade de acessar o sítio ativo (composto por Ser-146, Asp-201 e His-258). Ao entrar em contato com o suporte e seus grupamentos hidrofóbicos pode ocorrer a imobilização da lipase em sua forma aberta no suporte causando a ativação da enzima.

Além dos grupos hidrofóbicos na superfície da lipase também foram demarcados todos os aminoácidos com grupamentos amino presentes na estrutura, como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Visualização dos grupos amino demarcados na superfície da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

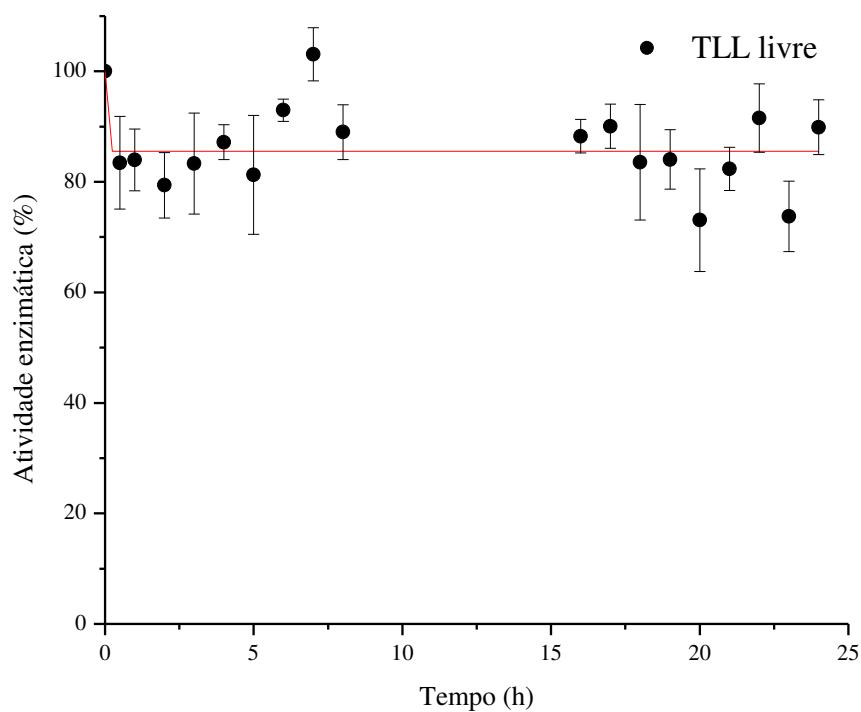


Fonte: elaborado pelo autor. Demarcação de todos os aminoácidos com grupos amino em seu radical que estão presentes na superfície da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e que podem ser usados como pontos disponíveis para ligação covalente com glutaraldeído. Imagem gerada pelo software de análise UCFS Chimera a partir da estrutura tridimensional da TLL extraída do Protein Data Bank (PDB), com código 1DT3.

Com base na Figura 7, notamos que diferente dos grupos hidrofóbicos na superfície da enzima, que aparecem em abundância, existem poucos grupamentos amino na estrutura. Analisando a estrutura 3D da TLL notamos uma escassez de grupos amino na superfície, com apenas 8 grupos amino em cada subunidade da lipase, sendo 7 dos 8 grupos oriundos de aminoácidos Lisina. Vale ressaltar que o estudo de **Sheldon et al. (2011)** já evidenciaram que são estes grupos amino presentes principalmente em aminoácidos lisina que formam ligações covalentes com reticulantes como o glutaraldeído e a quantidade desses grupos na estrutura pode influenciar na eficácia da imobilização covalente. Desta forma, podemos afirmar que o estudo da estrutura 3D da lipase de *Thermomyces lanuginosus* auxilia na escolha do método de imobilização, uma vez a composição e a natureza dos aminoácidos presentes na superfície da enzima pode influenciar na eficácia do processo de imobilização. Com uma grande quantidade de grupos hidrofóbicos em sua superfície pode-se esperar uma imobilização eficiente em uma resina de interação hidrofóbica como a *Streamline phenyl*.

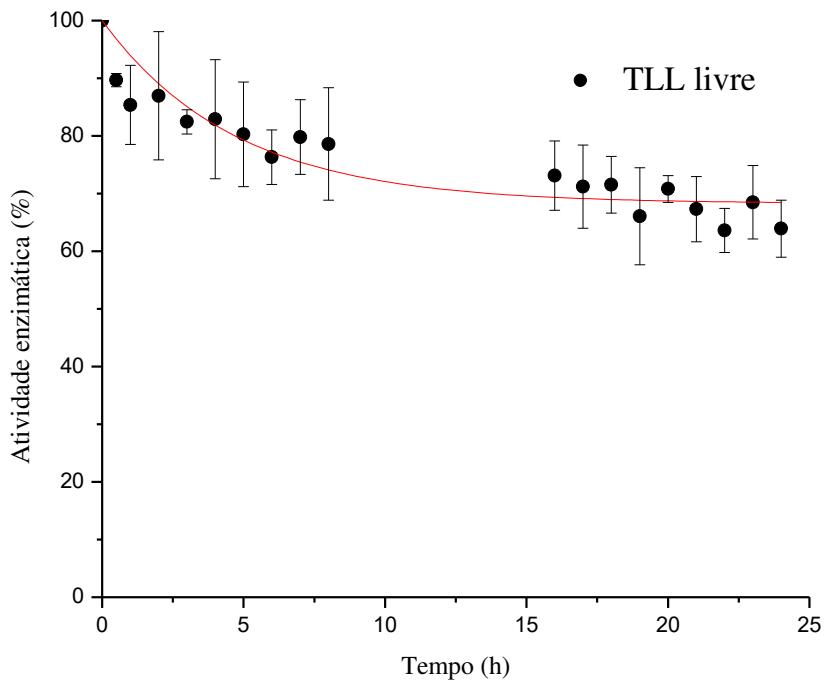
Além disso, o extrato enzimático também foi caracterizado quanto a estabilidade térmica. Dessa forma, acompanhou-se o perfil de desativação da enzima livre a 55 °C, 60 °C e 65 °C. Ver Figuras 8, 9 e 10.

Figura 8 – Desativação térmica da enzima livre a 55 °C



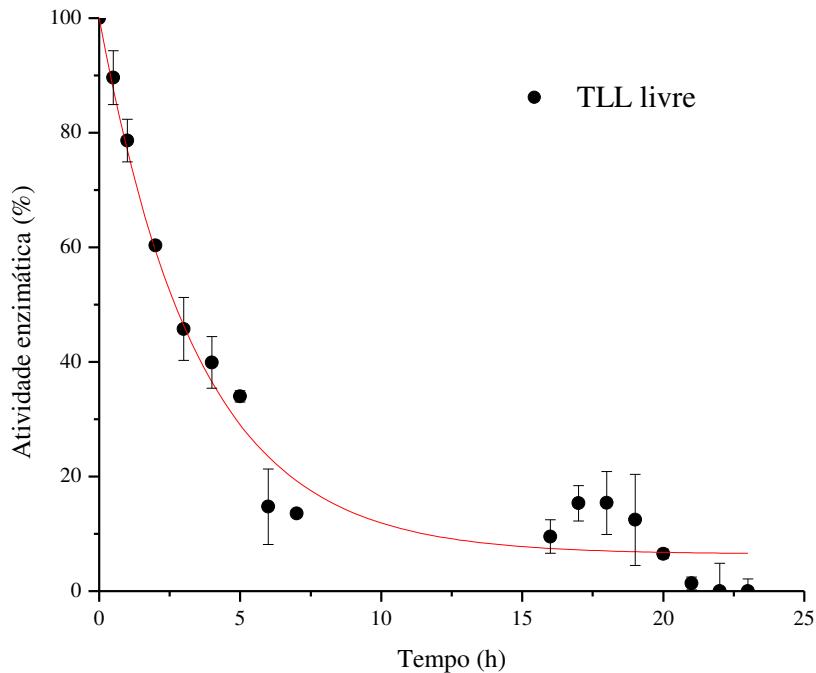
Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 55 °C da enzima livre em termos de atividade relativa à inicial por tempo em horas. O ensaio ocorreu em Tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,0.

Figura 9 – Desativação térmica da enzima livre a 60 °C



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 60 °C da enzima livre em termos de atividade relativa à inicial por tempo em horas. O ensaio ocorreu em Tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,0.

Figura 10 – Desativação térmica da enzima livre a 65 °



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 65 °C da enzima livre em termos de atividade relativa à inicial por tempo em horas. O ensaio ocorreu em Tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,0.

Avaliando as estabilidades térmicas da enzima livre notou-se que a 55°C a atividade da enzima sofre uma leve queda em sua atividade no início e permanece praticamente constante durante 24h, retendo 85% da atividade relativa a inicial (Figura 8), enquanto a 60°C percebe-se que a enzima sofre uma lenta desativação, de forma que após 24h ainda possui mais da metade de sua atividade original, permanecendo com cerca de 70% da atividade relativa, como pode ser visto na Figura 9. Resultados semelhantes foram obtidos por **Fernandes et al., (2004)** que obtiveram, em pH 8,0, uma retenção de 95% da atividade após 2h de incubação a 55 °C e 80% da atividade após 2h de incubação a 60 °C. Entretanto a 65°C a enzima sofre desativação completa com cerca de 8h de experimento (Figura 10) e apresentou um tempo de meia vida de 2h e 52 minutos, sendo por isso a temperatura e o tempo escolhidos para estudar a desativação térmica de todos os biocatalisadores deste trabalho a fim de verificar aumentos de estabilidade.

5.2 Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via resina hidrofóbica

A imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via *Streamline phenyl* aconteceu possivelmente por interação hidrofóbica entre os resíduos hidrofóbicos da enzima e os grupos fenil no suporte utilizado, assim como esperado. Os resultados provenientes do ensaio de Bradford dos sobrenadantes e do branco de imobilização mostraram que com 2h, restou cerca de metade da atividade oferecida para a imobilização nos sobrenadantes, atestando um rendimento de imobilização de aproximadamente 50% (Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento de imobilização com base na concentração proteica presente no branco de imobilização e nos sobrenadantes após a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via resina hidrofóbica *Streamline phenyl*

	Branco	Sobrenadante	Rendimento (%)
Concentração (mg/ml)	0,1308 ± 0,020	0,0689 ± 0,006	52,65 ± 2,286

Fonte: elaborado pelo autor. A concentração proteica do branco de imobilização e dos sobrenadantes foi determinado pelo ensaio de Bradford após o término da imobilização de 2h.

Como esperado, as atividades recuperadas dos derivados ultrapassaram 100% da atividade teórica, o que implica em hiper ativação da lipase imobilizada como descrito por **Virgen-Ortíz et al. (2019)**. Os parâmetros de imobilização podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via resina hidrofóbica *Streamline phenyl*

Biocatalisador	At ₀ (U/mL)	At _f (U/mL)	R (%)	At _{teo} (U/g)	At _d (U/g)	At _r (%)
iTLL	13,70 ± 0,45	6,82 ± 0,68	51,29 ± 4,82	71,91 ± 6,76	76,75 ± 8,14	106,67 ± 3,19

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros importantes acerca da imobilização da TLL via resina hidrofóbica. A atividade recuperada (*At_r*) é uma razão entre a atividade do derivado (*At_d*) e a atividade teórica (*At_{teo}*), que por sua vez é definida com base na atividade de enzima oferecida (*At₀*) e na atividade obtida no sobrenadante (*At_f*). A imobilização foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0 a 25 °C e proporção entre suporte e solução enzimática de 1:10 (m/v).

Este valor de atividade recuperada possivelmente está relacionado com a interação entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na enzima e os grupos fenil do suporte. Como visto anteriormente na Figura 5, existem muitos aminoácidos com propriedades hidrofóbicas na superfície da lipase, o que possibilitou a imobilização eficiente da lipase na resina. Além disso, assim como nos resultados de Bradford, o rendimento de imobilização permaneceu em torno de 50% com base na atividade enzimática do branco e dos sobrenadantes ao final de 2h de imobilização. Outros trabalhos também mostram que normalmente a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos são rápidas e eficientes. O trabalho de Zaak *et al.* (2017), por exemplo, mostra a imobilização da TLL em octil agarose utilizando 1mg de TLL/g de suporte em condições semelhantes as deste trabalho (tampão fosfato 5mM a 25°C). Diferente do presente trabalho, Zaak e colaboradores obtiveram um rendimento de 100% com 3h de imobilização.

5.3 Efeito da diluição na atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

Para investigar o efeito da diluição na atividade do derivado foi feita a comparação as atividades dos derivados sem diluição e os diluídos em 1:5 A Tabela 4 mostra a atividade dos derivados de TLL produzidos a partir de uma carga oferecida para a imobilização de 1mg/g.

Tabela 4 – Efeito da diluição na atividade da lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus*

Amostra	Diluição do derivado	Atividade no derivado (U/g)	Atividade recuperada (%)
iTLL	-	$35,45 \pm 0,86$	$55,41 \pm 2,55$
iTLL	1:5	$76,75 \pm 8,14$	$106,67 \pm 3,19$

Fonte: elaborado pelo autor. Efeito da diluição na atividade das lipases imobilizadas e na atividade recuperada. A atividade recuperada se trata da razão entre a atividade do derivado e a atividade teórica. As imobilizações foram conduzidas em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0 a 25°C e proporção entre suporte e solução enzimática de 1:10 (m/v)

Os resultados da Tabela 4 nos mostram que diluir os derivados é essencial para estimar a atividade enzimática real. Caso a amostra não seja diluída, os valores de atividade serão menores do que o valor esperado e a atividade nos derivados estará sendo subestimada, consequentemente a atividade recuperada também será menor.

As lipases precisam estar em uma faixa ideal de diluição para que sua atividade seja mensurada corretamente, como evidenciado na Tabela acima e na Figura 4. Se não forem diluídas o suficiente algumas lipases podem permanecer agregadas umas às outras com suas formas abertas através da adsorção entre os bolsões hidrofóbicos próximo ao centro ativo. A maioria das lipases tendem a formar estes agregados e caso aconteça durante a reação o centro ativo ficará inacessível para interagir com o substrato, exibindo valores de atividades enzimáticas inferiores ao esperado. Quando a diluição atinge um nível ideal as enzimas não permanecem agregadas e os centros ativos antes bloqueados são liberados para agir no substrato, mostrando os reais valores de atividade. No trabalho de **Fernández-Lorente et al (2003)** já foi mostrado que estes agregados biomoleculares afetam drasticamente as propriedades da lipase de *Pseudomonas fluorescens*, de forma que apresentam propriedades catalíticas completamente diferentes em relação as moléculas individuais da lipase. Dessa forma, encontrar a faixa de diluição ideal é importantíssimo para o cálculo da atividade enzimática da enzima livre e de seus imobilizados, como foi feito no presente trabalho.

5.4 Efeitos da reticulação com glutaraldeído e revestimento com PEI na atividade dos biocatalisadores imobilizados

A tabela 5 mostra os resultados do tratamento da enzima imobilizada com glutaraldeído e PEI, mostrando os efeitos nas atividades dos derivados e nas atividades recuperadas, quando comparamos aos biocatalisadores imobilizados apenas por adsorção hidrofóbica (iTLL).

Tabela 5 – Efeito do glutaraldeído e polietilenoimina (PEI) nas atividades das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* e nas atividades recuperadas nos derivados

Biocatalisador	Atividade teórica (U/g)	Atividade no derivado (U/g)	Atividade recuperada (%)
iTLL	71,91 ± 6,76	76,75 ± 8,14	106,67 ± 3,19
iTLL-GLU	63,79 ± 3,67	36,02 ± 0,67	56,53 ± 2,19
iTLL-PEI	72,93 ± 5,16	46,35 ± 4,77	62,16 ± 4,25

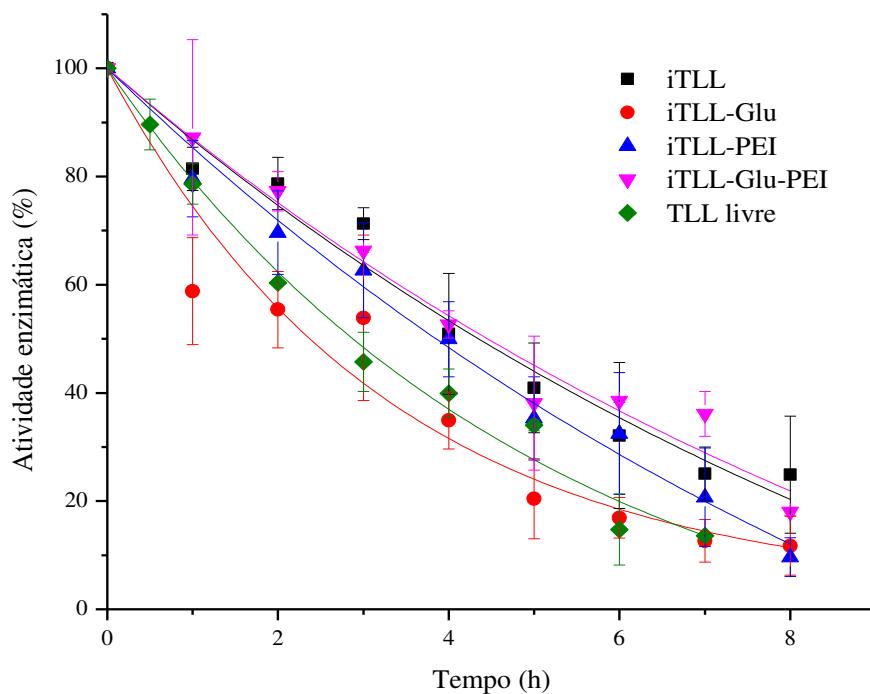
iTLL-PEI-GLU	$76,18 \pm 6,65$	$39,12 \pm 5,78$	$51,21 \pm 3,11$
Fonte: elaborado pelo autor. As amostras de iTLL-GLU e iTLL-PEI-GLU foram produzidas com uma concentração de 1% de glutaraldeído enquanto as amostras de iTLL-PEI e iTLL-PEI-Glu foram produzidas com uma concentração de 10% (p/v) de Polietilenoimina (PEI).			

O glutaraldeído é um agente reticulante bifuncional que é capaz de formar ligações cruzadas covalentes com grupos amino de aminoácidos, principalmente de resíduos lisina (WEETAAL., 1974). A reticulação da enzima com glutaraldeído gerou derivados (iTLL-GLU) com atividades menores quando comparamos com o derivado inicial (iTLL), exibindo uma atividade recuperada de aproximadamente 56%. De acordo com Sheldon *et al.* (2010) a reticulação de enzimas geralmente leva a uma redução de atividade enzimática, como vemos na tabela acima. Dessa forma, investigou-se os efeitos do recobrimento com Polietilenoimina nos derivados. Porém, os derivados revestidos com PEI sem adição de glutaraldeído (iTLL-PEI) também apresentaram uma perda de atividade similar ao iTLL-GLU, apresentando uma atividade recuperada de aproximadamente 62%. Por fim, os derivados que passaram por reticulação com glutaraldeído após revestimento com PEI (iTLL-PEI-GLU) sofreram uma leve queda de atividade em comparação com o seu derivado antecessor (iTLL-PEI) e perderam cerca de 50% de atividade no derivado quando comparamos ao biocatalisador inicial (iTLL). Analisando a tabela anterior vemos que tanto a reticulação com glutaraldeído quanto o revestimento com o PEI afetaram negativamente as atividades dos derivados e consequentemente as atividades recuperadas, que perderam aproximadamente metade das unidades enzimáticas por grama de suporte.

5.5 Estabilidade térmica dos biocatalisadores imobilizados

Embora os demais biocatalisadores imobilizados tenham apresentado resultados negativos quanto a atividade recuperada, estes também foram avaliados quanto a estabilidade térmica a 65°C a fim de observar se houve estabilização térmica que compensasse a perda de atividade, como mostra a Figura 11 e a Tabela 6.

Figura 11 – Desativação térmica das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* a 65°C



Fonte: elaborado pelo autor. Desativação térmica a 65 °C dos derivados produzidos da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e da enzima livre em termos de atividade relativa à inicial por tempo em horas. O ensaio ocorreu em Tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,0.

Tabela 6 - Parâmetros de desativação térmica das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* a 65°C

Biocatalisador	R ²	t _{1/2} (min)	FE	α	K _d (min ⁻¹)
iTLL	0,97	260,4	1,61	- 0,60	0,08
iTLL-GLU	0,92	142,2	0,88	0,03	0,30
iTLL-PEI	0,98	230,4	1,43	- 0,74	0,08
iTLL-PEI-GLU	0,97	267,0	1,66	- 0,56	0,08
Enzima livre	0,98	172,2	-	- 0,15	0,19

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros do modelo de Sadana e Hanley para a desativação térmica dos derivados da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e da enzima livre. As condições empregadas para a desativação foram tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e temperatura 65°C. R² é o fator de correlação; t_{1/2} é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade (a razão entre t_{1/2} do derivado e t_{1/2} da enzima livre); α representa a fração da enzima ou derivado que perde atividade; K_d é a constante de desativação térmica

Como observado na Figura 11 e detalhado nos parâmetros de desativação térmica na Tabela 6, o biocatalisador imobilizado iTLL apresentou resultado positivo elevando o tempo de meia vida para 4h e 20 minutos, uma estabilização de 1,61. Com isso, avaliou-se a desativação térmica do biocatalisador iTLL-GLU esperando que o glutaraldeído garantisse uma maior estabilidade ao derivado devido as ligações entrecruzadas covalentes entre os grupos aldeído e os grupos amino presentes na TLL, o que não ocorreu. O biocatalisador reticulado apenas com glutaraldeído (iTLL-GLU) se destacou negativamente com a desativação térmica mais rápida, em torno de 2h e 22 minutos, semelhante a enzima livre ($t_{1/2} = 2h\ e\ 52\ minutos$). Entretanto, com o uso do PEI, obtemos derivados com um tempo de meia vida superior, de 3h e 50 minutos para o biocatalisador iTLL-PEI e 4h e 27 minutos para o iTLL-PEI-GLU, o mais consistente entre todos, com a menor constante de desativação térmica do experimento e o maior fator de estabilidade.

A partir da análise dos parâmetros de desativação e dos gráficos de estabilidade térmica vemos que o derivado que foi reticulado com glutaraldeído 1% não apresentou um bom resultado, apresentando os piores parâmetros de desativação com o maior valor de K_d e o menor fator de estabilidade. Em contrapartida, o derivado revestido com PEI que foi reticulado com glutaraldeído 1% apresentou a menor constante de desativação térmica e o maior tempo de meia vida, se mostrando o mais consistente entre os derivados de TLL. Possivelmente, este comportamento pode ser explicado analisando a composição grupamentos amino na superfície da TLL, que servem como pontos para ligação covalente com os grupos aldeído do glutaraldeído, como mostrado anteriormente na Figura 7. Possivelmente, esta escassez de grupos amino na superfície da lipase reflete os resultados negativos de desativação térmica do derivado iTLL-GLU, já que estes grupos amina são os pontos de interação com glutaraldeído. Por isto, resolveu-se utilizar a polietileneimina (PEI), um polímero ramificado com múltiplos grupos amina, muito utilizado na imobilização de enzimas para incrementar o número de grupamentos amino para uma possível estabilização dos derivados. O uso desse composto fez com que elevasse o número de grupos amino disponíveis para formar ligações covalentes com o glutaraldeído. Isso explicaria o fato do biocatalisador iTLL-PEI-GLU ter sido o mais estável em comparação aos demais biocatalisadores imobilizados e em relação a enzima livre também.

No trabalho de **Zaak et al (2017)**, testou-se a inativação térmica em 3 condições diferentes de temperatura (73°C, 70,5°C e 65°C) e pH (5, 7, 9) de imobilizados de TLL em octil agarose (OC-TLL) e preparações OC-TLL com PEI e glutaraldeído-PEI. Mesmo em condições diferentes a deste trabalho foi comprovado um aumento na estabilidade térmica destes derivados ao utilizar a polietilenoimina (PEI) para revestir as enzimas imobilizadas,

aumentando o tempo de meia vida dos biocatalisadores, enquanto o biocatalisador com glutaraldeído (OC-TLL-GLU) não gerou efeitos significativos na estabilidade, assim como no presente trabalho.

5.6 Ensaio de dessorção e estabilidade da enzima livre com o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio

O ensaio de dessorção mostrou que mesmo em contato com o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio por 24h, a enzima solúvel praticamente não perdeu atividade e que, quando em contato com o surfactante a atividade da enzima obteve um leve aumento na atividade enzimática, como visto na Tabela 7. Isso aconteceu, pois, a parte hidrofóbica do composto CTAB ativa a lipase e deixa seu sítio ativo aberto para interagir com o substrato via ativação interfacial, estabilizando a forma aberta da enzima. Resultados similares foram obtidos por **Fernandez-Lorente et al. (2007)** que constataram um aumento na atividade das lipases imobilizadas de *Pseudomonas fluorescens* e *Candida antarctica* ao utilizar o detergente CTAB nas concentrações 0,01% e 0,1%.

Tabela 7 – Efeito do surfactante Cetiltrimetilamonio 0,6% na estabilidade da lipase livre de *Thermomyces lanuginosus*

Amostra	Atividade em 0h (U/mL)	Atividade em 24h (U/mL)
Enzima livre	6,36	6,79
Enzima livre + CTAB	7,70	7,26

Fonte: elaborado pelo autor. Incubação da enzima livre com o surfactante CTAB 0,6% por 24h.

Os resultados também mostraram que mesmo após 24h em contato com o surfactante, as enzimas imobilizadas não foram totalmente dessorvidas do suporte, tanto no derivado iTLL quanto no derivado reticulado com glutaraldeído 1 %, iTLL-GLU. Isso mostra que a concentração de 0,6% de CTAB não é suficiente para dessorver a enzima do suporte, o que é um resultado importante visto que em aplicações industriais a dessorção da enzima do suporte resultaria na contaminação do produto desejado. Entretanto, esperava-se que o derivado com glutaraldeído fosse capaz de reter mais atividade do que o derivado iTLL após 24h de

incubação, mas isso não ocorreu, pois, as taxas de dessorção foram bem semelhantes e o derivado sem glutaraldeído obteve a menor taxa de dessorção, com cerca de 24,42%, como pode ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 – Efeito do surfactante Cetiltrimetilamônio 0,6% nas atividades dos derivados iTLL e iTLL-GLU

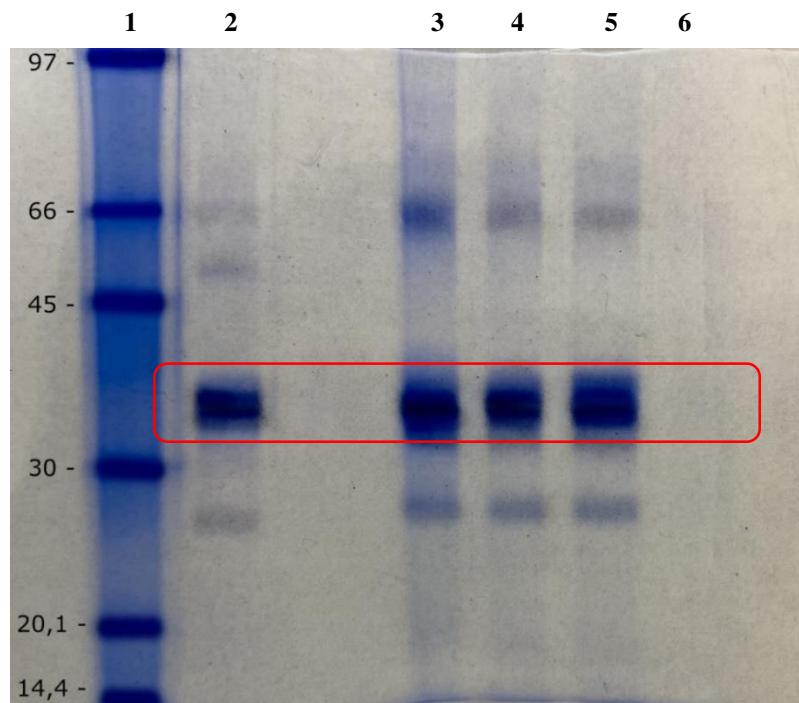
Amostra	Atividade em 0h (U/g)	Atividade em 24h (U/g)	Taxa de dessorção (%)
iTLL	30,30	22,90	24,42
iTLL-GLU	14,40	10,30	28,47

Fonte: elaborado pelo autor. Incubação dos derivados iTLL e iTLL-GLU com o surfactante CTAB 0,6% por 24h. A taxa de dessorção indica a razão entre a atividade perdida após 24h e a atividade inicial em U/g dos derivados.

5.7 Eletroforese dos biocatalisadores imobilizados

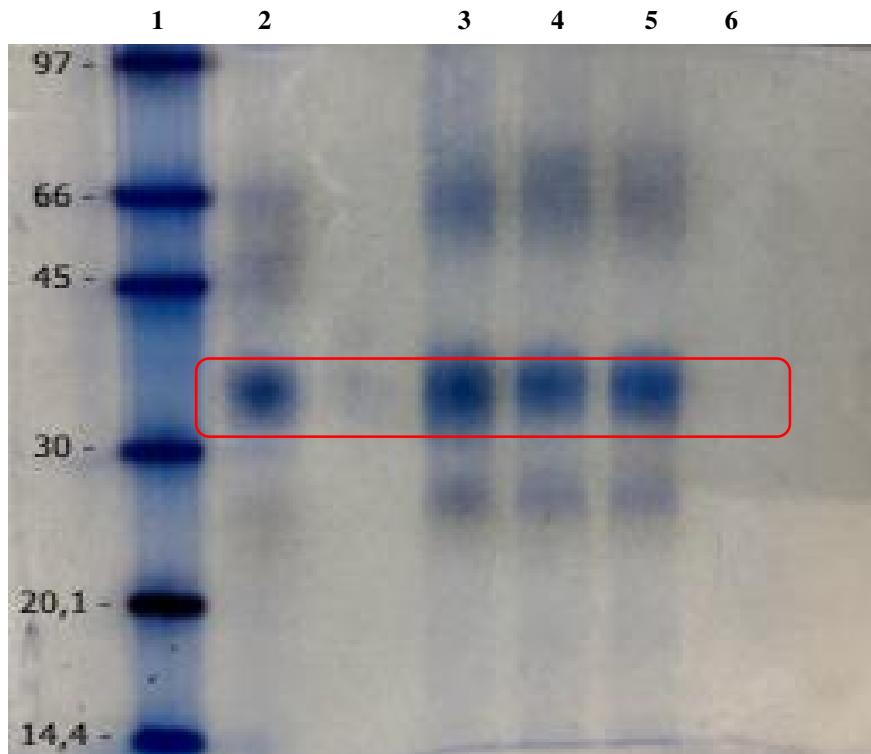
As revelações dos géis de eletroforese com Comassie Blue, mostradas nas Figura 12 e 13, evidenciaram a banda da lipase estudada acima de 30kDa e alguns outros componentes presentes no extrato com bandas em torno de 66 kDa e abaixo de 30kDa.

Figura 12 – Eletroforese das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* antes da desativação térmica a 65°



Fonte: elaborado pelo autor. Gel de eletroforese mostrando a banda da lipase em torno de 30kDa, marcação em vermelho. 1 – marcador de baixo peso molecular, 2 - branco de imobilização, 3 - iTLL, 4 - iTLL-GLU, 5 - iTLL-PEI, 6 - iTLL-PEi-GLU. A concentração no poço de cada derivado foi de 5mg/ml.

Figura 13 – Eletroforese das lipases immobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* após a desativação térmica a 65°



Fonte: elaborado pelo autor. Gel de eletroforese mostrando a banda da lipase em torno de 30kDa, marcação em vermelho. 1 – marcador de baixo peso molecular, 2 - branco de imobilização, 3 - iTLL, 4 - iTLL-GLU, 5 - iTLL-PEI, 6 - iTLL-PEi-GLU. A concentração no poço de cada derivado foi de 5mg/ml.

As imagens indicam que a reticulação do derivado contendo PEI com glutaraldeído 1 % (iTLL-PEI-GLU) foi satisfatória, visto que a banda da lipase não apareceu quando o sobrenadante, após contato com tampão de ruptura, foi analisado. Sendo assim, acredita-se que se formaram as ligações entrecruzadas covalentes entre a enzima e os grupos aldeído, favorecendo a retenção da proteína no suporte. O mesmo comportamento é observado quando se analisa o biocatalisador antes e depois da incubação para o estudo da desativação térmica. Entretanto, a banda da lipase para o biocatalisador reticulado apenas com glutaraldeído aparece, indicando que as ligações covalentes não foram formadas de forma eficiente, prevalecendo apenas a imobilização por adsorção hidrofóbica para uma porção da proteína.

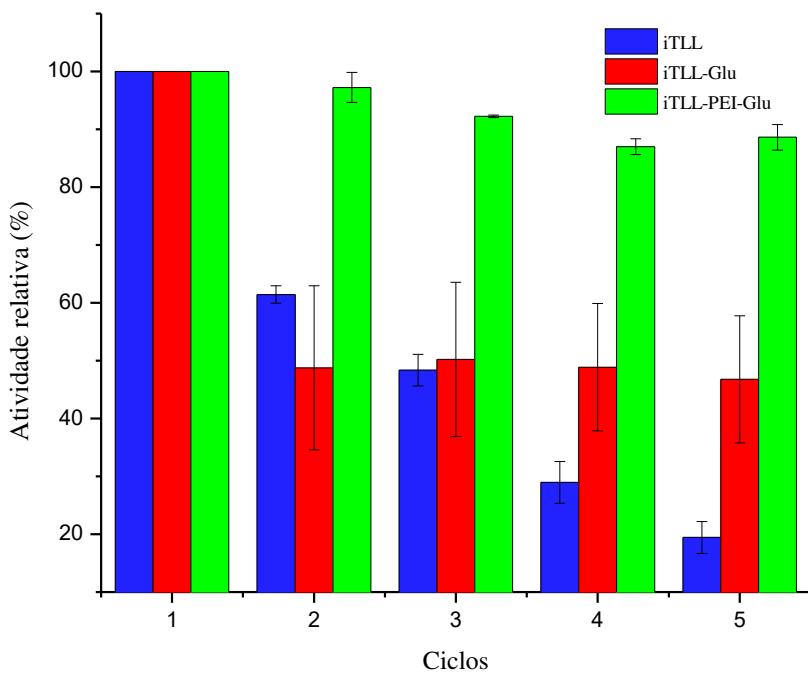
A diferença de comportamento dos dois biocatalisadores com glutaraldeído (iTLL-PEI e iTLL-PEi-GLU) só reforça que a escassez de grupos amino na superfície da lipase, como

visto na Figura 7, influencia na formação efetiva de ligações covalentes com glutaraldeído. Dessa forma, pode-se afirmar que, provavelmente, apenas algumas moléculas do biocatalisador iTLL-GLU foram imobilizadas por ligação covalente com o glutaraldeído, não sendo suficiente para reter toda a proteína no suporte, ou seja, neste biocatalisador há um misto de interação hidrofóbica com ligação covalente . Por outro lado, percebe-se que o derivado com PEI e glutaraldeído não aparece no gel de eletroforese, indicando provavelmente que a polietilenoimina de fato ofereceu mais grupamentos amina para formar ligações covalentes com o glutaraldeído de forma eficiente, sendo capaz de reter toda a proteína no suporte. Estudos anteriores como o de **Arana-Peña et al. (2019, 2020)** e **Zaak et al. (2017)** já evidenciaram que o uso do glutaraldeído permite a imobilização covalente irreversível da enzima no suporte e que o uso do desse agente na lipase-PEI evita a liberação da enzima no suporte, como podemos ver através dos géis de eletroforese.

5.8 Estabilidade Operacional dos biocatalisadores imobilizados em reações sucessivas de hidrólise

A estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados de TLL foi conduzida em 5 ciclos de hidrólise de *p*NPB utilizando 1 mg de enzima imobilizada oriunda da suspensão de uma solução diluída 1:5 de cada derivado com carga 1mg/g, como pode ser observado na Figura 14

Figura 14 – Estabilidade operacional das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* utilizando *p*NPB como substrato



Fonte: elaborado pelo autor. Estabilidade operacional dos derivados da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, ao longo de 5 ciclos de 1minuto e 30 segundos de duração cada. Os ciclos de hidrólise de *p*NPB subsequentes foram realizadas em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, a 25°C.

Esse experimento visou investigar a possibilidade de reutilização dos biocatalisadores imobilizados ao longo de repetidos ciclos de atividade utilizando *p*NPB como substrato. Logo após o 2º ciclo de operação os diferentes biocatalisadores apresentaram diferenças significativas em relação a atividade inicial, exceto para o biocatalisador iTLL-PEI-GLU, finalizando o ensaio no 5º ciclo de hidrólise de *p*NPB. O biocatalisador iTLL teve sua atividade reduzida para aproximadamente 20% ao final do processo, indicando que sua reutilização seria inviável nessas condições. Já o biocatalisador iTLL-GLU mostrou-se um pouco melhor, perdendo cerca de 50% da atividade inicial após o 2º ciclo e mantendo-se constante até o final do 5º ciclo, indicando uma razoável possibilidade de reutilização. Por fim, fica nítido que o iTLL-PEI-GLU foi o biocatalisador mais consistente neste experimento, mantendo-se com uma significativa estabilidade operacional. Esse biocatalisador manteve sua atividade relativa de aproximadamente 90% da sua atividade inicial, indicando um grande potencial de reutilização. Este resultado, assim como evidenciado nos resultados da eletroforese, reflete a efetividade da reticulação com glutaraldeído após o revestimento do derivado com PEI, responsável por estabilizá-lo.

5.9 Efeito da concentração de enzima durante a imobilização.

Com o objetivo de avaliar o efeito da carga oferecida (mg de enzima/g de suporte) nos parâmetros de imobilização foram produzidos imobilizados com diferentes cargas proteicas (1mg/g, 2mg/g, 4mg/g, 8mg/g, 10mg/g, 14mg/g) nas mesmas condições, como observado na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeito da carga de proteína oferecida nos parâmetros de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em resina hidrofóbica *Streamline phenyl*

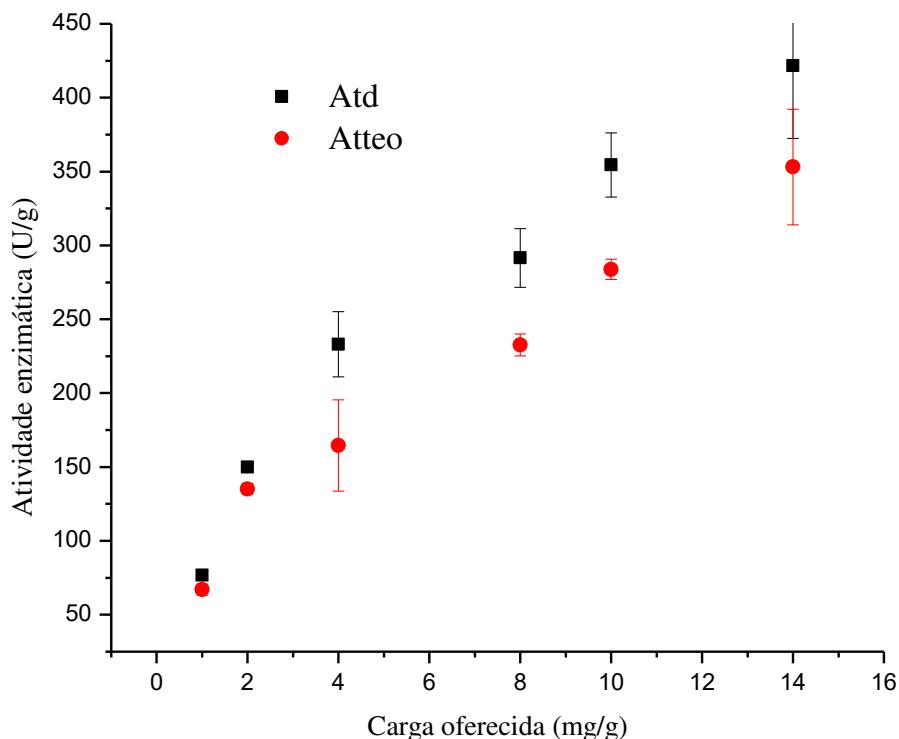
Carga oferecida (mg/g)	A _{t0} (U/ml)	A _{tf} (U/ml)	R (%)	A _{teo} (U/g)	A _{td} (U/g)	A _r (%)
1	13,7 ± 0,4	6,9 ± 0,1	48,9 ± 1,1	67,1 ± 3,7	76,8 ± 0,7	114,7 ± 7,4
2	23,7 ± 0,3	10,2 ± 0,7	56,9 ± 2,3	135,1 ± 3,6	150,0 ± 3,2	111,1 ± 5,4
4	36,9 ± 1,4	20,4 ± 1,6	44,5 ± 6,5	164,5 ± 30,9	233,1 ± 22,1	142,9 ± 13,4
8	44,9 ± 6,8	21,6 ± 6,1	52,4 ± 6,3	233,7 ± 7,4	291,5 ± 19,8	124,6 ± 4,5
10	54,3 ± 7,1	26,1 ± 6,4	52,6 ± 5,6	283,8 ± 6,83	354,5 ± 21,7	124,8 ± 4,8
14	91,1 ± 4,6	55,8 ± 0,7	38,8, ± 2,3	353,1 ± 39,1	421,6 ± 49,1	119,3 ± 0,6

Fonte: elaborado pelo autor. Parâmetros importantes acerca da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via resina hidrofóbica, oferecendo diferentes concentrações de proteínas para imobilização. A atividade recuperada (*A_{tr}*) é uma razão entre a atividade do derivado (*A_{td}*) e a atividade teórica (*A_{teo}*), que por sua vez é definida com base na atividade de enzima oferecida (*A_{t0}*) e na atividade obtida no sobrenadante (*A_{tf}*). A imobilização foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0 a 25 °C e proporção entre suporte e solução enzimática de 1:10 (m/v).

Com base na tabela observamos que a o rendimento de imobilização e atividade recuperada tiveram comportamentos semelhante em todas as concentrações, com o rendimento permanecendo em 50% e a atividade recuperada acima de 100%, exceto para a carga proteica de 14mg/g que mostrou um rendimento perto de 40%, indicando que talvez o rendimento possa começar a cair a partir deste valor de carga oferecida. Além disso, a tabela mostra que as atividades teóricas e as atividades dos derivados cresceram juntamente com as cargas e

atividades oferecidas para imobilização. Isso pode ser melhor observado na Figura 15, que mostra o aumento destes parâmetros conforme o aumento de carga oferecida.

Figura 15 – Influência da carga oferecida para imobilização na atividade enzimática da lipase immobilizada de *Thermomyces lanuginosus*

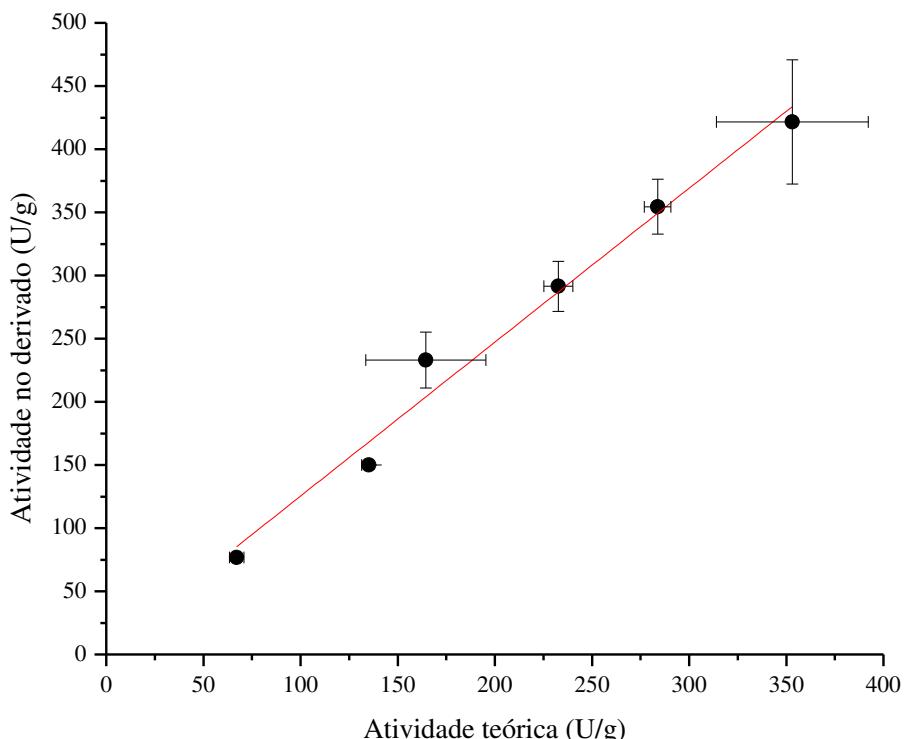


Fonte: elaborado pelo autor. Variação da atividade teórica (Atteo) e atividade dos derivados (Atd) conforme aumento da carga proteica oferecida para imobilização. As imobilizações foram conduzidas em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0, 25°C e proporção entre suporte e solução enzimática de 1:10 (m/v).

Estudos anteriores também já avaliaram o efeito da concentração de enzimas durante a imobilização. O trabalho de **Tacias-Pascacio et al. (2016)**, por exemplo, avaliou a imobilização de 5 lipases diferentes em 6 diferentes suportes hidrofóbicos comerciais e verificou a carga de enzima suportada por cada um deles utilizando condições experimentais semelhantes as utilizadas neste trabalho (tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0 e 25°C). De acordo com os resultados do trabalho, o menor valor de carga suportada foi de 5mg/g e a maior foi de 17 mg/g, resultados apresentados em suportes diferentes, já que cada um suporta um valor de carga máxima diferente.

Além disso, também podemos analisar a relação que existe entre a atividade nos derivados e a atividade teórica quando aumentamos a carga de proteínas que oferecemos para a imobilização por meio da Figura 16.

Figura 16 – Relação entre a atividade no derivado e a atividade teórica conforme o aumento de carga de proteínas oferecida para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



Fonte: elaborado pelo autor. Correlação existente entre atividade teórica (Atteo) e atividade nos derivados (Atd) conforme aumento da carga proteica oferecida para imobilização. $R^2 = 97,8$. As imobilizações foram conduzidas em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7,0, 25°C e proporção entre suporte e solução enzimática de 1:10 (m/v).

Com base na Figura 16, fica claro que há um aumento diretamente proporcional entre a atividade teórica e a atividade do derivado conforme o aumento de carga proteica imobilizada. Isso mostra que não há limitação difusional para o substrato e o produto no meio catalítico, ou que pelo menos a ativação da lipase compensa a restrição difusional.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram apresentadas as condições ideais para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*, produzindo derivados ativos e estáveis, com 100% ou mais de atividade recuperada. Foram produzidos diferentes tipos de derivados, utilizando glutaraldeído como agente reticulante e polietilenoimina para recobrir e estabilizar os biocatalisadores imobilizados, com cada um apresentando aspectos positivos e negativos em relação a atividade enzimática e estabilidade térmica e operacional. Foi possível atestar que embora alguns biocatalisadores tenham apresentado desempenhos não tão bons, estes cumpriram o papel principal das enzimas imobilizadas, a reutilização do biocatalisador ativo, que consiste no objetivo principal da imobilização enzimática.

Em síntese, os resultados experimentais foram bem positivos, principalmente para o biocatalisador revestido com polietileneimina e reticulado com glutaraldeído (iTLL-PEI-GLU), que, embora tenha apresentado uma queda de atividade, demonstrou uma excelente estabilidade térmica a 65°C e uma ótima consistência em ciclos sequenciais de hidrólise de *p*NPB, provocadas pelo estabelecimento de ligações entrecruzadas covalentes com glutaraldeído.

REFERÊNCIAS

ABENDROTH, Jan; CHATTERJEE, Shivani; SCHOMBURG, Dietmar. Purification of a D-hydantoinase using a laboratory-scale Streamline phenyl column as the initial step. **Journal of Chromatography**, p. 187-194, 2000.

ALMEIDA, Francisco Lucas Chaves; CASTRO, Maria Paula Jiménez; TRAVALIA, Beatriz Medeiros; FORTE, Marcus Bruno Soares. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, p. 37-51, 2018.

ALOULOU, Ahmed; RODRIGUEZ, Jorge A.; FERNANDEZ, Sylvie; VAN OOSTERHOUT, Dirk; PUCCINELLI, Delphine; CARRIÈRE, Frédéric. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 995-1013, 2006.

ARANA-PEÑA, Sara; CARBALLARES, Diego; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCÁNTARA, Andrés R.; RODRIGUES, Rafael C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. One Pot Use of Combilipases for Full Modification of Oils and Fats: Multifunctional and Heterogeneous Substrates. **Catalysts**, p. 1-58, 2020.

ARANA-PEÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; Mendez-Sanchez, Carmen; LOKHA, Yuliya; CARBALLARES, Diego; GONÇALVES, Luciana R.B.; Fernández-Lafuente, Roberto. Coimmobilization of different lipases: simple layer by layer enzyme spatial ordering. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-39. 2019

ARANA-PEÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; Mendez-Sanchez, Carmen; LOKHA, Yuliya; GONÇALVES, Luciana R.B.; Fernández-Lafuente, Roberto. Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalysts with very high volumetric activity using octyl agarose beads: Avoiding enzyme release during multilayer production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 137, p. 1-11, 2020.

BASTIDA, Agatha; SABUQUILLO, Pilar; ARMISEN, Pilar; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; HUGUET, Joan; GUISÁN, José M. A Single Step Purification, Immobilization, and

Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.

BORDES, Florence; BARBE, Sophie; ESCALIER, Pierre; MOUREY, Lionel; ANDRE, Isabelle; MARTY, Alain; TRANIER, Samuel. Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. **Biophysical Journal.**, v. 99, p. 2225-2234, 2010.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, Dean; JORDAAN, Justin. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRZOZOWSKI, A. M; DEREWENDA, U; DEREWENDA, Z. S; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M; TURKENBURG, J. P.; BJÖRKLING, F; HUGE-JENSEN, B; PATKAR, S.A.; THIM, L. A Model for Interfacial Activation in Lipases from the Structure of a Fungal Lipase-Inhibitor Complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491-494, 1991.

CARRASCO-LÓPEZ, César; GODOY, César; RIVAS, Blanca de Las; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, José M.; GUÍSÁN, José M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; MARTÍNEZ-RIPOLL, Martín; HERMOSO, Juan A. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365-4372, 2009.

CASTILLA, Ignacio Abreu; WOODS, David F.; REEN, F. Jerry; O'GARA, Fergal. Harnessing Marine Biocatalytic Reservoirs for Green Chemistry Applications through Metagenomic Technologies. **Marine Drugs**, v. 16, n. 7 p. 1-21, 2018.

CAVALCANTI, Jorge dos Santos. **Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo "tipo coalho" usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leito na forma expandida**. 2010. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química,

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

CIPOLATTI, Eliane Pereira; PINTO, Martina Costa Cerqueira; HENRIQUES, Rosana Oliveira; PINTO, José Carlos Costa da Silva; CASTRO, Aline Machado de; FREIRE, Denise Maria Guimarães; MANOEL, Evelin Andrade. Enzymes in Green Chemistry: The State of the Art in Chemical Transformations. **Advances in Enzyme Technology**, p. 137-151, 2019.

CHANDRA, Prem; ENESPA; SINGH, Ranjan; ARORA, Pankaj Kumar. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, p. 1-42, 2020.

CHEN, Bo; MILLER, Elizabeth M.; MILLER, Lisa; MAIKNER, John J.; GROSS, Richard A. Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. **Langmuir**, v. 23, p. 1381-1387, 2007.

CHENG, Cheng; JIANG, Tianyue; WU, Yulu; CUI, Lupeng; QIN, Song; HE, Bingfang. Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-27, 2018

CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 1443-1454, 2015.

DEREWENDA, Zygmunt S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 1-52, 1994.

DIZGE, Nadir; AYDINER, Coskun; IMER, Derya Y.; BAYRAMOGLU, Mahmut; TANRISEVEN, Aziz; KESKINLER, Bülent. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 1983-1991, 2009.

FÄRENMARK, Johan; GUSTAVSSON, Jan; LAGERLUND, Inger; SANDBERG, Lena. Characterisation of STREAMLINE™ Phenyl. **Bioseparation**, v. 8, p. 139-144, 1999.

FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.M.; ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62 p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ARMISÉN, Pilar; SABUQUILLO, Pilar; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; GUÍSÁN, José M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93 p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, Jose M.; CABRERA, Zaida; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUÍSÁN, José M. Improved Catalytic Properties of Immobilized Lipases by the Presence of Very Low Concentrations of Detergents in the Reaction Medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242-250, 2007.

FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, José M.; FUENTES, Manuel; MATEO, Cesar; GUÍSÁN, José M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* Lipase into Bimolecular Aggregates Dramatically Affects Functional Properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232-237, 2003.

FILHO, Danielle Gonçalves; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-25, 2019.

GARCIA-GALAN, Cristina; BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to

Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GARCIA-GALAN, Cristina; SANTOS, José C.s. dos; BARBOSA, Oveimar; TORRES, Rodrigo; PEREIRA, Ernandes B.; CORBERAN, Vicente Cortes; ALVES, Luciana R.B. Gonc.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRÍGUEZ-AGUADO, Elena; ALVES, Luciana R.B. Gonc.,. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49(4), p. 604-616, 2014.

GHATTAS, N.; FILICE, M.; ABIDI, F.; GUISAN, J.M.; SALAH, A. Ben. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopus oryzae* lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 111-116, 2014.

GONÇALVES, Maria Carolina Pereira; KIECKBUSCH, Theo Guenter; Perna, Rafael Firmani; FUJIMOTO, Jaqueline Tomie; MORALES, Sergio Andres Villalba; ROMANELLI, Joao Paulo. Research on the enzyme immobilization based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, p. 1-37, 2018.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report by Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028**. 2021. Disponível em: www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry. Acesso em: 5 jan. 2022

GROCHULS, Pawel; LI, Yunge; SCHRAG, Joseph D.; BOUTHILLIER, François; SMITH, Penny; HARRISON, David; RUBIN, Byron; CYGLER, Miroslav. Insights into Interfacial Activation from an Open Structure of *Candida rugose* Lipase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12843-12847, 1993.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Industrial Applications of Microbial Lipases**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLMQUIST, Mats; CLAUSEN, Ib Groth; PATKAR, Shamkant; SVENDSEN, Allan; HULT, Karl. Probing a Functional Role of Glu87 and Trp89 in the Lid of *Humicola lanuginosa*

Lipase Through Transesterification Reactions in Organic Solvent. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 217-224, 1995.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and Their Industrial Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

IYER, Padma V.; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.

JAVED, Saira; AZEEM, Farrukh; HUSSAIN, Sabir; RASUL, Ijaz; SIDDIQUE, Muhammad Hussnain; RIAZ, Muhammad; AFZAL, Muhammad; KOUSER, Ambreen; NADEEM, Habibullah. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress In Biophysics And Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2017.

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**, v. 213, n. 1, p. 262-264, 1999.

JURADO, Encarnación; BRAVO, Vicente; LUZÓN, Germán; FERNÁNDEZ-SERRANO, Mercedes; GARCÍA-ROMÁN, Miguel; ALTMAJER-VAZ, Deisi; VICARIA, José María. Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme–Surfactant Interactions and Washing Tests. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 10, p. 61-70, 2007.

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KATE, Aditya; SAHU, Lavanya Kumar; PANDEY, Jaya; MISHRA, Mohit; SHARMAD, Prasanna Kumar. Green catalysis for chemical transformation: The need for the sustainable development. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, p. 1-7, 2022.

KIM, Sang Hyeon; KIM, Soon-Ja; PARK, Seongsoon; KIM, Hyung Kwoun. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. p. 10-16, 2013.

KRISHNA, S. Hari; KARANTH, N. G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews: Science and Engineering**, v. 44, n. 4, p. 499-591, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LYBERG, Ann-Marie; ADLERCREUTZ, Patrick. Lipase specificity towards eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid depends on substrate structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 343-350, 2008.

MADUKO, C. O.; AKOH, C. C.; PARK, Y. W. Enzymatic Interesterification of Tripalmitin with Vegetable Oil Blends for Formulation of Caprine Milk Infant Formula Analogs. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 594-601, 2007.

MAHALIK, J. P.; MADRAS, Giridhar. Enzymatic Degradation of Poly(D,L-lactide) and Its Blends with Poly(vinyl acetate). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, p. 675-680, 2006.

MANOEL, Evelin A.; SANTOS, Jose C. S. dos; FREIRE, Denise M. G.; RUEDA, Nazzoly; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUISAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MOKHTAR, Nur Fathiah; RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja Abd.; NOOR, Noor Dina Muhd; SHARIFF, Fairolniza Mohd; ALI, Mohd Shukuri Mohamad. The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. **Catalysts**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2020.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.*; revisão técnica: Carlos Termignoni *et al.*

NICOLAS, Paula; LASSALLE, Verónica L.; FERREIRA, María L. About the role of typical spacer/crosslinker on the design of efficient magnetic biocatalysts based on nanosized magnetite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 296-304, 2015.

NIELSEN, Per Munk; BRASK, Jesper; FJERBAEK, Lene. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

NG, Michelle Y.T.; TAN, Wen Siang; TEY, Beng Ti. Purification of recombinant hepatitis B core antigen from unclarified Escherichia coli feedstock using phage-immobilized expanded bed adsorption chromatography. **Journal Of Chromatography B**, v. 903, p. 60-67, 2012.

OLLIS, David L.; CHEAH, Eong; CYGLER, Miroslav; DIJKSTRA, Bauke; FROLOW, Felix; M. FRANKEN, Sybille; HARE, Michal; REMINGTON, S.James; SILMAN, Israel; SCHRAG, Joseph. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

ORTIZ, Claudia; FERREIRA, María Luján; BARBOSA, Oveimar; SANTOS, José C. S. dos; RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; BRIAND, Laura E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Novozym 435: THE “PERFECT” LIPASE IMMOBILIZED BIOCATALYST? **Catalysis Science & Technology**, p. 1-126, 2019.

PALOMO, Jose M.; MUÑOZ, Gloria; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; MATEO, Cesar; FUENTES, Manuel; GUISAN, Jose M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 201-210, 2003.

PEIRCE, Sara; TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; RUSSO, Maria Elena; MARZOCCHELLA, Antonio; VIRGEN-ORTÍZ, José J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of

Candida antarctica Lipase B (CALB) Immobilized on Octyl Agarose by Treatment with Polyethyleneimine (PEI). **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1-11, 2016.

PENG, Lifeng; XU, Xuebing; MU, Huiling; HØY, Carl-Erik; ADLER-NISSEN, Jens. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 523-532, 2002.

QUAYSON, Emmanuel; AMOAH, Jerome; HAMA, Shinji; KONDO, Akihiko; OGINO, Chiaki. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 134, p. 1-17, 2020.

REETZ, Manfred T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. **Journal of The American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12840-12496, 2013

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 237-250, 2009.

RIGO, Elisandra; RIGONI, Roberta Eletízia; LODEA, Patrícia; OLIVEIRA, Débora de; FREIRE, Denise M.G.; LUCCIO, Marco di. Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 9, p. 1243-1248, 2008.

RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLING, Roberto; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnology Advances**, v. 52, p. 1-37, 2021.

RODRIGUES, Rafael C.; GODOY, Cesar A.; FILICE, Marco; BOLIVAR, Juan M.; PALAU-ORS, Armand; GARCIA-VARGAS, Jesus M.; ROMERO, Oscar; WILSON, Lorena; AYUB, Marco A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 6 , p. 641-646, 2009.

RODRIGUES, Rafael C.; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 5, p. 6290-6307, 2013.

RODRIGUES, Rafael C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; SANTOS, José C.s. dos; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCANTARA, Andres R.; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, p. 746-770, 2019.

ROY, Ipsita; MUKHERJEE, Joyeeta; GUPTA, Munishwar N. Cross-Linked Enzyme Aggregates for Applications in Aqueous and Non aqueous Media. **Methods in Molecular Biology**, p. 109-123, 2016.

ROY, J. Jegan; ABRAHAM, T. Emilia. Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3705-3722, 2004.

RUEDA, Nazzoly; SANTOS, Jose C. S. dos; TORRES, Rodrigo; ORTIZ, Claudia; BARBOSA, Oveimar; BARBOSA, Oveimar. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **Rsc Advances**, v. 5, p. 11212-11222, 2015.

SADANA, Ajit; HENLEY, James P. Analysis of Enzyme Deactivations by a Series-Type Mechanism: Influence of Modification on the Activity and Stability of Enzymes. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 501, p. 73-79, 1987.

SAHIN, Nese; AKOH, Casimir C.; KARAALI, Artemis. Enzymatic Production of Human Milk Fat Substitutes Containing γ -Linolenic Acid: Optimization of Reactions by Response Surface Methodology. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 82, n. 8 p. 549-557, 2005.

SAUNDERS, Paria; BRASK, Jesper. Improved Immobilization Supports for *Candida Antarctica* Lipase B. **Biocatalysis in Polymer Chemistry**, p. 65-82, 2010.

SCHOEMAKER, Hans E.; MINK, Daniel; WUBBOLTS, Marcel G. Dispelling the Myths: Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science, New Series**, v. 299, n. 5613, p. 1694-1697, 2003.

SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam Chand. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHELDON, Roger A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Pharmaceutical Process Chemistry**, p. 159–181, 2010.

SHELDON, Roger A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 213–223, 2011

SINGH, Suren; MADLALA, Andreas M.; PRIOR, Bernard A. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3-16, 2003.

SIVAKANTHAN, Subajiny; MADHUJITH, Terrence. Current trends in applications of enzymatic interesterification of fats and oils: A review. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 132, p. 1-12, 2020.

SONG, Huiting; ZHOU, Lichao; ZHANG, Lujia; GAO, Bei; WEI, Dongzhi; SHEN, Yaling; WANG, Rui; MADZAK, Catherine; JIANG, Zhengbing. Construction of a whole-cell catalyst displaying a fungal lipase for effective treatment of oily wastewaters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 166-170, 2011.

SUN, Huihua; ZHANG, Hongfang; ANG, Ee Lui; ZHAO, Huimin. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 1275-1284, 2017.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; PEIRCE, Sara; TORRESTIANA-SANCHEZ, Beatriz; YATES, Malcon; ROSALES-QUINTERO, Arnulfo; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **Rsc Advances**, v. 6, n.102, p. 1-46, 2016.

UPPENBERG, Jonas; HANSEN, Mogens Trier; PATKAR, Shamkant; JONES, T Alwyn. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

VASUDEVAN, Palligarnai T.; BRIGGS, Michael. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industry Microbiology Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.

VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; PEDRERO, Sara G.; 2, Laura Fernandez-Lopez; LOPEZ-CARROBLES, Nerea; GORINES, Beatriz C.; OTERO, Cristina; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Desorption of Lipases Immobilized on Octyl-Agarose Beads and Coated with Ionic Polymers after Thermal Inactivation. Stronger Adsorption of Polymers/Unfolded Protein Composites. **Molecules**, v. 22, p. 1-12, 2017.

VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; SANTOS, José C.S. dos; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; BARBOSA, Oveimar; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis. **Molecular Catalysis**, v.473, p. 1-13, 2019.

WEETALL, Howard H. Immobilized enzymes: analytical applications. **Analytical Chemistry** v. 46, p. 602A- 604A, 1974.

XU, Xuebing. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science Technology**, p. 287-303, 2000.

YAGMUROV, Eldar Ruslanovich; KOZLOV, Grigori Vladimirovich; PUSHKAREV, Mikhail Alekseyevich. Lipase purification: the review of conventional and novel methods. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, p. 60-69, 2017.

ZAAK, Hadjer; FERNANDEZ-LOPEZ, Laura; OTERO, Cristina; SASSI, Mohamed; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106 p. 67-74, 2017.

ZECHNER, Rudolf; ZIMMERMANN, Robert; EICHMANN, Thomas O.; KOHLWEIN, Sepp D.; HAEMMERLE, Guenter; LASS, Achim; MADEO, Frank. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n.3, p. 279-291, 2012.

ZHANG, Hong; JACOBSEN, Charlotte; ADLER-NISSEN, Jens. Storage stability study of margarines produced from enzymatically interesterified fats compared to margarines produced by conventional methods. I. Physical properties. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 107, p. 530-539, 2005.

ZHANG, Hong; JACOBSEN, Charlotte; PEDERSEN, Lars Saaby; CHRISTENSEN, Morten Würtz; ADLER-NISSEN, Jens. Storage stability of margarines produced from enzymatically interesterified fats compared to those prepared by conventional methods – Chemical properties. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 108, p. 227-238, 2006.

ZHANG, Kun; JIN, Zi; WANG, Pan; ZHENG, Sui-Ping; HAN, Shuang-Yan; LIN, Ying. Improving the catalytic characteristics of lipase-displaying yeast cells by hydrophobic modification. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1689-1699, 2017.